

Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005

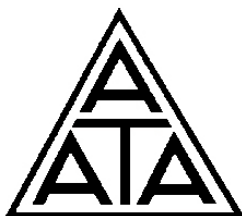
TRABAJOS DEL X CONGRESO CYTAL

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías

“Apertura a nuevos procesos, productos e ideas: camino al futuro”

Realizado en Mar del Plata, Argentina del 18 al 20 de mayo de 2005



ASOCIACION ARGENTINA de TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

Filial Mar del Plata
aatamdq@gmail.com

AATA Central
Alsina 943. 4to Piso, oficina 406 (1088) Buenos Aires
TE/FAX: 54 11 4334 0155

Asociación afiliada a:



ITF- Institute of Food Technologists



IUFoST- Institutional Union of Food Science and Technologists



ALACCTA- Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



IAEF- International Association for Engineering and Food

ISBN: 987-22165- 1- 7.

Editado: Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina.
1er Edición. Volumen 1. Marzo de 2006.



RINFI es desarrollado por la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005

TRABAJOS DEL X CONGRESO CYTAL

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías

“Apertura a nuevos procesos, productos e ideas: camino al futuro”

Realizado en Mar del Plata, Argentina del 18 al 20 de mayo de 2005



ASOCIACION ARGENTINA de TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

Filial Mar del Plata
aatamdq@gmail.com

AATA Central
Alsina 943. 4to Piso, oficina 406 (1088) Buenos Aires
TE/FAX: 54 11 4334 0155

Asociación afiliada a:



ITF- Institute of Food Technologists



IUFoST- Institutional Union of Food Science and Technologists



ALACCTA- Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



IAEF- International Association for Engineering and Food

ISBN: 987-22165- 1- 7.

Editado: Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina.
1er Edición. Volumen 1. Marzo de 2006.

Comité Organizador

Presidente Honorario

Ing. Qco. Héctor Mateo Lupin

Presidente

Dra. Elida Elvira Ramírez

Vicepresidente I

Ing. en Alimentos Gabriel Durand

Vicepresidente II

Dra. María Laura Martínez Souto

Secretaría Científica

Ing. Qca. María Isabel Yeannes

Coordinador Simposio

Dra. Stella Alzadora

Secretaría General

Ing. Bernardo Pascual

Ing. Patricia Hartenstein

Ing. en Alimentos Vanina Sgromo

Ing. Qca. María Rosa Casales

Ing. Qca. Aurora Zugarramurdi

Lic. En Tec. De Alimentos Gabriela Sánchez Pascua

Ing. En Alimentos Lucila Fouguet

Lic. En Nutrición Lourdes Saez

Lic. M. Juliana Simona

Secretaría administrativa: Sra. Andrea Roca

Secretaría de Finanzas

Dra. Nélide Martínez

Ing. en Alimentos Carlos Almada

Secretaría de Relaciones Públicas

Ing. Qca. María I. Yeannes

Dr. Jorge Raed

Dra. Rosalía Fritz

Secretaría de Prensa y Difusión

Lic. en Cs. Biológicas Mónica Félix

Ing. en Alimentos Lucila Fuguet

Coordinador de Secretaría General

Ing. Bernardo Pascual

Comité AATA Central

Presidente

Ing. Gabriel Durand

Vicepresidente

Ing. Patricia Hartenstein

Secretario

Lic. Gustavo Locati

Prosecretaria

Dra. Margarita Olivera

Tesorero

Ing. Carlos Almada

Protesorero

Dr. Carlos Campi

Vocales

Lic. Orlando Araujo

Lic. María del Carmen Benavente

Lic. Ernesto Bertschi

Dra. Irene Dasso

Lic. Roberto Urrere

Dra. Susana Vidales

Vocales suplentes

Dra. Stella Alzamora

Lic. Mariano Czastkiewicz

Ing. Guillermo Richiello

Revisores de Cuenta

Dra. Lia Gerschenson

Sr. Néstor E. Galibert

Gerente Ejecutivo

Lic. María Juliana Simone

Secretaria Administrativa

Andrea Rocca

Comisión directiva AATA Filial Mar del Plata

Presidente

Dra. Elida Elvia Ramírez

Vicepresidente

Dra. María Laura Martínez de Souto

Secretario

Ing. Qca. María Rosa Casales

Prosecretaria

Lic. En Tec. de Alimentos Gabriela Sánchez Pascua

Tesorero

Dra. Nélidea Beatriz Martínez

Vocales

Ing. Qca. María Isabel Yeannes

Dra. Florencia Cremonte

Lic. En Cs. Biológicas Mónica M. Félix

Dra. Flavio Nario

Lic. En Nutrición Lourdes Saez

Ing. En Alimentos Vanina Sgromo

Vocales suplentes

Ing. En Alimentos Lucila Paola Fuguet

Revisor de cuentas

Dra. Rosalia Fritz

COMITÉ CIENTIFICO

Coordinador: María Isabel Yeannes

Banco de evaluadores

Almada, Carlos Alberto
Alzamora, Stella Maris
Añón, María Cristina
Califano, Alicia
Casales, María Rosa
Chavez, Alicia
Closa, Sara
Crupkin, Marcos
Dantoni, Graciela
Drago, Silvina
Fritz, Rosalía
Gomes, Rosa
Guerrero, Sandra
Hough, Guillermo
Lausada, Lucía Itatí
Lozano, Jorge
Mans, Cristina
Martinez, Nélide
Mascheroni, Rodolfo
Montti, María Isabel
Olivera Carrión, Margarita
Paredi, María Elida
Parín, María Amelia
Pascual, Bernardo
Pece, Silvia Rodríguez de
Petriella, Claudio
Portela, María Luz Pîta Martin de
Ramirez, Elida Elvia
Reiheimer, Jorge
Resnik, Silvia
Ronayne, Patricia
Ruiz Holgado, Aida Pesce de
Sammán, Norma
Siñeriz, Faustino
Tomás Mabel
Trincherro, Jorge
Urbicain, Martín
Vidales, Susana
Vignolo, Graciela
Viollaz, Pascual
Wagner, Jorge
Yeannes, María Isabel
Zugarramuridi, Aurora

Agradecimientos:

A Maria Rosa Casales, Marina Czerner, Monica Félix, Rosalía Fritz, Gabriela Sanchez Pascua y Maria Isabel Yeannes, por las correcciones de las pruebas previas a la edición.

AATA

Un espacio abierto a la integración entre la ciencia y la producción de alimentos

La Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios – AATA – recorriendo el país de la mano de la Ciencia y Tecnología de Alimentos.

La AATA realiza una serie de actividades que ofrece a sus socios y a aquellos técnicos, profesionales y empresas relacionados con la Ciencia y Tecnología de Alimentos. Dentro de las mismas se encuentran cursos, seminarios, talleres, conferencias y congresos.

El Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL) organizado por AATA tiene una trayectoria reconocida dentro las actividades nacionales, latinoamericanas e internacionales del área.

1977- San Rafael- Mendoza-

I Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- I CYTAL

1981- Capital Federal

II Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- II CYTAL

1983 – Santa Fé

III Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- III CYTAL

1985 - Mendoza

IV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- IV CYTAL

1987 - Salta

V Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- V CYTAL

1994- Capital Federal

VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- VI CYTAL

1997 – Capital Federal

VII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- VII CYTAL

1999 – Rafaela- Santa Fé

VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- VIII CYTAL

2002 – Capital Federal

IX Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- IX CYTAL

2005 - Mar del Plata – Buenos Aires

X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- X CYTAL

Tomo I:

Alimentos conservados por nuevas tecnologías

Alimentos salados, deshidratados, fermentados

Alimentos pasteurizados y esterilizados

Alimentos refrigerados y congelados

Alimentos regionales

Tomo II:

Calidad sensorial

Composición y química de los alimentos. Propiedades fisicoquímicas.

Tomo III:

Biotecnología- Bioingeniería

Contaminantes y tóxicos en alimentos

Desarrollo de nuevos productos

Envases, embalaje y rotulado

Higiene y seguridad alimentaria

Tomo IV

Ingeniería y precesamiento de alimentos

Ingredientes y aditivos

Metodología de análisis

Tomo V

Microbiología

Nutracéuticos y alimentos funcionales

Nutrición

Varios

Tomo I:

Alimentos conservados por nuevas tecnologías

Alimentos salados, deshidratados, fermentados

Alimentos pasteurizados y esterilizados

Alimentos refrigerados y congelados

Alimentos regionales

INDICE

ALIMENTOS CONSERVADOS POR NUEVAS TECNOLOGÍAS

-EFFECT OF HIGH-PRESSURE TREATMENT ON STRUCTURE AND EMULSIFYING PROPERTIES OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS FROM EGG YOLK.....	11
-EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y MATERIALES DE ENVASADO SOBRE DISTINTAS ESPECIES DE HIERBAS AROMÁTICAS DE TRASLASIERRA-CÓRDOBA, ARGENTINA.....	19
-EFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO EN LA INTERFASE DE CRECIMIENTO / NO CRECIMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	27
-EFECTO DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN EN EL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LECHUGA MANTECOSA MÍNIMAMENTE PROCESADA.....	34
-DESARROLLO DE TECNOLOGÍA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE TRATAMIENTOS DE PRESERVACIÓN DE LA CALIDAD DE FRUTOS EN POSCOSECHA.....	42
-“BIFES A LA CRIOLLA” PREPARADOS MEDIANTE EL SISTEMA <i>SOUS VIDE</i> : EVALUACION DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE COCCION-PASTEURIZACION.....	51
-EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE FACTORES DE ESTRÉS APLICADOS A LA SUPERVIVENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> EN RAÍCES DE MANDIOCA PRESERVADAS POR TECNOLOGÍA DE OBSTÁCULOS.....	59
-INACTIVACIÓN DE <i>Listeria innocua</i> POR APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS EN CONCENTRADO PROTEICO DE SUERO LÍQUIDO (CPSL): EFECTO DEL INÓCULO INICIAL.....	67
-INACTIVACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO: CURVAS DE RESPUESTA A LA DOSIS.....	75
-IRRADIACIÓN ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA DE RODAJAS DE MANZANA.....	82
-RESPUESTAS EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE APIO PRECORTADO FRENTE AL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	90
-TRATAMIENTO TÉRMICO Y CONSERVACIÓN REFRIGERADA DE APIO (<i>Apium graveolens</i> L.) PRECORTADO.....	97

ALIMENTOS SALADOS, DESHIDRATADOS, FERMENTADOS

-DESHIDRATACIÓN DE BANANAS POR MÉTODOS COMBINADOS.....	105
-RETENCIÓN DEL COLOR Y CINÉTICA DE LA DESHIDRATACIÓN DE GUINDAS (<i>PRUNUS CERASUS</i>).....	113
-DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA DA CARNE DE FRANGO.....	122
-ESTUDO DA SECAGEM DAS SEMENTES DE PINHÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS DE AR....	127
-DESHIDRATACION OSMÓTICA DE FRUTAS. APLICACIÓN A LA PRODUCCION DE MERMELADAS Y BOCADILLOS DE KIWI.....	133
-ELABORACIÓN DE PASTAS DESHIDRATADAS ESTABILIZADAS DE FRUTAS Y VEGETALES RICOS EN PIGMENTOS ANTOCIANOS Y CAROTENOIDES.....	142
-ANÁLISIS DE VIDA UTIL DE BERENJENAS (<i>egg plant</i>) DE HUMEDAD INTERMEDIA CONSERVADAS POR FACTORES COMBINADOS.....	150

-ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE METABISULFITO DE SODIO COMO INHIBIDOR DEL PARDEAMIENTO EN DURAZNOS DESHIDRATADOS AL SOL..... 157

ALIMENTOS PASTEURIZADOS Y ESTERILIZADOS

-DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA DE CALOR FLUIDO PARTICULA Y GLOBAL DURANTE LA ESTERILIZACION TERMICA DE ARVEJAS FRESCAS EN LATAS SOMETIDAS A AGITACION..... 164

-INCIDENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS DEL SUERO DULCE DE QUESO RECONSTITUIDO EN LA FORMACION Y ESTABILIDAD DE LA ESPUMA..... 173

-DESCONTAMINACIÓN MICROBIANA EN JUGOS DE NARANJA APLICANDO RADIACIONES ULTRAVIOLETAS..... 181

-INACTIVACIÓN TÉRMICA DE *Listeria innocua* EN JUGO DE NARANJA CON AGREGADO DE VAINILLINA..... 188

ALIMENTOS REFRIGERADOS Y CONGELADOS

-PRINCIPALES VARIABLES DE OPERACIÓN QUE AFECTAN LA CONGELACIÓN DE QUESOS MOZZARELLA POR INMERSIÓN..... 196

-PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LECHUGA ICEBERG FRESCA CORTADA..... 204

-INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON CALCIO Y PECTINEMTILESTERASA SOBRE LA TEXTURA Y LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES DE FRUTILLAS..... 210

-ANALISIS ESTRUCTURAL SOBRE ALIMENTOS NO EMPAQUETADOS, DURANTE SU CONGELACION Y ALMACENAMIENTO..... 218

-VIDA UTIL DE MUSCULOS ADUCTORES DE VIEIRA (*ZYGOCHLAMYS PATAGÓNICA*) DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRIO..... 227

-EFECTO DEL ALMACENAMIENTO CONGELADO SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE ALETAS DE CALAMAR (*Illex argentinus*).. 234

-ALMACENAMIENTO REFRIGERADO DE ESPINACA (*Spinacia oleracea L.*) ORGÁNICA 244

-CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE PROTEINAS DE MUSCULO DE SALMON DE MAR DURANTE EL ALMACENAMIENTO REFRIGERADO..... 252

ESTUDIOS SOBRE EL FUNCIONAMIENTO DE UN REFRIGERADOR DOMESTICO..... 261

-UNTABILIDAD DE QUESO TIPO MASCARPONE Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE GRASA 269

ALIMENTOS REGIONALES

-CARACTERIZACION FISICOQUÍMICA DE LA YERBA MATE COMPUESTA CON HIERBAS Y DE SUS COMPONENTES..... 276

-EL COLOR COMO UNA MEDIDA DEL PORCENTAJE DE PALOS EN LA YERBA MATE..... 289

-VARIABILIDAD DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA YERBA MATE ELABORADA EN DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS..... 296

-VARIACIONES DEL COLOR Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE "VINO DE NARANJA" CON LA TEMPERATURA 303

-YERBA MATE ELABORADA EN SAQUITOS: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA GANANCIA DE HUMEDAD..... 311

-EVALUACION NUTRICIONAL DE HARINA DE CHIA COMERCIAL.....	318
-EFECTO DE LA INMERSIÓN A 100 °C EN NaOH ACUOSO Y MACERACIÓN CON CuCl ₂ SOBRE EL COLOR Y LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS EN HOJAS DE YERBA MATE.....	327
-EVALUACION DE LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA TOTAL DE ALGUNAS MIELES ARGENTINAS.....	334
-SEMILLAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze: ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE AZÚCARES.....	340
-CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN PROVENIENTE DE PIÑONES DE DOS ESPECIES DE ARAUCARIA.....	346
-MATERIAS PRIMAS NO CONVENCIONALES: DESARROLLO DE PULPA DE HIGO DE TUNA (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	353
-EVOLUCIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES EN GUINDAS DESHIDRATADAS BAJO DISTINTAS CONDICIONES.....	362
-COMPORTAMIENTO DE PAPAS ANDINAS FRENTE A PROCESOS DE COCCIÓN.....	369
-EFECTO DE LAS CONDICIONES DEL DESHIDRATADO EN EL COLOR SUPERFICIAL DE CEREZA	377
- DULCE DE LECHE ARGENTINO – SU CARACTERIZACIÓN	385
-PRODUCTOS FRUTÍCOLAS DIFERENCIADOS EN GRAL. PUEYRREDON.....	395
<i>(SU APORTE A LA ECONOMÍA LOCAL EN LA ÚLTIMA DÉCADA)</i>	

EFFECT OF HIGH-PRESSURE TREATMENT ON STRUCTURE AND EMULSIFYING PROPERTIES OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS FROM EGG YOLK

SPERONI, Francisco¹, PUPPO, Cecilia¹, CASTELLANI, Oscar¹, CHAPLEAU, Nicolas², de LAMBALLERIE, Marie², AÑÓN, Cristina¹, and ANTON, Marc³.

¹ CIDCA - Facultad Ciencias Exactas - UNLP-CONICET, 47 y 116, 1900 La Plata, 0221-4249287, 4254853. fransperoni@yahoo.com.

² Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires ENITIAA, GEPEA, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France.

³ Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire d'Etude des Interactions des Molécules Alimentaires, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France. INRA, LEIMA, Groupe Physico-chimie des Emulsions, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France.

RESUMEN

Mediante la tecnología de altas presiones se puede mejorar la estabilidad microbiológica de componentes alimenticios que son sensibles a tratamientos térmicos. En este trabajo, dispersiones de lipoproteína de baja densidad (LDL) a dos pH (3 y 8) fueron tratadas mediante altas presiones y se analizaron los efectos sobre la estructura y las propiedades emulsificantes de dicha lipoproteína. Se emplearon presiones de: 200, 400 y 600 MPa. Soluciones sin tratar y tratadas se utilizaron en la formación de emulsiones aceite-agua (O/W 30:70). Se analizaron ciertas propiedades de las lipoproteínas como solubilidad, agregación y desnaturalización y, por otro lado, se estudiaron la actividad emulsificante y la floculación. Los tratamientos de alta presión provocaron la agregación y desnaturalización proteica, especialmente a pH 8, donde, las emulsiones de LDL mostraron una menor floculación. Los resultados obtenidos indican una mejora en las propiedades emulsificantes de LDL a pH 8 tratada con altas presiones.

ABSTRACT

High-pressure treatment represents a new method valid to improve the microbiological stability of agricultural raw materials that is sensitive to heat treatments. This is the case of egg yolk low-density lipoproteins (LDL), the main responsible fraction for the exceptional emulsifying properties of yolk. In this study, LDL dispersions in two pH conditions (3 and 8) were treated by high-pressure at 200, 400 and 600 MPa. Then, treated and non-treated solutions were studied and used to obtain oil-in-water emulsions. Some physicochemical characteristics of protein solutions like solubility, protein aggregation and protein denaturation, and some emulsifying properties like emulsifying activity and flocculation

were studied. Protein aggregation and denaturation were drastically enhanced by high-pressure treatments at pH 8. At this pH value, emulsifying properties of treated LDL showed diminution of flocculation. So, at least at pH 8, high-pressure treatments improve LDL emulsifying properties.

Key Words: low-density lipoprotein, high-pressure treatment, protein aggregation, emulsifying properties.

INTRODUCTION

Low-density lipoproteins (LDL) extracted from hen egg yolk are now confirmed as the principal contributor to emulsifying properties of yolk, forming a film at the interface between oil and water (Martinet et al., 2002). LDL are a globular supramolecular assembly of phospholipids and proteins surrounding a neutral lipid core, and this assembly is essential to understand and control the production of food made with yolk, and particularly emulsions.

Concerning the adsorption mechanism of LDL at an oil-water interface, it has been shown that LDL micelles break down when they contact the hydrophobic interface. The lipid core coalesces with the oil phase and proteins and phospholipids spread at the interface (Kiosseoglou, 1989). Then, LDL structure appears essential to ensure their interfacial and emulsifying properties. On the other hand, it has been demonstrated that LDL molecules are sensitive to thermal treatments (Le Denmat et al., 1999). Heat treatment of solutions containing plasma (mainly LDL) causes a decrease in protein solubility and an increase in apparent viscosity. High-pressure (HP) process is a promising technology to microbiologically stabilize food products without temperature detrimental effect. However, protein or complex biopolymers subjected to HP may be modified by disruption of hydrophobic and electrostatic interactions (Molina et al., 2001). So, we have submitted dispersions of native LDL to different pressures (up to 600 MPa) at two pH values (3-8) and followed structural and functional modifications.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of LDL fraction. LDL was isolated like indicated in Martinet et al. (2002).

High-pressure processing. Dispersions of LDL of 10 g/l protein at pH3 (0.050 M glycine, 0.1 M NaCl) and pH8 (0.050 M Tris-HCl, 0.1 NaCl) were prepared. High-pressure treatment at 200, 400 and 600 MPa were applied for 10 min at 20°C. Process was carried out in a 3 L reactor unit (ACB Pressure Systems) with a temperature and pressure regulator device.

LDL solubility. Solubility was determined by Markwell method (Markwell et al., 1978). Calibration was performed by standard bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.). LDL percentage solubility was calculated as:

Solubility (%) = Protein in the supernatant (mg/mL) x 100 / Initial protein (mg/mL).

Dynamic light scattering. The average diameters of protein particles of LDL dispersions were measured by dynamic light scattering (Malvern Instruments Ltd.). Scattered light were measure at 90° and particle diameters were calculated from diffusion coefficients using the Stoke–Einstein relation for spheres.

Differential scanning calorimetry (DSC). DSC was performed on a Micro DSC III (SETARAM). Sample buffer was used as reference. Enthalpies of thermal denaturation (ΔH) were estimated as the area under the DSC curve.

Emulsion preparation. Oil-in-water emulsions were prepared with sunflower oil and LDL dispersions (10 g proteins/l) at pH3 and pH8 (oil volume fraction (ϕ) of 0.3). Homogenization was carried out with a high-pressure valve Stansted FPG 7400 homogenizer (Stansted Fluid Power Ltd.) at 120 bars with a recirculation of 3 min, as described in Puppo et al. (2005).

Average droplet diameter. Immediately after homogenization, 0.5 ml of emulsion was taken and diluted in 11.5 ml of 0.05M pH8 Tris-HCl buffer with 1% SDS. Droplet size distribution was estimated by laser light diffraction in a Particle Size Analyzer (Saturn DigiSizer 5200, Micrometrics Instrument Corporation) using the mean diameter weighted (d4,3 index).

Flocculation index (FI). The FI was calculated by the ratio between the d4,3 droplet size in the buffer without SDS and the d4,3 in the 1% SDS buffer (deflocculated condition).

$$FI = d_{4,3} \text{ of flocs} / d_{4,3} \text{ of droplets.}$$

Depletion Flocculation. A first step consisted of deformation of flocs present in the emulsion by application of a shear stress of 10 Pa during 2 min. Thereafter, the emulsion was left for 15 min to enhance droplet interactions. Finally, an increasing shear stress from 0.002 to 10 Pa in a 6 min period was applied to the emulsions for floc disruption. Measurements were performed at 20 °C in a Haake Rheostress RS75 equipped with a plate/cone sensor system (60 mm diameter, 2.09° angle).

Statistical analyses. Three measures were conducted for all determinations. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance according to the general linear model procedure with least-square mean effects to determine significant differences between treatments ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical properties of LDL dispersions.

Table 1 shows that LDL solubility is high (about 98%) at pH values 3 and 8, before (0.1 MPa) and after HP treatments. So, solubility is not influenced by HP treatments at these two pH values. Thermal stability of LDL dispersions is inferred by the DSC parameter (ΔH), which is also showed in table 1.

Table 1. Solubility (g%) and denaturation enthalpy (ΔH) of LDL dispersions.

HP (MPa)	LDL pH3		LDL pH8	
	Solubility (%)	ΔH (J/g)	Solubility (%)	ΔH (J/g)
0.1	96.8 \pm 0.9	1.36 \pm 0.28	97.4 \pm 1.4	5.62 \pm 0.38
200	98.7 \pm 2.7	1.58 \pm 0.24	94.9 \pm 1.2	5.94 \pm 0.81
400	99.1 \pm 2.2	1.28 \pm 0.29	99.8 \pm 0.7	4.13 \pm 0.45
600	100.0 \pm 3.1	1.21 \pm 0.36	96.8 \pm 1.4	2.92 \pm 0.50

Results show that protein at pH 8 is in native form, while at pH 3 LDL proteins are denatured as indicated by the lower value of denaturation enthalpy. In reference to HP treatments, 400 and 600 MPa have denaturation effects only at pH 8, where denaturation enthalpy drops, in comparison with non-treated protein, about 27% and 48% respectively. At pH 3, where proteins are denatured by the acid effect, HP treatments did not shown an extra denaturation effect.

We have also studied the state of aggregation of LDL particles by dynamic light scattering. Figure 1 shows the profiles of LDL dispersions before and after HP treatments for the assayed pH values. For the non-treated dispersions at pH 3 there are two main populations presenting hydrodynamic diameters of 30 and 300 nm; and pH 8 profiles present an extra particle population of 6000 nm. LDL particle diameters ranging from 17 to 60 nm have been usually described in the literature (Martin et al., 1964). Furthermore, particles of 300 nm may be merged LDL particles like described by Ala-Korpela (1998) for human plasma LDL. High-pressure treatments affect the size of LDL particles only at pH 8 (see figure 1).

From 400 MPa, HP-treatments cause a shift to higher diameter values in the distribution, and at 600 MPa main populations have diameters between 200 and 2000 nm. These results point out the aggregation of LDL-particles submitted to pressures upon 400 MPa

only at pH 8. Results may indicate that LDL particles at pH 8 and submitted to pressures over 400 MPa present firstly the denaturation of proteins, and then a reorganization of supramolecular structures with the formation of aggregates. These aggregates could be stabilized by protein-protein hydrophobic interactions, favored by the protein hydrophobic-core exposition during HP denaturation. This mechanism is similar to that followed by LDL under thermal treatments (Powrie and Nakai, 1986). Nonetheless in the HP case the effect is less pronounced than in thermal treatments, as denoted by the gelation of LDL dispersion in the last case. On the contrary at pH 3, HP-treatments did not alter the already denatured LDL proteins, or the structure of LDL particles. One may surmise that the excess of positive charges is important, since these particles keep non-aggregated. More over, even though at this pH value LDL proteins are denatured, the LDL structure and subsequent aggregation is not affected by pressure treatments.

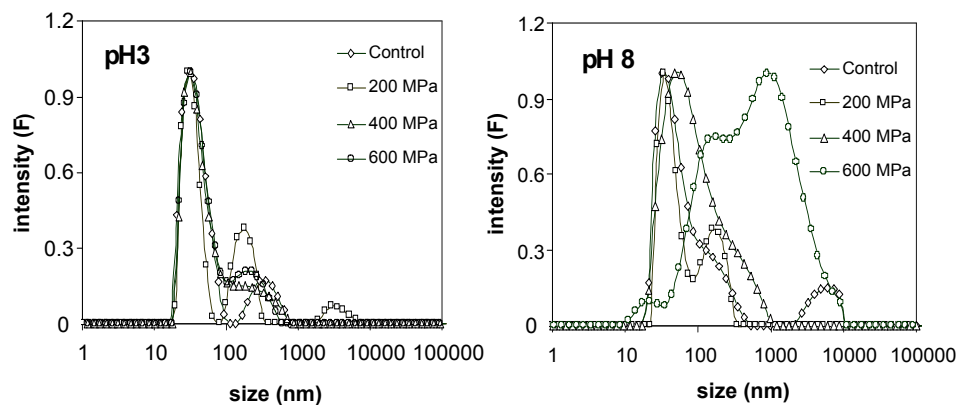


Figure 1. Dynamic light scattering of pH 3 and pH 8 LDL dispersions (10 mg protein/mL).

LDL emulsion properties.

As shown in table 2, emulsions showed the same droplet size, whatever the pH and the pressure of LDL treatments. Droplet diameter was about 0,44 μm (D4.3 in the table) indicating good emulsifiers properties. It is also observed the same protein adsorption at all conditions. So that, the previous high-pressure treatment of LDL does not alter their emulsifying nor adsorption capacities.

In figure 2, we can observe the profiles obtained for droplet size distribution in the absence of SDS. We use its D4.3 parameters to assess the flocculation index (FI in table 2) by comparison with D4.3 in the presence of SDS. At pH 8, emulsion prepared with non-treated LDL and 200, and 400 MPa treated LDL showed similar profiles with high droplet size values in the absence of SDS, which are characteristic of flocculated emulsions. Nonetheless using LDL treated at 600 MPa profiles present a monomodal distribution with a D4.3 around 0,44 μm , indicating slight flocculation (FI 3.0). On the other hand, at pH 3

no pressure effects were detected and flocculation index keeps high. At pH 8, LDL aggregation is correlated by a rough decrease in bridging flocculation (600 MPa).

Table 2. Droplet size ($d_{4,3}$), and flocculation index (FI) of emulsions prepared with LDL dispersions.

HP (MPa)	LDL pH3		LDL pH8	
	$d_{4,3}$ (μm)	FI	$d_{4,3}$ (μm)	FI
0.1	0.46 ^a	15.5 ^a	0.42 ^a	14.6 ^a
200	0.46 ^a	14.4 ^a	0.45 ^a	13.3 ^a
400	0.42 ^b	19.3 ^a	0.48 ^b	11.2 ^a
600	0.43 ^b	18.7 ^a	0.44 ^a	3.0 ^b

Results are means values of triplicate analysis. Means within a column with same subscripts are not significantly different ($p < 0.05$).

Bridging flocculation was investigated using laser light diffraction.

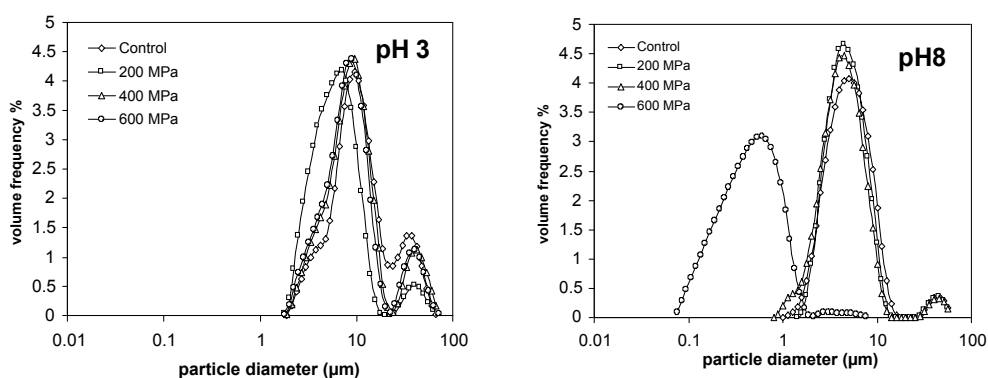


Figure 2. Volume frequency of emulsions ($f = 0.3$) prepared with pH 3 and pH 8 LDL dispersions (10 mg protein/mL) in the absence of SDS.

We could assess that the big aggregates formed during this treatment can interact with the droplet surface; nonetheless the non-adsorbed aggregates are not as flexible as necessary to form stable inter-droplet bridges. Conversely, in conditions where LDL structure is held, LDL spread at the interface and the extra non-modified LDL particles coming additionally to the covered interface. Therefore, they may interact with adsorbed proteins forming stable bridges between droplets, due to the robustness of the native non-adsorbed LDL structure.

Depletion flocculation was evaluated by measuring viscosity of emulsions as a function of shear stress application. The principle of the measure was first to eliminate any flocculation by using an intense strain. Then the reformation of flocks is essentially influenced by depletion, and the change in emulsion-flock characteristics can be pointed out by viscosity variation measurements.

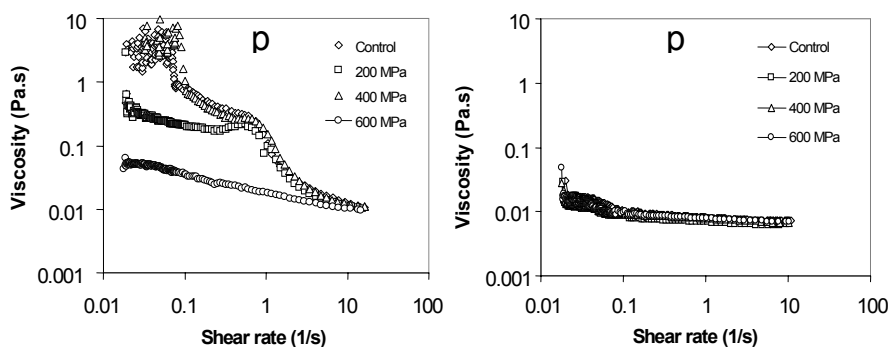


Figure 3. Viscosity vs. shear stress of emulsions ($f = 0.3$) prepared with pH 3 and pH 8 LDL dispersions (10 mg protein/mL).

Figure 3 shows that at pH 3 all emulsions present a very low viscosity, indicating no HP-treatment effect, nonetheless at pH 8 emulsions made with non-treated LDL exhibited a high apparent viscosity at low shear stress. This result indicates depletion flocculation of emulsion, since viscosity values are related to the number of droplets concerned with the aggregates. Similar behaviour presented LDL treated at 200 and 400 MPa, but at 600 MPa the profile shows a noticeable drop of initial viscosity, indicating the absence of depletion flocculation. We could suppose that the non-adsorbed LDL can interact with water through the polar side chains of proteins and the polar head of phospholipids. The subsequent treatment at 600 MPa could modify these interactions rendering non-adsorbed LDL less interacting with water and decreasing the depletion effect.

CONCLUSIONS

At pH8 high-pressure treatment of LDL dispersion from 400 MPa brings some modifications of structure and functional properties. Aggregation and protein denaturation are induced, which result in an improvement of LDL emulsifying properties, where flocculation process became particularly diminished. More over, these modifications do not influence the LDL solubility nor its emulsifying capacity. In conclusion, the final LDL emulsion characteristics and stability could be improved by previous high-pressure treatment of LDL dispersions combined with an alkaline pH.

BIBLIOGRAPHY

Ala-Korpela, M., Pentikäinen, M., Korhonen, A., Hevonoja, T., Lounila, J., Kovanen P. 1998. Journal of Lipid Research, 39, 1705-1712.

Kiosseoglou, V.D. 1989. In Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications; Charalambous, G., Doxastakis, G. Eds. Elsevier, London, GB. 63-85.

Le Denmat, M., Anton, M., Gandemer, G. 1999. Journal of Food Science, 64, 194-197.

Markwell, M., Haas, S., Bieber, L., Tobert, N. 1978. Analytical Biochemistry, 87, 206-210.

Martin, W., Augustyniak, J., Cook, W. 1964. Biochimica et Biophysica Acta, 84, 714-720.

Martinet, V., Beaumal, V., Dalagalarrondo, M., Anton, M. 2002. Recent Research and Development in Agricultural and Food Chemistry, 37, 103-116.

Molina, E., Papadopoulou, A., Ledward, D. 2001. Food Hydrocolloids, 15, 263-269.

Powrie, W., Nakai, S. 1986. In Egg Science and Technology; Stademan, W., Cotterill, O., Eds. The Avi Publishing Company Inc., Westport, USA. 97-139.

Puppo, M., Speroni, F., Chapleau, N., de Lamballerie, M., Añón, M., Antón, M. 2005. Food Hydrocolloids, 19, 289-296.

ACKNOWLEDGMENTS: this work was supported by the Ecos-Sud Project of France and SECyT of Argentina (n° A01B04). Authors thank Valérie Beaumal and Elisabeth David-Briand (INRA-LEIMA), for their meticulous analytical work.

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y MATERIALES DE ENVASADO SOBRE DISTINTAS ESPECIES DE HIERBAS AROMÁTICAS DE TRASLASIERRA-CÓRDOBA, ARGENTINA.

FAILLACI¹, Silvina M., MARÍN¹, María A., CARRANZA¹, Patricia M. y ZYGADLO², Julio A.

1. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. F.C.E.F y N – Universidad Nacional de Córdoba – Av. Vélez Sarsfield 1600 – (5016) – Ciudad Universitaria Córdoba – Argentina - TE-FAX: +54 3514334439. altaloma@ciudad.com.ar

2. Cátedra de Química Orgánica. F.C.E.F. y N. - UNC. Argentina. IMBIV-CONICET.

RESUMEN

El cultivo de hierbas aromáticas es una práctica cultural importante por sus propiedades terapéuticas y aromáticas.

Posterior a la cosecha y secado del material vegetal, el material empleado en el envasado, el tiempo de almacenamiento y las condiciones ambientales de luminosidad y humedad son fundamentales para la conservación de las características organolépticas y funcionales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes materiales de envasado y atmósferas controladas en dos especies de hierbas aromáticas, *Minthostachys mollis* (peperina) y *Origanum vulgare* (orégano) determinando sus aceites esenciales, el contenido de las clorofilas y los cambios en las características organolépticas a través del análisis sensorial de las muestras.

Como resultados, el aceite esencial de orégano presentó como componentes principales timol y ment-2-en-1-ol (trans para) y la peperina mentona y pulegona. Se observaron cambios en el contenido de las clorofilas y pérdida de los componentes principales de acuerdo a las condiciones de almacenamiento coincidentes con el análisis sensorial.

Palabras Claves: Orégano, peperina, aceites esenciales, material de envase, análisis sensorial.

ABSTRACT

Cultivation of aromatic herb is a very important cultural practice because of their medical and aromatic properties.

After collecting and drying the herb, the packing material, time of storage, and environmental conditions of light and humidity are fundamental for keeping organoleptics and functional characteristics.

The purpose of this work was to measure the influence of different packing material and controlled atmosphere in two aromatic herb species, the *Minthostachys mollis* (peperina) and *Origanum vulgare* (oregano) by finding their essential oils, the content of chlorophyll and the changes in the organoleptics characteristics through the sensorial analysis of the samples.

As result, the oregano essential oil showed timol and ment-2-en-1-ol (trans para) as main components and peperina mentona and pulegona. Changes in the content of chlorophyll and loss of main components were found, in accordance with the storage conditions in coincidence with the sensorial analysis.

INTRODUCCIÓN

En la República Argentina y en particular en la provincia de Córdoba el cultivo de las hierbas aromáticas es una práctica cultural muy arraigada ya que las mismas son utilizadas tanto para resaltar los sabores de las comidas como por sus propiedades medicinales.

Así, después de la cosecha y secado del material vegetal, el envasado y las condiciones de almacenamiento resultan etapas claves en el proceso para mantener las características organolépticas y funcionales que el consumidor pretende de las hierbas aromáticas.

El material empleado en el envasado es fundamental para la conservación de las hierbas aromáticas como así también el tiempo de almacenamiento y las condiciones ambientales de luminosidad y humedad.

Una práctica en la industria alimentaria destinada a favorecer la preservación de los alimentos es la técnica de envasado con atmósfera controlada.

OBJETIVOS

- Determinar la influencia de diferentes materiales de envasado en dos especies de hierbas aromáticas, *Minthostachys mollis* (peperina) y *Origanum vulgare* (orégano) a través de la comparación de la composición sus aceites esenciales cuando se los almacena en distintos materiales de envasado.
- Evaluar las características organolépticas por medio del análisis sensorial de las hierbas almacenadas y conservadas en envases de materiales diferentes y en atmósferas controladas.
- Evaluar las modificaciones en el contenido de clorofilas a y b en las hierbas almacenadas y conservadas en distintos materiales de envasado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Material vegetal:

Hojas secas de oréganos y peperina. El material vegetal fue secado a temperatura ambiente y a la sombra antes de su envasado, y posteriormente fraccionado en paquetes de 15 g.

2- Condiciones de almacenamiento y material de los envases

2.1- Sin atmósfera modificada

Material de los envases

- a.-Bolsa de papel (BP)
- b.-Poliamida/adhesivo/etilvinilalcohol/adhesivo/polietileno de baja densidad (PENT)
- c.-poliéster/aluminizado/polietileno baja densidad (TRIA)
- d.-control

2.2- Con atmósfera modificada

- a) 100% de N₂

Dos lotes de 60 envases de 15 g cada uno fueron almacenados en oscuridad durante 6 semanas a 25° C y 60° C respectivamente.

3- Evaluación de los cambios en el material vegetal

3.1- Análisis de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales de peperina (*Minthostachys mollis* (Kurth Griseb) y orégano (*Origanum vulgare*) fueron obtenidos por extracción a través del arrastre con vapor de agua en un equipo Clevenger, durante una hora.

Se les realizó una cromatografía gas-líquida, columna DB-5 (30 m x 0.25 µm d.i.), 60 °C a 240 °C con una variación de 4° C / minuto. La temperatura del inyector fue de 250° C, utilizándose helio como gas transportador a 0.9 ml / min.

3.2- Análisis sensorial

3.2.1- Se realizó una prueba de preferencia en muestras envasadas en PENT y TRIA ambos sin atmósfera modificada y con 100% de N₂. La mitad de los jueces probó primero las muestras sin atmósfera modificada y el resto del grupo, en el orden inverso. Se contó con treinta jueces no entrenados. Se les entregó una planilla para completar que indagaba sobre los motivos de la preferencia.

3.2.2- Con treinta jueces no entrenados se efectuaron pruebas de determinación del grado de satisfacción con escala hedónica de tres puntos:

- 1.Me gusta
- 2.No me gusta ni me disgusta
- 3.No me gusta

Se les entregó muestras envasadas con los tres sistema sin atmósfera modificada.

Análisis de los datos

Los resultados fueron analizados usando Análisis de Varianza (ANOVA) a un criterio de clasificación. Cuando el test F del ANOVA resultó significativo ($p < 0,05$) se realizó la comparación a posteriori utilizando el Test de Tuckey

3.3. *Determinación del contenido de clorofila a y b.*

Se homogeneizaron 0,75 g de material vegetal triturado en 10 ml de etanol al 96% V / V. Posteriormente se separó el sobrenadante y en él se midió la densidad óptica (DO) a 665 nm y 649 nm para la cuantificación de clorofilas a y b respectivamente (Cl-a y Cl-b) según el método de Wintermans y De Mots (1965).

El material vegetal analizado fue almacenado durante 6 semanas en diferentes sistema de envasado a TA:

- a) BP
- b) PENT envasado con el 100% de N₂ (PENT 100%)
- c) TRIA con el 100% de N₂ (TRIA 100%)

RESULTADOS

Evaluación en los cambios en el material vegetal

1. Análisis de los aceites esenciales.

El aceite esencial de orégano presentó como componentes principales al timol y al ment-2-en-1-ol (trans para), mientras que en el de peperina se encontraron la mentona y la pulegona como los más representativos. En los gráficos 1 y 2 se muestran las variaciones a TA y a 60 ° C de orégano y peperina respectivamente.

En la tabla 1 se observan las variaciones de los principales componentes del aceite esencial de orégano y peperina en diferentes materiales de envasado a TA sin atmósfera modificada.

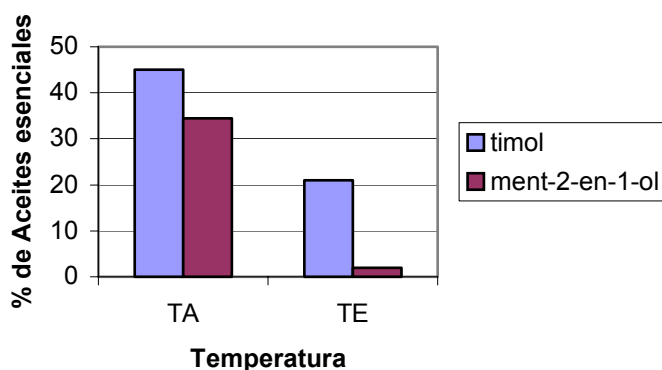


Gráfico 1 : Variación de los principales componentes del aceite de orégano a TA y a 60°C (TE) de material vegetal envasado en PENT

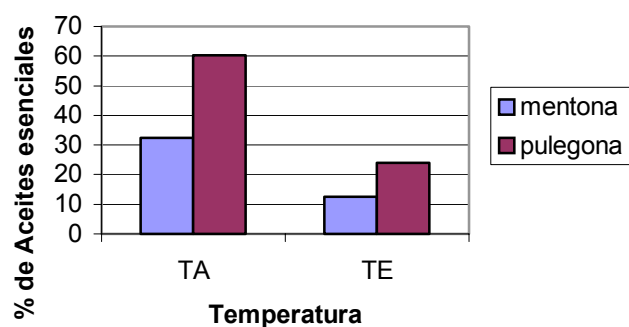


Gráfico 2: Variación de los principales componentes del aceites de peperina a TA y a 60°C (TE) de material vegetal envasado en PENT

Tabla 1: Variación de los principales componentes del aceite esencial de orégano y peperina en diferentes materiales de envasado a TA sin atmósfera modificada

ORÉGANO	Control (%)	TRI A (%)	BP (%)	PENT (%)
Ment-2-en-1-ol (trans - para)	27,5	23,9	18,1	24,5
Timol	40,6	39,2	33,6	40,1

PEPERINA	Control (%)	TRI A (%)	BP (%)	PENT (%)
Mentona	37,5	34,9	31,6	37,5
Pulegona	60,2	36,9	37,8	52,3

2- Análisis sensorial

En las tablas 2 y 3 se puede observar la preferencia de los jueces por peperina y orégano conservados en PENT y TRIA ambos con atmósfera de N₂ al 100%.

Tabla 2: Cantidad de jueces que prefirieron peperina conservada en diferentes materiales de envase y atmósferas.

Material de envase	100% de N ₂	Sin atmósfera modificada
PENT	22	8
TRIA	19	11

Tabla 3: Cantidad de jueces que prefirieron orégano conservado en diferentes materiales de envase y atmósferas.

Material de envase	100% de N ₂	Sin atmósfera modificada
PENT	21	9
TRIA	20	10

En cuanto a los motivos de la preferencia de los jueces en el caso de la peperina se indicó que “parecía más fresca” y “con mayor aroma”. El motivo señalado en el caso del orégano fue el “mayor aroma” que percibían.

Las tablas 4 y 5 del ANOVA para el grado de satisfacción de orégano y peperina, muestran que los valores de F calculados superaron a los valores de tabla indicando diferencias significativas.

Tabla 4: ANOVA del grado de satisfacción para orégano

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Varianza estimada	F
Tratamientos	2	17.3	8.7	9.9
Jueces	17	2.1	0.1	0.1 NS
Residual	34	10.3	0.9	
Total	53	29.5		

NS = no significativo

Tabla 5: ANOVA del grado de satisfacción para peperina

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Varianza estimada	F
Tratamientos	2	15.2	7.6	24.5
Jueces	17	2	0.1	0.38 NS
Residual	34	16.8	0.3	
Total	53	34		

NS = no significativo

En la tabla 6 el test de Tukey determinó diferencias significativas de A) con B) y con C), mientras que se determinó que B y C eran iguales.

Tabla 6: Test de Tuckey de las muestras tratadas con los tres sistemas de envasado

Muestras	A	B	C
Orégano	2,6 ^a	1,6 ^b	1,3 ^b
Peperina	2,6 ^a	1,3 ^b	1,2 ^b

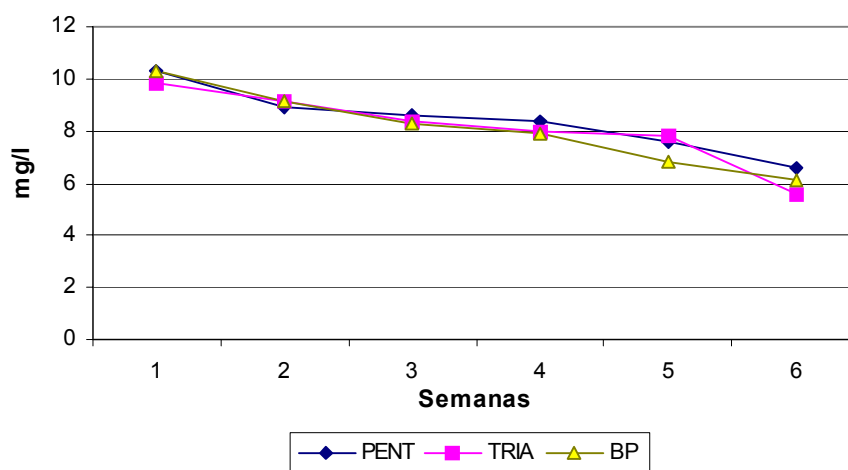


Gráfico 3: Contenido de clorofila a en orégano conservados a TA en tres envases diferentes.

3. Determinación del contenido de clorofila a y b.

Los gráficos 3 y 4 muestran las variaciones de clorofila a y b de orégano y los gráficos 5 y 6 los de peperina durante 6 semanas, conservados a TA en tres envases diferentes.

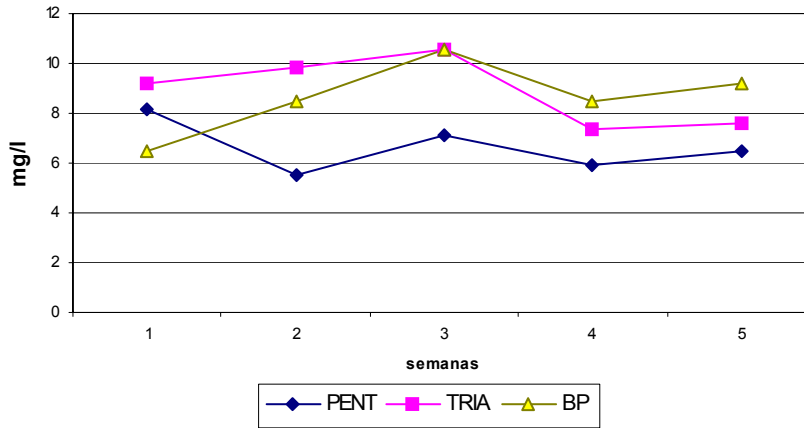


Gráfico 4: Contenido de clorofila b en orégano conservados a TA en tres envases diferentes.

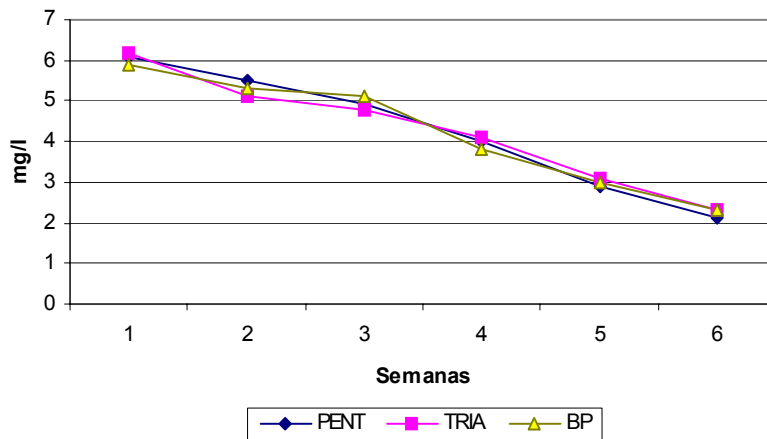


Gráfico 5: Contenido de clorofila a en peperina conservados a TA en tres envases diferentes.

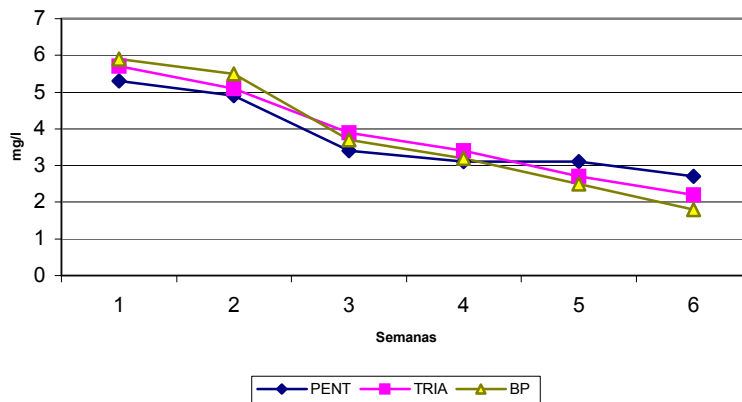


Gráfico 6: Contenido de clorofila b en peperina conservados a TA en tres envases diferentes.

CONCLUSIONES

El contenido de aceite esencial tanto de orégano como de peperina disminuye con el aumento de temperatura y con el periodo de almacenamiento para todos los tipos de material empleado. De los materiales utilizados, el PENT sin atmósfera modificada conservó mejor las concentraciones existentes al momento del envasado.

Con respecto al análisis sensorial existen diferencias significativas entre las muestras almacenadas en bolsa de papel y las tratadas con atmósfera modificada. No se observaron diferencias significativas entre el PENT 100% y el TRIA100% .

Se puede concluir que el envasado en recipientes herméticos conserva la integridad de los aceites esenciales en ambas hierbas aromáticas.

Así mismo se observó disminución del contenido de clorofila a y b en el tiempo, durante las seis semanas en los tres tipos de envases utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

Wintermans, J.F.G.M and De Mots, A. 1965. Spectrofotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phaeophytins ethanol. *Biochemistry et Biophysica Acta* 109: 448-453

Brody, Aarom L.. 1996. Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y a vacío. Ed. Acribia S.A.

Hernández Muñoz P., Catala R. y Gavara R.1999. Effect of sorbed oil on food aroma loss through packaging materials. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4370-4374.

Huang, Wan-Hwa, Hsu, Cheng K., Chiang Been H. 1999. Formulation of controlled atmosphere agents for packaged food. *J. Agric. Food Chem.* 47, 906-910.

Ducruet V., Fournier N., Saillard P., Feigenbaum A., Guichard E. 2001. Influence of packaging on the aroma stability of strawberry syrup during shelf live. *J. Agric. Food Chem.*47,2290-2297.

EFFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO EN LA INTERFASE DE CRECIMIENTO / NO CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* O157:H7

DEL CASTILLO, Lourdes L.; MEICHTRI, Leslie E.; RODRÍGUEZ, Ricardo H. y MASANA, Marcelo O.

Instituto de Tecnología de Alimentos. Centro de Investigación de Agroindustrias INTA. Dirección: CC 77, B1708WAB Morón, Pcia. de Buenos Aires, República Argentina. Tel. +54-11-46240443/0457, ldelcastillo@cnia.inta.gov.ar

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo investigar la influencia que el número de células inoculadas tiene en la respuesta de *E. coli* O157:H7 ante condiciones limitantes del desarrollo, y considerar dicha respuesta en un modelo predictivo a desarrollar.

Se observó que en determinadas combinaciones límites, la respuesta microbiana dependió del número de células inoculadas. Por lo tanto el efecto de las condiciones ambientales se analizó separadamente para los niveles de inóculo ensayados. Con los datos obtenidos se creó un modelo de regresión logística binaria, para la probabilidad de crecimiento del 50%.

En este caso se pudo observar que existió una modificación de la interfase de crecimiento de *E. coli* O157:H7 de acuerdo al número inicial de células, dato significativo dado la variabilidad natural de la contaminación microbiológica de los alimentos.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effect of the number of cells in the inoculum on *E. coli* O157:H7 response under limiting growth conditions, as part of the development of a growth/no-growth predictive model.

It was observed that under some of the experimental conditions tested the growth response changed depending on the number of inoculated cells. Therefore, the effect of environmental parameters (pH, NaCl and temperature) on the growth/ no-growth boundary was analyzed independently for each inoculum size. As a result a logistic regression model for the probability of growth was developed for each inoculum case.

The observed modification of the growth/no-growth boundary for *E. coli* O157:H7 has significance in the application of predictive models to foods given the natural variability of the microbial contamination of foods.

Palabras Clave: *Escherichia coli* O157:H7, Inóculo, Interfase

INTRODUCCIÓN

En microbiología predictiva se han desarrollado numerosos modelos cinéticos con el objeto de determinar el comportamiento de microorganismos a distintas condiciones ambientales. Dichos modelos no permiten estimar el comportamiento bacteriano en condiciones cercanas a su límite de crecimiento, por lo que Ratkowsky y Ross (1995) propusieron el uso de otros modelos para predecir la interfase de crecimiento / no crecimiento de las bacterias en presencia de distintos factores ambientales como temperatura, pH y otros aditivos como sal y ácidos orgánicos débiles. Este tipo de modelo se ha usado para distintas especies bacterianas (Presser et al, 1998; Masana y Baranyi, 2000; McKellar y Lu, 2001).

Por otra parte, autores como Buchanan y Klawitter (1991), han destacado la relevancia del estado fisiológico del inóculo puede tener un efecto en la cinética de crecimiento, particularmente en la duración del período lag. A su vez Coleman (2003) observó un significativo efecto de la densidad de la población inicial de *Escherichia coli* O157:H7, en parámetros de crecimiento (velocidad, lag y población máxima alcanzada) en condiciones de bajos pH a diferentes temperaturas así como en la interfase de crecimiento bacteriano. Este trabajo es parte del objetivo de modelar la interfase de crecimiento / no crecimiento de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) bajo distintas condiciones ambientales (temperatura, pH, concentraciones de sales). En este ensayo en particular se evaluó la influencia del inóculo en dicha interfase.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo:

Se empleó una cepa de *Escherichia coli* O157:H7, aislada de un caso clínico de síndrome urémico hemolítico (SUH), denominada Ec04. Esta cepa fue seleccionada ya que en trabajos previos en nuestro laboratorio presentó una mayor tolerancia ácida natural a pH 3.0, no inducida (Del Castillo y col., 2004).

Diseño experimental:

Se estudió el efecto de cuatro factores, NaCl (0.5-7.5%), pH (3.6-6.0), temperatura (10, 37°C) y dos niveles de inóculo inicial, uno medio y el otro alto (del orden de $\log_{10} 3$ y $\log_{10} 6$, respectivamente), sobre el desarrollo bacteriano en caldo TSB repartido en placas multiwell. Cada una de las combinaciones de los factores, se probaron por duplicado y

fueron observadas periódicamente contra un blanco sin inocular, registrándose el tiempo para la aparición de turbidez o pellet de células.

En un primer ensayo se estudiaron 140 condiciones de pH, NaCl, temperatura y con los dos inóculos. Luego, en un segundo estudio se analizaron 80 condiciones más, seleccionadas por su cercanía al límite de crecimiento/no crecimiento determinado en el primer tamizaje.

Medio de crecimiento: Se utilizó caldo Triptona de soya (TSB, Oxoid) al cual se adicionó ClNa para llegar a la concentración adecuada. El pH de cada medio fue ajustado con HCl 1M (pHmetro Metrohm 691) y llevado a volumen final. Todas las combinaciones de medio de cultivo fueron esterilizadas en autoclave (105°C, 15 minutos) y el pH confirmado nuevamente. Trescientos ul de cada una de las combinaciones a ensayar (por duplicado) se repartió en placas multiwells (Corning Inc, USA).

Procedimiento de inoculación: Cada well fue inoculado al 1% con la dilución adecuada de un cultivo en TSB de 18 horas a 37°C (aproximadamente 10^9 UFC/ml), para obtener el nivel de inóculo deseado. Las placas fueron incubadas a 10 y 37°C y observadas periódicamente durante 30 y 7 días, respectivamente, para detectar crecimiento en forma visual.

En los pocillos donde no fue evidente el crecimiento se realizó la siembra del mismo, para confirmar que efectivamente no hubo un incremento en el número de microorganismos inoculados. Recuentos en placa: Cuando fue necesario se realizaron recuentos en placa, para lo mismo las muestras se diluyeron en forma seriada en agua peptonada y se plaquearon en TSA. Luego se incubaron a 37°C durante 24 horas para su enumeración.

Desarrollo del modelo: Los datos obtenidos fueron ordenados en una grilla de la combinación de pH y concentración de NaCl empleadas, para cada temperatura y nivel de inóculo utilizado, y asignándose un valor de “1” si se observaba crecimiento y “0” para no-crecimiento, independientemente del tiempo necesario para visualizar el desarrollo. Estos datos fueron tratados mediante un modelo de regresión logística binaria usando el software estadístico SPSS (Illinois, USA). Se obtuvo así una ecuación de regresión logística de segundo orden para la predicción de la probabilidad de crecimiento (p):

$$p(x_i) = \frac{1}{1 + e^{-x_i\beta}}$$

en función de las variables (X_i): pH, % NaCl y Temperatura. Los coeficientes β_i fueron estimados a partir de los datos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El valor de los inóculos iniciales determinado por recuento en placa fue de $1,3 \times 10^6$ y $1,3 \times 10^3$ células/well, para el nivel alto y medio respectivamente.

En los pocillos donde no fue evidente el crecimiento confirmó que no hubo un incremento del número de microorganismos presentes (datos no mostrados).

La probabilidad de crecimiento decreció cuando se incrementó la concentración de sal o con la disminución el pH, más notablemente para la temperatura de incubación menor.

Los tiempos hasta la aparición de pellet celular se observa en la tabla 1. Como es esperable, los inóculos empleados influyen los tiempos para detectar crecimiento sobre todo en las condiciones más extremas.

Tabla 1. Tiempo para la detección de crecimiento (días) de *E. coli* O157:H7. - : no se observó desarrollo

%NaCl	pH	37°C		10°C	
		N° (células / well)			
		1.3×10^6	1.3×10^3	1.3×10^6	1.3×10^3
0.5	6.0	1	1	3	8
	5.6	1	1	3	8
	5.2	1	1	3	8
	4.8	1	1	3	8
	4.4	1	1	8	-
3.0	6.0	1	1	3	8
	5.6	1	1	3	8
	5.2	1	1	3	21
	4.8	1	1	8	-
	4.4	-	-	8	-
4.5	6.0	1	1	8	-
	5.6	1	1	8	-
	5.2	1	5	8	-
	4.8	-	-	8	-
6.0	6.0	1	5	-	-
	5.6	1	5	-	-

Aún cuando los tiempos de detección fueron distintos para los dos inóculos, no se observaron diferencias entre los patrones de crecimiento/ no crecimiento a 37°C (Figura 1, A y B). Diferentemente, a 10°C el patrón de crecimiento/no crecimiento dependió del número de células inoculadas (Figura 1, C y D).

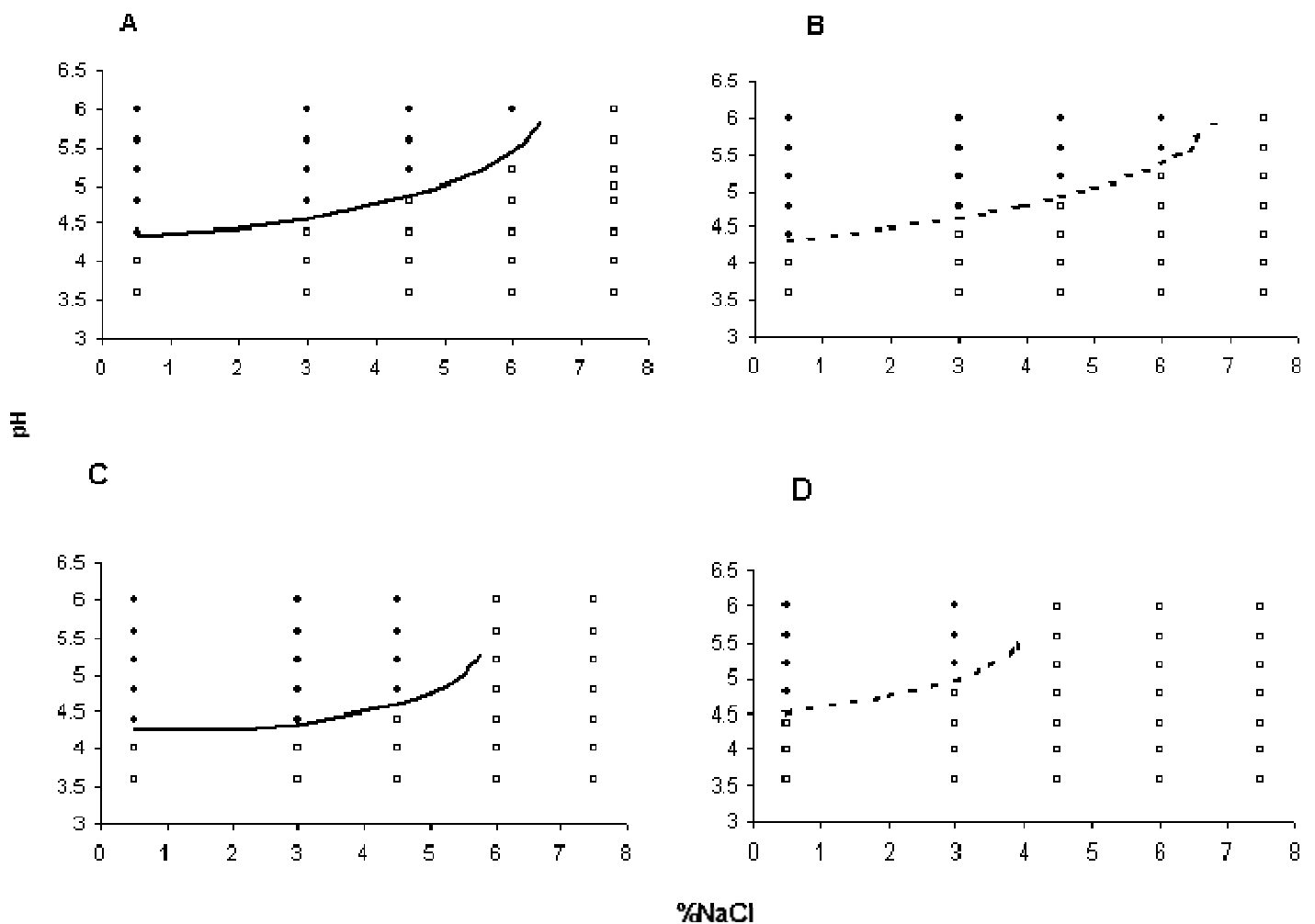


Figura 1. Combinaciones de pH vs. % NaCl para el desarrollo de *E. coli* O157:H7.

A: 10⁶ UFC/ml y B: 10³ UFC/ml a 37°C; C: 10⁶ UFC/ml y D: 10³ UFC/ml a 10°C

• crecimiento □ no crecimiento — Probabilidad 0.5 de crecimiento para inóculo inicial alto --- Probabilidad 0.5 de crecimiento para inóculo medio

El efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de *E. coli* O157:H7 se analizó separadamente para los dos niveles de inóculo ensayados usando un modelo de regresión logística binaria de las respuestas observadas en función de las tres variables analizadas (pH, %NaCl y T), obteniéndose dos ecuaciones polinomiales cuadráticas

cuyos parámetros se listan en la tabla 2. Estas ecuaciones permitieron un 100% de predicciones correctas.

Tabla 2. Parámetros estimados por regresión logística binaria para los niveles de inóculo medio y alto

Inóculo inicial (células/well)	Términos	Coefficiente
1.3 x 10 ⁶	Constante	-2.60E+03
	pH	9.75E+02
	NaCl	2.50E+01
	pH ²	-9.53E+01
	NaCl ²	-6.21E+00
	T ²	-4.72E-01
	TpH	5.06E+00
	TNaCl	-8.19E-01
1.3 x 10 ³	Constante	-1.80E+03
	pH	6.56E+02
	NaCl	-1.36E+01
	pH ²	-6.00E+01
	NaCl ²	-1.49E+00
	T ²	-1.53E-01
	TpH	1.92E+00
	TNaCl	-1.27E-01

La interfase de crecimiento (Figura1, A-D), considerada como la condición donde el microorganismo tiene una chance de crecer del 50%, se determinó resolviendo la ecuación logística obtenida para $p = 0.5$.

CONCLUSIONES:

El número de células puede tener importancia en la respuesta microbiana tal como se ha reportado para el caso de la fase de latencia o para la probabilidad de crecimiento. En este caso se pudo observar que existió una modificación de la interfase de crecimiento de *E. coli* O157:H7 de acuerdo al número inicial de células, dato significativo dado la variabilidad natural de la contaminación microbiológica de los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Buchanan, R. L. y Klawitter, L. A. 1991. “Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperature” en *International Journal of Food Microbiology*, vol. N° 12, p. 235-246.

Coleman, M. E.; Tamplin, M. L.; Phillips, J. G. y Marmer, B. S. 2003. “Influence of agitation, inoculum density, pH, and strain on the growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7- relevance to risk assessment” en *International Journal of Food Microbiology*, vol. N° 83, p. 147-160.

Masana M. y Baranyi, J., 2000, “Growth/no growth interface of *Brochothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity” en *Food Microbiology*, vol. N° 17, p. 485-493.

McKellar R. C. y Lu, X., 2001, “A probability of growth model for *Escherichia coli* O157:H7 as a function of temperature, pH, acetic acid, and salt” en *Journal of Food Protection*, vol. N° 64 (12), p. 1922-1928.

Presser, K. A., Ross, T. y Ratkowsky, D. A, 1998, “Modelling the growth limits (growth/ no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity” en *Applied and Environmental Microbiology*, vol. N° 64 (5), p. 1773-1779.

Ratkowsky, D. A. y Ross, T., 1995, “Modelling the bacterial growth/ no growth interface” en *Letters in Applied Microbiology*, vol. N° 20, p. 29-33.

Software estadístico SPSS, versión 10.0. Illinois. USA

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la ANPyCT (PICT 8832) para la concreción de este trabajo.

EFFECTO DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN EN EL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LECHUGA MANTECOSA MÍNIMAMENTE PROCESADA

LOGEGARAY¹, Verónica R., LEÓN¹, Adrián P., FREZZA¹, Diana.

¹ Cátedra de Horticultura, Facultad de Agronomía U.B.A , Av. San Martín 4453 (C1417DSE), Buenos Aires, Argentina Tel.054-11-4524-8011, Fax.054-11-4514-8737 logegara@mail.agro.uba.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del sistema de producción en el contenido de vitamina C y su evolución en poscosecha para lechuga mantecosa envasada en atmósfera modificada pasiva. Los sistemas evaluados fueron: cultivo en suelo al aire libre (SAL), cultivo en suelo en invernadero (SI) y dos sistemas de cultivo sin suelo: floating system (FS) y perlita (P). El contenido de vitamina C se determinó a cosecha y al finalizar el período de conservación por electroforesis capilar. A cosecha se observaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C según el sistema de producción: 114.6; 55.2; 38.9 y 11.35 mcg g⁻¹ pf para P, SAL, SI y FS respectivamente. La temperatura de almacenamiento tuvo efecto en el contenido de ácido ascórbico. La mayor temperatura determinó una mayor pérdida de la vitamina al final del periodo de conservación.

Palabras Clave: Vitamina C, poscosecha, cultivo sin suelo.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of the production system on the ascorbic acid content in butterhead lettuce at harvest and its evolution in passive modified atmosphere in postharvest. Open air (OA), greenhouse (GH) and two soilless culture: floating system (FS) and perlite (P) were evaluated. The vitamin content was determined at harvest and at the end of the storage period by capillary electrophoresis. Significant differences were found in ascorbic acid content between different systems at harvest: 114.6 mcg g⁻¹ wf P, 55.2 mcg g⁻¹ wf OA, 38.9 mcg g⁻¹ wf GH and 11.35 FS mcg g⁻¹ wf. The storage temperature influences the ascorbic acid content., high losses at the highest temperature were found.

INTRODUCCION

El ácido ascórbico (vitamina C) es una de las más importantes vitaminas solubles en agua. Actúa como agente antioxidante ayudando a eliminar radicales libres en el metabolismo celular, como coenzima en la síntesis de colágeno, estimula las defensas contra las infecciones y es indispensable para el funcionamiento de las hormonas antiestrés.

Los seres humanos han perdido la capacidad para sintetizarla. Esta incapacidad resulta de la mutación de un gen que codifica para la formación de la enzima L-gulonolactona oxidasa que se requiere para la biosíntesis de la vitamina. Por lo tanto, los requerimientos de vitamina C se deben satisfacer a partir de la dieta.

El requerimiento diario de vitamina C para adultos (mayores de 18 años) es de 90 mg/día para varones y 75 mg/día para mujeres según Frei y Trabe (2001). Akhilender Naidu (2003). La deficiencia de esta vitamina provoca la enfermedad llamada escorbuto. Esta enfermedad que puede llegar a ser fatal se puede prevenir con un consumo de apenas 10 mg de vitamina C/día, una cantidad fácilmente obtenida por el consumo de vegetales.

El contenido de vitamina C en frutas y hortalizas puede variar conforme a diferentes genotipos, condiciones climáticas durante el crecimiento, prácticas culturales, madurez a cosecha y manejo postcosecha (Sorensen et al, 1994, Drew et al,1995,.Lee y Kader,2000, Frezza *et al*, 2000).

A mayor intensidad de luz durante el período de crecimiento aumenta el contenido de ácido ascórbico al igual que menores frecuencias de irrigación y altas tasas de fertilización nitrogenada tienden a disminuirlo.

Schnitzler y Gruda, (2003) señalan escasa experimentación existente donde se cuantifiquen las diferencias en composición de las diferentes técnicas de cultivo (en suelo y sin suelo) en la cadena de producción. Entre los componentes se señalan cationes inorgánicos, aniones (nitratos, sulfatos, etc) y vitaminas (ácido ascórbico, tiamina, vitaminas del complejo B).

El ácido ascórbico es muy susceptible a cambios químicos y oxidación enzimática durante el procesado y periodo de conservación (Gil et al, 1999)

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del sistema de producción en la concentración de ácido ascórbico logrado a la cosecha y su evolución en postcosecha para lechuga mantecosa envasada en atmósfera modificada pasiva.

MATERIALES Y METODOS

Condiciones experimentales

El ensayo se llevó a cabo en el campo experimental de la Cátedra de Horticultura de la Facultad de Agronomía de la UBA. Se cultivó lechuga (*Lactuca sativa* L.) de tipo mantecosa cv. Lores en producción otoño-invernal en 4 sistemas de producción: cultivo en suelo a campo y en invernadero y dos sistemas sin suelo (raíz flotante y perlita).

El cultivo en suelo se realizó en canteros que fueron cubiertos con polietileno negro y el riego se realizó a través de un sistema por goteo. La densidad de plantas fue 12.5 plantas. m⁻² para el cultivo al aire libre como en invernadero.

El cultivo hidropónico (FS) se llevó a cabo en tres piletas de 2.4 m de largo, 1 m de ancho y 0.4 m de alto. La densidad de plantación fue de 39 plantas m⁻². La solución nutritiva fue oxigenada con aireadores de estanque.

El sistema con perlita (sustrato inerte) se efectuó en tres canteros de 500x 40x30 cm (largo, ancho, alto). En este caso la densidad de plantas fue de 18 plantas m⁻². Al igual que en el cultivo en suelo se fertirrigó según las necesidades del cultivo.

Durante el ciclo de cultivo se tomó registro horario de la temperatura del aire (°C) intensidad de la radiación (w m⁻²) a través de un datalogger.

Cosecha y acondicionamiento del producto para la postcosecha

A la cosecha se extrajeron hojas de cada tratamiento, las cuales fueron lavadas, oreadas y acondicionadas en bolsas de poliolefina coextrudada, (PD 961 EZ) de 31 μ de espesor, con permeabilidad de 24hs 73°F 1 atm y tasa de transmitancia para O₂ y CO₂ 7000 y 20500 cm³/m² respectivamente.

Los envases tuvieron un peso aproximado de 100 g de producto, previo a la conservación fueron termoselladas y llevadas a cámara.

Seguendo los sistemas de cultivo, en postcosecha se realizaron a su vez dos tratamientos de conservación en cámara: 1 °C y 8° ± 2°C durante 7 días.

Evaluación del contenido de ácido ascórbico

Se determinó el contenido de ácido ascórbico por electroforesis capilar (Paňak *et al*, 1998). Se tomaron 6 muestras al momento de la cosecha y al final del período de conservación para cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado durante el cultivo fue en bloques al azar, mientras que en postcosecha (en cámara de conservación) el diseño fue completamente aleatorizado.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de variancia y se compararon las medias de los tratamientos a través del test de Tukey ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 puede observarse el contenido de ácido ascórbico a la cosecha en los distintos sistemas de producción. En perlita se presentó diferencias significativas ($p = 0.0000$) con relación a los otros tratamientos.

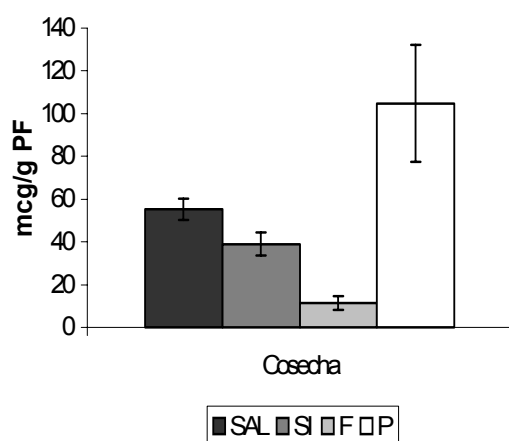


Figura 1. Contenido de ácido ascórbico de lechuga mantecosa a la cosecha en distintos sistemas de producción (SAL. Suelo al aire libre, SI: suelo invernadero, F: floating system, P: sustrato perlita).

El ácido ascórbico presente en los tejidos de las plantas varía ampliamente con el crecimiento y desarrollo de los cultivos según la especie y cultivar (Chiesa *et al*, 2000).

Condiciones ambientales, como la luz y la temperatura, tienen una estrecha relación sobre la composición química de los cultivos. En la figura 2 se puede visualizar el ritmo y evolución de temperatura y radiación dentro y fuera del invernadero.

Con el avance del ciclo de cultivo tanto la temperatura como la radiación disminuyeron, mientras que en invernadero se produce una reducción de la radiación por efecto de la cubierta del orden de 20-25 % con relación al exterior. La temperatura dentro del invernadero es mayor y se presenta más favorable para el crecimiento del cultivo. Si se compara los contenidos de ácido ascórbico entre sistema al aire libre y en suelo del invernadero, se podría inferir que las condiciones del ambiente tienen fuerte influencia. Lee y Kader (2000) señalan que aunque la luz no sea esencial para la síntesis de ácido ascórbico en las plantas, la cantidad e intensidad de la luz recibida durante la estación de crecimiento tiene influencia sobre la cantidad de ácido ascórbico formado. Una baja

intensidad de luz durante el cultivo, determina un bajo contenido de ácido ascórbico. El ácido ascórbico se sintetiza a partir de los azúcares suministrados a través de la fotosíntesis de la planta. Por otra parte la temperatura es el factor más importante en determinar la velocidad de crecimiento y la composición química de los cultivos.

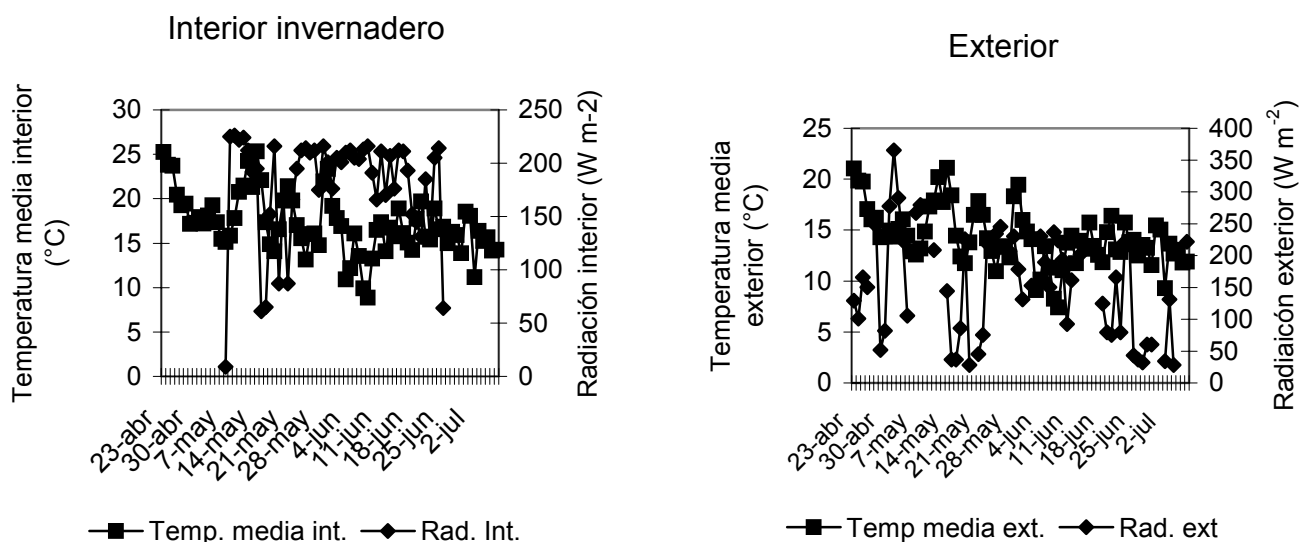


Figura 2: Evolución de la temperatura del aire y la radiación al aire libre y en el invernadero

Cuando se analizan los sistemas de producción sin suelo los factores determinantes parecerían ser el medio de cultivo y la solución nutritiva empleada. En los cultivos sin suelo las necesidades nutricionales del cultivo se adecuan estrictamente a cada fase de cultivo y a las condiciones climáticas del lugar en que se producen. Como en estos sistemas las plantas crecen a alto ritmo es necesario incrementar la fertilización nitrogenada, responsable del crecimiento de las plantas. Cuando esto sucede se produce una disminución del ácido ascórbico en tejido, como consecuencia de un efecto de dilución en el mismo (Lee y Kader, 2000).

En postcosecha se obtuvo una notable disminución del ácido ascórbico en las hojas. Hubo un efecto diferencial con relación a la temperatura de conservación y al período de conservación. A $8^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ la disminución fue mayor ($p=0.0000$), (Figura 3)

La temperatura de conservación es un factor en la postcosecha que afecta notablemente la calidad nutricional de los productos. Así vegetales de hojas, mantenidos a 6°C perdieron un 10 % del contenido de ácido ascórbico en 6 días, mientras que aquellos mantenidos a temperatura ambiente perdieron el 20 % en dos días (Lee y Kader, 2000).

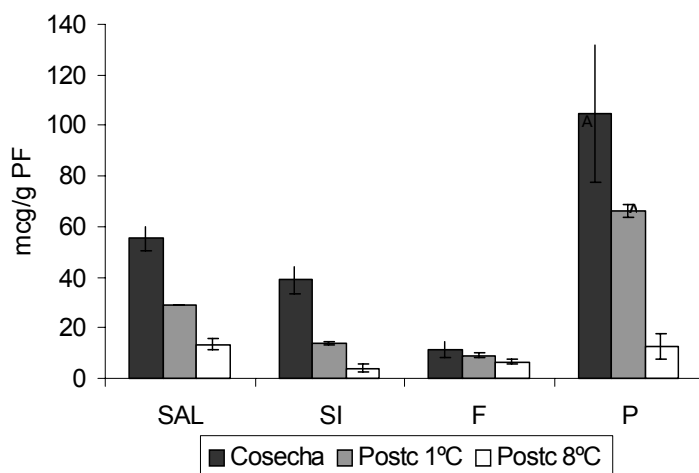


Figura 3: Contenido de ácido ascórbico de lechuga mantecosa a cosecha y al final del período de conservación para los distintos tratamientos (SAL. Suelo al aire libre, SI: suelo invernadero, F: floating system, P: sustrato perlita).

Frezza *et al*, 2000, encontraron una importante reducción de ácido ascórbico en condiciones de atmósfera modificada pasiva en lechuga mantecosa producidas al aire libre; resultados similares a este experimento.

En la tabla 1 puede verse la variación porcentual de la pérdida de ácido ascórbico entre sistemas de producción en la postcosecha y entre temperaturas de conservación.

El floating system, a pesar de su menor contenido en ácido ascórbico, es el que presentó una menor reducción con relación a la cosecha y entre las temperaturas de conservación.

La atmósfera modificada es una técnica que puede resultar en un mejor mantenimiento del ácido ascórbico, retardando la conversión a dehidroascórbico, (Albrecht et al, 1990). A pesar de ello, en este experimento tuvo mayor influencia el sistema de producción.

CONCLUSIONES

Tanto las condiciones ambientales como las técnicas de cultivo son determinantes de las variaciones en el contenido el ácido ascórbico. Por lo que antecede es necesario determinar para cada lugar en particular, para cada genotipo y sistema de producción la combinación más idónea para lograr obtener un producto de alta calidad nutricional y que perdure en el tiempo.

Tabla 1: Variación porcentual del contenido de ácido ascórbico en lechuga mantecosa minimamente procesada entre sistemas de producción (SAL. Suelo al aire libre, SI: suelo invernadero, F: floating system, P: sustrato perlita) y entre temperaturas en el periodo de conservación (1°C y 8° ± 2°C).

Sistema de producción	Fin del periodo de conservación		Variación entre temperaturas (%)
	de 1°C	8° ± 2°C	
Suelo aire libre (SAL)	↓ 48 %	↓ 76 %	53 %
Suelo invernadero (SI)	↓ 64 %	↓ 90 %	72 %
Floating system (F)	↓ 22 %	↓ 42 %	27 %
Perlita (P)	↓ 51 %	↓ 87 %	73 %

BIBLIOGRAFIA

Akhilender Naidu K. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Nutrition Journal 2003, 2-7.

Albrecht, J. A. Schafer, H. W., Zottola, E.A. 1990. Relationship of total sulfur to initial and retained ascorbic acid in selected cruciferous and noncruciferous vegetables, J. Food Sci. 55: 181-183

Chiesa, A.; Massa, A.; Filippini, O.; Frezza, D.; Moccia, S. 2000. Effect of processing degrees on the ascorbic acid content and visual quality fresh cut lettuce. Actas: Postharvest 2000. IV International Conference on Postharvest Science. Jerusalén, Israel. Vol 1,

Drews, M.; Shonhof, F. Krumbein, A. 1995. Influence of growth season on the content of nitrate, vitamin C, beta-carotene, and sugar of head lettuce (*Lactuca sativa L.*) under greenhouse conditions. Gartenbauwissenschaft. 60: 4; 180-187.

Frei, B. and Trabe, M.G. 2001. The new US dietary reference intakes for vitamin C and E. Redox Rep. 6(1): 5-9

Frezza, D, Moccia, S, Chiesa, A. 2000. Evolution of ascorbic acid content in latin and butterhead lettuce under modified atmosphere packaging. Agricultura Tropica et Subtropica Universitas Agriculturae Praga. Vol 33, 96-101.

- Gil, M.I. Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A 1999.** Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh cut spinach. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 2213-2217
- Lee, S. K. and Kader, A. A. 2000.** Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20:207–220.
- Lisiewska Z y Kmiecik W. 1996.** Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention. *Food Chemistry*, Vol 57, Nro 2, Pag 267-270
- Pañak, K., Giorgeri, S., Ruiz, O. y Díaz, L.E., 1998.** Postharvest analysis of vitamin C content and inorganic cations in lettuce by CZE. *Journal of Capillary Electrophoresis*, 5:59-63.
- Schnitzler, W. H., Gruda, N. 2003.** Quality issues of greenhouse production. *Acta Horticulturae* 614: 663-674.
- Sorensen, J.N.; Johansen, A.S.; Poulsen, N. 1994.** Influence of growth conditions on the value of crisphead lettuce. Marketable and nutritional quality as affected by nitrogen supply, cultivar and plant age. *Plant Foods for Human Nutrition* 46: 1-11.

DESARROLLO DE TECNOLOGÍA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE TRATAMIENTOS DE PRESERVACIÓN DE LA CALIDAD DE FRUTOS EN POSCOSECHA

^{1,2}POLENTA, Gustavo A; ²GUIDI, Silvina M; ¹MURRAY, Ricardo y ^{2,3}GONZALEZ, Claudia B.

¹Estación Experimental Agropecuaria San Pedro (INTA) Ruta 9, km 170, CC 43, CP 2930, San Pedro. ²Instituto Tecnología de Alimentos-Centro de Investigaciones Agroindustriales CC77 B1708WAB, Morón, Buenos Aires (INTA). ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). gpolenta@correo.inta.gov.ar

RESUMEN

El éxito de los tratamientos de estrés térmico utilizados para preservar la calidad de frutas durante su conservación en frío depende de la intensidad del tratamiento, señalándose a las proteínas de estrés (HSPs) como las probables responsables de la protección. En consecuencia, se decidió purificar una sHSP obtenida en tomate tratado térmicamente, utilizándosela como inmunógeno. Los anticuerpos obtenidos permitieron detectar y cuantificar por técnicas inmunoquímicas a las sHSPs producidas por frutos (tomate, pomelo y mandarina) sometidos a tratamientos de estrés, y conservados a temperaturas inductoras del daño por frío. Los anticuerpos mostraron una importante de reactividad cruzada. Se detectó aumento de las sHSPs a los 30 minutos de exposición al tratamiento (tomate). En cítricos, se evaluaron las sHSPs durante la frigoconservación. Los resultados obtenidos son promisorios para el desarrollo de un equipo comercial que permita evaluar la intensidad de los tratamientos aplicados y/o la vida útil del producto frigoconservado.

Palabras clave: Proteínas de estrés, Tomate, Poscosecha, Dot blot, Daño por frío.

ABSTRACT

The success of the heat shock treatments applied to maintain fruits quality during cold storage depends upon treatment intensity. Considering that the HSPs are suitable candidates for this issue, we decided to purify a thermally induced-HSP from tomatoes to be used as immunogen. The obtained antibody was used to detect and quantify sHSP in fruits (tomato, grapefruit, mandarin) submitted to stress treatment, and stored under refrigeration to induce chilling injury. Both, the detection and quantification were carried out by immunochemical techniques. The antibody showed an important cross-reactivity. The sHSPS were detected in tomatoes as soon as in 30 min of treatment. In citrus the sHSPs quantification accomplished during the storage period. The results are promissory

for the development of a commercial kit to evaluate treatment intensity and/or product shelf life during cold storage.

Keywords: Heat Shock Protein, Tomato, Postharvest, Dot blot, Chilling Injury.

INTRODUCCIÓN

El daño por frío, causado por la exposición de frutas a bajas temperaturas, resulta generalmente en una pérdida de la calidad, asociada a la aparición de depresiones (“pitting”), falta de uniformidad del color superficial y aumento de la susceptibilidad al ataque por patógenos (Paull, 1990). Lurie & Klein (1991) han sugerido el uso de altas temperaturas u otro tipo de estrés (vg. anaerobiosis, bajas temperatura, etc.) para prevenir el desarrollo de los síntomas del daño. La tolerancia de frutos tratados térmicamente, a las bajas temperaturas ha sido relacionada con la persistencia de las proteínas de estrés (Sabehat y col., 1996), habida cuenta de su capacidad para estabilizar proteínas y membranas, y auxiliar en su plegamiento bajo condiciones de estrés (Wang y col., 2004). En plantas la familia más diversa por su localización celular y función, son las proteínas cuyo PM oscilan entre 15 y 40 kD (sHSPs, Vierling, 1991).

Investigaciones previas (Polenta 2005) sugieren que existe un estrecho límite para considerar un tratamiento como efectivo o deletéreo. Así, el uso de indicadores para determinar la intensidad del tratamiento de estrés aplicado, o para monitorear el nivel de actividad protectora durante el almacenamiento, se presenta como un importante desafío. En consecuencia, el objetivo fue seleccionar el indicador más apropiado, y desarrollar con él metodología específica para el control de la calidad de los frutos durante la poscosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Material vegetal

Se utilizaron para el ensayo 960 tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Colt 45), verde maduro (USDA), cosechados directamente de un invernadero comercial. Los pomelos Marsh Blanco (*Citrus paradisi* Mc-Fadyen) y las mandarinas Nova [*Citrus clementina* Hort. Ex. Tanaka x (*Citrus paradisi* Mc-Fadyen x *Citrus reticulata* Blanco)], 820 unidades de cada uno, se cosecharon de la EEA-Concordia (INTA).

II. Tratamientos de estrés

Los frutos de tomate fueron sometidos a los siguientes tratamientos: no tratados, utilizado como control (C); tratamiento térmico por inmersión por 30 min a 42°C (HS30’); ídem por 60 min a 42°C (HS60’); tratamiento térmico en cámara por 72 h a 38°C -95 % HR

(HS72h); tratamiento de anaerobiosis, incubación a 20°C con circulación de N₂ humidificado durante 72 h (ANA72h); ídem por 144 h (ANA144h). Luego de tratados, los frutos fueron conservados a 2°C por 20 días. La evaluación se realizó a la salida de la conservación y luego de 4 días de exposición a 20°C.

Los tratamientos aplicados en mandarina fueron control (C), y tratamiento térmico en cámara por 48 h a 36°C- 90% HR (HS48h). En pomelos los tratamientos fueron control (C), térmico en cámara por 24 h a 40°C-90% HR (HS24h) y por 48 h (HS48h). Las mandarinas fueron conservados a 2°C durante 60 días y los pomelos durante 75 días. Las evaluaciones se realizaron a la salida de los tratamientos y en periódicamente cada 15 días durante la conservación.

III. Índice de daño por frío

El porcentaje de frutos que presentaba síntomas de pudriciones y “pitting” fue registrado y utilizado como índice de daño por frío (Lurie y Klein, 1991).

IV. Extracción de proteínas

Las proteínas fueron extraídas del pericarpio de los tomates y del flavedo de los cítricos siguiendo el método de Hurkman y Tanaka (1986).

V. Electroforesis en gel de poliacrilamida-Na dodecil sulfato (SDS-PAGE)

Las electroforesis se desarrollaron de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970), en geles de poliacrilamida 12% de 0,75 mm de espesor. Se sembraron aproximadamente 15 µg de proteínas en cada una de las calles.

VI. Isoelectroenfoque (IEF)

La banda de 21 kD obtenida en el punto V, fue purificada mediante IEF. El mismo fue llevado a cabo en un sistema vertical, en un gel compuesto por 5% de poliacrilamida, 0.4% de anfólitos (pH 3-10), 2% de anfólitos (pH 4-6,5) y 8 M urea.

VII. Producción del anticuerpo primario (Ab-HSPC1)

La banda mayoritaria obtenida en el IEF (HSPC1) fue extraída del gel e inyectada en conejos como inmunógeno según protocolos convencionales.

VIII. Detección de HSP mediante la técnica de Western blot.

Los extractos proteicos de tomates fueron desarrollados en SDS-PAGE, las proteínas fueron luego electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm) y reveladas utilizando como anticuerpo primario el Ab-HSPC1, y como secundario anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina (BIORAD).

IX. Detección y Cuantificación de HSP mediante la técnica de dot blot.

Para la cuantificación de las diferentes proteínas de estrés se utilizó el método de dot blot. Se sembraron 4 µl de los extractos proteicos de tomates (40 µg proteínas totales) de las

diferentes muestras en una membrana de nitrocelulosa, se dejó secar, y se la lavó posteriormente con buffer PBS. El revelado se realizó como en VIII. La curva de calibración (0.1-2 μ g) se realizó utilizando como estándar la proteína purificada HSPC1 (Polenta, 2005). La cuantificación de las proteínas se realizó por densitometría (BIORAD GS-800), y las intensidades se evaluaron con el programa Quantity One 1-D (BIORAD).

X. Reactividad Cruzada con otras especies

La técnica utilizada en este ensayo es la descrita en el punto IX. Se sembraron 5 μ l (25 μ g proteínas totales) de los extractos proteicos de los frutos cítricos proveniente de los diferentes tratamientos aplicados, como anticuerpo primario se utilizó el antisuero policlonal obtenido de tomates (Ab-HSPC1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se observan nuevas bandas en la región de bajo PM de los extractos de frutos de tomate tratados térmicamente, estas corresponderían a las denominadas proteínas de estrés térmico de bajo PM (15 y 30 kD) descritas en plantas. La banda de aprox. 21 kD es la que presentó la mayor intensidad. Además, la cantidad acumulada de proteínas de estrés se correlacionó con la intensidad del tratamiento aplicado, por lo que se decidió la purificación de una de ellas con el propósito de producir los anticuerpos para el desarrollo de métodos inmunológicos de análisis.

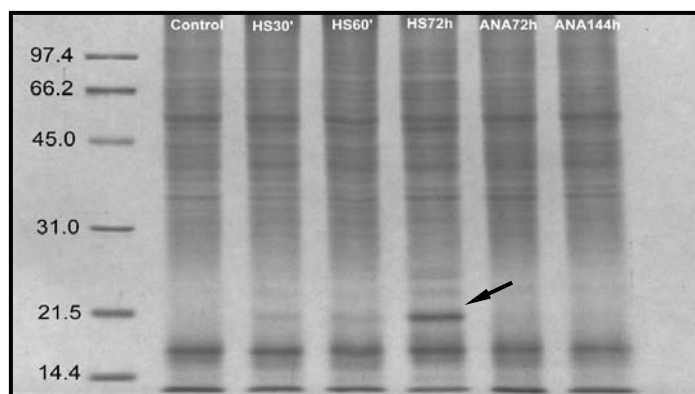


Figura 1: Análisis electroforético de extractos proteicos de tomates no tratados (Control) y sometidos a los tratamientos HS30', HS60', HS72h, ANA72h o ANA144h. Las frutas fueron analizadas inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos. La flecha indica la banda inducida por el tratamiento.

Se extrajeron las bandas de 21 kD de varios geles, y se analizaron mediante IEF (figura 2).

Se observa la buena resolución de las bandas, y la excelente reproducibilidad y

rendimiento de la proteína obtenidos. De cada calle se extrajo la proteína mayoritaria (HSPC1), y se la inyectó en conejos para producir el antisuero correspondiente (Ab-HSPC1). El análisis de Western blot (figura 3) muestra la importante reactividad cruzada del Ab-HSPC1 contra otras proteínas de la misma familia de las sHSP. Esta sería la primera oportunidad donde se obtuvo un antisuero contra sHSPs de tomates.

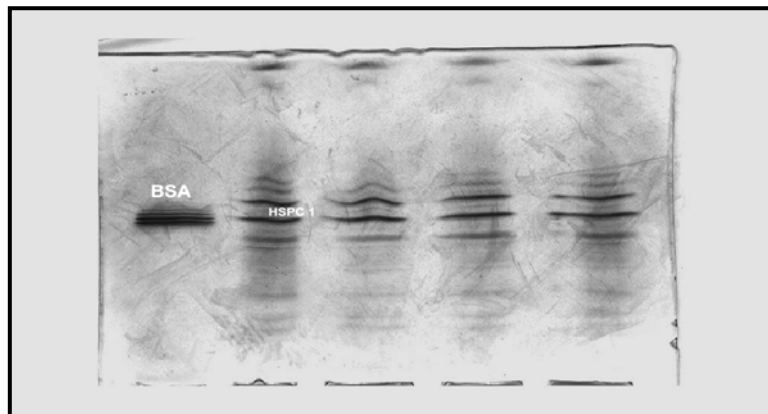


Figura 2: Separación por IEF de las bandas de 21 kD de extractos de tomates tratados (HS72h), obtenidas de varios geles SDS-PAGE.

Se observa la buena resolución de las bandas, y la excelente reproducibilidad y rendimiento de la proteína obtenidos. De cada calle se extrajo la proteína mayoritaria (HSPC1), y se la inyectó en conejos para producir el antisuero correspondiente (Ab-HSPC1). El análisis de Western blot (figura 3) muestra la importante reactividad cruzada del Ab-HSPC1 contra otras proteínas de la misma familia de las sHSP. Esta sería la primera oportunidad donde se obtuvo un antisuero contra sHSPs de tomates.

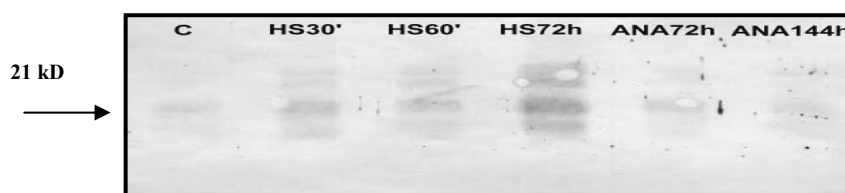


Figura 3: Análisis de Western blot de extractos proteicos de tomates Control (C), o sometidos a los tratamientos HS30', HS60', HS72h, ANA72h o ANA144h. Los extractos fueron revelados con Ab-HSPC1.

Desde un punto de vista tecnológico, la detección y cuantificación por métodos inmunológicos de las HSPs generadas por los tratamientos de estrés, permitirían monitorear la intensidad de los tratamientos aplicados. Una herramienta de este tipo

permitiría además, evaluar la combinación óptima “tiempo-temperatura” en la que los efectos perjudiciales de la exposición al estrés son contrarrestados por los efectos benéficos del tratamiento. Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren la posibilidad de desarrollar un método simple y específico para cuantificar las sHSPs. En consecuencia, se decidió optar para la cuantificación por la técnica de dot blot, que no requiere de las etapas de separación electroforética de proteínas y transferencia a membrana. Así, los extractos proteicos se depositan directamente sobre la membrana de nitrocelulosa, continuándose con las etapas de bloqueo, reacción con los anticuerpos y revelado. La aplicación de la técnica de dot blot a los extractos de tomates sometidos a los diferentes tratamientos (figura 4), muestra que los tratamientos de estrés térmico fueron capaces de inducir la producción de sHSPs (particularmente el de 72 hs), corroborando lo hallado previamente en los análisis de SDS-PAGE y Western blot (figuras 1 y 3).

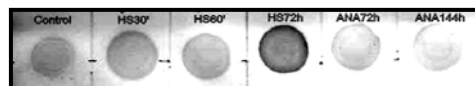


Figura 4: Análisis por Dot blot de los extractos proteicos de tomates sometidos a los tratamientos Control, HS30', HS60', HS72h, ANA72h y ANA144h; revelados con Ab-HSPC1

La tabla 1 muestra las cantidades absolutas de sHSPs y las relativas al control. Los tratamientos de estrés térmico indujeron un aumento de la síntesis de sHSPs de aproximadamente 2.5 veces respecto del control para los tratamientos cortos, y de 6.7 veces para el tratamiento largo. En cambio, los tratamientos de anaerobiosis produjeron efectos diferentes dependiendo de su intensidad, un leve aumento para ANA72h y una relativa disminución para ANA144h. A diferencia de investigaciones previas donde se realizaron análisis semi-cuantitativos de las proteínas de estrés (Florissen y col. 1996) , en el presente trabajo se logró la cuantificación absoluta de las sHSPs.

Al comparar la intensidad de las bandas de proteínas inducidas por los tratamientos HS30', HS60' y HS72h (figs. 1, 3 y 4) con el porcentaje de frutos que presentaron síntoma de daño por frío (Tabla 2), se observa que el efecto protector no es proporcional a la concentración de sHSPs encontrada. Así, al aumentar la duración del tratamiento térmico a 72 h, se incrementa la incidencia de las alteraciones fisiológicas. Este resultado permitiría postular que existe una intensidad de los tratamientos por altas temperaturas capaz de otorgar máxima protección, y más allá de esa intensidad se manifestarían los síntomas negativos del tratamiento.

Tabla 1: Masa de proteínas (ng) cuantificada por Dot blot (incluida en los 40 µg de proteínas totales sembradas) y porcentajes relativos al control (100%).

	Tratamientos					
	Control	HS30'	HS60'	HS72h	ANA72h	ANA144h
Masa de proteínas (ng)	616	1545	1663	4130	970	480
Cantidad relativa al C (%)	100	251	270	670	157	78

Tabla 2: Porcentajes de frutos con pudriciones y “pitting” en tomates “Colt 45”, sometidos a los diferentes tratamientos, y conservados durante 20 días a 2° C + exposición por 4 días a 20° C.

Tratamientos	Frutos conservados 20 días a 2° C + 4 días a 20° C	
	(%) Frutos con pudriciones	(%) Frutos con pitting
Control	37,50	12,50
HS30'	18,75	0
HS 60'	0	0
HS72hs	18,75	68,75
ANA72h	75,00	93,75
ANA144h	100,00	NE

Ritenour y col. (2001) encontraron que los anticuerpos obtenidos contra una HSP de 18.1 kD de arveja, eran capaces de reconocer en manzanas tres proteínas relacionadas de 20.9, 22.0 y 22.5 kD. Por lo tanto, se decidió utilizar el Ab-HSPC1 contra extractos proteicos de pomelos y mandarinas sometidos a diferentes tratamientos térmicos. En ambos casos se obtuvo una reacción positiva con el anticuerpo (figuras 5 y 6).

Este resultado muestra la alta reactividad cruzada del anticuerpo obtenido en tomates con las sHSPs generadas en otros frutos. Es interesante destacar el resultado obtenido con pomelos tratados térmicamente por 48 h (HS48h, figura 5), donde se observa un aumento importante de sHSPs(2.3 veces respecto del C) inmediatamente después de tratados. Durante la conservación en frío (2°C) este valor disminuye progresivamente hasta hacerse igual al C a los 75 días de conservación, momento en el que se manifestó también la sintomatología del daño por frío (datos no mostrados). En el caso de las mandarinas las sHSPs se manifiestan recién a los 15 días (figura 6), y los valores

obtenidos se mantienen hasta finalizar la conservación. Coincidentemente, este fruto no mostró en el período estudiado síntomas de daño (< 2%, no mostrado).

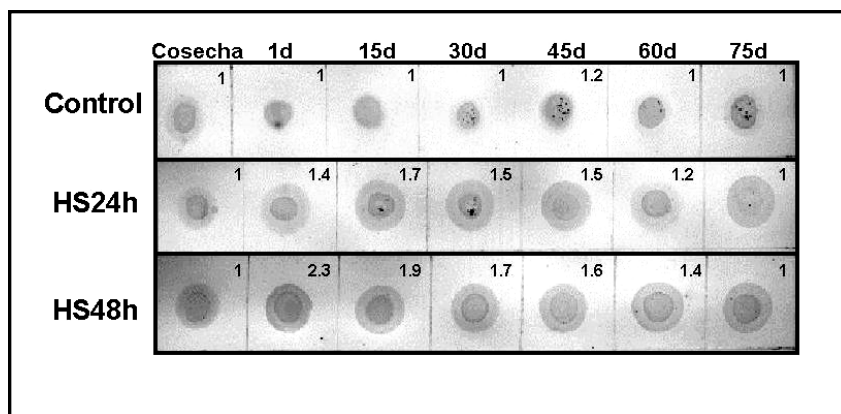


Figura 5: Análisis por Dot blot de los extractos proteicos de pomelos sometidos a los tratamientos Control, HS24h y HS48h, evaluados a la salida de los tratamientos y consecutivamente cada 15 días durante la frigoconservación. Revelados con Ab-HSPC. Los números en el interior de cada cuadro indican la cantidad de sHSPs relativa al control. números en el interior de cada cuadro indican la cantidad de sHSPs relativa al control.

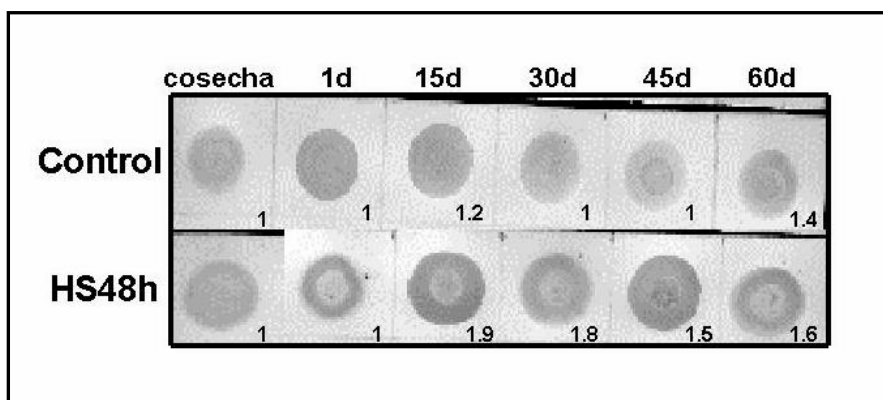


Figura 6: Análisis por Dot blot de los extractos proteicos de mandarinas sometidas a los tratamientos Control y HS24h, evaluados a la salida de los tratamientos y en períodos consecutivos de 15 días durante la frigoconservación. Revelados con Ab-HSPC. Los números en el interior de cada cuadro indican la cantidad de sHSPs relativa al control.

Como se comentó previamente, el desafío para aplicar tecnológicamente con éxito los tratamientos de estrés es encontrar una manera efectiva de establecer su intensidad óptima. Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que la cantidad acumulada de proteínas de estrés sería el indicador más adecuado para monitorear la intensidad del tratamiento aplicado y/o la continuidad en el tiempo del efecto protector. Además, el método desarrollado (dot blot utilizando Ab-HSPC1 de tomate) se presenta como una herramienta rápida y eficaz para monitorear dicha intensidad.

CONCLUSIONES

Dado que la aplicación de tratamientos térmicos es una tecnología promisoría para prevenir el desarrollo de daño por frío, el presente trabajo demostró que:

Existe una “intensidad de tratamiento óptima” para ejercer un efectivo control del daño por frío.

Las proteínas de estrés poseen las características para monitorear adecuadamente la intensidad de los tratamientos térmicos.

Se logró obtener anticuerpos contra una sHSP producida en tomates tratados térmicamente.

El método inmunológico desarrollado con el Ab-HSPC1 permite de manera simple la cuantificación de sHSPs inducidas por los tratamientos de estrés.

Existe una importante reactividad cruzada permitiendo reconocer proteínas de la misma o diferente especie vegetal.

La selección de una variable específica de monitoreo y el desarrollo del método para cuantificarla, es sin duda el punto de partida de futuras investigaciones dirigidas a preservar la calidad de los frutos durante la conservación poscosecha.

BIBLIOGRAFÍA

Florissen, P; Ekman, J; Blumenthal, C; McGlasson, W; Conroy, J. y Holford, P (1996). Postharvest Biol. Technol. 8: 129-141.

Hurkman, W. y Tanaka, C (1986). Plant Physiol. 81: 802-806.

Laemmli, U. K (1970). Nature. 227: 680-685.

Lurie, S. y Klein, J.D (1991). J. Amer. Soc Hort. Sci. 116: 1007-1012.

Paull, R.E. (1990). En: "Chilling injury of horticultural crops" (C.Y. Wang, ed), pp. 17-36. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Polenta, G. (2005). Tesis doctoral.

Ritenour, M; Kochhar, S; Schrader, L; Tsui-Ping Hsu y Ku, M (2001). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126(5): 564-570.

Sabehat, A; Weiss, D; y Lurie, S (1996). Plant Physiol. 110: 531-537.

Vierling, E (1991). Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 579-620.

Wang, W; Vinocur, B; Shoseyov, O, y Altman, A (2004). TRENDS Plant Science 9(5): 244-252.

“BIFES A LA CRIOLLA” PREPARADOS MEDIANTE EL SISTEMA *SOUS VIDE*: EVALUACION DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE COCCION-PASTEURIZACION

ARDILES Ariel G.¹, CARDUZA Fernando², INSANI E. Marina ², MASANA Marcelo O.², GRIGIONI Gabriela M.^{2,3,4}, SANCHO Ana M.^{2,4} y VAUDAGNA Sergio R.^{2,3,4} (*)

1. Dpto. de Tecnología, UNLu. 2. Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA. CC 77, B1708WAB Morón, Pcia. Bs. As., Argentina. 3. CONICET 4. Fac. Agronomía y Cs. Agroalimentarias, Universidad de Morón. (*)E-mail: svaudagna@cnia.inta.gov.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos de cocción-pasteurización sobre las propiedades físicas, la calidad sensorial y microbiológica y la estabilidad durante el almacenamiento de “Bifes a la Criolla” preparados mediante el sistema *sous vide*. Las porciones fueron cocidas-pasteurizadas aplicando dos combinaciones temperatura-tiempo en el punto de mínimo tratamiento de los bifes: 65°C–9min y 70°C–2min (reducción 6D de *Listeria monocytogenes*). Estos tratamientos permitieron obtener un producto de excelente calidad organoléptica, siendo 65°C-9min mejor ponderado que 70°C–2min. Para ambos se observó un aumento de la relación de pesos salsa/porción y del pH de la salsa. El deterioro de los atributos sensoriales, principalmente la alteración del flavor de la salsa, limitó la estabilidad del producto refrigerado a 28 días.

Palabras clave : 1- *Sous vide* 2- Pasteurización 3-Carne 4- Calidad Sensorial 5-Vida útil

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effect of different thermal treatment combinations on the physical properties, sensory and microbiological quality and storage stability of Bifes a la Criolla meal prepared using *sous vide* system. Two different processing temperature and time combinations were applied at the slowest heating point of the beef steaks: 65°C-9 min and 70°C-2min (in order to achieve a 6D reduction of *Listeria monocytogenes*). Both treatments have produced a significant increment in sauce/portion ratio (% w/w) and pH of sauce. The product treated at 65°C-9min presented the highest scores. The storage stability of the product (28 days) was limited by changes in the sensory quality, particularly due to the decreasing of the sauce flavour.

KEYWORDS: 1-*Sous vide* 2-Pasteurization 3-Beef 4-Sensory Quality 5-Shelf life

INTRODUCCION

La definición del sistema *sous vide*, dada por el Sous Vide Advisory Comitte establece: “*sous vide* es un sistema en el que los alimentos crudos o parcialmente cocidos son envasados al vacío dentro de una bolsa o recipiente de laminado plástico, cocidos-pasteurizados en un sistema controlado, enfriados en forma rápida y finalmente almacenados a temperaturas de refrigeración, particularmente entre 0-3°C” (Vaudagna y col., 2002). El envasado al vacío aporta importantes ventajas como ser retención física de componentes del flavor, nutrientes y humedad del alimento, extensión de vida útil, etc. Sin embargo, el mayor inconveniente que presenta es el riesgo microbiológico por patógenos anaerobios ó microaerófilos, particularmente *Clostridium botulinum* psicrotrofo (E, B y F no proteolíticos) y *Listeria monocytógenes* (FAIR CT96-1201, 1997).

La aplicación del sistema *sous vide* en la preparación de platos preparados en base a carne bovina, se plantea como una alternativa para incrementar el consumo de productos procesados derivados de la misma y valorizar materia prima de baja perfomance comercial (Boles y Shand, 2002) .

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de diferentes protocolos de cocción-pasteurización recomendados a nivel internacional, sobre las propiedades físicas, la calidad sensorial y microbiológica y la estabilidad durante el almacenamiento refrigerado de “Bifes a la Criolla” preparados mediante el sistema *sous vide*.

MATERIALES Y METODOS

Cada porción fue preparada con dos bifes frescos (peso unitario promedio: 263 g) obtenidos del músculo *Bíceps femoris* y salsa precocida. Esta se formuló en base a tomates frescos (57,8%), cebolla (19,3%), pimiento rojo (19,3 %), ajo (1,2%), sal (1,2%), pimentón (0,12%), orégano (0,3%), ají molido (0,13%), azúcar (0,4%) y goma xántica (0,25%). La salsa precocida se incorporó sobre los bifes frescos hasta una cantidad que repretó el 29% del peso total de la porción y el conjunto fue envasado al vacío en una bolsa *cook-in* CN510 Cryovac. En la cocción-pasteurización de las porciones se ensayaron dos tratamientos propuestos para alcanzar 6D reducciones de *L. monocytógenes*: 65°C – 9 min y 70°C – 2 min (FAIR CT96-1020,1997). Las combinaciones se aplicaron en el punto de mínimo tratamiento de los bifes (mayores detalles en Ardiles y Arias, 2003). En todos los casos el tratamiento térmico se aplicó en un autoclave con ducha de agua (Microflow Barriquand). En las porciones procesadas se evaluó la relación porcentual de pesos salsa/porción, el pH de salsa y de los bifes, la

terneza de los mismos mediante cizalla de Warner-Bratzler, los atributos sensoriales visuales y de degustación y la calidad microbiológica (metodologías detalladas Ardiles y Arias, 2003). En los ensayos sensoriales se evaluaron también porciones preparadas mediante el procedimiento tradicional de preparación de “Bifes a la Criolla” (en adelante se hará referencia a este tratamiento como Tradicional). A su vez, un total de 42 porciones procesadas con la combinación 65°C–9min fueron almacenadas en cámara de refrigeración a $1.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ para el estudio de estabilidad. Se analizaron 7 porciones por día de salida, los cuales correspondieron a los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 de almacenamiento. Las porciones fueron sometidas a análisis microbiológicos y evaluación sensorial mediante panel de degustación (mayores detalles en Ardiles y Arias, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 1 se presentan los valores correspondientes a la relación porcentual de pesos salsa/porción para los tratamientos 65 °C – 9 min y 70 °C – 2 min. También se muestra el porcentaje nominal, denominado Relación Inicial (RI), ya que esta corresponde a la relación de los pesos antes del tratamiento térmico. La relación de pesos en platos preparados listos para consumir varía entre 50 y 75 % (Miles, 2002). En función de ello, se utilizó una relación inferior en el armado de las porciones (29%), ya que se consideró que la relación incrementaría en el tratamiento térmico, lo que se comprobó experimentalmente (Fig. 1). A su vez, las relaciones correspondientes a las porciones procesadas resultaron significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$). El incremento de la relación de pesos salsa/producto se debió a que la salsa incorporó los jugos perdidos por la carne en el procesamiento térmico. Esto se vincula con el rendimiento de cocción de los bifes, parámetro que fue afectado en forma significativa ($p < 0.05$) por el tratamiento aplicado (41% para 65°C – 9min y 38,5% para 70°C – 2min).

En la Figura 2 se presentan los valores de pH de la salsa precocida y de las salsas de las porciones cocidas-pasteurizadas mediante el sistema sous vide a 65°C – 9min ó 70°C – 2min. No se observó diferencia significativas ($p > 0,05$) entre los valores de pH de las salsas correspondientes a las porciones procesadas con ambos tratamientos térmicos, sin embargo se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estos y el valor de pH de la salsa precocida. El incremento del pH de la salsa en una unidad se debió a la incorporación del jugo perdido por la carne en el tratamiento térmico. Los bifes presentaron un valor de pH de $5,55 \pm 0,07$ y $5,55 \pm 0,05$, para 65°C – 9min y 70°C – 2 min, respectivamente. El valor de pH correspondiente a la salsa precocida actuaría como barrera para el desarrollo y producción de toxina de *C. botulinum* psicrótrofo, debido a que

el pH mínimo de crecimiento es 5,0 (FAIR CT96–1020, 1997). Sin embargo, los valores de pH de la salsa y de los bifes superaron el pH mínimo de crecimiento. En función de estas observaciones y considerando que el tratamiento térmico se diseñó para inactivar células vegetativas (microorganismo indicador *L. monocytógenes*), resulta fundamental garantizar cadena de frío entre 0 y 3 °C o bien limitar la vida útil del producto.

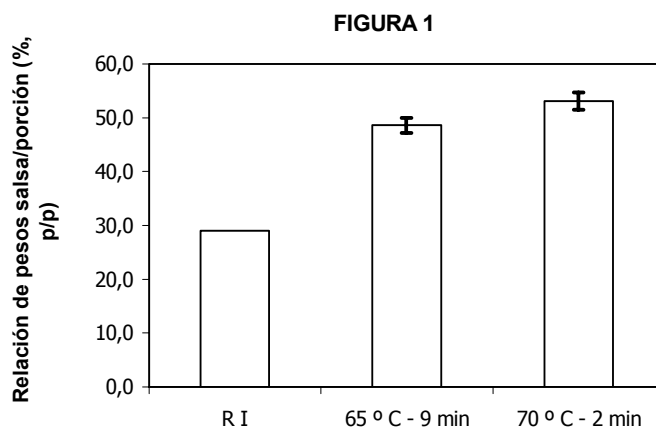


FIGURA 1: Relación porcentual de pesos salsa/porción correspondiente al valor nominal antes del tratamiento térmico (relación inicial, ri) y a las porciones del plato bifes a la criolla cocido-pasteurizado mediante el sistema *sous vide* a 65 °c – 9 min ó 70°c – 2 min.

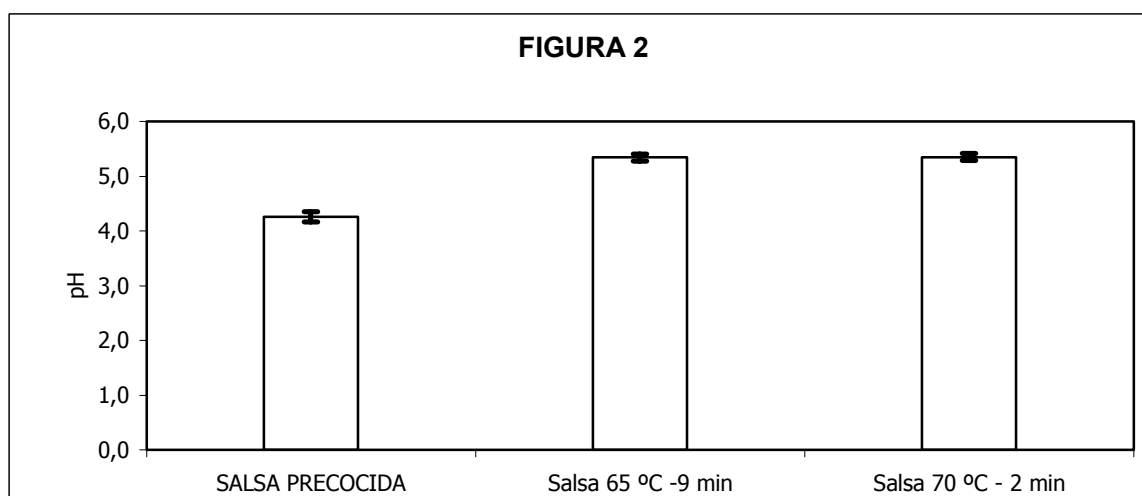


FIGURA 2: Valores de pH de la salsa precocida y de las salsas correspondientes a las porciones del plato Bifes a la Criolla cocido-pasteurizado mediante el sistema *sous vide* a 65 °C – 9 min ó 70°C – 2 min.

El tratamiento 70°C – 2min permitió reducir los recuentos de microorganismos totales viables (RTV) de 3,2 Log UFC/g (salsa precocida) a < 1,7 Log UFC/g (límite de detección de la técnica utilizada). A su vez, los recuentos correspondientes a la combinación 65 °C – 9 min (3 Log UFC/g) no se diferenciaron en forma significativa de los valores RTV

iniciales. Sin embargo, ambas combinaciones permitieron obtener valores inferiores a aquellos valores máximos (5 Log UFC/g) establecidos por la legislación de algunos países europeos para productos recién pasteurizados (FAIR CT96–1020, 1997).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el la intensidad del flavor de la salsa ni de los bifes, en ambos casos y para los distintos tratamientos, correspondió a flavor “algo intenso”. En el caso de la terneza global y de fibras se observó una clara gradación entre tratamientos, siendo la carne “tierna” en el tratamiento 70°C–2 min, “algo tierna” en el tratamiento 65 °C – 9 min y “algo dura” en el Tradicional. Con respecto a la cantidad de tejido conectivo, el tratamiento 70°C – 2 min (“trazas”) parece lograr una mayor efecto sobre el conectivo soluble que el tratamiento 65 °C – 9 min (“algo”), lo que explicaría los mayores valores de terneza observados para 70°C–2min. La jugosidad también fue favorecida por los tratamientos térmicos aplicados en el procesamiento *sous vide* en relación con el Tradicional (carne “ni seca ni jugosa” para los primeros y “algo seca” para el último). Los resultados correspondientes al atributo terneza global guardan relación con los valores de ezfuerzo al corte determinados mediante la técnica de Warner – Bratzler: 0.48 kg cm⁻², 0.52 kg cm⁻² y 0.59 kg cm⁻² para los bifes procesados mediante los tratamientos 70°C–2min, 65°C-9 min y Tradicional, respectivamente; el primero y el último valor resultaron significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Mediante análisis sensorial visual (ensayos triangulares) se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las porciones preparadas con el procedimiento Tradicional y cada uno de los tratamientos *sous vide* y también entre estos (Tabla 1).

TABLA 1: Análisis sensorial visual mediante test triangular del plato Bifes a la Criolla. Número de respuestas correctas respecto del total de respuestas, correspondiente a la comparación de los tratamientos 65°C- 9min, 70°C- 2min y Tradicional.

TRATAMIENTO	70°C - 2 min	Tradicional
70°C – 2 min	-	87/90 *
65°C– 9 min	134/180 *	86/90 *

(*) Existen diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las porciones preparadas con el tratamiento 65°C– 9min presentaron valores de los atributos Apariencia Global del Producto y Apariencia de la Salsa (Tabla 2) más altos que aquellas correspondientes a 70°C – 2 min, por lo tanto las primeras resultaron más apetecibles que las últimas (la salsa correspondiente a estas presentó pequeñas partículas blancas de grasa). A su vez, los productos preparados por ambos tratamientos presentaron valores medios de los atributos de color y de apariencia superiores a los

correspondientes al procedimiento Tradicional (Tabla 2). La salsa de los productos *sous vide* presentaron valores adecuados de consistencia, debido a la formulación de la misma con goma Xántica, a diferencia del producto Tradicional (salsa algo acuosa). Se puede concluir que el sistema *sous vide* permite preparar un producto de mejor calidad sensorial visual que el procedimiento Tradicional. A su vez, entre los tratamientos *sous vide* evaluados, el que resultó más adecuado fue la combinación 65°C – 9min.

TABLA 2: Perfil sensorial de atributos visuales del plato Bifes a la Criolla, correspondiente a la comparación de los tratamientos 65°C-9min, 70°C-2min y Tradicional.

ATRIBUTOS	TRATAMIENTOS*		
	65°C- 9min	70°C- 2 min	<i>Tradicional</i>
Intensidad del Color Global	6.11±1.40 a	5.24±1.66 b	3.41±1.06 c
Intensidad del Color Rojo Global	6.62±1.14 a	5.17±1.49 b	3.57±0.76 c
Intensidad del Color Marrón Global	4.58±1.31 a	4.84±1.74 a	3.75±1.43 b
Intensidad del Color de la Carne	3.91±1.34 a	4.03±1.45 ab	4.66±1.59 b
Intensidad del Color de la Salsa	5.62±1.36 a	5.08±1.42 b	3.28±1.32 c
Apariencia Global del Producto	5.90±1.52 a	5.07±1.19 b	4.32±1.72 c
Apariencia de la Salsa	5.94±1.55 a	4.65±1.61 b	3.55±1.33 c
Consistencia de la Salsa	6.20±1.53 a	6.25±1.41 a	1.42±0.85 b

(*) Letras diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En función de los resultados previos, se decidió realizar el estudio de estabilidad del producto procesado con el tratamiento 65°C – 9 min. Los valores de RTV oscilaron entre 2 y 3 Log UFC/g en los 35 días de almacenamiento, los cuales resultaron inferiores a los valores máximos (5 - 6 Log UFC/g) establecidos para el final de la vida útil de productos tipo *cook-chill* (FAIR CT96–1020, 1997). A su vez, no se observó desarrollo de *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* ni bacterias sulfito reductoras durante todo el período evaluado. En cada día de salida se realizó la evaluación sensorial comparando el producto almacenado bajo refrigeración con el producto recién preparado (control). En los días 0, 7, 14 y 21, no se observaron diferencias significativas entre los atributos de las porciones control y aquellos de las almacenadas (resultados no mostrados). En tanto que las porciones almacenadas durante 28 y 35 días presentaron diferencias significativas con las porciones control en los atributos Intensidad del flavor de la salsa, del ají y de la cebolla (Tabla 3). La intensidad del flavor de la salsa fue el atributo mas afectado, en el día 28 de almacenamiento el mismo fue evaluado como “intenso” en las porciones control y “algo débil” en las almacenadas (Tabla 3: valores 7.17 y 4.67, respectivamente), mientras que en el día 35 la valoración de las porciones almacenadas fue “muy débil”

(Tabla 3: 2.60). Los panelistas identificaron algunos off-flavors como abombado, ácido y amargo.

TABLA 3: Evaluación sensorial correspondiente al estudio de estabilidad de las porciones del plato Bifes a la Criolla, cocido-pasteurizado mediante el sistema *sous vide* a 65 °C – 9 min. Días 28 y 35 de almacenamiento refrigerado a 1 ± 0.5 °C.

PRODUCTO	FLAVOR SALSA		FLAVOR AJI		FLAVOR CEBOLLA		FLAVOR CARNE		FIRMEZA AJI		FIRMEZA CEBOLLA	
	DIA DE ALMACENAMIENTO*											
	28	35	28	35	28	35	28	35	28	35	28	35
CONTROL	7,17 a	4,97 a	5,92 a	5,50 a	5,90 a	3,37	5,83	5,75	3,87	4,12	3,55	2,57
PORCIONES ALMACENADAS	4,67 b	2,60 b	3,39 b	3,00 b	3,17 b	2,57	5,71	5,25	4,31	3,00	3,43	3,73

(*) Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre control y porciones almacenadas ($p < 0,05$).

En Figura 3 se presenta la Intensidad del flavor de la salsa en función del tiempo de almacenamiento. Se concluye que la estabilidad del producto Bifes a la Criolla resultó de 28 días, siendo limitada por el deterioro de los atributos sensoriales, principalmente el flavor de la salsa del producto.

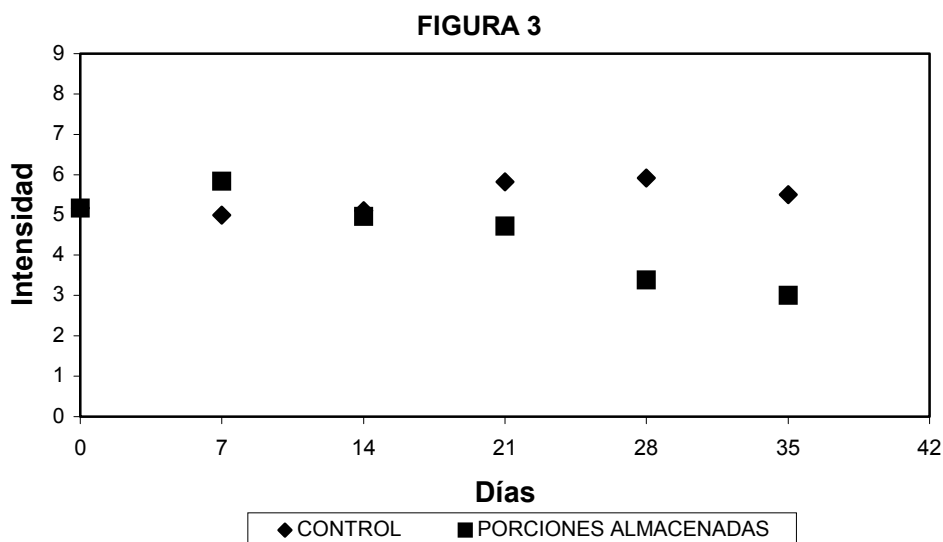


FIGURA 3: Intensidad del flavour de la salsa correspondiente al estudio de estabilidad de las porciones del plato Bifes a la Criolla, cocido-pasteurizado mediante el sistema *sous vide* a 65 °C – 9 min. Almacenamiento refrigerado a 1 ± 0.5 °C.

CONCLUSIONES

El sistema *sous vide* permitió preparar el plato “Bifes a la Criolla” con una calidad sensorial superior al obtenido con el procedimiento tradicional. Las porciones *sous vide* presentaron mejor apariencia, color, consistencia de la salsa, ternura y jugosidad de los bifes que las preparadas mediante la forma tradicional. El producto mejor ponderado fue el procesado con la combinación 65°C-9min. En las porciones *sous vide* se observó un aumento de la relación de pesos salsa/porción y del pH de la salsa debido a los jugos perdidos por la carne. La estabilidad del producto refrigerado fue de 28 días, limitada principalmente por la disminución de la intensidad de flavor de la salsa.

BIBLIOGRAFIA

Ardiles AG y Arias MN. 2003. Desarrollo de un producto alimenticio cocido-pasteurizado mediante la tecnología *sous vide*. Trabajo Final de Aplicación. Departamento de Tecnología, UNLu-Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA.

Boles JA & Shand PJ. 2002. *Journal of Muscle Foods*, 13, 25-35.

FAIR CT96-1020. 1997. Harmonization of Safety Criteria for Minimally Processed Foods. Inventory Report. Disponible en www.alma.kuleuven.ac.be.

Miles, E. 2002. Comunicación personal (edmond@miles-langley.fsnet.co.uk)

Vaudagna SR, Sánchez G, Neira MS, Insani EM, Picallo AB, Gallinger MM & Lasta JA 2002. *International Journal Food Science and Technology* 37: 425-441.

EFFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE FACTORES DE ESTRÉS APLICADOS A LA SUPERVIVENCIA DE *Staphylococcus aureus* EN RAÍCES DE MANDIOCA PRESERVADAS POR TECNOLOGÍA DE OBSTÁCULOS

BRUMOVSKY, Luis A., y FRETES, Raquel M.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Universidad Nacional de Misiones.
Félix de Azara 1552 – TE: 03752- 422186 - (3300) Posadas, Misiones. Argentina.
e-mail: lab@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto de la combinación de los siguientes factores de estrés: reducción de la actividad acuosa ($a_w = 0,95$), disminución del pH (4,0 y 4,5) y adición de sorbato de potasio y benzoato de sodio (0, 400, 800 y 1200 ppm) sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en raíces de mandioca preservadas por tecnología de obstáculos. En todas las experiencias, se redujo el número de células durante el almacenamiento hasta lograr una “auto-esterilización”.

Se observó que en raíces de mandioca preservadas por esta metodología, a una $a_w = 0,95$ y un pH = 4,0; es conveniente utilizar 800 ppm de conservantes. En estas condiciones, se produce la destrucción del inóculo entre los 2 y 3 días. A pH 4,5, el efecto estresante más significativo, se obtuvo con 1200 ppm de conservantes, requiriéndose 5 días para destruir el inóculo.

Palabras Claves: Tecnología de obstáculos, Mandioca, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The effect of the combination of the following stress factors was studied: reduction of the water activity ($a_w = 0.95$), pH decrease (4.0 and 4.5) and potassium sorbate and sodium benzoate addition (0, 400, 800 and 1200 ppm) on the survival of *Staphylococcus aureus* in cassava roots preserved by hurdle technology.

In all the experiences, the number of cells during the storage was reduced, until an “auto-sterilisation” effect was achieved.

It was observed that in cassava roots preserved by this methodology ($a_w = 0.95$ and pH = 4.0), a preservers concentration of 800 ppm was convenient. At these conditions, the inoculum was destroyed between 2 and 3 days. At pH 4.5, a more significant stressant effect was obtained with 1200 ppm of preservers, and it was necessary 5 days to destroy the inoculum.

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Misiones, se producen anualmente, alrededor de 140.000 toneladas de raíces de mandioca, destinadas al uso alimentario y a la fabricación de fécula. Desafortunadamente, el tiempo máximo de conservación de la raíz, luego de la cosecha es muy corto, aproximadamente, 2 a 3 días, produciéndose a continuación 2 tipos de deterioro, conocidos como: deterioro primario o “vascular streaking”, asociado con procesos fisiológicos endógenos (Noon y Booth, 1977) y deterioro secundario, debido a la acción de microorganismos (Booth, 1976). Luego de este periodo, la raíz se vuelve inaceptable, tanto para el consumo humano, como animal y para el uso industrial (Wenham, 1995).

Estos deterioros, constituyen un serio problema para el consumo del producto fresco, por lo que el mercado se ve reducido a zonas cercanas a la de producción, ya que la raíz se deteriora durante su distribución y/o comercialización. Por lo tanto una solución sencilla y económica a este problema, podría ser la preservación de las raíces utilizando “Tecnología de Obstáculos”.

Al desarrollar un nuevo producto, como es el caso de mandioca preservada por tecnología de obstáculos, es necesario evaluar los riesgos microbiológicos. Esto es importante, si se cuenta con escasa información sobre la conducta del microorganismo y su respuesta de crecimiento o inhibición en las condiciones del alimento en cuestión. Es posible entonces, que la aplicación del reto microbiano (inoculación y prueba), pueda proveer esta información básica y necesaria. Una bacteria patógena capaz de resistir valores de aw reducidos es *Staphylococcus aureus*, que podría contaminar el producto durante el procesamiento y representar un problema en el modelo de conservación propuesto.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la respuesta de la combinación de varios factores de estrés (aw, pH y conservantes) sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en raíces de mandioca conservada por Tecnología de Obstáculos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Raíz de mandioca: (*Manihot esculenta* Crantz), variedad blanca, procedente de Gobernador Roca, Misiones - Argentina.

Aditivos: Jarabe de maíz, sorbato de potasio, benzoato de sodio y ácido cítrico, todos de grado alimenticio. ClNa de grado analítico.

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 de la colección de cultivos de Pennsylvania State University USA.

Determinación del contenido de agua y pH: El contenido de agua de las raíces de mandioca se determinó gravimétricamente por secado en estufa de aire a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta pesada constante. El pH de las muestras de jarabe y de las raíces de mandioca se determinó mediante un medidor de pH marca ORION modelo SA 210.

Preparación del inóculo: Se preparó por repique de una colonia de *Staphylococcus aureus*, proveniente de un cultivo en placa con agar Baird-Parker en 10 ml de caldo infusión cerebro corazón, el cual se incubó a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 horas, con el fin de alcanzar una concentración de bacterias comprendida entre 10^{10} y 10^{11} ufc/ml. La concentración de la suspensión fue chequeada realizando el conteo en placas de Petri con agar Baird-Parker, por siembra en superficie de 0,1 ml. Las distintas diluciones se realizaron en agua peptonada estéril al 0,1 %.

Recuento de *Staphylococcus aureus*: Jarabe: método de recuento en placa de Petri por siembra en superficie de 0,1 ml del jarabe. Mandioca: método de recuento en placa de Petri por siembra en superficie de 0,1 ml de un homogenato de raíz de mandioca con agua peptonada estéril al 0,1 %. Las diluciones en ambos casos se realizaron con agua peptonada estéril al 0,1 %. El medio de cultivo utilizado fue agar Baird-Parker, con el agregado de yema de huevo y telurito. Se incubaron 36 ± 2 horas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Análisis estadístico: Para estudiar el efecto del pH y la concentración de conservantes en un medio de aw reducida, se utilizó un diseño factorial de dos factores sin repeticiones, realizándose 8 experiencias: Exp. 1 (pH = 4,0 y 1200 ppm de conservantes); Exp. 2 (pH = 4,0 y 800 ppm de conservantes); Exp. 3 (pH = 4,0 y 40 ppm de conservantes); Exp. 4 (pH = 4,0 y 0 ppm de conservantes); Exp. 5 (pH = 4,5 y 1200 ppm de conservantes); Exp. 6 (pH = 4,5 y 800 ppm de conservantes); Exp. 7 (pH = 4,5 y 400 ppm de conservantes) y Exp. 8 (pH = 4,5 y 0 ppm de conservantes). En todos los casos, se utilizó sorbato de K y benzoato de Na en partes iguales (50:50). La aw de todas las experiencias se redujo a 0,95 utilizando ClNa y jarabe de maíz. La temperatura de almacenamiento fue $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de las experiencias: **a)** Se preparó el jarabe adicionando la cantidad suficiente de los agentes humectantes, para obtener la actividad acuosa de 0,95; luego se agregaron los conservantes. Este jarabe se esterilizó por filtración con membrana (tamaño de poro $0,45\text{ }\mu\text{m}$) y se colocó en recipientes de vidrio estériles con tapa. **b)** Se utilizaron raíces con diámetros de aproximadamente 4 cm y se lavaron con agua potable. Después se sumergieron durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm). **c)** Se extrajo la cáscara y se las cortó en trozos de 5 cm de longitud. Luego se pesaron 200 g $\pm 0,01$ g de raíces. **d)** Se sumergieron estas raíces durante 5 minutos, en una solución de hipoclorito de sodio (150 ppm), luego se enjuagaron con abundante agua destilada

estéril y se adicionaron al jarabe preparado en el punto (a). **e)** Se ajustó el pH de las 8 formulaciones con solución de ácido cítrico (40 % p/v) hasta estabilizarlo al valor de diseño de cada experiencia. **f)** Después de alcanzado el equilibrio, se inoculó con 0,3 ml del caldo infusión cerebro corazón con las cepas de *Staphylococcus aureus*. La concentración inicial del inóculo se verificó por recuento en placa.

Las cantidades de raíz de mandioca, CINa y jarabe de maíz requeridas para producir una aw de 0,95 se calcularon a partir de balances de masa; donde la aw del jarabe de maíz se determinó a partir de un gráfico realizado por Chirife (1982), la aw del CINa se calculó por medio de la ecuación de Pitzer (1973) y la aw de equilibrio del sistema se calculó utilizando la ecuación de Ross (1975): $aw_{\text{equilibrio}} = (aw)_{\text{CINa}} \times (aw)_{\text{JM}} \times (aw)_{\text{mandioca}}$ donde $(aw)_{\text{CINa}}$ es la actividad de agua de la solución de CINa (0,96); $(aw)_{\text{JM}}$ es la actividad de agua del jarabe de maíz (0,99) y $(aw)_{\text{mandioca}}$ es la actividad de agua de la raíz de mandioca fresca, a los fines prácticos, se consideró igual a 1. Los valores de aw predichos en las formulaciones, se chequearon experimentalmente utilizando un higrómetro modelo Decagon CX-1 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). La relación “peso del jarabe / peso de raíz de mandioca” en todas las experiencias fue de 1,74.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH del jarabe de todas las experiencias se fue incrementando durante el almacenamiento, obteniéndose el mínimo incremento de 0,12 unidades de pH en la experiencia 2 y el máximo incremento de 0,38 unidades de pH en la experiencia 8.

Los recuentos de *Staphylococcus aureus* en las distintas experiencias del jarabe y la mandioca se indican en la Figura 1. Se utilizó un análisis de regresión lineal para ajustar el log (N/No) en el jarabe y el log del número de células sobrevivientes en la mandioca versus tiempo, resultando el ajuste muy significativo en todos los casos ($p < 0,01$). Los valores de los coeficientes de determinación se indican en la correspondiente figura.

En la Tabla 1 se presentan los valores de las pendientes calculadas a partir de regresión lineal con los datos de la Figura 1 (Jarabe y mandioca). En las mismas, se indican también, los valores de los límites superior e inferior de cada intervalo de confianza (al 95 %) calculados mediante el empleo del estadígrafo t de Student.

Efectuando una comparación entre los valores de las pendientes y sus intervalos

de confianza (95 %) de la Tabla 1, para el jarabe, se puede inferir lo siguiente:

A pH = 4,0 no existe diferencia significativa entre las pendientes de las experiencias 1 (1200) y 2 (800) ni entre las experiencias 3 (400) y 4 (0 ppm). En cambio se observan

diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 1 (1200) y 3 (400); 1 (1200) y 4 (0 ppm); 2 (800) y 3 (400); y 2 (800) y 4 (0 ppm).

Tabla 1 – Valor promedio de la pendiente, error estándar (Sb), límites máximo (Ls) y mínimo (Li) del intervalo de confianza (95 %) de dicha pendiente, para el jarabe y mandioca de cada experiencia

Experiencia	pH-ppm	Jarabe				Mandioca			
		Pendiente	Sb	Ls	Li	Pendiente	Sb	Ls	Li
1	4,0 - 1200	-2,679	0,114	-2,363	-2,995	-1,041	-	-	-
2	4,0 - 800	-1,850	0,210	-1,267	-2,433	-0,862	0,066	-0,578	-1,146
3	4,0 - 400	-0,574	0,047	-0,459	-0,689	-0,375	0,029	-0,250	-0,500
4	4,0 - 0	-0,547	0,038	-0,454	-0,640	-0,373	0,033	-0,231	-0,515
5	4,5 - 1200	-1,031	0,064	-0,866	-1,196	-1,015	0,043	-0,829	-1,202
6	4,5 - 800	-0,704	0,060	-0,562	-0,846	-0,469	0,033	-0,327	-0,611
7	4,5 - 400	-0,620	0,043	-0,515	-0,725	-0,368	0,044	-0,179	-0,557
8	4,5 - 0	-0,414	0,026	-0,350	-0,478	-0,283	0,037	-0,165	-0,401

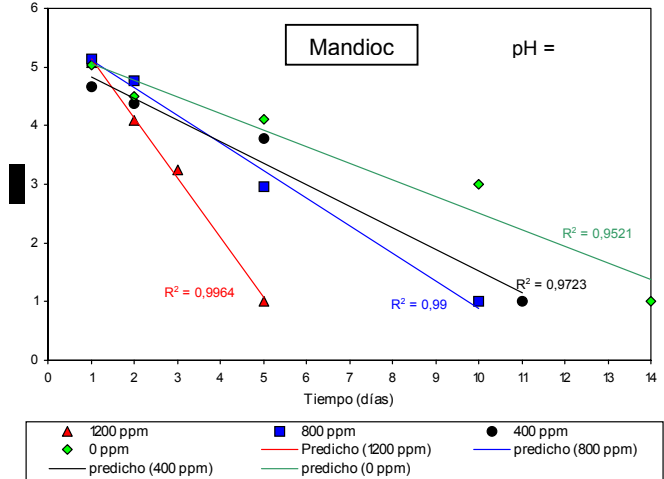
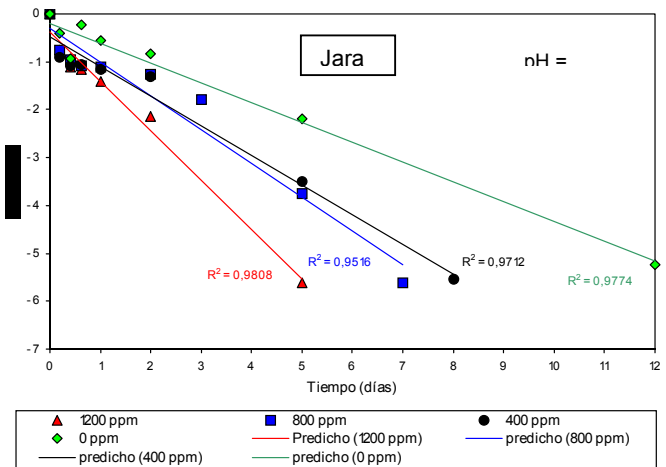
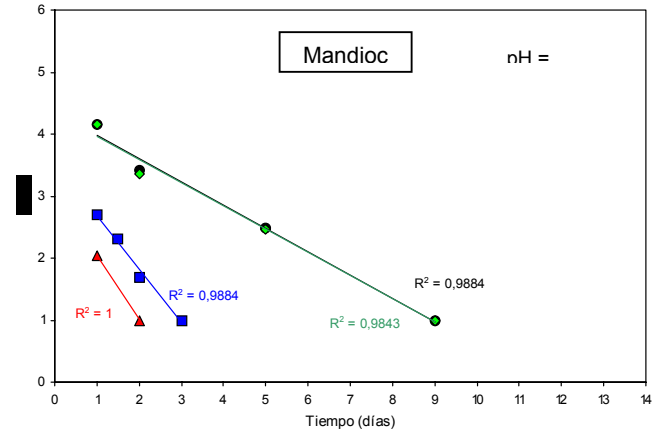
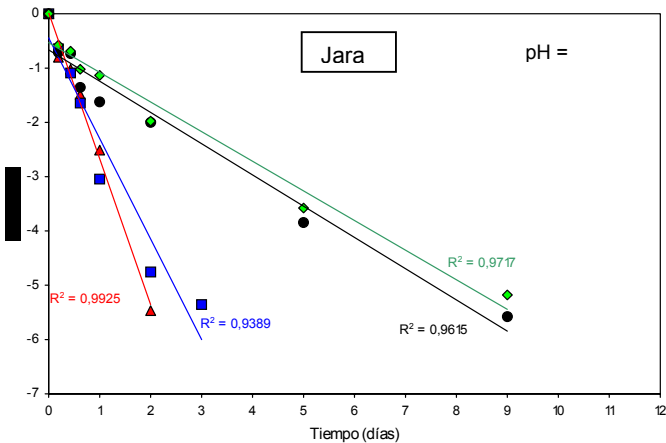
A pH = 4,5 se observa que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 6 (800) y 7 (400). En cambio se aprecian diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 5 (1200) y 6 (800); 5 (1200) y 8 (0 ppm); y entre las experiencias 6 (800) y 8 (0 ppm).

Efectuando una comparación entre las pendientes de las experiencias a diferentes valores de pH se puede ver que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 3 (400), 4 (0 ppm) a pH = 4,0 y las experiencias 6 (800), 7 (400), 8 (0 ppm) a pH = 4,5. En cambio se observan diferencias significativas entre la experiencia 2 (pH = 4,0 - 800) y la 5 (pH = 4,5 - 800).

La mayor inhibición en el jarabe se presenta en las experiencias 1 (pH = 4,0 - 1200 ppm) y la 2 (pH = 4,0 - 800), presentando estas dos experiencias, equivalente efecto estresante en la disminución del número de células supervivientes. Es decir, a pH = 4,0 no habría diferencia en utilizar 1200 ppm de conservantes que 800 ppm.

Efectuando un análisis similar (comparación de valores de pendientes y sus correspondientes intervalos de confianza) de la Tabla 1, para la mandioca, se puede observar que a pH = 4,0 no existen diferencias significativas entre la pendiente de la

experiencia 1 (1200) y la 2 (800) y entre la 3 (400) y 4 (control A). Sin embargo se observan diferencias significativas entre las experiencias 2 (800); 3 (400) y 4 (0 ppm). A pH = 4,5 se observa diferencias significativas entre la experiencia 5 (1200) y las experiencias 6 (800); 7 (400) y 8 (0 ppm). Sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre las experiencias 6 (800); 7 (400) y 8 (0 ppm).



Si se observan los resultados, para diferentes valores de pH, se puede inferir que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias efectuadas con concentraciones de 400, 800 y 1200 entre ambos valores de pH. Tampoco se observan diferencias significativas entre las pendientes de la experiencia 2 (pH = 4,0 – 800 ppm) y la experiencia 5 (pH = 4,5 – 1200 ppm), lo que significa que estas dos últimas experiencias tendrían equivalente efecto estresante sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSIONES

En todas las experiencias se redujo el número de células de *Staphylococcus aureus* durante el almacenamiento, hasta lograr un efecto de “auto-esterilización” el que fuera reportado por Leistner (1995).

Los resultados, indicaron que en formulaciones de mandioca preservadas por esta metodología a una $a_w = 0,95$ y un pH de diseño igual a 4,0; es conveniente utilizar una concentración de 800 ppm de conservantes en vez de 1200 ppm. Esto se cumplió tanto para el jarabe como para la mandioca. Además, a este pH, se produce la destrucción del inóculo en el jarabe y en la mandioca entre los 2 y 3 días. A las otras concentraciones estudiadas y al mismo pH, las cepas de *Staphylococcus aureus* sobrevivieron 9 días en el jarabe y la mandioca. Por lo tanto, la destrucción del inóculo, sigue el mismo patrón en el jarabe y en la raíz a pH 4,0 y a los 4 niveles de concentración de conservantes estudiados.

A pH 4,5 y utilizando 1200 ppm de conservantes, se obtuvo un efecto estresante más significativo que a las otras concentraciones estudiadas; esto se observó en el jarabe como en la raíz de mandioca. Por lo tanto, en formulaciones de pH = 4,5 la concentración de 1200 ppm (sorbato de K y benzoato de Na; 50:50) sería la más adecuada. En estas condiciones, se requirió 5 días para destruir el inóculo del jarabe y mandioca. A las concentraciones menores, en la raíz de mandioca se requirieron entre 10 y 14 días para destruir el inóculo.

BIBLIOGRAFÍA

-Alzamora, S. M. 1997. Preservación I – Alimentos Conservados por factores combinados. En Temas en Tecnología de Alimentos. Editorial Alfaomega. Capítulo 2. Volumen 1.

-Booth, R. H. 1976. Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta*). I. Post-harvest deterioration and its control. Expl. Agric. 12, p. 103 -111.

-Chirife, J. 1982. Principios de la deshidratación osmótica de frutas. Anales Asociación. Química Argentina, 70, p. 913 - 932.

-Leistner, L. and Gorris, L. G. M. 1995. Food preservation by hurdle technology. Trends in Food Science & Technology. 6, p. 41 - 46.

-Leistner, L. 1995. Principles and applications of hurdle technology. In: New Methods of Food Preservation. Edited by Gould, G. W. Blackie Academic & Profesional. Chapter 1.

- Noon, R. A. and Booth, R. M. 1977.** Nature of post-harvest deterioration of cassava roots, Transaction of the British Mycological Society. 69, p. 287 -290.
- Pitzer, K. S. 1973.** Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. J. Phys. Chem. 77, p. 268.
- Ross, K. D. 1975.** Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technol. 29 (3), p. 26 - 30.
- Troller, J. A. 1985.** Effect of aw and pH on growth and survival of *Staphylococcus aureus*. En: Properties of water in Foods in Relation to Quality and Stability. Ed. D. Simatos and J. L. Multon M. Nijhoff Publishers, p. 247.
- Wenham, J. E. 1995.** Post-harvest deterioration of cassava. A biotechnology perspective. Natural Resources Institute. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Chapter 1 and 2.

INACTIVACIÓN DE *Listeria innocua* POR APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS EN CONCENTRADO PROTEICO DE SUERO LÍQUIDO (CPSL): EFECTO DEL INÓCULO INICIAL

GALLO Luciana I.², PILOSOF Ana M.R.^{1,3} y JAGUS Rosa J.^{2*}

¹Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

²Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina. Fax: 01541-4576-3241 *rjagus@di.fcen.uba.ar

³Miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).

RESUMEN

Se estudió la influencia del inóculo inicial de *Listeria innocua* sobre la efectividad del tratamiento de pulsos eléctricos (PEF) en concentrado proteico de suero líquido (CPSL). El grado de inactivación describió una relación lineal con el logaritmo decimal de la concentración inicial de bacterias (N_0), estudiado a distintas condiciones de PEF, independientemente de la fase de crecimiento del microorganismo. A su vez, la reducción microbiana muestra una relación no lineal de tipo exponencial con la energía aplicada (Q) en el tratamiento, evaluada a distintos inóculos iniciales de *L.innocua*. El aumento de la concentración inicial de bacterias resultó en un aumento de la constante de inactivación y de la máxima reducción alcanzada. De esta forma, las respuestas observadas indican que la inactivación de *L.innocua* en CPSL por aplicación de PEF aumenta linealmente con el aumento del N_0 , confirmándose un comportamiento similar a través del parámetro Q .

Palabras Claves: suero líquido, pulsos eléctricos, *Listeria innocua*, inóculo inicial.

ABSTRACT

In this study, the influence of *Listeria innocua* inoculum size on the efficacy of pulsed electric fields (PEF) treatments in liquid whey protein concentrate (CPSL) was investigated. The level of inactivation was linearly related to the decimal logarithm of the initial concentration of cells (N_0), being this behavior independent of the microorganism growth phase. Moreover, the microbial reduction showed a non-linear relationship with respect to the total energy applied (Q) in the treatment, describing an exponential curve for the different N_0 evaluated. The increase on the initial cell concentration resulted in an increase on the inactivation constant and on the maximum reduction. In this way, the

observed results showed that the inactivation of *L.innocua* in CPSL by PEF treatment increase linearly with the increase of No. Similar behaviors were observed when the Q parameter was applied.

INTRODUCCIÓN

El concentrado proteico de suero líquido obtenido a la salida de los procesos de membrana puede ser incorporado directamente en la elaboración de alimentos, si es adecuadamente conservado. Actualmente, los consumidores reclaman alimentos más naturales y frescos, al percibir estas cualidades como más saludables. La tecnología de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad, o PEF (del inglés, "Pulsed Electric Fields") es una tecnología emergente no térmica que está siendo activamente estudiada. Implica la descarga de pulsos cortos de campos eléctricos de una intensidad entre 2-87 kV/cm, con una duración de micro a milisegundos (Barsotti et al., 1999; Góngora-Nieto et al., 2002).

El tratamiento de PEF, en buffer o en leche, permite reducir de 1 a 9 órdenes de magnitud el número de microorganismos contaminantes que resultan sensibles a este tratamiento (Barbosa et al., 1998; Wouters and Smelt, 1997). La inactivación microbiana, es causada principalmente por cambios en la estructura y en la permeabilidad de la membrana (Góngora-Nieto et al., 2002).

La energía total aplicada (Q) es un parámetro que integra los factores de mayor relevancia del proceso y está determinada por la ecuación:

$$Q = n \times \sigma \times \tau \times E^2 \quad (1)$$

donde n representa el número de pulsos aplicados; σ , la conductividad del sistema (S/cm); τ , el tiempo de decaimiento (μseg); y E, la intensidad de campo aplicada (V/ μm).

El tipo de microorganismo, como así también el estado o fase de crecimiento, el número inicial de microorganismos, el tamaño y forma del mismo, poseen gran influencia sobre el grado de inactivación en el procesamiento de PEF (Wouters et al., 2001).

En general, varios autores han demostrado que las células en fase estacionaria son más resistentes que las células en fase logarítmica frente a tratamientos físicos o de estrés. En la fase logarítmica de crecimiento, una gran proporción de células están en activa división. En esta etapa, la membrana de las células resulta más sensible a la aplicación de pulsos eléctricos (Hülshager et al., 1983, Pothakamury et al., 1996; Wouters et al., 1999).

El número de microorganismos presentes en el alimento también afecta la reducción microbiana al aplicar un tratamiento de PEF. Sin embargo, algunos autores no han encontrado diferencias significativas en la inactivación microbiana con el aumento del

inóculo inicial de microorganismos (Barbosa-Cánovas et al., 1998; Zhang et al., 1995). Recientemente, investigaciones realizadas con *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que un aumento en la concentración inicial de levaduras aumenta la efectividad del tratamiento de PEF, independientemente de la fase de crecimiento en la que se encuentre la levadura (Molinari et al., 2004).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia del inóculo inicial de *Listeria innocua* sobre la efectividad del tratamiento de PEF en concentrado proteico de suero líquido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo utilizado

La especie utilizada fue *Listeria innocua* (CIP 8011- CCMA 29- Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Bs.As.).

Preparación de las muestras

Una alícuota de un precultivo de 16-18 horas de incubación a 28°C fue transferida a un caldo fresco de triptona de soja enriquecido con extracto de levadura (TSYE) e incubado hasta la densidad poblacional inicial deseada para cada tratamiento.

Alícuotas de 20ml del cultivo inoculado fueron centrifugadas durante 30 minutos a 10.000xg y el pellet de células fue resuspendido en el mismo volumen de CPSL de 8g/l, preparado a partir de WPC (WPC34 en polvo, 36% proteínas, provisto por Williner S.A.).

Tratamiento de campos eléctricos de alta intensidad (PEF)

Las cubetas conteniendo 400µl de la suspensión de *L.innocua* a tratar fueron expuestas a las distintas condiciones de PEF (equipo Gene Pulser II Electroporation System, BIO-RAD): a) PEF1: 12 kV/cm de campo eléctrico, 3 µF de capacitancias, correspondiente a 0,12 mseg de tiempo de decaimiento (τ), y 60 pulsos; y b) PEF2: 10 kV/cm de campo eléctrico, 50 µF de capacitancias, correspondiente a 2 mseg de tiempo de decaimiento (τ), y 10 pulsos. Durante el tratamiento, las muestras se mantuvieron en un baño de agua-hielo para evitar un aumento de la temperatura. Luego del tratamiento, una alícuota de esta suspensión fue centrifugada durante 20 minutos y el pellet resuspendido en agua peptonada para luego realizar el recuento en placa de células viables en agar TSYE, según el método de la gota.

Las placas fueron incubadas durante 24-48hs a 37°C. Las colonias resultantes se informan como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras de los gráficos representan la desviación estándar de cada promedio.

El efecto de los distintos tratamientos se evaluó mediante el test t-student y las interacciones mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey-Kramer, considerando significativo un valor de $P < 0,05$ (InStat v3.03, GraphPad Software Inc).

La correlación entre la reducción microbiana y el logaritmo del inóculo inicial (N_0) fue analizada por un ajuste lineal a los datos experimentales. La bondad de ajuste de los datos fue analizada a través del análisis del coeficiente de correlación (R^2) (Prism v4.01, GraphPad Software Inc., 2004) ($P < 0,05$).

La ecuación exponencial siguiente se utilizó para el ajuste no-lineal a los datos experimentales de inactivación microbiana en función de la energía de aplicación del tratamiento (Prism v4.01, GraphPad Software Inc, 2004):

$$\begin{aligned} \text{Log} (N/N_0) &= a, & Q < Q_0 \\ \text{Log} (N/N_0) &= b + (a - b) \exp (- K (Q - Q_0)), & Q > Q_0 \end{aligned} \quad (2)$$

donde $\text{Log} (N/N_0)$ representa la reducción microbiana, a el plateau o lag de inactivación, b la máxima reducción al que tiende la caída exponencial, K la constante de inactivación, Q la energía aplicada y Q_0 la mínima energía aplicada necesaria para superar el plateau o lag.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra simultáneamente las curvas de crecimiento e inactivación de *L.innocua* por aplicación de PEF en las distintas fases de crecimiento. El aumento del número de células se expresa como el logaritmo decimal de UFC/ml en el tiempo (Figura 1a) o como unidades de densidad óptica (DO, 540nm) (Figura 1b). En ambos casos, la reducción de células viables obtenida a partir de la aplicación del tratamiento de PEF (condición PEF1) se expresa como $\log (N/N_0)$. Al comienzo de la fase exponencial, el tratamiento resultó poco efectivo, lográndose una reducción de 0,5 ciclos log. A medida que avanzó la fase logarítmica de crecimiento, la inactivación microbiana fue aumentando, llegando a una etapa de máxima efectividad al finalizar la fase logarítmica, donde alcanzó una reducción de 2 ciclos log. Esta respuesta indicaría que el tratamiento por PEF es más efectivo en la fase estacionaria que en la fase logarítmica. Hacia el final del período evaluado, las oscilaciones en la reducción se corresponden con las oscilaciones en la concentración de las células medidas por el recuento y no por la DO.

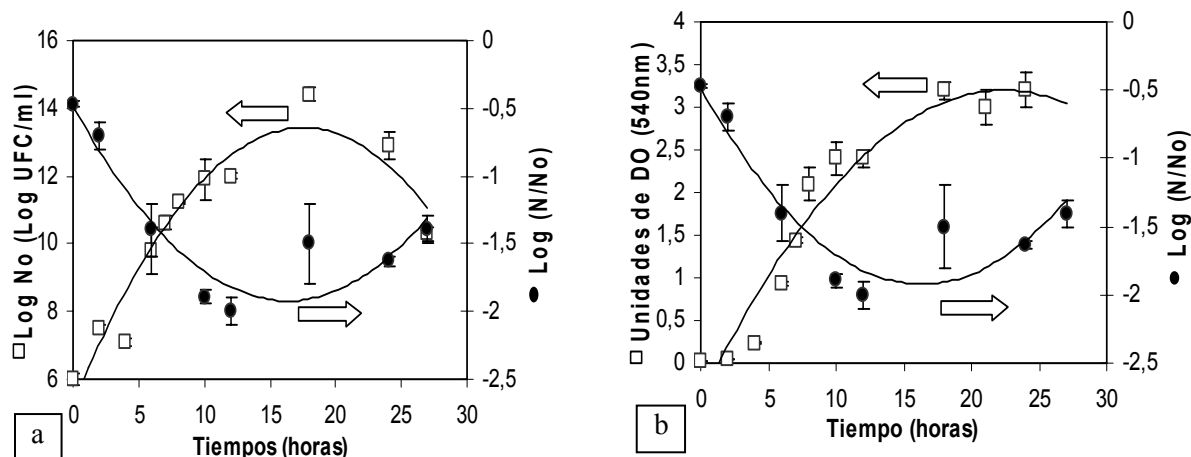


Figura 1.- Curvas de crecimiento (cuadros) e inactivación (círculos) por aplicación de PEF a *L.innocua* en las distintas fases de crecimiento. En **a** el crecimiento se midió por recuento de UFC/ml; y en **b**, por densidad óptica (DO, 540nm). Para el tratamiento de PEF se resuspendieron las células en CPSL (8g/l; pH 5,5). *No* representa el recuento de células viables antes del tratamiento de PEF1 y *N*, el recuento de células luego del tratamiento de PEF.

La Figura 2 muestra la respuesta frente a dos tratamientos de PEF en CPSL con inóculos iniciales distintos (*No*): a) 1×10^{10} UFC/ml; b) 1×10^8 UFC/ml obtenida a partir de una dilución de un cultivo de 1×10^{10} UFC/ml; y c) 1×10^8 UFC/ml, sin diluir. El mayor inóculo mostró una mayor reducción y la reducción es igual para igual *No*, independientemente de la procedencia de las células, es decir, de la fase de crecimiento.

Además se encontró una correlación lineal positiva entre el grado de inactivación en dos condiciones de PEF y la concentración inicial de bacterias ($\log No$) presentes al momento de la aplicación del tratamiento ($R^2 = 0.9864$ y 0.9219 , para los tratamientos PEF1 y PEF2 respectivamente), siendo mayor la pendiente al aplicar el tratamiento PEF2 ($-0,3402$ y $-0,4887$ para PEF1 y PEF2 respectivamente). Los parámetros de mayor relevancia en la optimización del procesamiento por PEF resultan englobados en un único parámetro como la energía aplicada (*Q*, ecuación 1). La variación de los parámetros del proceso considerados modifica la energía aplicada, afectando la efectividad del tratamiento. Se evaluó el efecto de *Q* para dos condiciones de recuento inicial de *L. innocua* en CPSL (pH 6). La Figura 3 muestra que la efectividad del tratamiento de PEF depende de *Q* en el rango estudiado, siendo más efectiva a mayor energía aplicada. Sin embargo, al ajustar los datos experimentales a la ecuación 2, se observa que por encima de un cierto valor de *Q* (por ejemplo, 1,5 kJ/ml) no se produce un aumento ulterior en la inactivación. A su vez, se logran distinguir dos curvas diferenciadas de acuerdo al recuento inicial de células: 2×10^8 y 2×10^{10} UFC/ml.

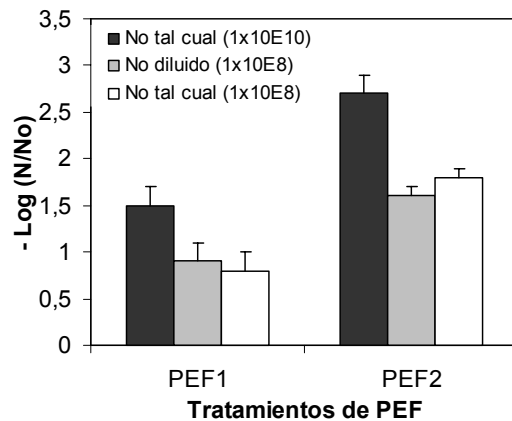


Figura 2.- Inactivación de *L.innocua* en CPSL (pH 6) por aplicación de PEF1 y PEF2 a 3 tipos de inóculos iniciales (No).

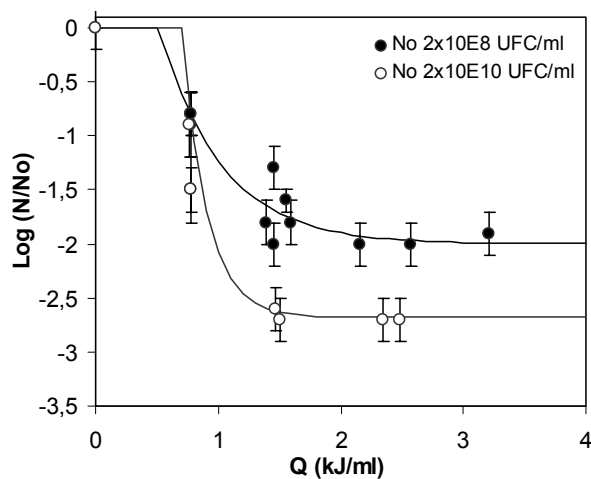


Figura 3.- Inactivación de *L.innocua* en CPSL (pH 6) por aplicación de PEF en función de la energía total aplicada (Q, medido en kJ/ml), a 2 concentraciones de inóculo inicial. Las líneas representan el ajuste no lineal de los datos experimentales (círculos) a la ecuación 2.

El aumento de la concentración microbiana inicial resultó en un aumento de la constante de inactivación (K, de 2 a 5 ml/kJ) y en un aumento de la máxima reducción alcanzada (de -2 a -2,7 ciclos log) (Tabla 1). Los resultados anteriores confirman que una mayor concentración de células produce un aumento en la efectividad del tratamiento de PEF. Un efecto similar se observó para *L.innocua* en caldo TSYE (datos no mostrados). En su conjunto, las respuestas observadas indican que la inactivación de *L.innocua* por aplicación de PEF aumenta linealmente con el aumento del inóculo inicial de microorganismos, confirmándose el comportamiento a través del parámetro integrador Q. Si bien, varios investigadores han descrito que la efectividad de PEF en la inactivación de *E.coli* y *L.innocua* resulta mayor en la fase exponencial de crecimiento (Pothakamury et al., 1996; Wouters et al., 1999; Alvarez et al., 2000), recientemente, Molinari et al.

(2004), han mostrado resultados similares a los presentados en esta investigación, encontrando una dependencia lineal entre el inóculo inicial de *S.cerevisiae* y su inactivación por la aplicación de PEF. Esta respuesta puede explicarse mediante la formación de células equivalentes resultantes de la alta concentración de células y el aumento en la atracción electrostática entre las mismas generado por la formación de dipolos frente a un campo eléctrico externo. Las células equivalentes responden ante la aplicación de PEF como células de mayor tamaño. Se ha mostrado que el efecto del campo eléctrico aplicado depende del tamaño celular, siendo este más efectivo en las células de mayor tamaño (Heinz et al., 2002). Si consideramos que las células que están en contacto son físicamente equivalentes a una sola célula de mayor tamaño, la mayor concentración de células daría lugar a la formación de células equivalentes mostrando por lo tanto mayor sensibilidad al tratamiento de PEF.

Tabla 1.- Parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales representados en la curva log (N/No) vs. Q al modelo exponencial (ecuación 2).

Log No	Parámetros				
	Q ₀	a	b	K	R ²
8	0.52 ± 0.09	0.0 ± 0.2	-2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.7	0.8903
10	0.74 ± 0.01	0.0 ± 0.1	-2.7 ± 0.1	5 ± 0.7	0.9633

a: plateau o lag de inactivación, b: reducción máxima al que tiende la caída exponencial, K: constante de inactivación, Q: energía aplicada y Q₀: mínima energía aplicada necesaria para superar el plateau o lag.

CONCLUSIÓN

L.innocua resultó ser resistente al tratamiento de PEF siendo posible reducir como máximo 3 ciclos log utilizando el Gene Pulser y aplicando una energía de 1,4kJ/ml.

En el medio utilizado y en las condiciones evaluadas en el presente trabajo se encontró que la inactivación de *L.innocua* aumenta con la concentración inicial de la misma, independientemente de la fase de crecimiento, describiendo un comportamiento similar al reportado en *S.cerevisiae* en jugos (Molinari et al., 2004).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por la Universidad de Buenos Aires y la Fundación Antorchas, Argentina.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, I., Raso, J., Palop, A. and Sala, F.J. (2000).** Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* (55): 143-148.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E. and Swanson, B.G. (1998).** Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker Inc., USA.
- Barsotti, L., Merle, P. and Cheftel, J.C. (1999).** Food processing by pulsed electric fields I. Physical aspects. *Food Res. Int.* (15): 163-180.
- Góngora-Nieto, M.M., Sepúlveda, D.R., Pedrow, P, Barbosa-Cánovas, G.V. and Swanson, B.G. (2002).** Food processing by pulsed electric fields: treatment delivery, inactivation level and regulatory aspects. *Lebensm. Wiss. U-Technol.* (35): 375-388.
- Heinz, V., Alvarez, I., Angerbach, A. and Knorr, D. (2002).** Preservation of liquid foods by high pulsed electric fields-basic concept for process design. *Trends in Food Science and Technol.* (12): 103-111.
- Hulsheger, H., Potel, J. and Niemann, E.G. (1983).** Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environm. Biophys.* (22): 149-162.
- Molinari, P., Pílosof, A.M.R. and Jagus, R.J. (2004).** Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices by pulsed electric fields. *Food Res. Int.* (37): 793-798.
- Pothakamury, U.R., Vega-Mercado, H., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V. and Swanson, B.G. (1996).** Effect of growth stage and temperature on inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields. *J. Food Protect.* (59): 1167-1171.
- Wouters, P.C. and Smelt, J.P.P. (1997).** Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: potential for food preservation. *Food Biotechnol.* (11): 193-229.
- Wouters, P.C., Dutreux, N., Smelt, J.P.P. and Lelieveld, H.L.M. (1999).** Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Appl. Environm. Microbiol.* (65): 5364-5371.
- Wouters, P.C., Alvarez, I. and Raso, J. (2001).** Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Sci. Technol.* (12): 112-121.
- Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V. and Swanson, B.G. (1995).** Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *J. Food Engineering* (25): 268-281.

INACTIVACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO: CURVAS DE RESPUESTA A LA DOSIS

RAFFELLINI, Silvia¹; GUERRERO, Sandra²; ALZAMORA, Stella^{2*}.

¹ Dpto. de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, 6700 Luján, Argentina.

² Dpto. de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina. Tel/Fax 011-4576-3495/3366 alzamora@ciudad.com.ar

RESUMEN

El empleo de hipoclorito para desinfección de vegetales suele cuestionarse por los derivados clorados carcinogénicos que pudieran producirse. Un desinfectante alternativo propuesto es peróxido de hidrógeno. El objetivo del trabajo fue modelar mediante curvas de respuesta a la dosis el efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* de distintas concentraciones de H₂O₂ a diferentes pH.

Los ensayos de inactivación se realizaron inoculando *E. coli* ATCC 35218 en buffer (pH 3,0 á 7,2) con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0,0 á 3,0%p/v), a 25°C.

La inactivación del microorganismo se incrementó a menor pH y mayores tiempos de tratamiento. Para evaluar respuesta a la dosis se aplicaron modelos tradicionales (por ejemplo, log sobrevivientes *versus* concentración × tiempo) y modelos basados en la ecuación de Fermi. En general los modelos tradicionales correlacionaron pobremente la respuesta observada mientras que la ecuación tipo Fermi tuvo mejor desempeño, permitiendo evaluar adecuadamente la influencia del pH y el tiempo de tratamiento.

Palabras Clave: peróxido de hidrógeno, *Escherichia coli*, ecuación de Fermi

ABSTRACT

The use of hypochlorite for disinfecting raw fruits and vegetables is questionable due to the potential formation of carcinogenic chlorinated byproducts. Hydrogen peroxide has been proposed as an alternative sanitizer. The objective of this work was to model by dose-response curves the effect of different H₂O₂ concentrations at different levels of pH against *Escherichia coli*. Inactivation experiments were carried out by inoculation of *E. coli* ATCC 35218 in buffer solutions (pH 3.0 to 7.2) with different H₂O₂ concentration (0 to 3.00% w/v) and subsequent incubation at 25°C. The inactivation of *E. coli* increased as pH decreased and exposure time increased. Traditional models (e.g. log of surviving microorganisms vs. concentration x time) and models based on the Fermi equation were applied. Generally,

the traditional models showed low correlation with the observed responses while Fermi equation showed a better performance and allowed to evaluate adequately the influence of the pH and the exposure time.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales frescos son vulnerables a la contaminación y subsiguiente supervivencia y desarrollo de microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Habitualmente, estos productos son sometidos a desinfección mediante lavados con hipoclorito de sodio. Sin embargo, debido al reducido efecto antibacteriano del hipoclorito al ser aplicado sobre los alimentos y a los probables efectos adversos por los derivados orgánicos clorados potencialmente carcinogénicos que se pueden producir cuando reacciona con materia orgánica, existe interés a escala internacional en el empleo de productos desinfectantes alternativos. Uno de los productos propuestos es el peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno puede tener efecto letal o inhibitorio sobre los microorganismos, acción que depende de las condiciones ambientales (por ejemplo, pH y temperatura) bajo las cuales se produce la aplicación del mismo (Beuchat, 2000). Su toxicidad se atribuye a su acción como intermediario en la reducción del oxígeno para generar formas de oxígeno más reactivas (Juven and Pierson, 1996).

A través de los años, se han sugerido una gran variedad de aplicaciones del H_2O_2 en la industria alimentaria para aprovechar sus propiedades antimicrobianas. Sin embargo, se necesita contar con investigaciones sistemáticas que permitan optimizar su utilización. Mientras que las cinéticas de inactivación microbiana por tratamientos térmicos han sido ampliamente estudiadas, es relativamente escasa la información reportada que aporta datos cuantitativos sobre tratamientos no térmicos y la influencia de las condiciones ambientales sobre el efecto de los mismos.

El objetivo del presente trabajo fue modelar, mediante curvas de respuesta a la dosis, el efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* de distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno aplicadas a diferentes valores de pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo, medios, condiciones de cultivo y preparación del inóculo

La cepa *Escherichia coli* ATCC 35218 fue repicada semanalmente en Caldo Triptona Soja (TSB; DIFCO, USA) y Agar Triptona Soja (TSA; DIFCO, USA) (incubación 24 h a 37°C) y almacenada a 4°C. El inóculo a emplear en los ensayos de inactivación fue preparado en

TSB: las células de *E. coli* se cultivaron a 37°C hasta la fase estacionaria de crecimiento, se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril (0,85% p/v ClNa) y se concentraron 10 veces. 1 ml de esta suspensión concentrada se inoculó en 99 ml de cada uno de los sistemas ensayados (población bacteriana inicial $\approx 7,5 \log \text{ UFC/ml}$)

Ensayos de inactivación y recuento de sobrevivientes

Los ensayos de inactivación se realizaron inoculando las células de *E. coli* ATCC 35218 en buffer ácido cítrico– Na_2HPO_4 (pH 3,0 – 4,4 – 5,8 – 7,2) con diferentes concentraciones de H_2O_2 (0,0 á 3,0% p/v) (p.a., FNAVI, Argentina) a 25°C. El pH de cada tratamiento se midió con pHmetro (METTLER TOLEDO, modelo 220, USA) y la concentración de H_2O_2 se monitoreó por titulación con permanganato de potasio (p.a., MALLINCKRODT, USA) (Kolthoff y col., 1979).

Para cuantificar las células sobrevivientes, se tomaron periódicamente alícuotas (1000 μl) de cada sistema inoculado, se neutralizaron con 9 ml de una solución 4% p/v $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, Alemania) buffereada, se hicieron diluciones decimales en de agua peptonada 0.1% p/v y se realizaron los recuentos en placas de Agar para Recuento en Placas (PCA, BIOKAR, Francia), las que se incubaron a 37°C durante 48 h (dos placas por cada dilución). Cada ensayo de inactivación se realizó por triplicado y se reportan los promedios. Las curvas de supervivencia experimentales se representaron como el logaritmo de la fracción de sobrevivientes (N/N_0) en función del tiempo.

Modelado matemático

Para evaluar la respuesta a la dosis se aplicaron modelos lineales ($\log N/N_0$ versus concentración \times tiempo, y $\log N/N_0$ versus concentración \times tiempo $\times \text{pH}^{-1}$) y un modelo basado en la ecuación de Fermi (la cual representa una función de forma sigmoidea que es la imagen especular de la función logística). La expresión matemática de la ecuación de Fermi es:

$$S(X) = 1 / \{1 + \exp[(X - X_c) / a]\} \quad (1)$$

donde $S(X)$ es la fracción de microorganismos sobrevivientes; X es la dosis de agente letal; X_c es una dosis característica que marca el punto de inflexión de $S(X)$ y que corresponde al 50% de mortalidad (nivel de X donde la mitad de la población sobrevive) y a es una constante que tiene las mismas unidades de X y constituye una medida de la pendiente de la curva de supervivencia $S(X)$ alrededor de X_c (Peleg, 1996).

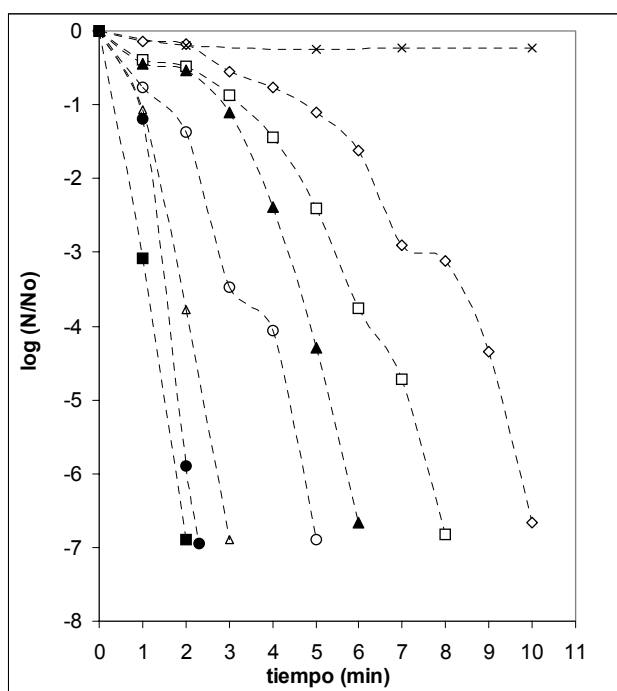
Análisis estadístico

Los análisis de varianza y de comparaciones múltiples (test de mínimas diferencias significativas de Fisher) y las regresiones se realizaron usando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (Washington, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presentan, a modo de ejemplo, las curvas de supervivencia experimentales de *E. coli* obtenidas durante 10 minutos de exposición a diferentes concentraciones de H₂O₂ a los dos niveles extremos de pH ensayados, 7,2 (Fig 1a) y 3,0 (Fig 1b) (los datos a pH 4,4 y 5,8 no se muestran). La inactivación del microorganismo se incrementó a menores valores de pH y a mayores tiempos de tratamiento.

a)



b)

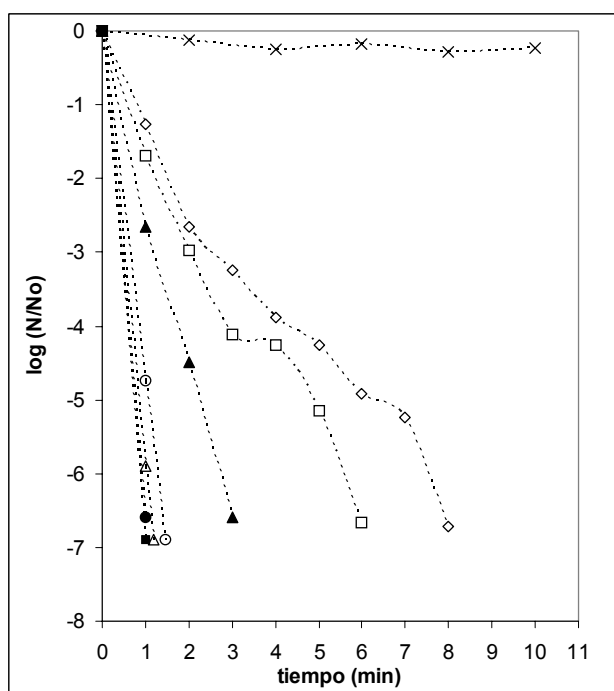


Figura 1: Curvas experimentales de inactivación de *E. coli* expuesta durante 10 minutos a diferentes concentraciones de H₂O₂ a pH 7,2 (a) y pH 3,0 (b). Referencias: Control (0% H₂O₂) (X); 0,50% p/v H₂O₂ (◇); 0,75% p/v H₂O₂ (□); 1,00% p/v H₂O₂ (▲); 1,50% p/v H₂O₂ (○); 2,00% p/v H₂O₂ (Δ); 2,50% p/v H₂O₂ (●); 3,00% p/v H₂O₂ (■)

A las mayores concentraciones de H₂O₂, la población de *E. coli* decayó a niveles no detectables dentro de 1 – 2 minutos de exposición a todos los pH ensayados. A medida que la concentración de H₂O₂ decreció, la influencia del pH aumentó. Por ejemplo, cuando se expuso a *E. coli* a 1% H₂O₂ (p/v) se necesitaron 2 ó 5 minutos de exposición para alcanzar una reducción de 5 log UFC/ml a pH 3,0 ó 7,2 respectivamente.

En la Figura 2 se representan las curvas de respuesta a la dosis a distintos tiempos de exposición, obtenidas cuando los datos experimentales se modelaron aplicando la ecuación de Fermi, considerando como dosis a la concentración de H_2O_2 expresada en % (p/v). Los valores de R^2 ajustado fueron de 0,97 para pH 7,2 y mayores a 0,99 para el resto de los pH ensayados.

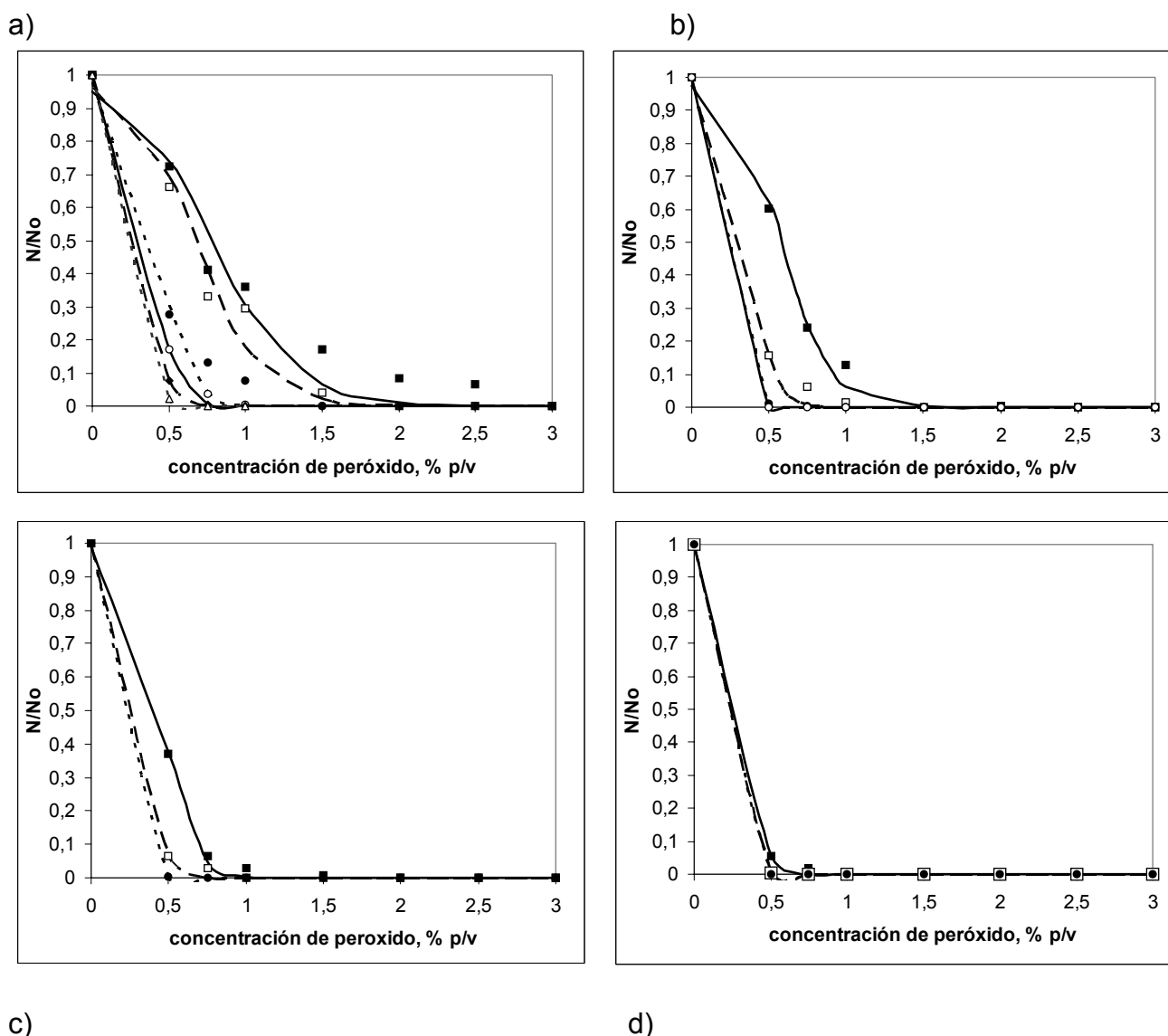


Figura 2: Curvas de respuesta a la dosis de *E. coli* tratada con H_2O_2 a diferentes tiempos de exposición y pH: valores experimentales (puntos) y predichos (líneas) utilizando la ecuación de Fermi. Referencias: 1 minuto (■, —); 2 minutos (□, - -); 3 minutos (●, - · -); 4 minutos (○, —); 5 minutos (◆, · · ·); 6 minutos (△, - · - ·). (a) pH 7,2; (b) pH 5,8; (c) pH 4,4; (d) pH 3,0

La Figura 3 representa los valores de los parámetros X_c y a en función del pH y del tiempo de exposición, y en las Tablas 1 y 2 se reflejan los análisis estadísticos realizados a partir de estos parámetros, donde se corrobora la incidencia significativa del pH en la inactivación de *E. coli* provocada por la exposición a H_2O_2 .

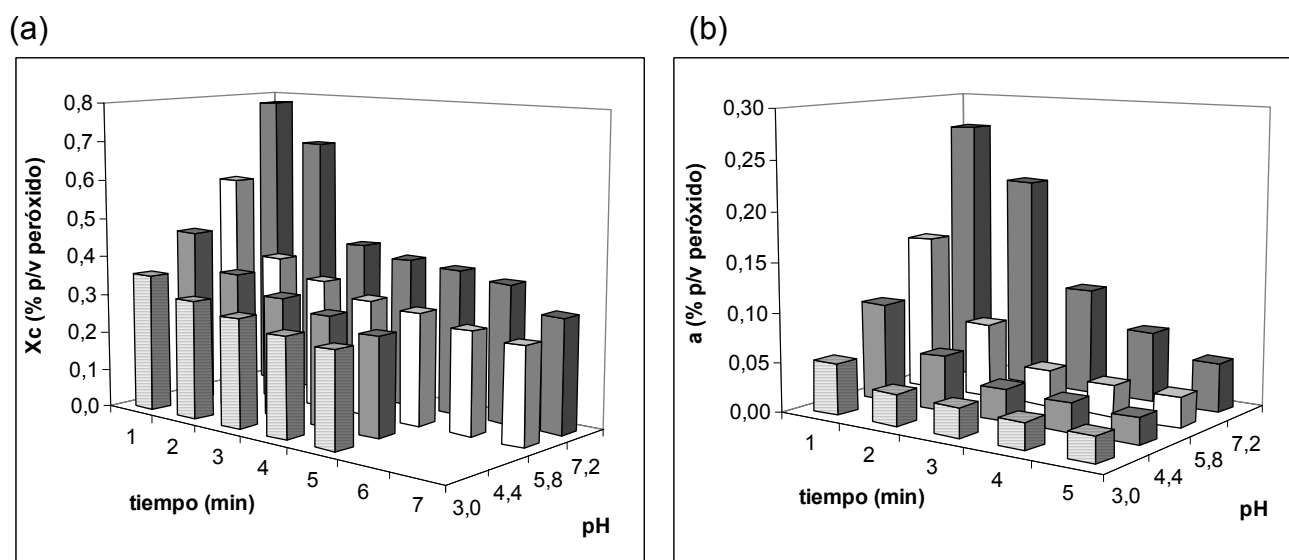


Figura 3: Influencia del pH y del tiempo de exposición sobre los parámetros de regresión de la ecuación de Fermi: (a) parámetro “ X_c ”; (b) parámetro “ a ”.

Cuando se aplicó la ecuación de Fermi a los datos experimentales considerando a la “dosis” como “concentración de H_2O_2 x tiempo”, los R^2 de las curvas de ajuste fueron de 0,96 para pH 7,2 y mayores a 0,99 para el resto de los pH ensayados. En cambio, cuando se modelaron las curvas de respuesta a la dosis para cada pH a partir de los datos experimentales aplicando modelos lineales tradicionales, donde “ x ” es la dosis expresada como “concentración x tiempo” y donde “ y ” es el logaritmo de la fracción de sobrevivientes ($\log N/N_0$), los R^2 obtenidos fluctuaron entre 0,80 y 0,93. Cuando la dosis (“ x ”) se expresó como concentración x tiempo/pH, el R^2 de la ecuación obtenida fue 0,86.

Tabla 1: Análisis de varianza para evaluar el efecto de las variables independientes pH y tiempo sobre los parámetros “ X_c ” y “ a ” estimados por la ecuación de Fermi

Parámetro	Fuente de variación	SS	GL	MS	F	Valor de P
EFECTOS PRINCIPALES						
X_c	pH	0,16	3	0,053	12,5	0,0003
	Tiempo	0,24	6	0,041	9,6	0,0003
	RESIDUAL	0,06	14	0,004		
TOTAL		0,42	23			
EFECTOS PRINCIPALES						
a	pH	0,03	3	0,0106	7,1	0,004
	Tiempo	0,05	6	0,0083	5,6	0,004
	RESIDUAL	0,02	14	0,0015		
TOTAL		0,09	23			

Tabla 2: Test de mínimas diferencias significativas de Fisher (MDS) para los parámetros “Xc” y “a” a los distintos niveles de pH ($\alpha = 0,05$)

pH	Parámetros estimados por la ecuación de Fermi Xc	a
3,0	A*	A
4,4	AB	A
5,8	B	A
7,2	C	B

(*): letras distintas denotan diferencia significativa

Por consiguiente, pudo comprobarse que los modelos tradicionales correlacionaron pobremente la respuesta observada. Por el contrario, la ecuación tipo Fermi tuvo un mejor desempeño en este caso en que las curvas de respuesta a la dosis de *E. coli* expuesto a H₂O₂ no tuvieron forma lineal (sobre todo, a las menores concentraciones). Además, a través de los parámetros Xc y a, esta ecuación permite evaluar adecuadamente la incidencia de diversos factores (como, por ejemplo, el pH) que pueden influir sobre la supervivencia del microorganismo ante el agente letal al que es expuesto, lo cual constituye una de las ventajas de la aplicación de la misma (Peleg, 1996).

CONCLUSIONES

La ecuación de Fermi ha resultado una herramienta válida para modelar las curvas de respuesta a la dosis correspondientes a la inactivación producida por distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno a diferentes valores de pH sobre *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET, ANPCyT-BID y Universidad Nacional de Luján.

BIBLIOGRAFÍA

Beuchat, L.R. 2000. Use of Sanitizers in Raw Fruit and Vegetable Processing. En: S.M. Alzamora, M.S. Tapia, A. López-Malo (eds.) *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications*. Aspen Publishers, Inc ,Gaithersburg, Maryland, USA.

Juven, B.J. and Pierson, M.D. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *Journal of Food Protection* 59: 1233–1241.

Kolthoff, I.M.; Sandell, E.B.; Meehan, E.J. and Brusckenstein, S. 1979. *Análisis Químico Cuantitativo*. 6° Edición. Editorial Nigar, Buenos Aires, Argentina.

Peleg, M. 1996. Evaluation of the Fermi equation as a model of dose-response curves. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 303-306.

IRRADIACIÓN ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA DE RODAJAS DE MANZANA

FERRANTE, Silvina; GUERRERO, Sandra y ALZAMORA, Stella Maris.

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.
Tel/Fax: 011 4576 33 66. E-MAIL: sguerrero@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Algunas nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos están basadas en la combinación de factores de inhibición emergentes y/o tradicionales con el propósito de combatir los microorganismos patógenos y deteriorativos. Actualmente existe un interés particular en el uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) como una alternativa potencial para desinfectar frutas y vegetales sensibles al tratamiento térmico. Los objetivos del presente trabajo fueron cuantificar mediante actinometría la energía lumínica disponible para irradiar rodajas de manzana inoculadas con *Listeria innocua* y examinar los efectos del tratamiento por luz UV-C en la supervivencia de dicho microorganismo.

Se utilizó una cabina provista con dos lámparas (15 watts) y estantes de altura variable (10 – 20 cm). Para la cuantificación de las dosis de luz UV-C a cada tiempo de tratamiento (0-15 minutos) se utilizó el par actinométrico yoduro-iodato, el cual generaba, mediante una reacción fotoquímica, una cantidad conocida de moles de triioduro los cuales se cuantificaron mediante absorbancia a 352 nm permitiendo calcular la energía emitida por las lámparas para cada condición ensayada. Para el estudio microbiológico rodajas de manzana (diámetro: 30 mm, espesor 3,1 mm) se sumergieron en una solución concentrada conteniendo *L. innocua* durante 5 minutos y se sometieron inmediatamente a la irradiación UV-C durante 15 minutos. Se extrajeron 4 muestras a distintos tiempos para el posterior recuento de microorganismos sobrevivientes. Placas de agar Tripteina Soya inoculadas con *L. innocua* en condiciones similares fueron sometidas a la irradiación UV-C.

El actinómetro yoduro-iodato resultó efectivo y reproducible para cuantificar la energía emitida por las lámparas para cada dosis de luz UV-C. Las mismas oscilaron entre 302 y 2362 J/m². Se observó una reducción aproximada de siete ciclos logarítmicos para *L. innocua* inoculada en placas conteniendo medio de cultivo mientras que la reducción fue marcadamente menor (aproximadamente 1,5 ciclos log) cuando se irradiaron placas de manzana impregnadas con dicho microorganismo.

Palabras Clave: *Listeria innocua*, manzana, radiación UV-C, actinometría, par ioduro-iodato

ABSTRACT

Some new technologies of food processing are based on the combination of emerging and/or traditional inhibition factors in order to reduce the development of spoilage and pathogen microorganisms. Nowadays there is a particular interest in the use of short-wave ultraviolet light as an alternative preservation technology to be used on fruit and vegetables which are sensitive to thermal treatment. The objectives of this research were to quantify the available light energy through photochemical reactions in order to disinfect inoculated slices of apple with *Listeria innocua* and examine the effects of the UV-C light treatment on the survival of this microorganism.

The UV-C radiation equipment consisted of a wooden box with two lamps (15 watts) and trays placed below the lamps at different distances (10-20 cm). For the quantification of the UV-C light dose at each treatment time (0-15 minutes), an iodide-iodate actinometer was used. This actinometer generated, through a photochemical reaction, a known amount of triiodide molecules which were quantified through absorbance at 352 nm and allowed to determine the energy emitted of each lamp at every assayed condition. For the microbiology study, slices of apple (diameter: 30 mm, thickness: 3,1 mm) were impregnated in a *L. innocua* concentrated solution during 5 minutes and then were immediately treated with UV-C radiation during 15 minutes. Four slices were taken at different times and monitored for survival population. Tryptone soy agar plates were inoculated with *L. innocua* and then treated with UV-C radiation in similar conditions.

The iodide-iodate actinometer was effective, having good reproducibility to quantify the energy emitted by the lamps for each dose of UV-C light. The doses ranged between 302 y 2362 J/m². An approximated 7 log-cycle reduction was observed when *L. innocua* was inoculated in agar plates while the reduction was less notorious (1,5 log-cycle) when the impregnated slices of apple were radiated.

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que las pérdidas post-cosecha de frutas y vegetales frescos pueden alcanzar altos niveles dependiendo de las especies, métodos de cosecha y tiempo de almacenamiento, entre otros factores. Hoy en día existe la necesidad de prácticas alternativas de preservación con el propósito de conservar la calidad de los vegetales y frutas frescas. A su vez, la gran cantidad de químicos usados en los tratamientos post-

cosecha han sido progresivamente restringidos en gran cantidad de países debido a un potencial daño para los seres humanos así como también para el medio ambiente. En frutas y sus derivados, a pesar de su alta acidez y de la acción antimicrobiana de algunos aniones, diversas cepas de *Listeria* han demostrado su capacidad de sobrevivir y adaptarse a dichas condiciones (Parish y col., 1989). Sado y col.(1998) analizaron diversos jugos frutales y encontraron que a pH 3,8 el jugo de manzana sin pasteurizar contenía *L. monocytogenes*. La FDA estableció en un reporte sobre microbiología de tecnologías alternativas, 5 reducciones decimales para patógenos emergentes tales como *L. monocytogenes* (FDA,2000).

Un posible tratamiento para la preservación de frutas y verduras de fácil implementación y bajo costo es el uso de la radiación no ionizante ultravioleta, UV-C. La eficacia antimicrobiana de esta tecnología ha sido descrita por diferentes autores (Wrightly col., 2000) y es de gran interés su aplicación en la desinfección de productos alimenticios (Gardner y Shama, 2000). Se ha reportado que el tratamiento con luz UV-C es efectivo como decontaminante en la línea de producción de manzanas para controlar el decaimiento postcosecha (Wilson y col.,1997).

La radiación ultravioleta ha sido utilizada también, para la desinfección de superficies (El-Gaouth y Wilson, 1995). El efecto de la luz ultravioleta (UV-C, $\lambda = 254$ nm) puede ser explicado de dos maneras posibles.

En primer lugar, provoca un efecto directo sobre microorganismos patógenos dado que daña su ADN. En segundo lugar, la radiación UV-C puede inducir mecanismos de resistencia en el alimento contra dichos patógenos (Liu y col., 1993; Nigro y col., 1998). La exposición a la radiación UV-C de baja intensidad ha sido comprobada como reductor del envejecimiento postcosecha en otras frutas tales como, duraznos (Stevens y col., 2002), uvas (Nigro y col., 1998) y frutillas (Marquenie y col., 2002).

Es posible utilizar la actinometría para estimar la cantidad energía disponible en una exposición del alimento a radiación UV-C. La actinometría es la cuantificación de la energía de la luz UV a través de la generación de reacciones fotoquímicas a partir de diversos actinómetros químicos (por ejemplo, par ioduro-iodato)..

El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto de la radiación UV-C en la supervivencia de *L. innocua*, como surrogante de *L. monocytogenes*, en rodajas de manzana y cuantificar las dosis UV-C generadas usando el par actinométrico ioduro-iodato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de rodajas de manzana

Manzanas verdes fueron adquiridas en el mercado local. Las mismas se decontaminaron externamente mediante sucesivos lavados con agua clorada.

En condiciones de asepsia, se cortaron las rodajas de 3,1 mm de espesor y 30 mm de espesor con un cortante estéril especialmente diseñado para este estudio.

Preparación del inóculo

Se utilizó para este estudio *Listeria innocua* ATCC 19114 D (como surrogante de *L. monocytogenes*). En cada experiencia se preparó el inóculo transfiriendo una ansada del cultivo fresco en estría a un recipiente conteniendo 150 ml de caldo Tripteina Soya (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). El mismo se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se utilizaron 20 ml de inóculo para sumergir cada rodaja de manzana durante 5 minutos. Mediante este procedimiento, las rodajas de manzana sin irradiar alcanzaron un recuento promedio de *L. innocua* de $\cong 3 \times 10^6$ UFC/gramo. Este procedimiento se llevó acabo por cuadruplicado de muestra a cada tiempo de tratamiento.

Equipo de Irradiación UV-C y procedimiento

El dispositivo de radiación UV-C consistió en una cabina provista con 2 lámparas UV-C (15 watts, 50 W, Phillips, Holland) colocadas en posición horizontal y estantes de madera de altura variable (10 ó 20 cm.). La cabina estaba provista de un sistema de ventilación para impedir el aumento de temperatura debido a la radiación UV. En cada experiencia, cuatro rodajas de manzana inoculadas fueron sometidas a radiación UV-C durante tiempos prefijados hasta 15 minutos. Las muestras se ubicaron a una distancia definida (10 y 20 cm). Cada una de ellas recibió la misma exposición a la radiación.

Paralelamente, con el propósito de evaluar el efecto de la matriz alimenticia en la radiación recibida por el microorganismo, placas de agar Tripteina Soya (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) se inocularon con *L. Innocua* y fueron sometidas a condiciones similares de radiación UV-C y recuento microbiano que las muestras de manzanas.

Determinación del número de colonias sobrevivientes

Muestras irradiadas y no irradiadas fueron analizadas para el recuento de los microorganismos sobrevivientes utilizando la técnica de diluciones seriadas y plaqueo en

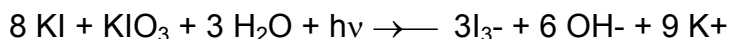
superficie por duplicado. Las placas de Petri se almacenaron a 37°C durante 48 a 72 hs. El recuento se realizó con un contador de colonias (COMECTA S.A., Barcelona, España).

Determinación de la dosis de UV-C

Para determinar la intensidad de la radiación emitida, se utilizó el par actinométrico yoduro-iodato (1). Dicho par se preparó mezclando iodato de potasio (0,1M en buffer borato 0,01 M, pH 9,25) y yoduro de potasio 0,6 M. Se colocaron 3 ml de la solución actinométrica en una celda de cuarzo de 1 cm. de paso de luz, la cual fue expuesta a 10 ó 20 cm de distancia de la radiación UV-C durante distintos tiempos de tratamiento. Luego de la exposición, se cuantificaron los moles de triioduro formados mediante absorbancia a 352 nm con un espectrofotómetro. Dicha cuantificación se llevó a cabo mediante las siguientes expresiones:

Actinómetro yoduro-iodato

(1)



Lambert-Beer: $\text{Abs}_{352} = \epsilon \cdot b \cdot C$ (2)

$$\text{Mol I}_3 = \frac{\text{Abs}_{352} \times V(l)}{\epsilon \cdot b} \quad \begin{array}{l} \epsilon: 26400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \\ b: 1 \text{ cm} \end{array}$$

N° Einstein (fotones absorbidos) = $\frac{\text{Mol I}_3}{QY}$ (3)

Siendo QY= umbral quantum = $0,75 [1+0,02(T-20,7)(1+0,23(C-0,577))]$ (4)

con T= temperatura (°C) y C= concentración de yoduro

entonces,

$$E \text{ (J)} = 4.72 \times 10^5 \text{ (J/einstein)} \cdot \text{N}^\circ \text{ einstein}$$

A partir de las absorbancias obtenidas a 352 nm a los distintos tiempos de tratamiento, se utilizó el principio de Lambert-Beer (2) para calcular los moles de triioduro formados. Obtenido este dato, se calcularon los números de fotones absorbidos o número Einstein (3) y el valor del umbral quantum (4) para la concentración de yoduro y la temperatura de la experiencia. Posteriormente, se obtuvo la energía emitida (5), dosis UV-C, por las lámparas para cada condición ensayada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra las variaciones de las dosis en el tiempo y respecto a la distancia entre las rodajas tratadas y las lámparas de UV-C. Como puede observarse, a mayor tiempo de irradiación, mayores fueron las dosis aplicadas, como así también, conforme se redujo de 20 a 10 cm la distancia entre los estantes y las lámparas, se incrementó la energía recibida por las muestras.

Las figuras 2a y 2b muestran las curvas de inactivación promedio de *L. innocua* inoculada en las rodajas de manzana y en placas de agar Tripteina Soya en función de la energía emitida y a una distancia dada (2a: 10cm; 2b: 20cm) respecto de las lámparas de UV-C. Mediante la actinometría se determinaron las dosis de UV-C aplicadas que oscilaron entre 302 (1min. ; 20cm) y 2362 (15 min. ; 10 cm) J/m^2 . Se observó una reducción aproximada a 1,5 ciclos log al irradiar las rodajas de manzana con dicho microorganismo. Cabe destacar, que esta inactivación fue marcadamente menor respecto a la irradiación de *L. innocua* inoculada en placas agar Tripteina Soya.

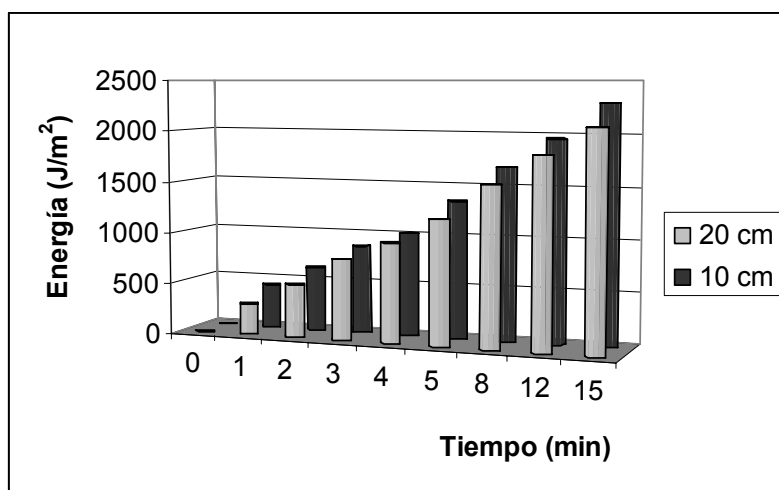


Figura 1: Dosis aplicadas de radiación UV-C respecto al tiempo de exposición y a la distancia de la muestra respecto de las lámparas (-: 10 cm; □ : 20 cm)

CONCLUSIONES

El actinómetro yoduro-yodato resultó efectivo y reproducible para la determinación de las dosis de luz UV-C aplicadas durante el tratamiento de desinfección. Las dosis de radiación UV-C aplicadas variaron según los diferentes tiempos de exposición a una distancia dada, así como también variaron respecto a la distancia entre las muestras tratadas y las lámparas de UV-C a un mismo tiempo de exposición. La comparación del tratamiento aplicado a las placas de agar Tripteina Soya inoculadas con *L. innocua* respecto del tratamiento aplicado a las rodajas de manzana inoculadas con el mismo microorganismo, resultó provechoso para implementar , en estudios posteriores,

condiciones alternativas con el propósito que la radiación de luz UV-C alcance una mayor efectividad como tratamiento de desinfección de superficies.

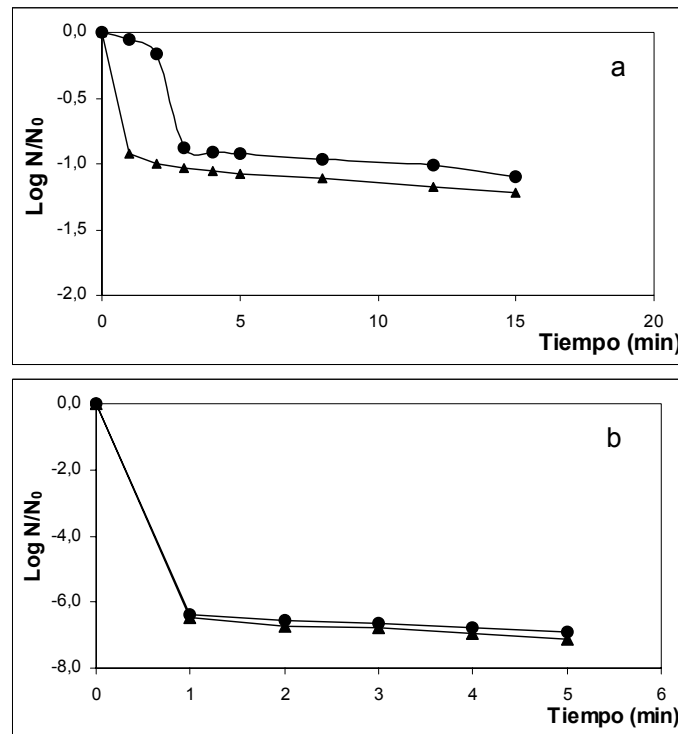


Figura 2: a) Curvas de supervivencia de *L. innocua* en rodajas de manzana (-□-) y en agar Tripteina Soya (-□-) con aplicación de radiación UV-C (□□ 254 nm) a 10 cm. b) Curvas de supervivencia de *L. innocua* en rodajas de manzana (-□-) y en agar Tripteina Soya (-□-) con aplicación de radiación UV-C (□□ 254 nm) a 20 cm.

BIBLIOGRAFÍA

EI-Ghaouth A. y Wilson C.L. (1995). Biologically-based technologies for the control of postharvested diseases. *Postharvest News As Information*, 6(1), 5-11.

Gardner D.W. y Shama G. (2000). Modeling UV-induced inactivation of microorganisms on surfaces. *Journal of Food Protection*, 63(1), 63-70.

Liu J.; Stevens C.; Khan V.A.; Lu J.Y.; Wilson C.L.; Adeyeye O.; Kabwe M.K.; Pusey P.L.; Chalutz E.; Sultana T. y Droby S. (1993). Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 56(10), 868-872.

Marquenie D.; Michiels C.W.; Geeraerd A.H.; Schenk A.; Soontjens C.; Van Impe J.F and Nicolai B.M. (2002). Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 187-196.

Nigro F.; Ippolito A. y Lima G. (1998). Use of UV-C light to reduce Botrytis storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 13, 171-181.

Parish M.E. y Higgins D.P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, 52:144-147.

Sado P.N.; Jinneman K.C.; Husby G.C.; Sorg S.M. y Omiecinsky C.J. (1998). Identification of *Listeria monocytogenes* from pasteurized apple juice using rapid test kits. *Journal of Food Protection*, 61:1199-1202.

Stevens C.; Khanj V.A.; Lu J.Y.; Wilson C.L.; Chalutz E.; Droby S.; Kabwe M.K.; Haung Z.; Adeyeye O.; Pusey P.L.; y Tang A.Y.A. (1999). Induced resistance of sweetpotato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. *Crop Protection*, 18, 463-470.

Wilson C.L.; El Ghaouth A.; Upchurch B.; Stevens C.; Khan V.; Droby S. y Chalutz E. (1997). Using an on-line UV-C apparatus to treat harvested fruit for controlling postharvest decay. *Technology and Product Reports*, 7(3), 278-282.

Wright C.L.; Summer S.S.; Hackney C.R.; Pierson M.D. y Zoecklein B. W. (2000). Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* 0157:H7 in unpasteurized apple cider. *Journal of Food Protection*, 63, 563-567.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y al ANPCyT .

RESPUESTAS EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE APIO PRECORTADO FRENTE AL TRATAMIENTO TÉRMICO.

VIÑA, Sonia Z.; CHAVES, Alicia R.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - CONICET. Calle 47 y 116, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina. E-mail: soniavia@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar la incidencia de dos tipos de tratamientos térmicos (inmersión y aire caliente) sobre las propiedades antioxidantes de apio precortado. Se determinaron el potencial de pardeamiento, los contenidos de fenoles totales, ácido clorogénico, ascórbico, flavonoides totales y el poder antioxidante, inmediatamente luego de la aplicación de los tratamientos y transcurridas 24 horas a 0°C. El contenido de fenoles totales no fue afectado por los tratamientos. El nivel inicial de ácido clorogénico aumentó en los controles y trozos tratados por inmersión luego de 24 horas a 0°C, en tanto que con aire caliente se observó una ligera disminución. En el día 0 el tratamiento por inmersión indujo una disminución del contenido de flavonoides totales, ácido ascórbico y de la capacidad antioxidante, en tanto que con aire caliente se produjo pérdida de flavonoides totales sin incidir sobre el tenor de ácido ascórbico ni la capacidad antioxidante.

Palabras clave: hortalizas mínimamente procesadas; tratamientos térmicos; estrés controlado; antioxidantes; fenoles

ABSTRACT

The objective of the present work was to analyse the incidence of two types of thermal treatments (immersion and hot air) on the antioxidant properties of pre-cut celery. Browning potential, total phenols, chlorogenic acid, ascorbic acid, total flavonoids contents and antioxidant power were determined, immediately after the application of treatments and after 24 hours at 0°C. Total phenols content was not affected by the treatments. Initial chlorogenic acid level increased both in control and immersion-treated pieces after 24 hours at 0°C, meanwhile with hot air a light diminution was observed. At day 0 the immersion treatment caused a diminution in total flavonoids content, ascorbic acid and

antioxidant capacity, meanwhile hot air treatment occasioned loss in total flavonoids content without affecting ascorbic acid levels or antioxidant capacity.

KEYWORDS: minimally processed vegetables; heat treatments; controlled stress; antioxidants; phenolics

INTRODUCCIÓN

Para la correcta implementación de tratamientos térmicos en hortalizas resulta necesario ensayar diferentes combinaciones de tiempo y temperatura, considerando que el origen botánico de las partes comestibles es muy diverso. También el método de aplicación utilizado (calentamiento en agua, con vapor, aire seco) puede presentar limitantes según el producto.

La aplicación de tratamientos térmicos en productos mínimamente procesados tendría, entre otras, la finalidad de modificar las alteraciones en los procesos fisiológicos normales de la planta inducidas por el daño mecánico y oxidativo, como así también las respuestas asociadas a la cicatrización o protección de heridas (Saltveit, 2000). Así, la aplicación de un estrés térmico controlado acondicionaría los tejidos vegetales para soportar otros tipos de estrés, entre ellos el ocasionado por el corte, por los procesos de senescencia que ocurren durante el almacenamiento posterior y/o el estrés oxidativo.

Ha sido demostrado que un tratamiento térmico puede disminuir los cambios fisiológicos inducidos por el daño mecánico (por ejemplo, el pardeamiento de tejidos) que conducen a la reducción de la calidad y que acortan la vida de estante de apio (Loaiza-Velarde et al., 2003).

El objetivo del presente trabajo fue analizar la incidencia de dos tipos de tratamientos térmicos sobre diferentes componentes químicos que contribuyen al poder antioxidante de apio precortado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se trabajó con pecíolos de apio (*Apium graveolens* L.) lavados con agua corriente, trozados, desinfectados por inmersión en agua clorada fría, escurridos y envasados en bandejas de tereftalato de polietileno cristal, cubiertas con film de PVC (*T*, *testigo*). Los tratamientos térmicos ensayados fueron: aire caliente (en estufa) a 48°C, 60 minutos (*AC*) e inmersión en agua a 50°C, 90 segundos (*I*). Las determinaciones se realizaron inmediatamente después de su aplicación y luego de 24 horas a 0°C.

Determinaciones.

Potencial de pardeamiento. Se cuantificó midiendo la absorbancia a 320 nm sobre alícuotas de los extractos etanólicos obtenidos a partir de muestras exactamente pesadas de tejido congelado y triturado. Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia (UA) g⁻¹ de tejido fresco.

Fenoles totales. Sobre alícuotas de los extractos etanólicos, concentradas a sequedad en evaporador rotatorio y resuspendidas en agua bidestilada, se cuantificaron espectrofotométricamente los fenoles totales, empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (Swain y Hillis, 1959). Los resultados se expresaron como μmoles g⁻¹ de tejido fresco.

Ácido clorogénico. Sobre alícuotas de los extractos etanólicos, concentradas a sequedad en evaporador rotatorio y resuspendidas en metanol, se analizó el contenido de ácido clorogénico por HPLC. Se empleó una columna C18 y el solvente de corrida fue una mezcla de agua-metanol-ácido fórmico (85:10:5). La detección se realizó a 320 nm. Los resultados se expresaron como nmoles g⁻¹ de tejido fresco.

Ácido ascórbico. Se cuantificó por HPLC, según el método descrito por Wimalasiri y Wills (1983). La detección se realizó a 254 nm y los resultados finales se expresaron como mg de ácido ascórbico / 100 g de tejido fresco.

Flavonoides totales. Se determinaron colorimétricamente a 510 nm según la técnica descrita por Kim et al. (2003), a partir de alícuotas de los extractos etanólicos, concentradas a sequedad y resuspendidas en agua bidestilada.

Poder antioxidante. Se cuantificó mediante la reacción de inactivación del radical estable DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), según el método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Se calculó la concentración efectiva media (EC₅₀), definida como la cantidad (gramos) de tejido fresco necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH[•] en las mezclas de reacción. Los resultados finales se expresaron como Poder antioxidante (g⁻¹), equivalente a la inversa de la EC₅₀.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En lo que respecta al potencial de pardeamiento de apio precortado (Figura 1) en el día 0 se observaron incrementos muy ligeros por efecto de la aplicación de ambos tipos de tratamientos térmicos con respecto al control. Al cabo de 24 horas a 0°C el mayor incremento en el potencial de pardeamiento correspondió al testigo (1,3 veces mayor con respecto al inicio), mientras que en trozos tratados por inmersión se produjo una ligera disminución. El producto tratado con aire caliente no mostró variaciones en el potencial de pardeamiento luego de 24 horas a 0°C.

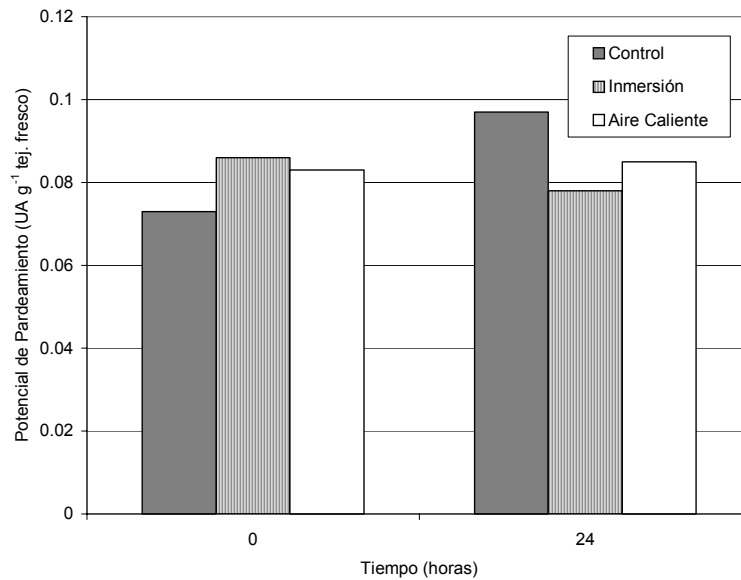


Figura 1. Potencial de pardeamiento de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 24 horas a 0°C. $LSD_{0,05} = 6 \times 10^{-3}$
 El contenido de fenoles totales (Figura 2) no fue afectado por la aplicación de los tratamientos ($p > 0,05$). Sin embargo, la tendencia observada en el contenido de fenoles totales guardó correspondencia con la evolución del potencial de pardeamiento de los trozos control y tratados.

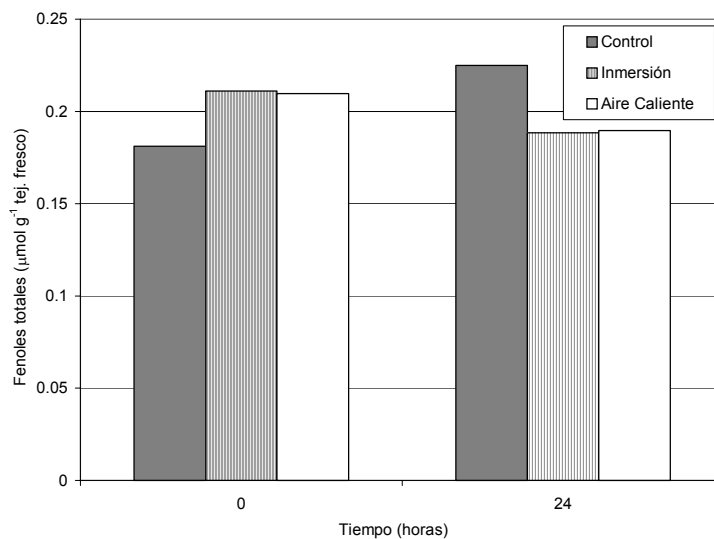


Figura 2 . Contenido de fenoles totales de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 24 horas a 0°C. $LSD_{0,05} = 0,06$

El nivel inicial de ácido clorogénico del testigo fue 14 nmol g^{-1} de tejido fresco. En el día 0, no hubo diferencias significativas en la concentración de este compuesto al comparar el testigo con los tratamientos térmicos ensayados (Figura 3). Luego de 24 horas a 0°C, el tenor de ácido clorogénico aumentó ($p < 0,05$) un 89 y un 47% en los controles y trozos tratados por inmersión, respectivamente. En los trozos tratados con aire caliente, en cambio, se observó una ligera tendencia a disminuir.

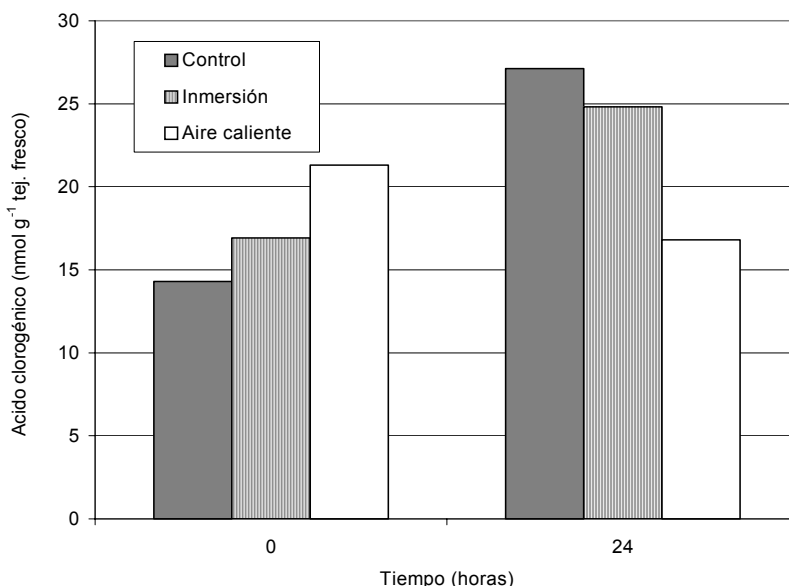


Figura 3. Contenido de ácido clorogénico de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 24 horas a 0°C. $LSD_{0,05} = 7,3$

En el día 0 (inicio) el tratamiento de inmersión indujo una disminución en el contenido de flavonoides totales, resultando la concentración registrada un 26% inferior con relación al control (Figura 4). El tratamiento con aire caliente ocasionó una pérdida aún mayor de flavonoides totales, ya que el tenor correspondiente fue 59% más bajo que el del testigo. Transcurridas 24 horas a 0°C tanto los controles como los trozos tratados por inmersión mostraron una disminución ($p < 0,05$) de flavonoides totales, en tanto que en las muestras tratadas con aire caliente prácticamente no hubo variación del contenido. En este punto, el nivel de flavonoides totales fue similar en las bandejas tratadas térmicamente, independientemente del método de aplicación del tratamiento. La concentración correspondiente a los controles resultó ligeramente superior a la de las muestras tratadas. Por efecto de la aplicación del tratamiento térmico de inmersión en trozos recién procesados, se produjo una ligera disminución del contenido de ácido ascórbico y una pérdida del 40% de la capacidad antioxidante, con respecto al control (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de ácido ascórbico y poder antioxidante de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente, inmediatamente después del procesamiento.

	Ácido ascórbico (mg / 100 g de tej. fresco)	Poder antioxidante (g ⁻¹)
Testigo	3,6	4,6
Tratamiento de inmersión	3,1	2,7
Tratamiento con aire caliente	3,4	4,2
$LSD_{0,05}$	0,4	0,6

En las muestras que recibieron el tratamiento con aire caliente, no hubo variaciones significativas del tenor de ácido ascórbico ni de la capacidad antioxidante del producto con respecto al control.

CONCLUSIONES

Los tratamientos ensayados resultaron beneficiosos por reducir los incrementos del potencial de pardeamiento verificados en los controles al cabo de 24 horas a 0°C. El tratamiento en estufa (aire caliente) resultó efectivo en reducir la concentración de ácido clorogénico, compuesto que puede actuar como sustrato de las reacciones de pardeamiento enzimático. Al respecto, la efectividad del tratamiento de inmersión fue menor.

Los tratamientos impactaron negativamente en el contenido de flavonoides totales, ocasionando pérdida del mismo. En cuanto a la retención de ácido ascórbico y de la capacidad antioxidante de apio trozado, el tratamiento con aire caliente resultó más beneficioso que el de inmersión

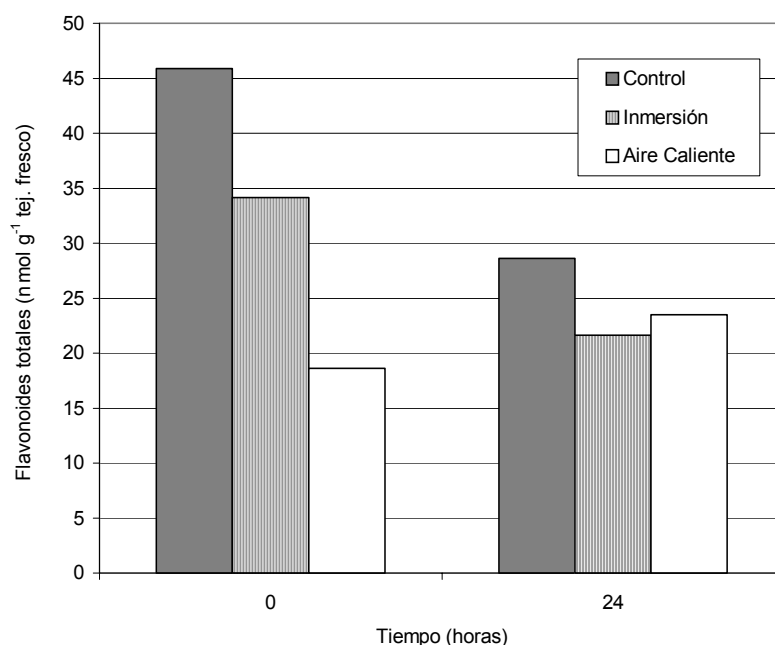


Figura 4. Contenido de flavonoides totales de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 24 horas a 0°C. $LSD_{0,05} = 4,5$

BIBLIOGRAFÍA

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, 28, 25-30.

Kim, D-O., Jeong, S. W., Lee, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* **2003**, 81, 321-326.

Loaiza-Velarde, J. G.; Mangrich, M.; Campos-Vargas, R.; Saltveit, M. Heat shock reduces browning of fresh-cut celery petioles. *Postharv. Biol. Technol.* **2003**, 27, 305-311.

Saltveit, M. E. Wound-induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharv. Biol. Technol.* **2000**, 21, 61-69.

Swain, T., Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **1959**, 10, 63-68.

Wimalasiri, P., Wills, R. B. H. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of*

TRATAMIENTO TÉRMICO Y CONSERVACIÓN REFRIGERADA DE APIO (*Apium graveolens* L.) PRECORTADO.

VIÑA, Sonia Z.; LÓPEZ OSORNIO, M. Mercedes; CHAVES, Alicia R.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - CONICET. Calle 47 y 116, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina. E-mail: soniavia@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron la calidad organoléptica y microbiológica de apio precortado tratado térmicamente y almacenado a 0°C. Se utilizaron pecíolos trozados envasados en bandejas de PET cristal cubiertas con PVC.

Los tratamientos fueron: control (no tratado, C), aire caliente 48°C, 60 min (AC) e inmersión en agua 50°C, 90 s (I). A los 0, 7, 14 y 21 días a 0°C se midió pérdida de peso, color superficial, contenido de clorofila, textura y se efectuaron recuentos de mesófilos aerobios totales.

El ángulo hue (h°) no varió durante el almacenamiento cuando se aplicó el tratamiento I. Para C y AC el h° disminuyó sólo un 5% del valor inicial. El contenido de clorofila total mostró similar comportamiento. A los 21 días a 0°C el tratamiento de inmersión produjo una ligera disminución ($p < 0,05$) en la textura y mostró los mayores niveles poblacionales de mesófilos totales.

Palabras Clave: tratamientos térmicos; almacenamiento refrigerado; color superficial; clorofila; textura; velocidad de crecimiento microbiano.

ABSTRACT

In this work, organoleptic and microbiological quality of minimally processed celery treated by heat and stored at 0°C was evaluated. At this end, cut petioles packaged in crystal PET trays, covered with PVC, were used. Assayed treatments were: control (non-treated), hot air 48°C, 60 min and immersion in water 50°C, 90 s. At 0, 7, 14 and 21 days at 0°C weight loss, external colour, chlorophyll content and texture were measured, as well as total aerobic mesophylls.

Hue angle (h°) did not vary during storage when pieces were treated by immersion. For controls and the hot air treatment, h° only diminished 5% of the initial value. Total chlorophyll content showed a similar behaviour. At 21 days at 0°C the immersion treatment

caused a light diminution in texture ($p < 0,05$) and showed the highest counts of total mesophylls.

KEYWORDS: heat shock treatments; refrigerated storage; surface colour; chlorophyll; texture; microbial growth rate.

INTRODUCCIÓN

El apio presenta una baja actividad respiratoria, muy baja tasa de producción de etileno y moderada sensibilidad al mismo (Cantwell, 2001). Estas características lo convierten en un producto apto para el procesamiento mínimo.

La forma más común de comercializarlo es cortado en trozos de diferente longitud y envasado en bolsas o bandejas recubiertas con películas plásticas.

Los principales fenómenos que reducen la calidad de apio precortado son el pardeamiento de los haces vasculares a nivel de las secciones de corte, la protusión de las mismas y el ahuecado de los pecíolos, causado por desintegración del parénquima medular (Loaiza-Velarde et al., 2003; Saltveit y Mangrich, 1996).

Ha sido demostrado que un tratamiento térmico puede disminuir los cambios fisiológicos inducidos por el daño mecánico (por ejemplo, el pardeamiento de tejidos) que conducen a la reducción de la calidad y que acortan la vida de estante de apio (Loaiza-Velarde et al., 2003).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad durante el almacenamiento a 0°C de apio precortado tratado térmicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se trabajó con pecíolos de apio (*Apium graveolens* L.) lavados con agua corriente, trozados, desinfectados por inmersión en agua clorada fría (100 ppm), escurridos y envasados en bandejas de tereftalato de polietileno (PET) cristal, cubiertas con film de cloruro de polivinilo (PVC) (C, *control*).

Los tratamientos térmicos ensayados fueron: aire caliente (estufa) a 48°C, 60 minutos (AC) e inmersión en agua a 50°C, 90 segundos (I). En este último caso (I) la desinfección de los trozos se realizó posteriormente al tratamiento, sumergiéndolos en agua clorada con hielo.

Las bandejas fueron almacenadas a 0°C durante 21 días, tomando muestras para su análisis a intervalos semanales.

Determinaciones.

Pérdida de peso. Se determinó en base a la diferencia de peso de las bandejas al inicio y al final del almacenamiento. Se expresó como porcentaje (%) con relación al valor de partida.

Color superficial. Se utilizó un colorímetro Minolta CR300, realizando las mediciones sobre la cara convexa de los trozos de apio. Se registraron los parámetros a^* , b^* y L^* de la escala CIE y se calcularon las funciones hue (ángulo de color, h°) y croma (saturación, C).

Clorofila total. Se determinó espectrofotométricamente, a partir de extractos en acetona fría y de acuerdo con el método propuesto por Bruinsma (1963).

Textura. Se utilizó un texturómetro TA-XT2i Stable Micro Systems, equipado con una celda de carga de 25 kg. Para los ensayos de corte se empleó el dispositivo Warner-Bratzler, registrando la Fuerza máxima (N) necesaria para producir el corte transversal de los trozos. Para los ensayos de compresión, se utilizó un plato cilíndrico de 75 mm de diámetro y se midió la Fuerza necesaria para producir un 20% de deformación en la sección de los bastones.

Recuentos microbianos. Se determinaron mesófilos aerobios totales y se efectuó un análisis regresional para establecer la relación entre los recuentos y el tiempo de almacenamiento. Se empleó el modelo lineal ($y = a + bxt$) donde $y = \log \text{ UFC } g^{-1}$, a : constante, b : velocidad de crecimiento y t : tiempo. Se compararon las velocidades de crecimiento.

Microscopía electrónica de barrido. Los trozos de apio fueron fijados en FAA (etanol 96°: agua destilada: formaldehído: ácido acético glacial, 50:35:10:5) al menos durante dos meses. Las características morfológicas y anatómicas (secciones de corte, haces vasculares expuestos, tejido parenquimático medular, etc.) fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) Philips ElectroScan 2010, presión de 0 a 20 Torr y temperatura de $\pm 50^\circ\text{C}$ a partir de la temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La pérdida de peso de las bandejas aumentó significativamente ($p < 0,05$) a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento a 0°C , tanto para el control como para los trozos tratados. No hubo diferencias significativas entre la pérdida de peso de las bandejas control y las tratadas. Al final del almacenamiento (día 21), se observó que la pérdida de peso de las bandejas alcanzó valores entre 1,2 y 1,3% (datos no mostrados).

El color superficial de los trozos de apio fue caracterizado mediante la evolución del ángulo de color (h°), que arrojó un valor inicial de $118,6^\circ$. En la escala CIE tomada como referencia, un ángulo de 90° representa un h° amarillo (Gnanasekharan et al., 1992). Por lo tanto, el h° correspondiente a nuestro material de partida denota un tinte básico amarillo-verdoso. Tanto para las muestras C como para AC, el h° disminuyó ligeramente y prácticamente en forma lineal alcanzando al cabo de 21 días un valor equivalente al 95% del inicial (Figura 1). No existieron diferencias significativas entre el testigo y las muestras tratadas con aire caliente ($p>0,05$) en ningún punto de muestreo. En el caso del tratamiento I, el h° permaneció prácticamente constante y cercano al valor de partida ($p>0,05$) durante todo el lapso considerado. Los resultados evidencian un buen efecto del calentamiento por inmersión en agua a 50°C 90 s sobre la retención del color en apio mínimamente procesado. En forma similar, pero realizando inmersiones de hasta 10 minutos en agua a $43\text{-}55^\circ\text{C}$ se retrasó el amarilleamiento de brócoli (Forney, 1995; Tian et al., 1996, 1997).

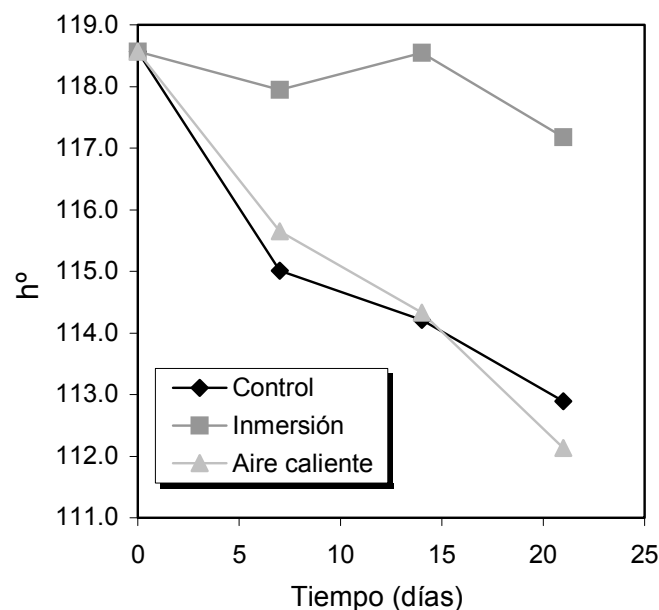


Figura 1. Evolución del color superficial (tinte básico, hue, h°) de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 21 días a 0°C . $\text{LSD}_{0,05} = 1,8$

En la Tabla 1 se observa que el contenido inicial de clorofila total ($34,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco) disminuyó significativamente ($p<0,05$) en el control a los 14 días a 0°C . Al final del almacenamiento el valor alcanzado representó un 42% del inicial. En las muestras tratadas en estufa se observó similar evolución, no existiendo diferencias significativas

con el testigo en ninguno de los puntos de muestreo. Los trozos tratados por inmersión no sufrieron pérdidas significativas del contenido de clorofila total durante 21 días a 0°C, en concordancia con las determinaciones de color superficial.

Tabla 1. Contenido de clorofila total de apio precortado tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 21 días a 0°C. $LSD_{0,05} = 7,5$

<i>Tiempo (días)</i>	<i>Clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco)</i>		
	<i>Control</i>	<i>Inmersión (50°C - 90s)</i>	<i>Aire caliente (48°C - 1h)</i>
0	34,5	34,5	34,5
7	31,2	31,8	28,1
14	15,1	30,1	13,8
21	14,6	29,7	13,3

La textura de los trozos de apio se evaluó principalmente midiendo la fuerza necesaria para cortar transversalmente a las fibras vasculares y al colénquima presente en los pecíolos. En la Figura 2a se observa una tendencia a disminuir en los valores de fuerza máxima de corte (FMC) al cabo de 21 días de permanencia en cámara. En las muestras sometidas a estrés por calentamiento, se alcanzó un valor de FMC de aproximadamente 67N, equivalente a un 82% de la inicial, no existiendo diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos térmicos.

En los ensayos de compresión también se observó una tendencia a disminuir en la Fuerza máxima luego de 21 días a 0°C (Figura 2b). Para el testigo, la reducción no alcanzó a ser significativa ($p > 0,05$). En el tratamiento de inmersión se registró la máxima caída de la fuerza, alcanzando al final de la permanencia en cámara un valor equivalente al 55% del inicial. En cambio en los trozos tratados con aire seco la fuerza medida al cabo de 21 días a 0°C representó el 73% de la inicial.

Cuando los tejidos vegetales son sometidos a esfuerzos, el quebrantamiento de los mismos puede producirse por separación o por ruptura celular. La liberación de los contenidos celulares, y por lo tanto la jugosidad, dependerá de la ruptura de las células. Si las fuerzas que mantienen unidas a éstas son elevadas, el quebrantamiento ocurrirá a nivel de las paredes celulares. Esto sucede normalmente en hortalizas frescas, crudas y frutos inmaduros. En dichos tejidos se verifica un alto nivel de turgencia, apreciándose como frágiles, crujientes (Waldron et al., 1997). En cambio, si la adhesión entre células es débil, éstas terminarán separándose, como consecuencia de la disolución de los

polímeros de la laminilla media y de la pared celular (Waldron et al., 1997). Hacia el final del almacenamiento de apio precortado podría haberse dado esta última situación. Un indicio es la condición diferente que mostró el tejido parenquimático medular en muestras tomadas al inicio y al final del almacenamiento (Figura 3 a y b).

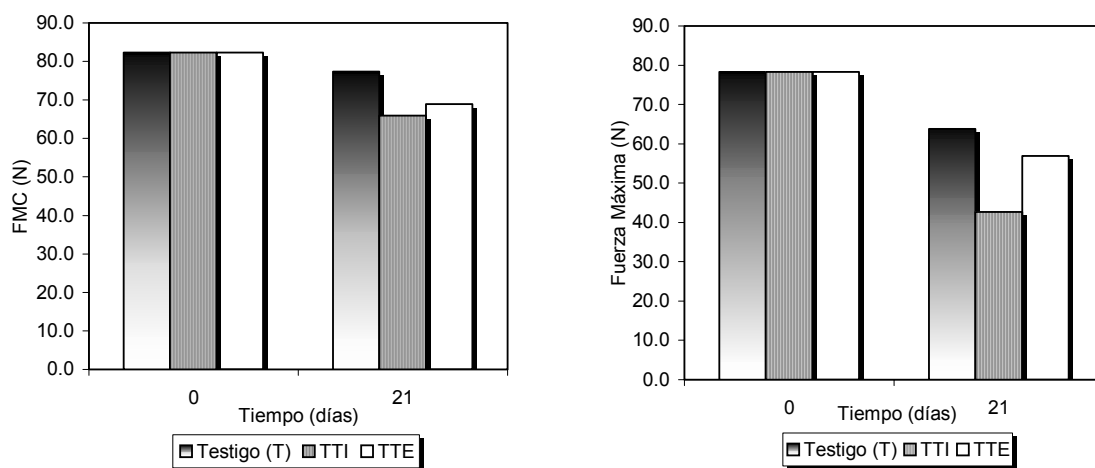


Figura 2a. Variación de la Fuerza Máxima de Corte (FMC), en Newtons, de apio mínimamente procesado, tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 21 días a 0°C. $LSD_{0,05} = 10,6$. **2b.** Variación de la Fuerza medida en compresión, en Newtons, de apio mínimamente procesado, tratado térmicamente por inmersión o con aire caliente y conservado durante 21 días a 0°C. $LSD_{0,05} = 20,5$.

En cuanto a los recuentos microbiológicos, los valores iniciales correspondieron a $2,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$, tanto para el control como para las muestras tratadas térmicamente. El análisis regresional determinó que la velocidad de crecimiento de mesófilos aerobios en apio trozado no tratado fue igual a $0,12 \log \text{ UFC día}^{-1}$. Para los trozos tratados en estufa correspondió a $0,16 \log \text{ UFC día}^{-1}$, en tanto que la mayor velocidad de crecimiento se registró en las muestras tratadas por inmersión ($0,24 \log \text{ UFC día}^{-1}$). Ello determinó que al cabo de 21 días a 0°C los niveles poblaciones alcanzados en estas últimas se incrementarían aproximadamente 5 ciclos con respecto al valor inicial, superando los valores límites permitidos para vegetales mínimamente procesados establecidos en la reglamentación francesa (Anónimo, 1988). Estos límites están determinados por dos parámetros: m y M cuyos valores son m: $5 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$ para el producto final y $5 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$ a la fecha de vencimiento, mientras que M tiene un valor de $5 \times 10^7 \text{ UFC g}^{-1}$ para el producto en el momento de su vencimiento. Se ha tomado como referencia esta reglamentación ya que los vegetales mínimamente procesados no están contemplados en el Código Alimentario Argentino.

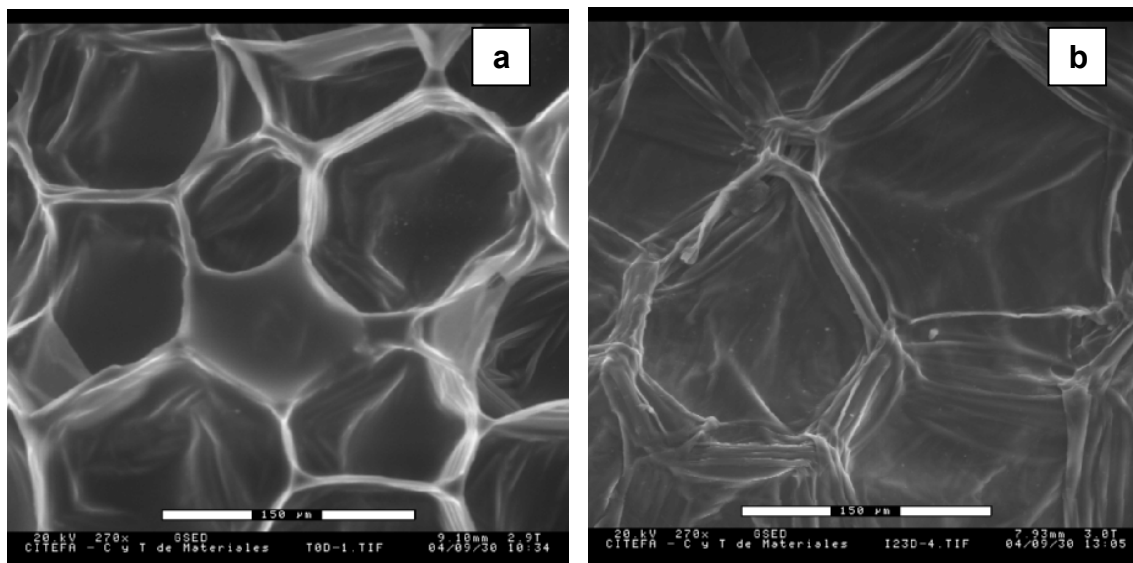


Figura 3a. Micrografías obtenidas con ESEM del parénquima medular de pecíolos de apio precortados, no tratados térmicamente (controles), al inicio del almacenamiento. **3b.** Micrografías ESEM del parénquima medular de pecíolos de apio precortados, tratados térmicamente por inmersión, al final del almacenamiento a 0°C.

CONCLUSIONES

La conservación a 0°C de apio mínimamente procesado constituye una manera eficiente de mantener la calidad del producto. La aplicación del tratamiento térmico en estufa seleccionado para este trabajo no produjo modificaciones importantes en la evolución de la pérdida de peso, del color superficial ni del contenido de clorofila total, con respecto al control.

El tratamiento térmico de inmersión ensayado produjo una mayor retención del color y del contenido de clorofila; sin embargo incidió negativamente en el desarrollo de microorganismos mesófilos aerobios totales, posiblemente por un mayor nivel de daño a nivel de los tejidos.

BIBLIOGRAFIA

Anónimo, 1988. Guide de Bonnes Pratiques Hygieniques Concernant les Produits Végétaux prêts à l'emploi dits de la "IV gamme". Bulletin Officielle de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, Août 1988, n°17, 221-232, Ed. Direction des Journaux Officiels, Paris.

Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls *a* and *b* in plant extracts. *Photochem. Photobiol.* 2 (2): 241-249.

- Cantwell, M. 2001.** Properties and Recommended Conditions for Storage of Fresh Fruits and Vegetables. Disponible en http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/sci_a.shtml. Accedido el 21/2/05.
- Forney, C. F. 1995.** Hot water dips extend the shelf life of fresh broccoli. *HortScience* 30, 1054-1057. Citado en Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharv. Biol. Technol.* 14, 257-269.
- Gnanasekharan, V., Shewfelt, R. L., Chinnan, M. S. 1992.** Detection of color changes in green vegetables. *J. Food Sci.* 57 (1), 149-154.
- Loaiza-Velarde, J. G., Mangrich, M., Campos-Vargas, R., Saltveit, M. 2003.** Heat shock reduces browning of fresh-cut celery petioles. *Postharv. Biol. Technol.* 27, 305-311.
- Saltveit, M. E., Mangrich, M. E. 1996.** Using density measurements to study the effect of excision, storage, abscisic acid and ethylene on pithiness in celery petioles. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121 (1) : 137-141.
- Tian, M. S., Islam, T., Stevenson, D. G., Irving, D. E. 1997.** Color, ethylene production, respiration and compositional changes in broccoli dipped in hot water. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122: 112-116. Citado en Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharv. Biol. Technol.* 14, 257-269.
- Tian, M. S., Woolf, A. B., Bowen, J. H., Ferguson, I. B. 1996.** Changes in color and chlorophyll fluorescence of broccoli florets following hot water treatment. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121, 310-313. Citado en Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharv. Biol. Technol.* 14, 257-269.
- Waldron, K. W., Smith, A. C., Parr, A. J., Ng, A. & Parker, M. L. 1997.** New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science & Technology* 8, 213-221.

DESHIDRATACIÓN DE BANANAS POR MÉTODOS COMBINADOS

WAIS, Natalia L. ^(1,2); AGNELLI, Miriam E. ^(1,2); MASCHERONI, Rodolfo H. ^(1,2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, 47 y 116 (1900) La Plata, Bs. As, Argentina. Tel.: 0221-424 9287

(2) Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería; Universidad Nacional de La Plata, 47 y 1 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. E-mail: magnelli@ing.unlp.edu.ar.

RESUMEN

Discos de banana deshidratados osmóticamente fueron secados por convección forzada con aire caliente o mediante el uso de vacío a alta temperatura. La transferencia de masa durante la deshidratación osmótica (DO) en una solución de azúcar, fue seguida a través de la pérdida de peso (PP) y ganancia de sólidos (GS) a 30°C y 40°C. Luego de la DO, las frutas fueron secadas hasta su condición final en un secador batch de aire caliente (SAC), a 60°C y 1.4 m/s o en una estufa de vacío (VAC) a 60°C y -1010 mbar.

Se evaluó la calidad de productos luego de cada etapa mediante análisis de color y textura y se la comparó con la de la fruta fresca.

Los resultados muestran que los tratamientos analizados (DO-SAC y DO-VAC) y sus condiciones de trabajo, deben ser elegidos de acuerdo a los requerimientos del producto final en que se utilizará la fruta deshidratada.

Palabras Clave: Deshidratación Osmótica; Secado, Color, Textura.

ABSTRACT

Banana slices osmotically dehydrated were dried by hot-air forced convection or in vacuum at high temperature. Mass transfer during osmodehydration in sucrose solution was followed through weight loss (PP) and solids gain (GS) at 30°C y 40°C. After DO, fruits were dried to its final condition in a batch hot-air dryer (SAC), at 60 °C and 1.4 m/s or in a vacuum oven (VAC) at 60 °C and -1010 mbar.

Food quality was evaluated after each step, by means of color and texture properties, and compared with those of fresh fruit.

Results show that the analyzed processes (DO-SAC and DO-VAC) and their working conditions must be chosen according to the final product requirements in which the dehydrated fruit will be used.

KEYWORDS: Osmotic Dehydration; Drying; Color; Texture.

INTRODUCCIÓN

El secado, ya sea por aire caliente o mediante el uso de vacío, ha sido ampliamente utilizado para preservar frutas y vegetales.

Con el fin de obtener productos deshidratados de alta calidad, se puede introducir como pretratamiento una etapa de deshidratación osmótica (DO). Para ello, se sumergen los alimentos en soluciones con una actividad acuosa menor que la de estos. Dado que la deshidratación se produce sin cambio de fase, se reduce notoriamente el consumo energético (Jaramayan y Das Gupta, 1992; Karathanos et al., 1995).

Durante la DO se produce una transferencia de agua y sólidos solubles propios de las fruta (vitaminas y minerales) hacia una solución osmótica (SO) (generalmente a base de sacarosa) y, simultáneamente, se incorpora azúcar de la solución a la estructura del alimento. Este método reducir entre un 30 y un 70% del contenido de agua del alimento (Lenart y Lewicki, 1988). Sin embargo, la DO no permite alcanzar una actividad acuosa suficientemente baja como para que el producto se considere auto-estable y debe completarse con una segunda etapa de preservación (secado, congelación, etc.) (Rahman y Lamb, 1991). La DO previa al secado permite además disminuir los cambios de color e incrementar la retención de sabor y propiedades nutricionales en frutas y vegetales deshidratados (Lenart y Lewicki, 1988). El producto resultante tiene generalmente mejor calidad que el secado sin pretratamiento.

En este trabajo se analizó la conveniencia de la introducción de una etapa de DO al secado de discos de banana por convección forzada con aire caliente (SAC) o mediante el uso de vacío a alta temperatura (VAC). La evolución de la transferencia de masa en cada una de las etapas involucradas (DO, SAC y VAC) fue seguida a través de medidas de pérdida de agua y ganancia de sólidos (sólo para DO). Además, se analizaron atributos de calidad de la banana pre-deshidratada osmóticamente y luego secada por aire caliente o utilizando vacío. Para ello, se realizaron medidas de color y textura después de cada etapa del proceso combinado, es decir, luego de la DO para diferentes tiempos de contacto y luego de DO-SAC y DO-VAC. Los resultados fueron comparados con los obtenidos para producto el fresco, con y sin etapa de secado.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Deshidratación osmótica

Los experimentos de deshidratación osmótica se diseñaron utilizando discos de banana de 1 cm. de espesor. Las muestras fueron sumergidas en una solución de sacarosa (de Grado Comercial) de 69 °Brix, a 30 y 40 °C, con diferentes tiempos de contacto.

La evolución de la transferencia de materia fue seguida a través de la variación de peso con el tiempo de inmersión. A partir de estos valores, se obtuvieron los parámetros normalmente utilizados para evaluar la DO: la pérdida de agua (PP) y la ganancia de sólidos (GS).

Luego de la DO, las muestras fueron lavadas intermitentemente, secadas en papel absorbente y pesadas. Una porción se utilizó para evaluar color, otra para evaluar textura, y dos restantes se destinaron a SAC y VAC.

2.2. Secado por aire caliente y vacío.

El SAC se llevó a cabo en un secador a escala piloto Didacta Italia IC106D, modificado en nuestro laboratorio, a 60 °C y utilizando una velocidad de aire de 1.4 m/s, hasta llegar a peso constante.

El VAC se efectuó en una estufa de vacío (Gallenkamp-Vacuum Oven) a 60 °C y a -1010 mbar, durante 70 min. dado que a tiempos mayores las muestras se deterioran visiblemente.

Luego de ambos procesos, se evaluaron cambios de color y textura de los productos obtenidos.

2.3. Medidas de color

El color fue evaluado mediante un sistema tridimensional, CIE 1976 L^* a^* b^* . Los parámetros de color fueron calculados según: $L^* = L - L_0$, $a^* = a - a_0$, $b^* = b - b_0$, donde el subíndice "0" representa el estado inicial, tomado como referencia. Luego, se evalúa la variación total de color, definida por la ecuación: $E^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2} + L^{*2}}$. Para este análisis se utilizó un colorímetro Minolta CR 300.

2.4. Análisis de textura

La textura de las muestras tratadas fue evaluada por medio de un ensayo de compresión de dos ciclos, en un texturómetro Stable Micro System, modelo TXT-2a. El experimento fue diseñado utilizando una probeta de acrílico de 1 cm. de diámetro a una velocidad de compresión de 5 mm/s. Los parámetros obtenidos fueron: dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra los resultados de la DO a 30 y 40 °C, utilizando una solución de sacarosa de 69 °Brix. Como es de esperarse, WL es mayor a 40 °C a tiempos largos. Como puede verse, la velocidad de deshidratación inicial es similar en los dos casos, sin embargo, a 30 °C el proceso se lentifica más que a 40 °C a mayores tiempos de contacto.

De todas formas, en ninguno de los dos casos se alcanza el equilibrio en la eliminación de agua dentro de las 24 horas del proceso.

Con respecto a GS, se comprueba que a 40 °C el máximo se alcanza a las 12 horas de tratamiento, luego, se aprecia una leve pérdida de sólidos. Durante la experiencia, se observa además el desprendimiento de pequeños fragmentos superficiales hacia la solución aunque la morfología de la muestra permanece inalterada. Ambas observaciones estarían indicando la formación de una costra superficial de sólidos que no sólo impide el ingreso de más solutos, sino que además libera parte de ellos durante la agitación. Cuando la deshidratación se lleva a cabo a 30 °C, GS muestra una tendencia creciente durante todo el proceso; sin embargo, se lentifica luego de las 12 horas de tratamiento.

El análisis del color luego de la DO (Figura 2), indica que en ambos casos la luminosidad aumenta notablemente con el tiempo de contacto. Además se observa que, superada la primera hora de deshidratación, la pérdida de la luminosidad es mayor a 40°C que a 30°C. La Figura 3 muestra la pérdida de agua del proceso combinado DO-SAC, a las dos temperaturas de trabajo, normalizada con la correspondiente a la fruta fresca secada sin tratamiento previo. La eliminación de agua es mayor cuanto mayor es el tiempo de deshidratación y cuanto menor es la temperatura de DO. Por otra parte, de los resultados presentados en la Tabla 1, puede verse que la constancia de peso se alcanza a tiempos mayores de SAC cuando se trabaja a 40°C. Estos resultados estarían de acuerdo a lo expuesto más arriba sobre la formación de la costra superficial.

De este modo, trabajar a una mayor temperatura durante la DO favorece la eliminación de agua, pero conduce a la formación de una costra que limita su liberación durante el SAC contrarrestando los supuestos beneficios de lograr un producto más deshidratado durante la primera etapa. La Figura 4 presenta los valores de PP (normalizados) para muestras sometidas a distintos tiempos de DO cuando el secado final se realiza mediante VAC durante 70 min. Se observa que PP para el DO-VAC, no presenta dependencia con el tiempo de DO cuando esta se realiza a 30°C. Cuando la DO se lleva a cabo a 40°C, se logra eliminar más agua, aunque el aumento en PP es sólo importante a tiempos largos.

En las Figuras 5 y 6 se comparan las eficiencias de ambas combinaciones (DO-SAC Y DO-VAC) cuando la DO se lleva a cabo a 40 y a 30 °C, respectivamente. El DO-SAC permite a eliminar mayor cantidad de agua que DO-VAC antes de que las muestras presenten un deterioro visible a simple vista, deformándose y adhiriéndose a la bandeja que sostiene la muestra, lo que sucede a partir de los 70 minutos de permanencia en la estufa independientemente del tiempo de contacto y de las condiciones y temperatura de la DO..

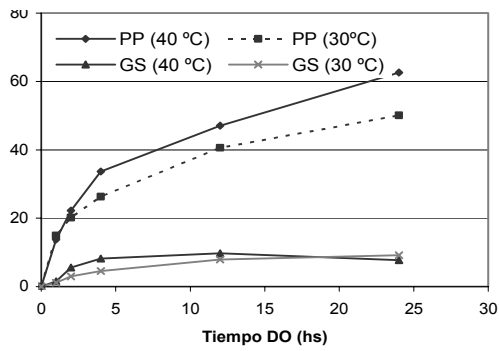


Figura 1

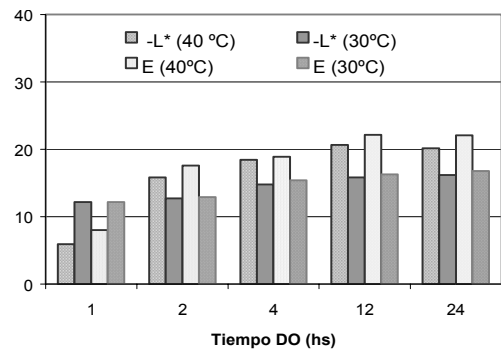


Figura 2

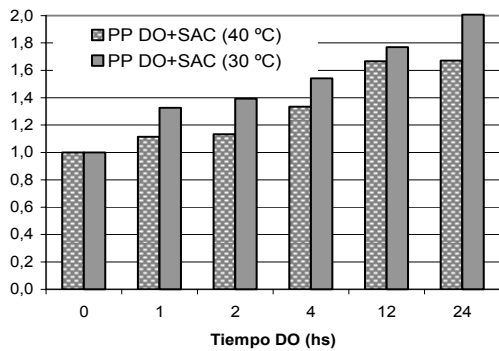


Figura 3

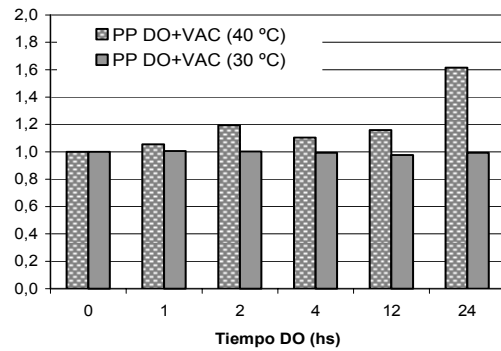


Figura 4

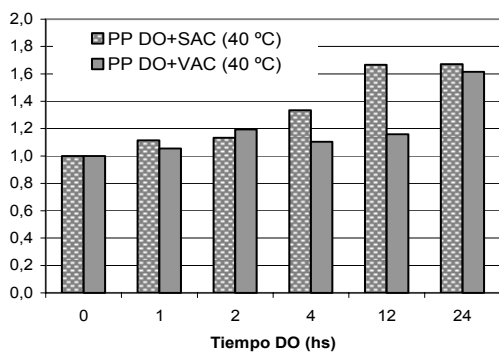


Figura 5

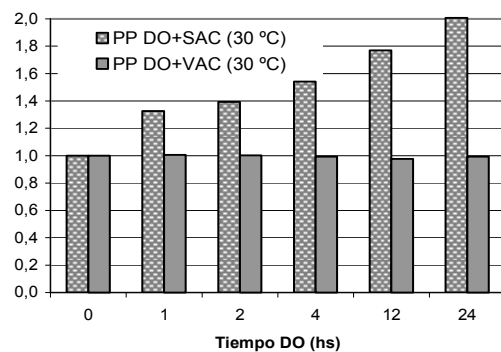


Figura 6

Figura 1: Pérdida de peso (PP (%)) y ganancia de sólidos (GS (%)) durante la deshidratación osmótica (DO) a 30 y 40 °C.

Figura 2: Análisis de color luego de la deshidratación osmótica (DO).

Figura 3: Pérdida de peso (PP (%)) durante el proceso DO-SAC a 30 y 40 °C, relativos a las muestras sin DO.

Figura 4: Pérdida de peso (PP (%)) durante el proceso DO-VAC a 30 y 40 °C, relativos a las muestras sin DO.

Figura 5: Pérdida de peso (PP (%)) durante el proceso DO-VAC y DO SAC a 40 °C, relativos al caso sin DO.

Figura 6: Pérdida de peso (PP (%)) durante el proceso DO-VAC y DO SAC a 30 °C, relativos al caso sin DO

La diferencia en la cantidad de agua removida durante el DO-SAC se hace más pronunciada cuando la DO se lleva a cabo a la temperatura más baja. Esta pérdida de

agua adicional que ocurre para el DO-SAC depende del tiempo de DO, a mayor tiempo mayor PP

La Figura 7 exhibe los cambios que tienen lugar en la elasticidad (E) y gomosidad (G) de las muestras deshidratadas a 30 y 40°C (los demás parámetros del análisis de textura no presentan cambios relevantes). Luego de la DO, se advierte que a 30 °C se obtienen productos más elásticos y gomosos que la banana fresca, aún más que los obtenidos a 40 °C.

En las Figuras 8 y 9 se presentan los resultados de textura de los productos obtenidos luego de DO-SAC. Se puede observar que cuando la DO se realiza a 40 °C, y durante tiempos largos (a partir de las 4 h), la dureza de la fruta al final del proceso es muy similar a la de la banana fresca sometida al SAC, en tanto que la cohesividad resulta ser menor (Figura 8). Además, las muestras se manifiestan más adhesivas luego de la primera hora de tratamiento independientemente del tiempo de DO y menos gomosas (Figura 9). Cuando la DO se lleva a cabo a 30 °C, los productos resultan más elásticos, sin importar el tiempo de DO (no se presenta en la Figura), en tanto que la gomosidad se incrementa significativamente a partir de las 12 h de DO (Figura 9). De acuerdo a estos resultados, la inclusión de una etapa de DO previo al SAC es conveniente si la DO se efectúa a 30 °C y tiempos cortos (menos de 12 h).

Las Figuras 10 y 11, revelan los resultados de textura de las bananas tratadas con DO-VAC. Se percibe que realizando la DO tanto a 30 como a 40 °C, la dureza y la elasticidad son menores que las de la fruta secada sin tratamiento previo (Figuras 10 y 11, respectivamente). Practicando la DO a 40 °C, se obtienen muestras más blandas cuanto mayor sea el tiempo de DO. Además, estas resultan menos cohesivas (independiente del tiempo de deshidratación, Figura 10) y con menor masticabilidad (decreciendo con el tiempo de DO, Figura 11). Esto último es lo inverso a lo que sucede cuando la DO se lleva a cabo a 30 °C. Por lo tanto, el uso del tratamiento combinado DO-VAC es favorable respecto del VAC cuando la DO se realiza a baja temperatura (30 °C) y durante tiempos cortos (hasta 4 h).

CONCLUSIONES

Analizando solamente la DO puede concluirse que se obtiene mayor eliminación de agua trabajando a 40 °C, A esta temperatura la ganancia de sólidos evoluciona favorablemente hasta las 12 horas de tratamiento. A tiempos mayores, tiene lugar una disminución de este parámetro debido a la formación de una costra superficial de sólidos sobre las muestras, de la que se desprenden pequeños fragmentos durante la agitación. También

puede observarse que luego de la DO a 40 °C se obtienen productos más oscuros, con la mayor variación total de color (a partir de la primera hora de tratamiento), menor elasticidad y menor gomosidad.

En cuanto a la eliminación de agua, el proceso combinado DO-SAC, se ve favorecido al introducir la DO en forma continua con el tiempo de contacto fruta-solución y menor es la temperatura del pretratamiento. Además, permite remover mayor cantidad de agua que DO-VAC a ambas temperaturas de trabajo antes de que se observe deterioro.

De acuerdo a los resultados de textura, la inclusión de una etapa de DO previo al SAC es conveniente si la DO se efectúa a 30 °C y tiempos cortos (menos de 12 h). Se llega a las mismas conclusiones para el DO-VAC (con respecto al VAC) sólo que el tiempo de DO debe ser menor a 4 h.

Como conclusión general puede decirse que la inclusión de una etapa previa de DO a baja temperatura (30°C) en el SAC es favorable porque permite una mayor eliminación de agua en tiempos menores y con menor gasto energético. Esto no sucede en el VAC, dado que la cantidad de agua eliminada permanece constante durante todo el proceso global.

Igualmente, mediante el uso del proceso DO-SAC en las condiciones citadas, se obtienen productos de mejor calidad organoléptica.

BIBLIOGRAFIA

Jarayaman, K.S., Das Gupta, D. K., (1992), Dehydration of fruits and vegetables: recent developments in principles and techniques, *Drying Technology*, 10 (1), pp. 1-50.

Karathanos, V. T., Kostaropoulos, A. E., Saravacos, G. D., (1995), Air drying of osmotically dehydrated fruits. *Drying Technology*, 13 (5-7), pp. 1503-1521.

Lenart, A., Lewicki, P.P., (1988), Osmotic preconcentration of carrot tissue followed by convection drying, *Preconcentration and Drying of Food Materials*, ed. S. Bruin, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 307-308.

Rahman, M. D. S., Lamb, J., (1991), Air drying behaviour of fresh and osmotically dehydrated pineapple. *Journal of Food Engineering*, 14, pp.163-171.

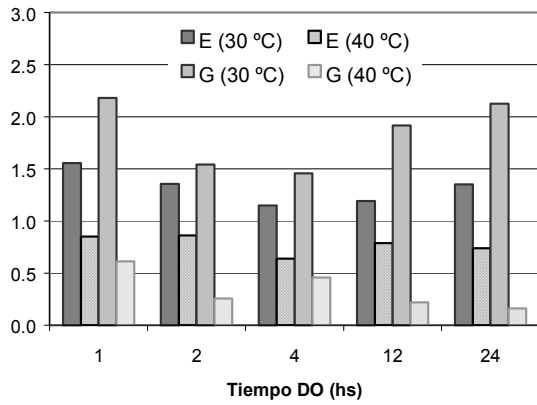


Figura 7

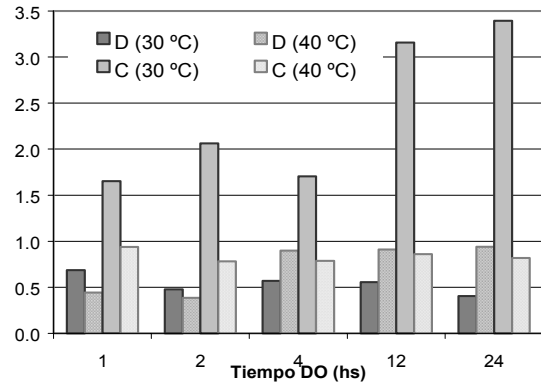


Figura 8

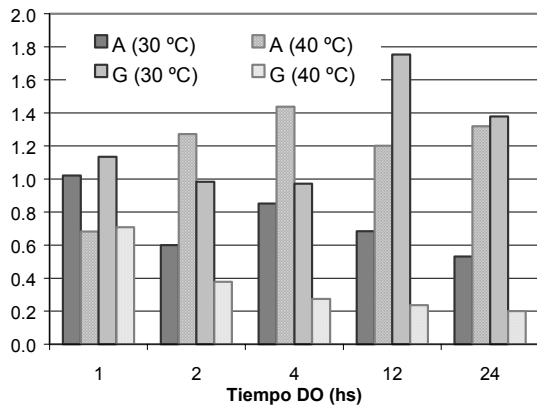


Figura 9

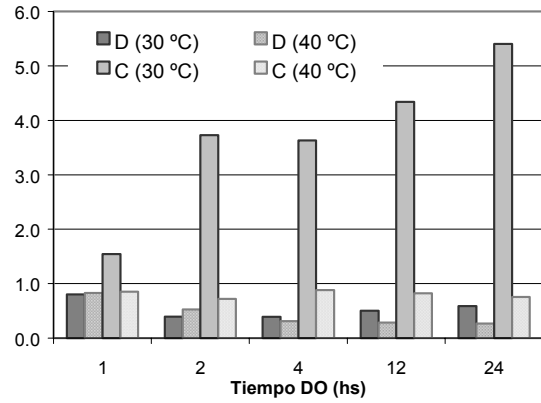


Figura 10

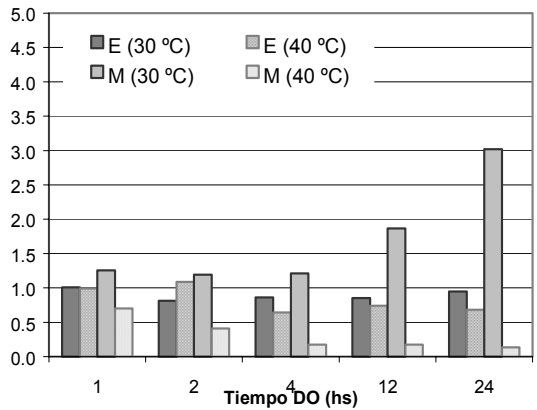


Figura 11

$t_{DO}(hs)$	0	1	2	4	12	24
$t_{SAC}(hs)$ 30 °C	1.58	1.50	1.33	1.17	1.17	1
$t_{SAC}(hs)$ 40 °C	4.88	3.33	4.83	3	2.83	2.67

Tabla 1

Figura 7: Análisis de textura luego de la DO.
 Figuras 8 y 9: Análisis de textura luego de DO-SAC.
 Figura 10 y 11: Análisis de textura luego de DO-VAC.
 Tabla 1: Comparación tiempos de SAC a 30 y 40 °C.

RETENCIÓN DEL COLOR Y CINÉTICA DE LA DESHIDRATACIÓN DE GUINDAS (*PRUNUS CERASUS*)

OHACO, Elizabeth H.¹; PIRONE, Beatriz N.¹; OCHOA, Mónica R.¹; KESSELER, Alicia G.¹; MÁRQUEZ, Carlos A, y DE MICHELIS, Antonio²

¹ Asentamiento Universitario Villa Regina, Universidad Nacional del Comahue, 25 de Mayo y Reconquista (8336) Villa Regina – Río Negro. Teléfono y Fax: 54 2941 462873. E mail: cam@neunet.com.ar

² CONICET – INTA AER El Bolsón. Mármol 1950 (8430) El Bolsón – Río Negro – Argentina. Teléfono y Fax: 54 2944 492422. E mail: inta@patagonsat.com.ar

RESUMEN

Este trabajo provee modelos cinéticos, para el secado de guindas en capas delgadas y evolución del color, simples y de cálculo rápido para utilizarlos en la simulación de equipos. El secado, convectivo, se efectuó a 50, 60, 70, 80 °C; 1, 3, 5 m/s y 5, 50 % de humedad relativa. Se seleccionó un modelo con radio de partícula variable debido al encogimiento de estos frutos. La influencia del secado sobre el color fue estudiada utilizando parámetros Hunter y los cambios se evaluaron mediante ΔE . Solamente posee influencia la temperatura del aire sobre los tiempos de secado. El secado es isotérmico y con control interno. Los coeficientes de difusión variaron entre $6,814 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ a 50 °C y $1,153 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ a 80 °C. Los cambios de color muestran una cinética de orden cero, con constantes de velocidad que variaban entre $0,181$ y $0,592 \text{ h}^{-1}$ y $E_a = 56,5 \text{ kJ/mol}$.

Palabras Clave: Guindas, cinéticas de secado y color, experiencias, simulación

ABSTRACT

This work provides kinetic models, for sour cherries drying in thin layers and evolution of the color, simples and of quick calculation to use in dryers simulation.

The drying, convective, was made at 50, 60, 70, 80 °C; 1, 3, 5 m/s and 5, 50% of relative humidity.

A model was selected with radio of particle variable due to the shrink of these fruits. The influence of the drying on the color was studied using Hunter's parameters and the changes were evaluated by means of ΔE .

Only was observed the temperature of the air influence on the drying times. The drying is isothermal and with internal control. The diffusion coefficients varied among $6,814 \cdot 10^{-11}$

m^2/s at 50 °C and $1,153 \cdot 10^{-9} m^2/s$ at 80 °C. The color changes show an order zero kinetics, with constant rate that varied between 0,181 and 0,592 h^{-1} and $E_a = 56,5 kJ/mol$.

INTRODUCCIÓN

Los métodos modernos para el diseño de equipos de secado se basan en la descripción matemática de la deshidratación en lechos. Un proceso complejo como la deshidratación puede ser analizado descomponiendo los lechos profundos en varios lechos de pequeño espesor, normalmente de la altura de una partícula individual. Por ello el secado en monocapa es el paso previo para la simulación y el diseño de equipos industriales. Asimismo, es necesario estudiar la cinética de degradación de componentes guía con el objeto de evaluar y/o predecir la calidad final del producto y expresar matemáticamente los resultados para obtener modelos que permitan su utilización en programas de cálculo. Existe numerosa bibliografía en la que se plantean diversos tipos de modelos con también diverso grado de complejidad. Está demostrado, para el caso de la cinética de secado, que los parámetros cinéticos varían con el método usado para obtenerlos (Giner, 1999; Mulet, 1994, Márquez y col, 2005), e incluso aquellos obtenidos con el mismo método pueden diferir dependiendo del contenido de humedad de equilibrio utilizado para expresar los resultados experimentales en forma adimensional. Por ello, y dado que los programas para la simulación de lechos profundos pueden llevar mucho tiempo de cálculo, es necesario seleccionar modelos que representen adecuadamente los resultados experimentales y que sean de cálculo lo más rápido posible para que los modelos de lechos profundos se puedan resolver en tiempos razonables. La cinética de secado en capa delgada constituye lo que se denomina “modelo del producto” o la ecuación constitutiva para la transferencia de masa en las partículas individuales. Dicha cinética es útil en dos aspectos principales: es un medio para estudiar de que forma una teoría puede adaptarse a los datos experimentales del secado de un alimento dado, y una vez verificada la validez de la teoría puede ser usada para determinar los parámetros cinéticos con condiciones operativas en el aire de secado, invariables, usuales en la práctica de la deshidratación. Luego puede ser utilizada para estudiar lechos profundos, en los cuales tanto el alimento como el aire cambian sus condiciones en el espacio y el tiempo, para predecir perfiles de temperatura y humedad, calcular tiempos de secado y acoplándole una cinética de degradación de componentes guía se puede predecir calidad. El objetivo de este trabajo es entonces determinar experimentalmente curvas de secado de guindas, en monocapa, en función de las variables operativas del aire. En similares condiciones que las experiencias de secado se determina la evolución del color superficial

de las muestras. Se evalúan y verifican modelos para con ellos calcular los correspondientes parámetros cinéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron guindas frescas, var. Montmorency, cosechadas en la zona de El Bolsón – Río Negro – Argentina. La fruta fue conservada a 4 °C hasta su uso. El contenido de humedad de la fruta fresca variaba entre 69,5 y 72 % base húmeda.

Se utilizó un equipo de secado de laboratorio, que consistía básicamente en un sistema cerrado con circulación forzada de aire con la posibilidad de variar y controlar las variables operativas en el aire (Ochoa y col., 2002).

La temperatura del aire de secado y del interior de las partículas se midió con termocuplas conectadas a un termómetro digital (0.5 °C de resolución). La velocidad y contenido de humedad del aire se midieron con un anemómetro y un higrómetro respectivamente. Pesando la muestra inicial y conociendo su humedad inicial, la masa seca de la muestra que se considero constante se calculó: $Masa\ seca = Masa\ inicial / (1+X_0)$, donde X_0 es la humedad inicial de la muestra. Los valores restantes de la humedad media de las partículas se obtuvieron por pesada discontinua de la bandeja. Las pesadas se efectuaban con una balanza digital de 0,001 gramo de resolución. Las humedades a los distintos tiempos de secado se calcularon: $X = Masa\ al\ tiempo\ actual / Masa\ seca - 1$, donde X es el contenido de humedad de la muestra parcialmente deshidratada. Las variables operativas utilizadas en el aire de secado fueron: temperatura: 50, 60, 70 y 80 °C; Velocidad: 1, 3 y 5 m/s; humedad relativa: 5 y 50 %.

Evaluación del color superficial

Se midieron los parámetros L, a y b con un colorímetro CR-300 Chroma Meters Minolta. El Instrumento fue estandarizado con una placa cerámica blanca (L= 95,55; a= -0,10 y b=+2,69). La diferencia de color ΔE fue calculada a partir de los parámetros a, b y L usando la ecuación de Hunter – Scotfield (Hunter, 1975). Se utilizó el mismo equipo experimental de secado y se ensayaron temperaturas de 55, 65 y 75 °C. Se realizaron 2 lecturas por fruto en la zona ecuatorial. Los resultados son promedio de veinte determinaciones por cada punto de la curva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secado

En primera instancia y con el objetivo de seleccionar un modelo adecuado es necesario evaluar con que mecanismo se conduce el secado. Para ello se midió la temperatura interior de los frutos, Fig. 1a, y se represento la velocidad de secado experimental en función del contenido de humedad de las partículas, Fig. 1b.

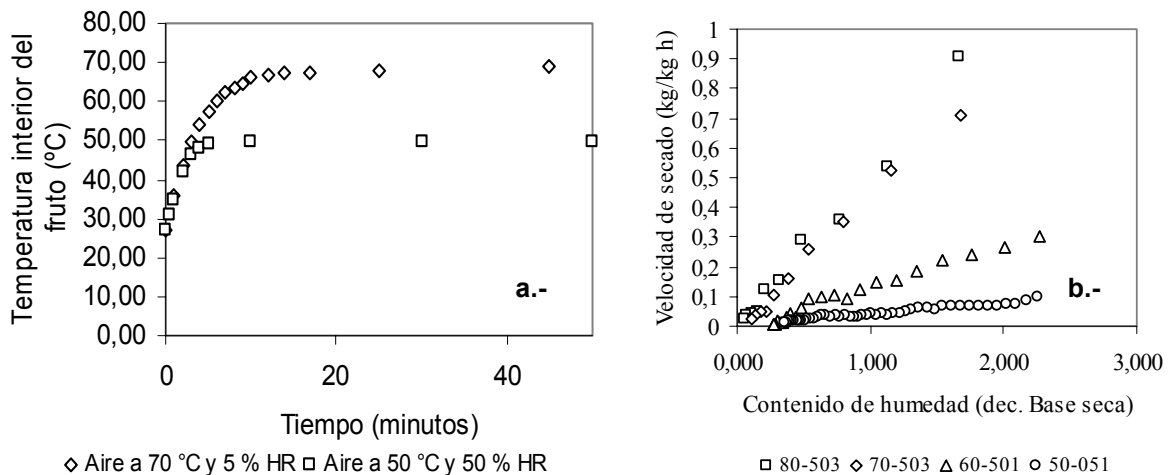


Figura 1: a.- Temperatura interior de los frutos en función del tiempo a temperaturas y humedades relativas del aire distintas. b.- Velocidad de secado de los frutos. Códigos: primeros dos dígitos: temperatura; segundos dos dígitos: humedad relativa %; último dígito: velocidad del aire

Como se observa en la Fig. 1a, y comparativamente con los tiempos de deshidratación la temperatura de las partículas rápidamente se aproxima a la temperatura del aire de secado, por ello es posible indicar que los perfiles de temperatura en el interior de las partículas pueden considerarse planos, y como la temperatura promedio de las partículas es muy próxima a del aire, que también se cumple la condición de secado isotérmico. Este hecho evita la resolución del balance de energía (Giner, 1999; Márquez y col., 2005). En la Fig. 1b, se observa que la velocidad de secado experimental presenta un único periodo de velocidad decreciente ($R^2 > 0,96$), lo cual indica que se puede seleccionar un modelo de transferencia de masa con control interno estricto. Por ello se selecciono el modelo de Becker (1959), que para geometría esférica es:

$$X^* = \frac{X - X_e}{X_o - X_e} = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} a_v \sqrt{Dt} + 0.331 a_v^2 Dt \quad (1)$$

Donde a_v es el área por unidad de volumen de la partícula, que lógicamente involucra el radio de la misma. Para esferas $a_v = 3/R$, siendo R el radio de la partícula. D es el coeficiente de difusión. X^* , y X_e son los contenidos de humedad adimensionales y de equilibrio de las partículas respectivamente. X es el contenido de humedad medio de la partícula parcialmente deshidratada y t el tiempo.

Las soluciones como la presentada, en la mayoría de los casos, se han utilizado con radio de partícula constante. Sin embargo, en trabajos de reciente aparición se ha justificado la utilización de radio variable en ellas (Thakor y col. 1999; Di Matteo y col., 2000; Márquez y col., 2005) haciendo uso de determinadas simplificaciones.

Los trabajos de Di Matteo y col., (2000) y Márquez y col., (2005), han propuesto el radio de una esfera de igual volumen que la partícula considerando radio variable en la solución de difusión tomando en cuenta la variación del radio mediante la consideración de que en cada paso del cálculo de la función se tomaba el valor medio entre el valor calculado con el radio inicial y el final de cada intervalo medido. En este trabajo se utilizará la ec. (1) con radio de partícula variable debido al encogimiento de las partículas, El radio se calculara con la ecuación presentada por Bernardi y col., (2001). La X_e se calculará con el modelo sorcional presentado por Vulliouy y col., (2004).

En la Fig. 2 se presentan, con símbolos, las curvas experimentales de secado a las distintas temperaturas estudiadas, y con líneas las predicciones de la ec. (1). Como se puede observar la correlación es satisfactoria. La regresión del modelo de la ec. (1) con los datos experimentales se efectuó minimizando el error % promedio y maximizando el coeficiente de regresión R^2 . Los valores del coeficiente de difusión D obtenidos mediante la aplicación del modelo de la ec. (1) se presentan en la Tabla 1 junto con los errores promedio y los coeficientes de regresión.

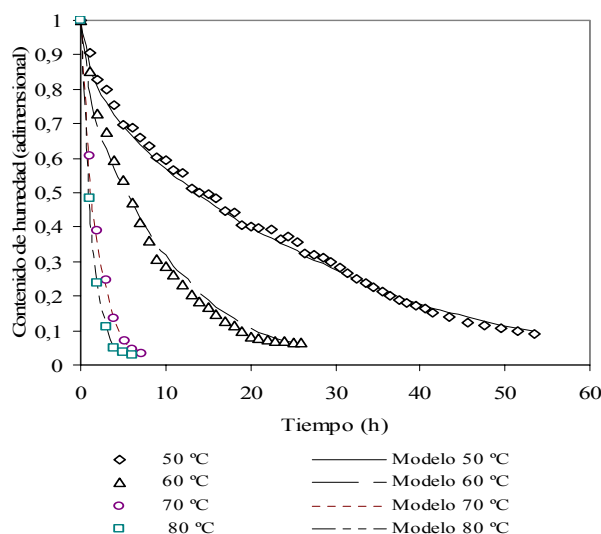


Figura 2: Humedad adimensional experimental de los frutos y predicciones de la ec. (1)

Tabla 1: Coeficientes de difusión para el secado de guindas, error promedio de la regresión y coeficiente de regresión.

Temperatura (°C)	D (m ² /s)	R^2	Error %
50	$6,814 \cdot 10^{-11}$	0,998	- 0,33
60	$1,711 \cdot 10^{-10}$	0,994	8,15
70	$8,129 \cdot 10^{-10}$	0,995	- 1,64
80	$1,153 \cdot 10^{-9}$	0,998	9,15

Correlación del coeficiente de difusión con la temperatura

Se utilizó un modelo tipo Arrhenius, se presenta en la ec. (2):

$$D = D_{\infty} \text{Exp}\left[-\frac{Ea}{R T}\right]; \text{Ln}D = \text{Ln}D_{\infty} - \frac{Ea}{R T} \quad (2)$$

Donde T es la temperatura del aire en K, D_{∞} es el factor pre exponencial, Ea la energía de activación y R la constante universal de los gases.

En la Fig. 3 se presentan los resultados obtenidos con la forma logarítmica de la ec. (2). Del gráfico de la Fig. 3 se obtuvo el valor de la energía de activación $Ea = 22,9$ J/mol, con un coeficiente $R^2 = 0.968$, por lo que es posible considerar que el ajuste es satisfactorio.

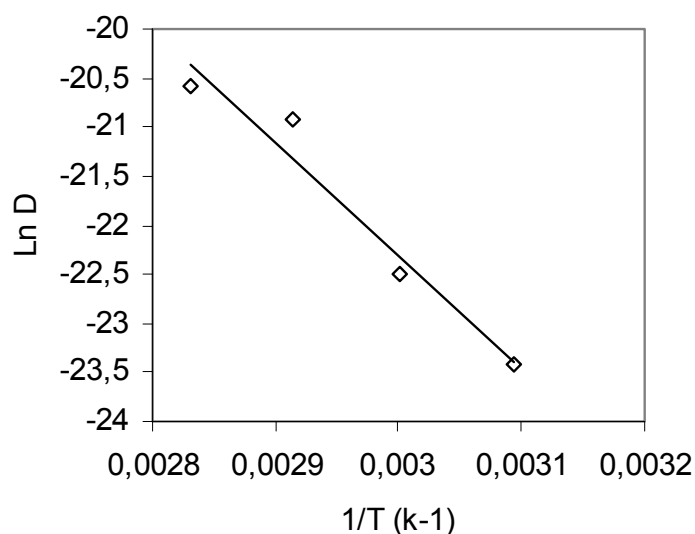


Figura 3: Funcionalidad del coeficiente de difusión con la temperatura

Comparación de valores experimentales de humedad dimensional y predichos por la ec. (1) con los valores de D obtenidos de las curvas de secado en capa delgada

La comparación de los valores experimentales de contenido de humedad dimensional de los frutos y los predichos por la ec. (1) presentan una correlación satisfactoria, con valores de $R^2 > 0,975$

Color Superficial

Los valores experimentales obtenidos para los parámetros Hunter a, b y L se expresaron de acuerdo a la ec. (3)

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2)} \quad (3)$$

Donde $\Delta a = a - a_0$; $\Delta b = b - b_0$ y $\Delta L = L - L_0$. Los subíndices “0” indican color inicial de la muestra fresca.

En la Fig. 4 se presentan las curvas de ΔE en función del tiempo. Del gráfico de la Fig. 4 se observa que el cambio de color del rojo típico hacia los marrones sigue una cinética de orden cero, cuyas constantes, energía de activación y coeficientes de regresión se muestran en la Tabla 2.

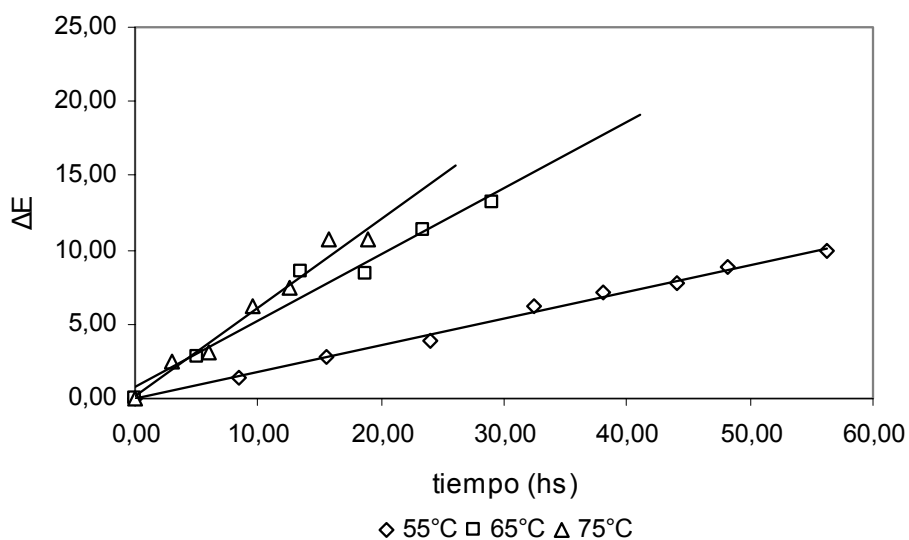


Figura 4: Evolución del color de las guindas en función del tiempo de secado en términos del Parámetro Hunter ΔE

Tabla 2: Constantes de velocidad de reacción, energía de activación y coeficientes de regresión para el cambio de color en guindas en términos del ΔE

T(°C)	K (h ⁻¹)	R ²
55	0.181	0.994
65	0.447	0.964
75	0.592	0.973
Energía de activación: 56,5 kJ/mol (R ² = 0,925)		

CONCLUSIONES

Se seleccionó un modelo muy simple para la evaluación de la cinética de deshidratación convectiva, en capa delgada, de guindas. Luego de comprobar la validez del mismo en las condiciones estudiadas, y mediante la utilización de un modelo de sorción y otro de encogimiento volumétrico obtenidos de la bibliografía, se obtuvo la cinética del secado de las guindas y los correspondientes coeficientes de difusión. Los coeficientes de difusión fueron correlacionados con la temperatura mediante un modelo tipo Arrhenius con un ajuste satisfactorio. Los valores obtenidos para el coeficiente de difusión efectivo se encuentran en concordancia con valores encontrados en la bibliografía para otros alimentos. El modelo seleccionado demostró funcionar satisfactoriamente atendiendo a que debido a la complejidad de la simulación de lechos no agregará mucho tiempo de cálculo. Asimismo, la cinética de degradación del color superficial de las guindas resultó de orden cero, ecuación esta también muy simple para los objetivos buscados.

BIBLIOGRAFÍA

Becker, H.A. (1959). A Study of Diffusion in Solids of Arbitrary Shape, with Application to the Drying of the Wheat Kernel. *Journal of Applied Polymer Science*, 1(2): 212-226

Bernardi, I., Vullioud, M, Márquez, C A y De Michelis, A (2001). Cambios de volumen y área durante la deshidratación de frutos enteros del prunus cerasus. Memorias del 8° Congreso Latinoamericano de Transferencia de calor y Materia. Latcym 2001. Veracruz, Mexico, Febrero 2001. ISBN 698-5401-00-4. Pp. 197-200

Di Matteo, M., Cinquanta, L., Galiero, G. & Crescitelli, S. (2000). Effect of a Novel Physical Pre-treatment Process on the Drying Kinetics of Seedless Grapes. *Journal of Food Engineering*, 46(1): 83-89

Giner, S.A. (1999). Diseño de Secadoras Continuas de Trigo. Simulación de la Transferencia de Calor y Materia y de Perdidas de Calidad. Tesis Doctoral. Departamento

de Química e Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata

Hunter, R. S. (1975) Scales for measurement of color differences; J. Wiley (Ed.), "Measurement of Appearance". New York: Interscience, pp 133.

Mulet, A. (1994). Drying Modelling and Water Diffusivity in Carrots and Potatoes. *Journal of Food Engineering*, 22: 329-348

Márquez, C.A.; De Michelis, A. y Giner, S.A. (2005). Drying kinetics of rose hip fruits (*Rosa eglanteria L.*). Enviado para su publicación en el Journal of Food Engineering

Ochoa, M.R., Kessler, A.G.; Pirone, B.N., Márquez, C. A. & De Michelis, A. (2002). Shrinkage during Convective Drying of whole Rose Hip (*Rosa Rubiginosa L*) Fruits. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35(5): 400-406

Thakor, N.J., Sokhansanj, S., Sosulski, F.W. & Yannacopoulos, S. (1999). Mass and Dimensional Changes of Single Canola Kernels During Drying. *Journal of Food Engineering*, 40: 153-160

Vullioud, M.; Márquez, C.A. and De Michelis, A. (2004). Desorption isotherms for sweet and sour cherry. *Journal of Food Engineering*, 63(1): 15-19

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen a: Fac. Ing. – U. N. del Comahue (Proy. FAIN - I089), y ANPCyT (Proy. PICT 09-06427) por el soporte financiero. A CORFO - CHUBUT e INTA AER El Bolsón por la provisión de la materia prima y otros insumos. El autor De Michelis es miembro del CONICET.

DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA DA CARNE DE FRANGO

OLIVAREZ, Silvana A., NOREÑA, Caciano P. Z., BRANDELI, Adriano

Departamento de Tecnologia de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP.91591-970. Fone: (51)33166681, Fax: (51)33167048, e-mail: czapatan@ufrgs.br.

RESUMEN

En este trabajo fue estudiado el proceso de deshidratación osmótica de los cortes de la pechuga de la carne de pollo, vía salazón seca con cloruro de sodio, a las temperaturas de 5 y 15°C. Durante la deshidratación fueron evaluados la pérdida de agua y la disminución de la actividad de agua en los cortes. Los resultados indicaron una mayor pérdida de agua a 15°C, siendo que las mayores tasas de reducción de la humedad y de la actividad de agua fueron durante las primeras 24 horas. Después de ese período, el efecto de la temperatura fue leve. También fue realizado el análisis químico de los principales componentes del pollo.

Palabras claves: pollo, deshidratación osmótica, actividad de agua.

ABSTRACT

In this work, the osmotic dehydration of chicken breast meat was studied through dry salt processing at 5 and 15°C. Water loss and decrease of water activity were evaluated during dehydration. The results indicate that water loss was higher at 15°C than 5°C. Reduction of moisture and water activity occurred at superior rates during the first 24 hours. After this time, the effect of temperature was negligible. Chemical analysis of chicken was also carried out.

Key-words: chicken, osmotic dehydration, water activity.

INTRODUÇÃO

A salga é uma operação comumente usada na conservação de carnes, pescado, produtos lácteos, azeitonas e picles. Durante a salga ocorre dois principais fluxos, o ingresso de sal e outros componentes que propiciam o curado e a saída de água e de outros componentes solúveis do alimento (Chiralt et al., 2000).

A salga é empregada com o intuito de diminuir a atividade de água a fim do alimento ter maior estabilidade frente ao deterioro microbiológico, químico e bioquímico (Mulvihill e Cox, 1980; Delacroix-Buchet e Trossat, 1991; citados por Chiralt et al., 2000).

Sabadini et al. (2001) estudaram o processo de desidratação osmótica via salga seca e úmida em carne às temperaturas de 10 e 20°C, avaliando as mudanças de atividade de água e cor.

Comaposada et al. (2000) obtiveram as isotermas de sorção em carne de porco a diferentes teores de sal e temperaturas de 5, 13 e 26°C, encontrando uma forte interação entre a concentração de cloreto sódio e temperatura na faixa de atividades de 0,903 e 0,946.

O objetivo deste artigo foi o estudo da variação da atividade de água e umidade da carne de frango durante o processo de salga seca às temperaturas de 5 e 15°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nos experimentos foram empregados peitos de frango, sem osso nem pele. Estes foram cortadas em forma de placa plana de aproximadamente 8x3x0,5cm e impregnadas de uma camada de sal grosso (cloreto de sódio) em toda a sua superfície, colocadas sobre uma placa de vidro e deixadas em câmaras de refrigeração às temperaturas de 5 e 15°C. A troca por uma nova camada de sal foi feita diariamente.

A cada 12 horas foram medidas nas amostras a perda de umidade e diminuição da atividade de água durante 10 dias.

O teor de umidade foi quantificado pelo método de estufa, até atingir peso constante (método n. 950.46 AOAC,1990). A atividade de água, medido num analisador marca Aqualab, modelo 3TE (método n. 978.18 AOAC,1990).

As análises de lipídeos e proteínas no peito de frango, foram realizadas seguindo a metodologia de normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976), Brasil, que consistem na extração com éter de petróleo seguida de remoção por destilação do solvente em parelho tipo Soxhlet (lipídeos) e na determinação de nitrogênio pelo método Kjeldahl (proteína).

RESULTADOS E DISCUSSAO

Os valores da análise físico-química do peito de frango sem pele foram de 74,38% de umidade, 23,87% em proteína e 1,76% em lipídios. Esses valores são similares aos reportados por Delgado e Sun (2001) de 73,81% e 25,06% para os dois primeiros componentes, no entanto, quanto aos lipídios eles reportaram valor de 0,41%. Essas diferenças podem ser devidas à idade, tipo de alimentação, raça e manejo das aves.

A atividade de água (a_w) da amostra foi de 0,99, valor que concorda com Banwart (1989), citado por Mello Franco e Landgraf (1996) que menciona ser maior que 0,98.

A Figura 1 apresenta os valores de atividade de água em função do tempo. Nela se observa que o gradiente de diminuição da atividade de água é maior nas primeiras 24 horas, sendo essa diminuição maior a 15°C. Assim temos que a 15°C as amostras atingiram um a_w de 0,742 em 12 horas, enquanto que, a 5°C esse valor foi atingido em 24 horas.

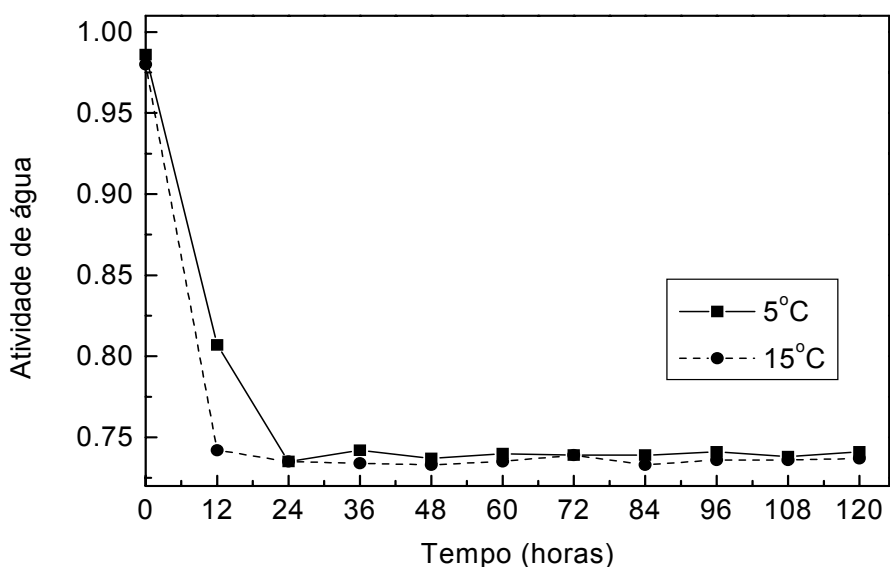


FIGURA 1. Valores experimentais de atividade de água de carne de frango durante a salga.

Depois de 24 horas a atividade de água ficou entorno de 0,74, para as duas temperaturas durante os seguintes nove dias. Delgado e Sun (2001) mencionam que o efeito da temperatura, nas isotermas de sorção do peito de frango, não é significativo para valores de atividade de água menores que 0,5-0,6. Acima desses valores o incremento na temperatura resulta num decréscimo na umidade de equilíbrio.

Comaposada et al. (2000) encontraram que para a_w de 0,75, não houve efeito significativo da temperatura, nos valores de equilíbrio das isotermas de carne salgada de porco. Sabadini et al. (2001) após desidratação mediante salga seca da carne obtiveram valores finais de a_w para as temperaturas de 10 e 20°C de 0,789 e 0,745 respectivamente.

A Figura 2 apresenta o perfil de umidade durante o processo de desidratação, onde se observa que durante as primeiras 24 horas as taxas de saída de água foram as maiores

no processo. A saída da água livre provocou uma diminuição na atividade de água como foi discutido anteriormente.

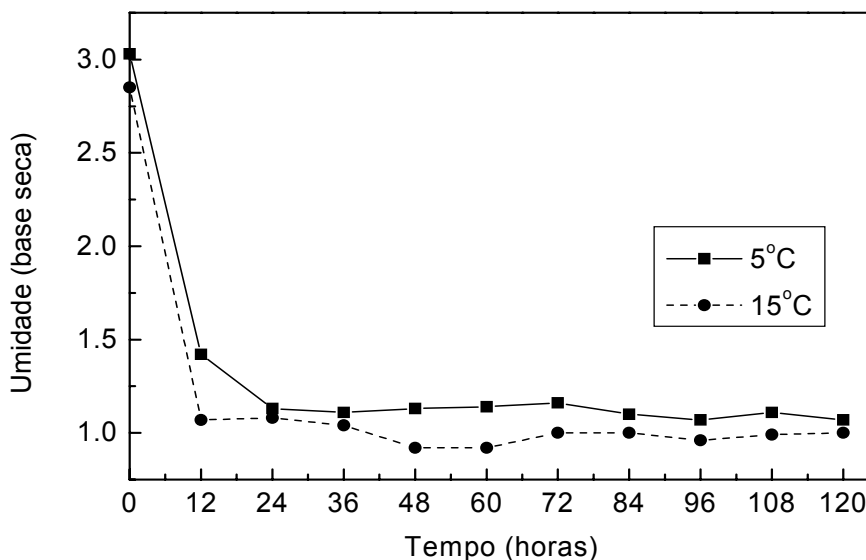


FIGURA 2. Valores experimentais da umidade de carne de frango durante a salga.

Também pode ser observado o efeito da temperatura na perda de umidade, sendo maior a 15°C. Isso é devido à transferência de massa ser dependente da temperatura. Esse efeito foi maior durante as primeiras 24 horas, diminuindo drasticamente após esse período, devido à menor disponibilidade de água. Rastogi et al. (1997) mencionam que o gradiente de pressão é a força motriz para a transferência de massa por osmose, que a sua vez, depende da temperatura e a concentração.

CONCLUSÕES

Os resultados da desidratação osmótica do peito de frango empregando cloreto de sódio, indicaram uma maior perda de água e diminuição da atividade de água à 15°C que à 5°C, sendo que as maiores perdas de umidade foram durante as primeiras 24, que correspondeu a um a_w de 0,74. Após esse período o efeito da temperatura foi leve.

BIBLIOGRAFIA

CHIRALT, P., FITO, P., BARAT, J. M., ANDRÉS, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., ESCRICHE, I., CAMACHO, M. M. Use of vacuum impregnation in food salting process. *Journal of Food Engineering*, v. 49, n. 2-3, p. 141-151, 2001.

COMAPOSADA, J., GOU, P., ARNAU, J. The effect of sodium chloride content and temperature on pork meat isotherms. *Meat Science*, v. 55, n. 3, p. 291-295, 2000.

DELGADO, A. E., SUN, D. W. Desorption isotherms and glass transition temperature for chicken meat. *Journal of Food Engineering*, v. 55, n. 1, p.1-8, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto "Adolfo Lutz". Métodos químicos e físicos para análises de Alimentos. 2ª ed., São Paulo, 1976. 371 p.

MELO FRANCO, B. D. G., LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. Ed. Atheneu, 1996. 182p.

RASTOGI, N. K., RAGHAVARAO, M. S., NIRANJAN, K. Mass transfer during osmotic dehydration of banana: Fickian diffusion in cylindrical configuration. *Journal of Food Engineering*, v. 31, p. 423-432, 1997.

SABADINI, E., HUBINGER, M. D., SOBRAL, P. J. A., CARVALHO, J. B. C. Alterações da atividade de água e da cor da carne no processo de elaboração da carne salgada desidratada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 14-19, 2001.

ESTUDO DA SECAGEM DAS SEMENTES DE PINHÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS DE AR

OLIVAREZ, Silvana A., NOREÑA, Caciano P. Z.

Departamento de Tecnologia de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP.91591-970. Fone: (51)33166681, Fax: (51)33167048, e-mail: czapatan@ufrgs.br.

RESUMEN

Fue estudiado el efecto de la temperatura sobre la cinética de deshidratación del piñón con y sin cáscara a las temperaturas de 55, 65 y 75°C, siendo que la disminución de la humedad fue mayor a medida que aumenta la temperatura. Fueron encontrados que a las temperaturas de 55 y 65°C las pérdidas de agua fueron menores en las semillas con cáscara. Los valores obtenidos de la composición centesimal estuvieron de acuerdo con los valores reportados por la bibliografía.

Palabras claves: piñón, deshidratación.

ABSTRACT

The effect of the temperature on the dehydration kinetics of the pinhão with and without coat was studied. The experiment was conducted at 55, 65 and 75°C, being that the decrease of the moisture was higher as the temperature increases. When temperatures of 55 and 65°C were used, the lost of water was lower in the seeds with coat. The obtained values of the chemical composition agreed with the values reported by the bibliography.

Key-words: pinhão seeds, drying

INTRODUÇÃO

O pinhão, semente da Araucária (*Araucária angustifolia*), é uma espécie que ocupa uma área muito grande nos estados do Sul do Brasil, alcançando, também, manchas esparsas, no sudeste e no nordeste de São Paulo, no sul de Minas Gerais e no noroeste do Rio de Janeiro. É amplamente consumido na alimentação das pessoas na forma cozida.

Devido a sua alta umidade, a semente é atacada por fungos, pelo que se faz necessário armazenar o pinhão em ambientes secos e arejados, sendo uma boa alternativa a desidratação para assim poder prolongar seu tempo de vida de prateleira.

Pouca bibliografia se tem sobre as características nutricionais e tecnológicas do pinhão, entre elas encontramos os trabalhos de CORDENUNSI et al. (2004) que avaliaram as mudanças na composição química da semente crua e cozida, encontrando que os compostos fenólicos e a quercitina, presentes na envoltura interna (pele) da semente, migram para dentro do endosperma após cozimento. DATTA et al. (1993) avaliaram o efeito das modificações químicas das lectinas I e II presentes no pinhão.

LOBATO et al. (1998) avaliaram o efeito da fosfatação sobre a composição centesimal do amido de pinhão com o intuito do aprimoramento das características reológicas e seu melhor aproveitamento na área industrial.

STAHL et al. (1998) estudaram as modificações químicas de amido de pinhão com médio e alto grau de fosfatação, observando que se comportou de modo bastante semelhante ao amido de milho quanto à incorporação de fósforo. Os resultados obtidos por BOCHI et al (1998) sugerem que a fosfatação induziu um aumento na capacidade de ligação à água fria e na transparência dos géis de amido, podendo ter importante aplicação no preparo de alimentos pré-prontos.

Os objetivos do presente trabalho foram determinar a composição química do pinhão e elaborar as curvas de secagem do pinhão com casca e sem casca às temperaturas de 55, 65 e 75°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de pinhão (16kg) foram adquiridas no mercado local da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Após recebimento, foi realizada uma limpeza, empregando peneiras de diferentes diâmetros de malha com o intuito de retirar a poeira, resíduos de semente esfarelada em consequência da presença de larvas, falhas e eventuais sujeiras provenientes da produção ou do transporte. Posteriormente foi realizada uma seleção que consistiu em retirar as sementes mofadas, infestadas ou em estágio inicial de brotação, que não são perceptíveis se não descascadas. No trabalho foram empregados pinhões que tinham um comprimento de 6cm em média. Depois foram colocadas em sacolas de polipropileno de 2kg e armazenadas em ambiente seco, para serem empregadas nos experimentos de secagem.

A desidratação foi realizada num secador de cabine, com fluxo de ar, proveniente de um ventilador centrífugo, previamente aquecido por um conjunto de resistências elétricas, com controle de temperatura, projetado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Os experimentos de secagem foram realizados com o pinhão com casca e sem casca às temperaturas de 55, 65 e 75°C por oito horas. As análises físico-químicas das sementes foram realizadas seguindo a metodologia de normas analíticas do Instituto ADOLFO LUTZ (1976), Brasil, que consistem em: umidade, por aquecimento direto da amostra em estufa a 105°C até peso constante; acidez, por titulação com hidróxido de sódio 0,1N; lipídeos, pela extração com éter de petróleo seguida de remoção por destilação do solvente em aparelho tipo Soxhlet; cinzas, obtido pela perda de peso do produto submetido ao aquecimento em temperatura próxima a 550-570°C; fibra, obtido do resíduo orgânico insolúvel em éter de petróleo e após digestão com ácido sulfúrico 0,255N e hidróxido de sódio 0,313N; proteína, baseado na determinação de nitrogênio pelo método Kjeldahl e, açúcares redutores, baseado na redução de um volume conhecido do reagente de cobre alcalino (Fehling) a óxido cuproso.

As curvas de secagem foram elaboradas de acordo com a metodologia descrita por KARATHANOS et al. (1990) e GEANKOPLIS (1993), que consiste em pesar as amostras em tempos previamente estabelecidos durante a desidratação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, se apresenta a composição centesimal do pinhão. Os resultados indicaram que os teores de proteínas, gorduras e cinzas não foram expressamente diferentes aos valores reportados por CORDENUNSI et al. (2004) de 3,57%, 1,26 e 1,60%. FRANCO (1997) encontrou valores de 3,96 e 1,79% para os dois primeiros componentes. Essas diferenças é devida à composição química dos materiais biológicos que dependem da safra, do ambiente em que vivem e da amostragem realizada.

Tabela 1. Composição Centesimal da semente de pinhão.

Constituinte	% (base úmida)
Umidade	49,55
Acidez	1,30
Proteína	3,19
Gordura	1,27
Cinza	1,01
Açúcares não-redutores	0,06
Fibra	1,49
pH	6,5 ± 0,5

Os valores de atividade de água (a_w) e de umidade do endosperma foram de 0,98 e 49,55%. CORDENUNSI et al. (2004) encontrou uma umidade de $49,5 \pm 0,02$. Os altos valores de atividade de água encontrados fazem com que esse produto seja muito suscetível às reações de deterioração. A casca teve a_w de 0,71.

O rendimento médio da semente foi de 28,1% em casca e 71,9% em endosperma (incluído nele o embrião). As Figuras 1 e 2 apresentam as curvas de perda de umidade, no pinhão com casca e sem casca, em função do tempo. Nelas se observam que as curvas apresentam o período de secagem decrescente. KARATHANOS et al. (1990) mencionam que na maioria dos alimentos o processo de desidratação é conduzido durante o período de taxa decrescente, na qual a água é transportada do interior para a superfície do material por diversos mecanismos, sendo que, usualmente o transporte de água é descrito pela equação de FICK em estado não estacionário.

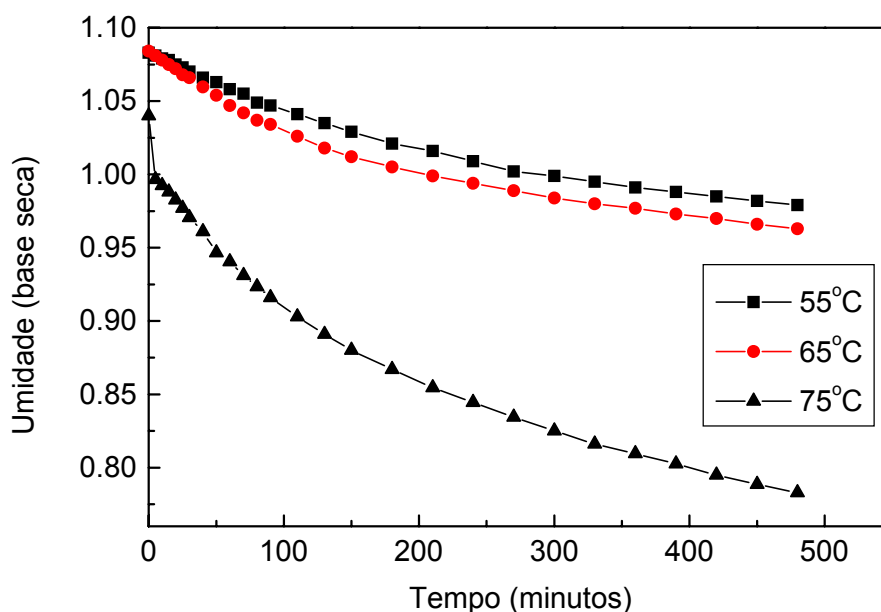


Figura 1. Curvas de secagem do pinhão com casca a diferentes temperaturas.

Nas mesmas figuras é mostrado o efeito da temperatura sobre as curvas de secagem, sendo que, quanto maior a temperatura mais rápido é o processo de secagem, devido às maiores perdas de umidade a medida que aumenta a temperatura do ar. ÖZDEMIR e DEVRES (1999), mencionam que o emprego de maiores temperaturas aumentam as taxas de secagem significativamente.

Nas temperaturas de 55 e 65°C a remoção da umidade foi mais lenta no pinhão com casca, devido à alta resistência ao transporte de água oferecidas pela pele e a casca.

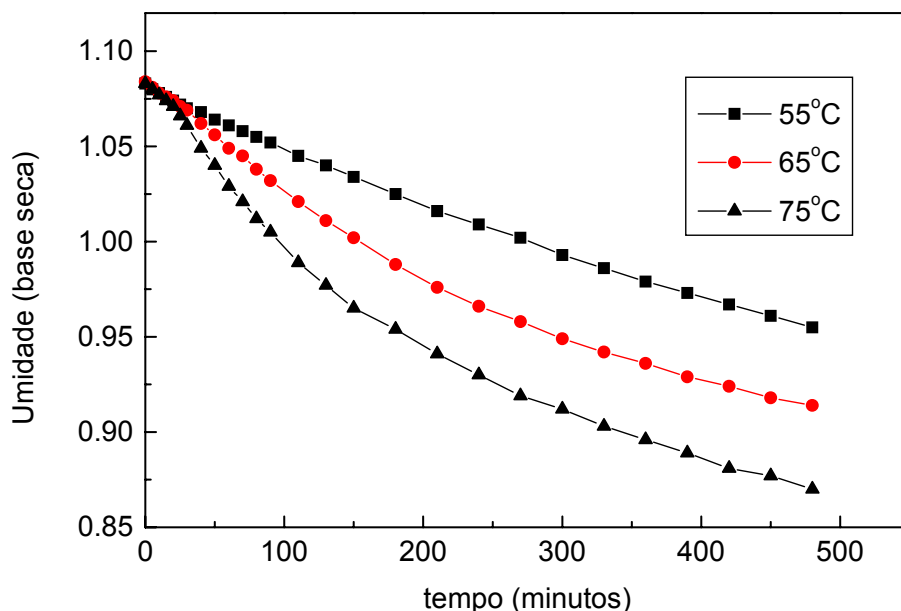


Figura 2. Curvas de secagem do pinhão sem casca a diferentes temperaturas.

CONCLUSÕES

Foi observado o efeito da temperatura sobre a cinética de secagem, sendo maior à medida que aumenta a temperatura no pinhão com casca e sem casca. Nas temperaturas de 55 e 65°C foram menores as perdas de umidade nas sementes com casca, consequência da alta resistência à transferência de massa oferecida pela superfície da casca.

BIBLIOGRAFIA

BOCHI, V. C., LOBATO, L. P., STAHL, J. A., EMANUELLI, T., COSTABEBER, I., KUBOTA, E. Avaliação da capacidade de ligação à água e cor de do gel do amido de pinhão modificado por fosfatação. Anais XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2002. p. 2582-2585.

CORDENUNSI, B., MENEZES, E. W., GENOVESE, M. I., SOUZA, A. G., LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian Pine (*Araucária angustifolia*) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, p. 3412-3416, 2004.

DATTA, P. K., FIGUEROA, M. O., LAJOLO, F. M. Chemical modification and sugar binding properties of two major lectinas from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, p. 1851-1855, 1993.

FRANCO, G. Tabela de Composição Química dos Alimentos. 9ª ed., São Paulo: Atheneu, 1997. 307p.

GEANKOPLIS, C. Transport processes and unit operations. Ed. Prentice Hall, Inc. 1993, 921p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto "Adolfo Lutz". Métodos químicos e físicos para análises de Alimentos. 2ª ed., São Paulo, 1976. 371 p.

KARATHANOS, V. T., VILLALOBOS, G., SARAVACOS, G. D. Comparison of two methods of estimation of the effective moisture diffusivity from drying data. *Journal of Food Science*, vol. 55, p. 218-223, 1990.

LOBATO, L. P., STAHL, J. A., BOCHI, V. C., KUBOTA, E., MONTAGNER, S. T., KRIESE, P. R., COSTABEBER, I., EMANUELLI, T. Composição centesimal do amido de pinhão: nativo e modificado por fosfatação. *Anais XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre, 2002. p. 2586-2590.

ÖZDEMIR, M., DEVRES, Y. O. The thin layer drying characteristics of hazelnuts during roasting. *Journal of Food Engineering*, v. 42, p. 225-233, 1999.

STAHL, J. A., LOBATO, L. P., BOCHI, V. C., KUBOTA, E., COSTABEBER, I., EMANUELLI, T. Modificação química de amido de pinhão com médio e alto grau de fosfatação. *Anais XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre, 2002. p. 2578-2581.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Brasil, pelo auxílio financeiro.

DESHIDRATACION OSMÓTICA DE FRUTAS. APLICACIÓN A LA PRODUCCION DE MERMELADAS Y BOCADILLOS DE KIWI.

WAIS, Natalia L. ^(1,2); AGNELLI, Miriam E. ^(1,2); MASCHERONI, Rodolfo H. ^(1,2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, 47 y 116. (1900) La Plata, Bs As, Argentina. Tel.: 0221-424 9287

(2) Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería; Universidad Nacional de La Plata, 47 y 1 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. E-mail: magnelli@volta.ing.unlp.edu.ar.

RESUMEN

La manufactura de mermeladas y dulces de fruta consiste en mezclar los ingredientes en proporciones tales que se alcance un contenido mínimo de fruta de 40% y 45% respectivamente, y 65 °Brix. A fin de obtener un producto que se preserve adecuadamente la mezcla se concentra por cocción, proceso que promueve efectos indeseables sobre sus características organolépticas y nutricionales. Utilizando frutas deshidratadas osmóticamente (DO) se reducen los tiempos y temperaturas de cocción conservándose mejor sus compuestos naturales. En este trabajo se elaboraron y analizaron las propiedades químicas y fisicoquímicas de mermeladas y dulces de kiwi obtenidos a partir de fruta DO. Estas fueron comparadas con las elaboradas tradicionalmente y con las disponibles en el mercado. Los productos obtenidos por DO, presentan características químicas que aseguran su estabilidad, y de color, superiores a las de los restantes tipos.

Palabras Claves: Mermeladas; Dulces; Deshidratación Osmótica; Kiwi; Calidad; Estabilidad.

ABSTRACT

Manufacture of fruit jams and sweets consists of mixing their ingredients in adequate proportions so as to get a minimum fruit content of 40 and 45%, respectively, and 65°Brix in solute concentration. So as to get a final product with adequate storage life, the mixture is concentrated by cooking, which also promotes undesirable results on their sensory and nutritional characteristics. The use of previously osmotically dehydrated fruits (DO) allows for reduction of high-temperature and time cooking, so the original quality attributes are better preserved. In this work, kiwi sweets and jams from previously DO fruit were obtained and their chemical and physicochemical characteristics were analyzed. These conserves were compared to those prepared with traditional methods and with those found

in retail markets. Their chemical characteristics - that assure their preservation – and their color are superior to those of the other preserves.

Key words: Jams, Sweets, Osmotic Dehydration, Kiwi, Quality, Stability.

INTRODUCCIÓN

La elaboración de derivados de frutas es una importante actividad económica en nuestro país, cuya rentabilidad aumenta con la obtención de productos de alto valor agregado.

El Código Alimentario Argentino, en su capítulo de alimentos azucarados (Cap. 10, art. 810 y 811, respectivamente), denomina “*mermeladas*” y “*dulces*” a las confituras obtenidas por cocción de frutas u hortalizas con azúcares, permitiéndose el agregado de ciertos aditivos como el ácido cítrico o agentes gelificantes. Las mermeladas deben contener no menos de 40% p/p de frutas enteras o en trozos, en tanto que los dulces no menos de 45% p/p. En ambos casos el contenido mínimo de sólidos solubles exigidos es de 65%.

En la manufactura tradicional, la mezcla de todos los ingredientes se concentra por aplicación de calor a presión normal o reducida, hasta alcanzar el contenido de sólidos solubles requeridos. El proceso lleva a una consistencia pegajosa o gelatinosa, asegura la destrucción de enzimas de la fruta, la extracción de algunas de sus pectinas y concentra al producto final hasta un punto en el cual se conserva por sí mismo (May, 1997), como resultado de su acidez y la reducción de su actividad acuosa.

La vida útil de mermeladas y dulces obedece a varios factores. Así, la acidez de las frutas utilizadas (pH entre 2.8 y 3.8) limita el desarrollo de microorganismos patógenos, siendo factible solamente el ataque de hongos y levaduras. Además, el tratamiento térmico elimina formas vegetativas de microorganismos y la mayoría de las esporuladas. Por último, la alta concentración final de sólidos solubles actúa como conservante.

La alta temperatura de cocción del método tradicional implica deterioros en color, textura, sabor y valor nutricional. La utilización de frutas deshidratadas osmóticamente aparece como una alternativa interesante en la formulación de mermeladas y dulces, porque reduce los requerimientos de concentración por evaporación (Shi et. al., 1996). Así, la DO permite obtener productos con mejor sabor, aroma y contenido nutricional y con una pequeña pérdida de minerales y vitaminas (Dixon & Jen,(1977); Lenart & Flink, J.M.,(1984); Ponting, (1973).

Durante la DO se produce una transferencia de agua y sólidos solubles propios de las fruta (vitaminas y minerales) hacia la solución osmótica (SO) (generalmente a base de

sacáridos), y simultáneamente, se incorpora azúcar de la solución a la estructura del alimento.

En este trabajo se formularon mermeladas y dulces a partir de kiwi DO y la SO utilizada, para ajustar el contenido de sólidos requerido. Esto último permite además recuperar los componentes volátiles de la fruta que emigraron hacia la solución. Se compararon parámetros de calidad físicos y fisicoquímicos de las mermeladas y dulces de kiwi desarrollados bajo este método, con los de los manufacturados tradicionalmente y los comerciales disponibles en el mercado. Los productos resultantes de la tecnología propuesta presentan mejores características de color y sabor y exhiben una calidad superior a la de los manufacturados por métodos tradicionales e industriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se elaboraron mermeladas a partir de kiwi DO y la SO resultante de la deshidratación, con agregado de pectina (designada MDOCP). Sus propiedades fueron comparadas con las de las elaboradas por el método tradicional, con y sin agregado de pectina (llamadas MTCP y MTSP, respectivamente), y con dos mermeladas disponibles en el mercado una denominada MC1 (a base de azúcar, jarabe de maíz de alta fructosa, y agregado de pectina, ácido cítrico, benzoato de sodio y sorbato de potasio) y otra denominada MC2 (a base de jarabe de maíz de alta fructosa, con agregado de pectina y ácido cítrico).

Además se elaboraron dulces (bocadillos) de kiwi mediante el método tradicional (llamados BKT) y a partir de fruta DO y solución deshidratante (denominadas BKDO). Sus propiedades fueron comparadas entre sí, dado que en el mercado no se encuentran productos similares.

Ambas formulaciones (mermeladas y bocadillos) contienen pectina de alto metoxilo (como gelificante) y jugo de limón (como conservante y para ajustar el pH necesario para la gelificación).

2.1. Deshidratación osmótica

Las muestras fueron peladas, cortadas en discos de 1 cm de espesor y sumergidas en una solución deshidratante de sacarosa, de 69 °Brix. La DO se efectuó a 30 °C durante 2 horas, tiempo en el cual se alcanza la máxima incorporación de sólidos en las condiciones de este trabajo. Las muestras contenidas en recipientes se colocaron en un shaker termostaticado con agitación constante a 110 rpm. Luego se enjuagaron intermitentemente, se secaron con papel absorbente y se pesaron, a fin de conocer los porcentajes de sólidos incorporados y de agua eliminada durante esta primera etapa.

2.2. Elaboración de mermeladas y dulces a partir de fruta DO y tradicionales

Estos productos fueron preparados mezclando fruta DO triturada con una procesadora con la solución deshidratante, en proporciones tales que se consigan el contenido de fruta y de sólidos solubles establecidos por la legislación. De esta forma se reduce el tiempo requerido del tratamiento térmico posterior para concentrar la mezcla. Además, se agregaron pectina de alto metoxilo y jugo de limón.

La cocción se efectuó hasta lograr el contenido de sólidos solubles (determinado por medición durante la cocción) y la consistencia exigidos en cada producto.

En el caso de dulces y mermeladas tradicionales, se utilizó kiwi fresco y sacarosa, reduciendo el contenido acuoso por cocción y con el posterior agregado de jugo de limón y pectina, en las proporciones correspondientes a cada producto.

2.3. Medición de color

Las medidas de color se efectuaron sobre 10 películas de mermelada de 2 cm de espesor, utilizando un colorímetro Minolta CR-300.

En el caso de los dulces, las medidas se efectuaron directamente sobre la superficie de éstos. Los parámetros obtenidos en todos los casos fueron: "L" (Luminosidad), "a" (enrojecimiento) y "b" (amarillamiento).

2.4. Ensayos de textura

Las propiedades de textura se determinaron con un texturómetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems). Según el producto, se utilizaron diferentes ensayos:

- Sobre las mermeladas se practicó un ensayo de fluencia (sobre 10 muestras), para lo cual se las dispuso en recipientes de acrílico (de 5 cm de diámetro) y se las extrudó con un émbolo (de 2 cm de diámetro) a una velocidad de 1 mm/s. Las propiedades que se analizan a partir de este ensayo son la dureza y adhesividad de las mermeladas.
- En los dulces se efectuó un ensayo de compresión en películas de 1.5 cm de espesor (sobre 10 muestras), con el mismo émbolo que para mermeladas. Se determinaron: dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad.

2.5. Determinación de propiedades fisicoquímicas

Se utilizó un higrómetro de punto de rocío AquaLab Serie 3 (Decagon Inc.) para medir actividad acuosa (a_w) a temperatura ambiente (obtenida haciendo uso de un psicrómetro aspirado, antes de cada determinación de a_w).

El contenido de sólidos solubles se determinó por refractometría mediante un refractómetro Bellingham-Stanley Limited.

El pH se determinó con un pH-metro (EC30-HACH), utilizando un electrodo de punta.

La humedad se determinó según la técnica correspondiente a cada producto establecidas en AOAC (1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 1 a 6 muestran y comparan los parámetros físicos y fisicoquímicos de las mermeladas elaboradas a partir de fruta DO, en forma tradicional, y también las comerciales.

El pH de todas las muestras indica que la mermelada obtenida a partir de fruta DO es la menos ácida (Figura 1). Aún así, ésta es lo suficientemente ácida como para no permitir el desarrollo de microorganismos patógenos durante su posterior almacenamiento.

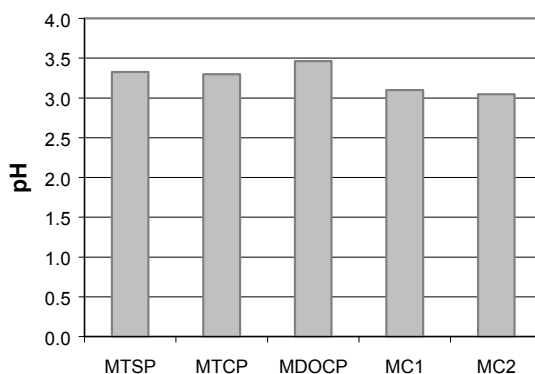


Figura 1: Valores de pH de mermeladas.

Como se ve en la Figura 2, las mermeladas tradicionales y la obtenida con kiwi DO, contienen mayor cantidad de sólidos solubles que las comerciales, siendo la MDOCP, la que mayor proporción presenta; sólo la (MC2) no alcanza el valor de este parámetro establecido por el Código Alimentario Argentino (65 °Brix).

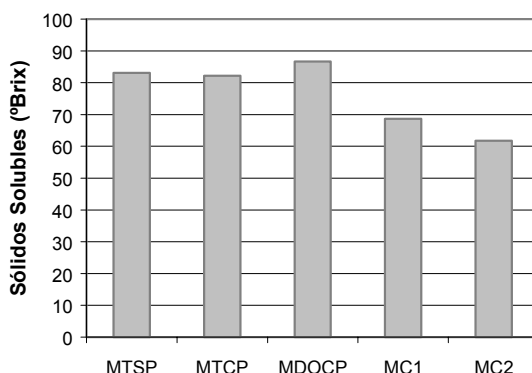


Figura 2: Contenido de Sólidos Solubles de mermeladas

En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis de actividad acuosa (a_w). El producto obtenido a partir del kiwi DO tiene una a_w mayor que la mermelada tradicional

sin agregado de pectina y una de las comerciales (MC1), pero menor que la comercial restante (MC2).

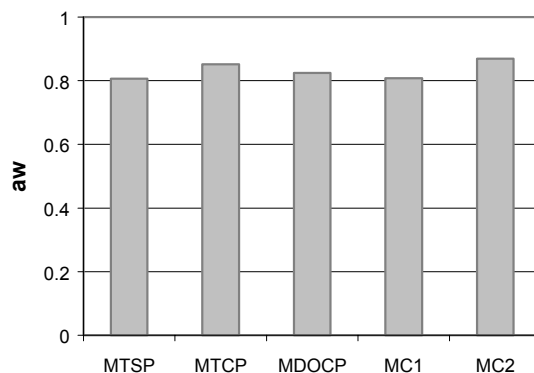


Figura 3: Actividad acuosa de mermeladas.

El contenido de humedad de la mermelada MDOCP es mayor que el de las tradicionales y que el de MC1, pero menor que el de MC2, como se ve en la Figura 4.

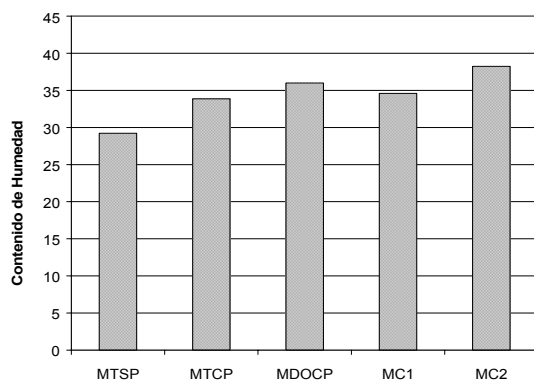


Figura 4: Contenido de Humedad de mermeladas.

La MDOCP presenta una coloración verde mucho más acentuada que las demás (valores más altos de “-a”). Es decir, conserva un aspecto muy similar a la fruta de origen y es aún más luminosa que las comerciales. Además muestra escaso amarillamiento en comparación con éstas, las que tienden a un color marrón (altos valores de “b”) (Figura 5). Del análisis de textura puede concluirse (Figura 6) que la MDOCP presenta mayor adhesividad y dureza que las mermeladas comerciales.

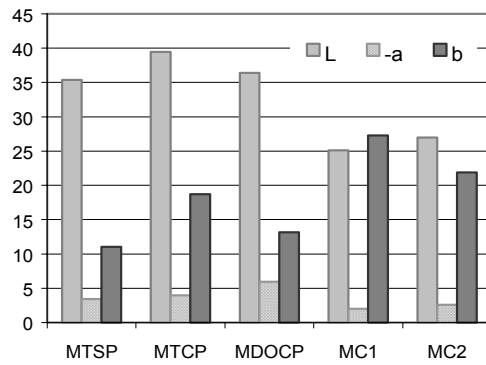


Figura 5: Propiedades de color de mermeladas.

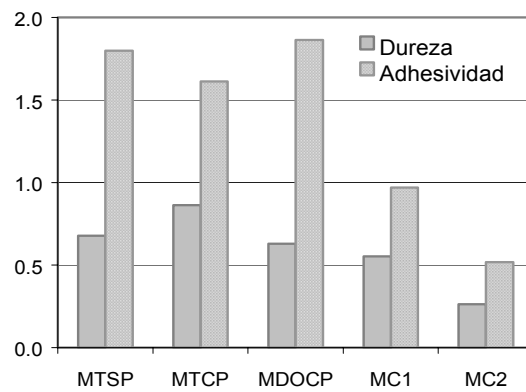


Figura 6: Propiedades de textura de mermeladas.

Los resultados del análisis de color obtenido para los dulces se presentan en la Figura 7.

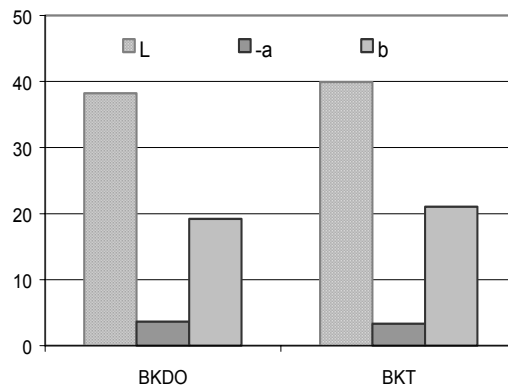


Figura 7: Propiedades de color de bocadillos.

El BKDO exhibe mayor oscurecimiento y menor amarillamiento. Simultáneamente, muestra una coloración verde algo más intensa que el elaborado en forma tradicional. Tanto la a_w como el contenido de humedad (Figura 8) alcanzan valores más altos que los

correspondientes al elaborado en forma tradicional. Sin embargo, ambos parámetros son suficientes para asegurar su conservación.

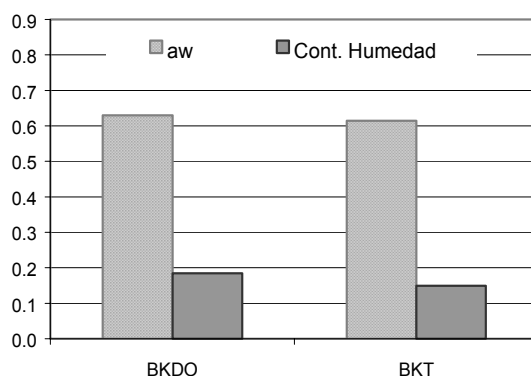


Figura 8: Valores de aw y Cont. de humedad

El dulce elaborado con kiwi DO contiene una proporción algo mayor de sólidos solubles y es apenas menos ácido que el elaborado en forma tradicional (Tabla 1).

Tabla 1 pH y Sólidos Solubles (°Brix) de bocadillos.

Bocadillo	pH	Sólidos Solubles
BKDO	3.58	93.46
BKT	3.47	93.11

Los datos de textura de los dulces preparados por ambos métodos se exhiben en la Figura 9 y la Tabla 2. Se observa que entre ambos productos no existen diferencias significativas con respecto a su cohesividad (Figura 9). Sin embargo, el BKDO es más blando y más elástico (Figura 9). Por otra parte, se manifiesta menos gomoso, más adhesivo y con mayor masticabilidad que el tradicional (Tabla 2).

Tabla 2: Adhesividad, gomosidad y masticabilidad de bocadillos

Bocadillo	Adhesividad	Gomosidad	Masticabilidad
BKDO	1.1	174.3	2419.8
BKT	0.5	183.4	2202.6

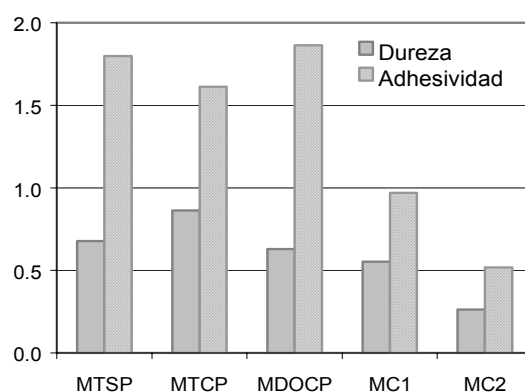


Figura 9: Dureza, cohesividad y elasticidad de bocadillos

CONCLUSIONES

Las mermeladas y dulces elaborados a partir de kiwi DO reúnen características químicas exigidas por la legislación, similares a las de los productos comerciales.

Tanto las mermeladas como los dulces elaborados bajo la tecnología propuesta (DO), guardan mayor similitud con la fruta fresca que las obtenidas por métodos tradicionales e industriales, fundamentalmente respecto al color. En este aspecto en especial, exhiben una tonalidad verde similar a la de la fruta fresca y un menor amarillamiento.

La DO previa permite usar bajas temperaturas durante la etapa de evaporación y tiempos menores durante la concentración, con lo cual se evita el daño térmico severo. Este hecho se refleja en la obtención de productos de mejor apariencia. Por lo tanto, el método estudiado se presenta como una excelente alternativa ante las tecnologías existentes, para producir estas conservas a base de frutas.

BIBLIOGRAFIA

AOAC (1980). Ass. of Off. Anal. Chem. Official Methods of Analysis. Washington, DC.

Código Alimentario Argentino, Capítulo 10. Artículos 810 y 811.

Dixon, G. M., & Jen, J.J. (1977). *Journal of Food Science*, 42, 1126-1127.

May, C. D. (1997). Pectins. In A. Imeson (Ed.), *Thickening and gelling agents for food* (pp. 230-260). London: Blackie Academic & Professional.

Lenart, A., & Flink, J.M. (1984). *Journal of Food Technology*, 19, 45-65.

Shi, X. Q., Chiralt, A., Fito, P., Serra, J., Escoin, C., & Gasque, L. (1996). ***Drying Technology*, 14, 841-857.**

Ponting, J. D. (1973). *Process Biochemistry*, 8, 18-20.

ELABORACIÓN DE PASTAS DESHIDRATADAS ESTABILIZADAS DE FRUTAS Y VEGETALES RICOS EN PIGMENTOS ANTOCIANOS Y CAROTENOIDES

GALLO, Alicia, TARONI, María Victoria y PETRIELLA, Claudio

Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7, (6700) Luján, Bs. As. Argentina
Email: agallo@unlu.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue la elaboración de productos deshidratados a partir de pastas mezcla de frutas y hortalizas con un alto contenido de pigmentos carotenoides y antocianos, de reconocida acción antioxidante. Se prepararon diversas formulaciones que incluían: zanahoria, pomelo rojo, frutilla y tomate. Las pastas fueron mezcladas o no con sacarosa y/o maltodextrina hasta un 40% de sólidos solubles, moldeadas en tabletas rectangulares y liofilizadas. Para caracterizar los productos secos se hicieron las correspondientes isotermas de absorción (a_w entre 0.11 y 0.84) y su estabilidad fue estudiada en ensayos de almacenamiento acelerado en estufa a 55°C. El color fue observado visualmente y documentado por fotografía digital. Como índice de estabilidad de los pigmentos, se extrajeron los pigmentos antocianos y cuantificaron en forma espectrofotométrica mediante el método del pH diferencial. Se seleccionaron mezclas de zanahoria, frutilla y pomelo, organolépticamente aceptables. Los productos liofilizados resultaron de coloración rosada, aspecto y sabor muy agradables. La adición de maltodextrina incrementó en forma significativa la estabilidad de los antocianos y la estabilidad del color de las tabletas deshidratadas.

Palabras clave: antocianos, encapsulación, liofilización, estabilidad.

ABSTRACT

The aim of this work was the elaboration of dehydrated products from fruits and vegetables mixtures with a high content of carotenoids and anthocyanins pigments, well-known by their antioxidant action. Different formulations were prepared, which include: carrot, red grapefruit, strawberry and tomato. The pastes were mixed with or without sucrose and/or maltodextrin up to 40% of soluble solids, they were modeled into rectangular tablets and freeze-dried. The sorption isotherms were made between 0.11-0.84 a_w and the stability was studied by accelerated storage assays at 55°C. The color was

registred by digital photography. The anthocyanins pigments were chosen as pigment stability index. They were extracted and quantified by the ph-differential method. Mixtures of carrots, strawberries and red grapefruits were selected based on their sensorial quality. The freeze-dried products showed pink color and very pleasant aspect and flavor. The maltodextrin addition improved the anthocyanin stability and color stability of freeze-dried tablets.

Key words: anthocyanins, encapsulation, freeze-drying, stability.

INTRODUCCIÓN

La demanda creciente de los consumidores por alimentos naturales y con acción beneficiosa para la salud ha incrementado el interés por el consumo de frutas y vegetales, no sólo por su tradicional rol como fuentes de diversas vitaminas, minerales y fibras, sino también por el efecto en la prevención de enfermedades degenerativas, que se atribuye al contenido en pigmentos y otras sustancias con acción antioxidante. Diversos estudios también sugieren una mayor eficacia cuando son varias las sustancias activas o son ingeridas no aisladas, sino en el alimento entero (Delgado Vargas y Paredes López, 2003). Entre los pigmentos con comprobada acción antioxidante sobresalen los carotenoides y los antocianos. La liofilización es una técnica de deshidratación que al emplear bajas temperaturas ocasiona una degradación mínima de los componentes lábiles del alimento y es especialmente apta para que este conserve sus propiedades organolépticas y nutricionales. Por esta razón el proceso de liofilización ha experimentado, no obstante su intrínscico mayor costo, una valorización notable en los últimos años. La encapsulación es otra técnica muy eficaz para la protección de sustancias lábiles y es extensamente empleada e investigado su uso para la conservación de compuestos del flavor, aceites esenciales y muchas sustancias con actividad biológica (Risch y Reineccius, 1988). Sin embargo existen muy pocos estudios sobre la protección de pigmentos naturales aislados o en la matriz vegetal original. Una forma sencilla de encapsulación se logra mediante agregado de maltodextrinas, mezclado y posterior deshidratación. El objetivo del trabajo fue la elaboración de productos deshidratados a partir de pastas mezcla de frutas y hortalizas, todas ellas de tonalidad roja con o sin agregado de maltodextrinas, la obtención de las isoterms de adsorción y el estudio de la cinética de deterioro en función de la actividad acuosa, en ensayos acelerados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron hortalizas (tomate y zanahoria) y frutas frescas (frutilla y pomelo rosado) ya que son productos de amplio consumo y aceptación y buena fuente de β -caroteno, licopeno y antocianinas. Se lavaron y pelaron en forma manual, luego se trituraron y homogeneizaron por separado utilizando una procesadora industrial. Las pulpas obtenidas se pesaron para calcular el rendimiento de la operación. Sobre las mismas se determinaron humedad, sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y pH. El proceso de escaldado se realizó en microondas ($70^{\circ}\text{C} - 2 \text{ min}$) y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Con las pulpas así procesadas se prepararon mezclas con diferentes proporciones de zanahoria, tomate, pomelo rosado y frutilla y realizó una análisis sensorial preliminar para seleccionar las mas aceptables. Las mezclas seleccionadas se mezclaron con maltodextrina (MD) con la ayuda de un homogenizador de mano (Tabla 1). Las muestras denominadas BM, CM, DM y EM se prepararon adicionando maltodextrina hasta llegar al 40% p/p de sólidos solubles, y 35% p/p en las mezclas de zanahoria y frutilla (CMA). Las muestras B, C y D no contienen maltodextrina.

Tabla 1: Composición de las muestras seleccionadas.

SAL	KCl	KI	NaBr	K ₂ CO ₃	MgCl ₂	LiCl
aw	0.843	0.689	0.576	0.432	0.328	0.113

Las mezclas preparadas con y sin maltodextrina se moldearon en forma de cubos de aproximadamente 3 cm de lado, se congelaron y posteriormente liofilizaron. Los productos deshidratados se evaluaron sensorialmente y se conservaron en desecadores sobre silica gel anhidra hasta su utilización. Se seleccionaron los pigmentos antocianos como indicadores apropiados para el estudio de la cinética del deterioro del color (Sá & Sereno, 1999). Para medir el contenido de antocianinas se utilizó la técnica espectrofotométrica del pH-diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Las muestras zanahoria-frutilla (C y CM) se emplearon para definir la longitud de onda visible máxima ($\lambda_{\text{vis-max}}$). Las isotermas de adsorción de las muestras se determinaron equilibrando las muestras sobre soluciones saturadas de sales a 25°C (Bell y Labuza, 2000, Tabla 2).

Las diferentes mezclas fueron almacenadas en estufa de circulación forzada a 55 °C. dentro de desecadores equilibrados a actividades acuosas de 0.11, 0.43 y 0.75. A intervalos de tiempo seleccionados se extrajeron muestras y cuantificaron los pigmentos por el método descripto.

Tabla 2: Soluciones saturadas de sales y valores de aw respectivos.

MUESTRA	RENDIMIENTO	HUMEDAD	pH	°BRIX
Tomate	65.4%	94.4%	4.33	6.25
Zanahoria	75.4%	87.7%	6.05	12
Pomelo rosado	66.3%	90.4%	3.19	9.5
Frutilla	79.7%	91.3%	3.24	7.5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de humedad, pH, °Brix y rendimiento de la materia prima se observan en la Tabla 3. Todas las mezclas preparadas (Tabla 1) presentaron sabores agradables y diferenciables entre sí. Sin embargo las que contenían tomate se descartaron porque no estaban dentro del perfil sensorial buscado.

Tabla 3: Caracterización de las materias primas

MUESTRA	RENDIMIENTO	HUMEDAD	pH	°BRIX	INDICE REFRAC.
Tomate	65.4%	94.4%	4.33	6.25	1.342
Zanahoria	75.4%	87.7%	6.05	12	1.351
Pomelo rosado	66.3%	90.4%	3.19	9.5	1.347
Frutilla	79.7%	91.3%	3.24	7.5	1.345

El aspecto de los cubos o tabletas deshidratados puede observarse en la fotografía de la Fig.1.



Figura 1: Fotografías digitales de los cubos deshidratados

En la Fig. 2 se han graficado las isotermas de adsorción de las muestras con y sin agregado de maltodextrina. Los controles (B, C, D) siguen un comportamiento característico de un alimento con alto porcentaje de hidratos de carbono (Bell y Labuza, 2000); en las muestras con MD se evidencia un desplazamiento hacia un menor contenido acuoso de las isotermas especialmente a elevadas a_w , esto indica que la adición de MD disminuye la higroscopicidad del material y por lo tanto, generaría un efecto protector positivo en el caso de almacenamiento prolongado (Wagner y Warthesen, 1995).

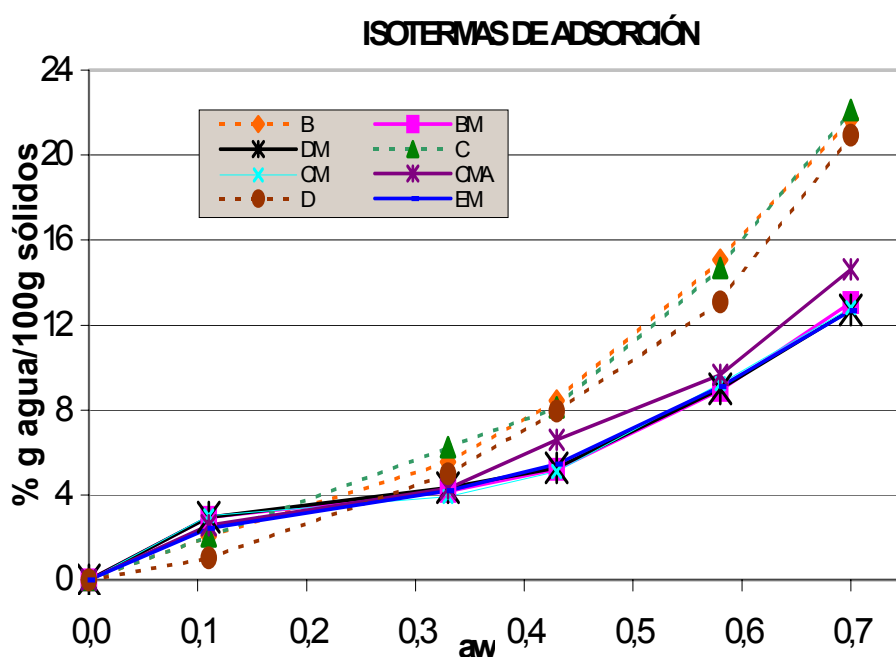


Figura 2. Isotermas de adsorción con y sin agregado de maltodextrina

En las figuras 2, 3 y 4, se observa el porcentaje remanente del contenido inicial de los pigmentos antocianos correspondientes a las muestras almacenadas durante diferentes tiempos y condiciones ambientales. A baja a_w la pérdida de pigmentos antocianos en las muestras encapsuladas no es significativa. En el caso de las muestras control, B y D evidencian una mayor pérdida, en C podría pensarse en algún efecto sinérgico protector por el mayor contenido de β -caroteno proveniente de la zanahoria (Gallo y col. 2001). A $a_w=0.43$ el comportamiento entre los controles y las muestras con maltodextrina es más diferenciado. Cuanto mayor es el contenido de maltodextrina, se observa un mayor efecto protector de la encapsulación, como se evidencia comparando las muestras CM y CMA (zanahoria:frutilla, 40 y 35% respectivamente).

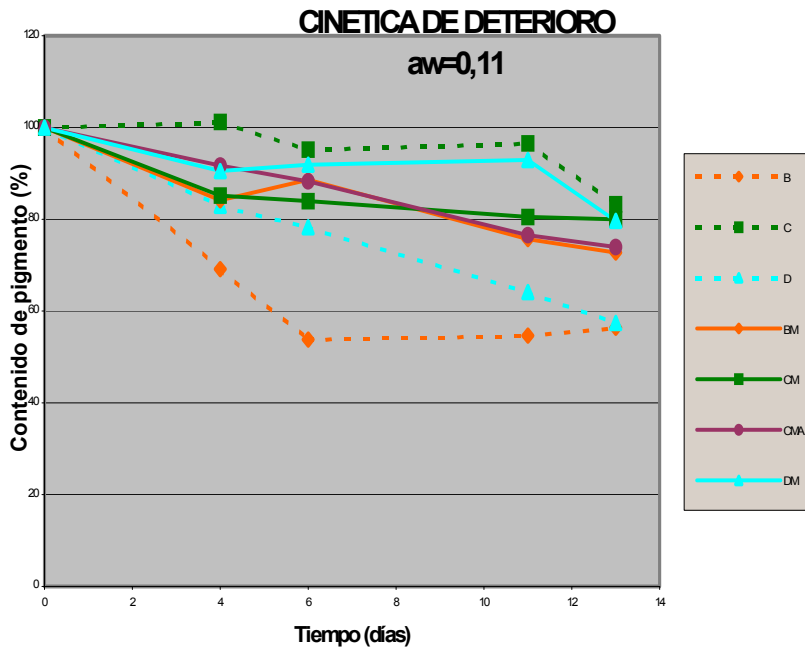


Fig 2: Cinética de deterioro de mezclas liofilizadas a aw: 0.11

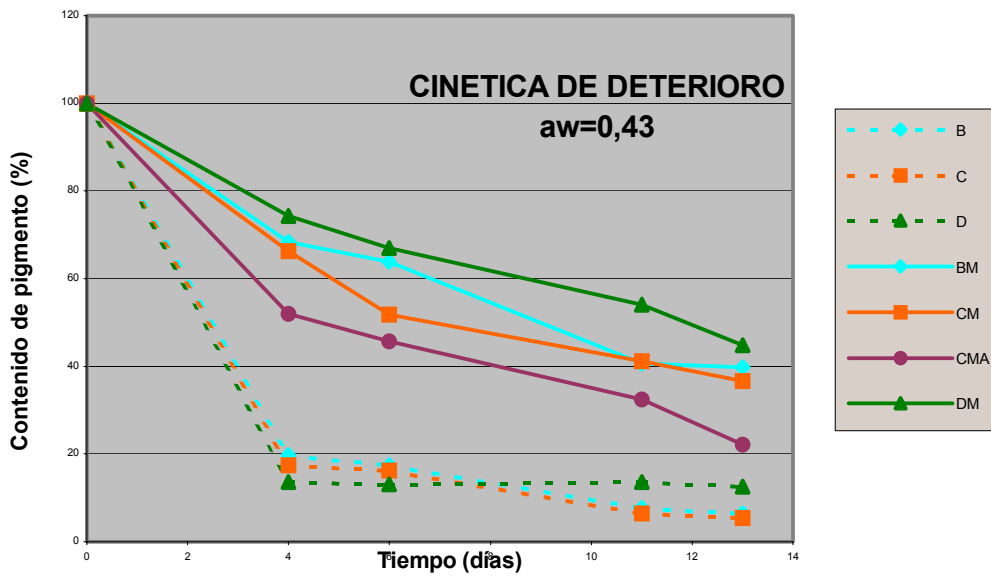


Fig 3: Cinética de deterioro de mezclas liofilizadas a aw: 0.43

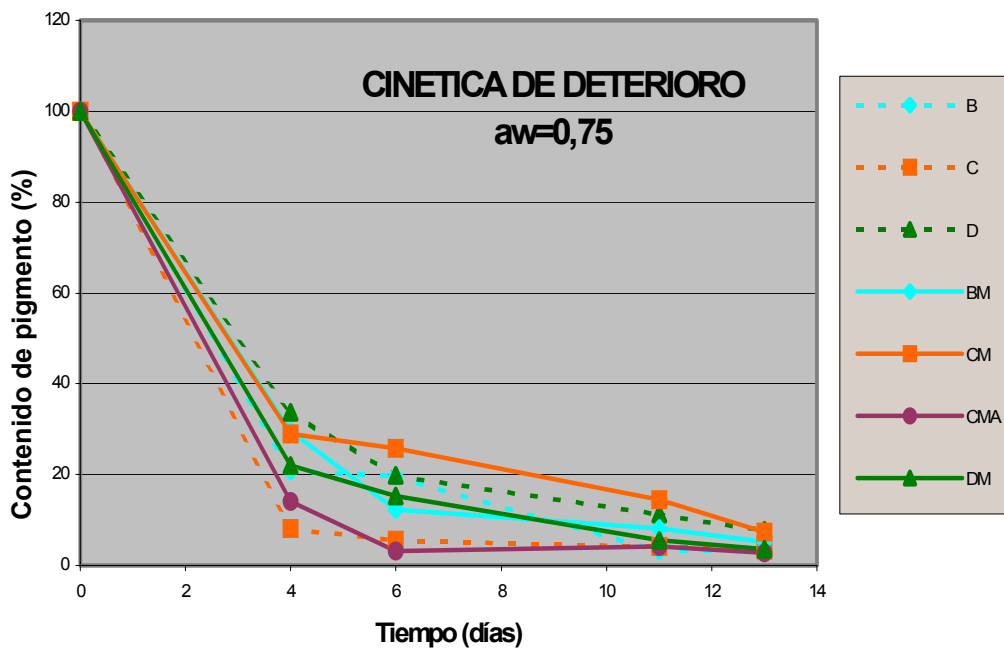


Fig 4: Cinética de deterioro de mezclas liofilizadas a a_w : 0.75

En las condiciones de más alta a_w =0.75, el deterioro es francamente notable y no existen diferencias significativas en la fase final del almacenamiento. Sin embargo, se observa una ligera variación de comportamiento en los primeros estadios del deterioro, donde las muestras controles C y D presentan una mayor velocidad de pérdida de pigmentos antocianos. La disminución en el contenido de antocianos está acompañada de un deterioro del color rojizo y la aparición de tonalidades pardas. Sa y Sereno (1999) encontraron en cebollas y frutillas una relación lineal entre la cinética de deterioro de los pigmentos antocianos y el pardeamiento no enzimático. Por consiguiente se puede considerar la degradación de los pigmentos antocianos un parámetro indicativo del deterioro del alimento.

CONCLUSIONES

Se prepararon con mezclas de pulpas de zanahoria, frutilla y pomelo rosado, productos liofilizados de aspecto y sabor muy agradables. La adición de maltodextrina confirió a los productos una textura crocante y una atractiva coloración rosada. También incrementó en forma significativa la estabilidad del color de las tabletas deshidratadas y de los

pigmentos antocianos. Las isothermas correspondientes son típicas de los productos ricos en carbohidratos y la presencia de maltodextrina disminuye la higroscopicidad de los productos, con una probable extensión de su vida útil. Los pigmentos antocianos contenidos en los productos preparados son estables a la menor actividad estudiada (0.11) y en cambio se deterioran en forma notable a alta a_w (0.75). Los productos elaborados tienen una alta concentración de pigmentos naturales de diferente naturaleza y con reconocido valor antioxidante, lo que constituye una alternativa de alto valor nutracéutico para consumo directo o como ingrediente en la elaboración de otros alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján por el soporte económico de los proyectos de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Bell, L.N.; Labuza, T.P. (2000) Moisture Sorption. Practical Aspects of isotherm measurement and use. Second Edition. Editorial American Association of Cereal Chemists.

Delgado Vargas, F. y Paredes López, O. (2003) Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press.

Gallo, A., Ocampo, M., Petriella, C. And Buera, M. P. (2001). Stability of β - carotene in dehydrated carrot pulp. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA), Valencia , España.

Giusti, M.; Wrolstad, R.E. (2000). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.

Risch, S. J. and Reineccius, G. A. (1989) Flavor Encapsulation. American Chemical Society, Washington D.C.

Sá, M.M. and Sereno, A.M. (1999) The kinetics of browning measured during the storage of onion and strawberry. International Journal of Food and Technology, 34, 343-349.

Wagner, L. A. and Warthesen, J. J. (1995). Stability of Spray-Dried Encapsulated Carrot Carotenes. Journal of Food Science, 60, 5.

ANÁLISIS DE VIDA UTIL DE BERENJENAS (*egg plant*) DE HUMEDAD INTERMEDIA CONSERVADAS POR FACTORES COMBINADOS

EUSTAQUIO, Analía; GADOMSKI, Gabriela y VIDALES, Susana L.

Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Cruce Rutas 5 y Avda. Constitución, (6700) Lujan, Buenos Aires Argentina. svidales@unlu.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar la vida útil y la aceptabilidad sensorial de berenjenas de humedad intermedia, analizando el efecto de la aplicación de factores combinados como método de conservación. Se utilizaron berenjenas cortadas en rodajas, que fueron escaldadas, osmodeshidratadas, y deshidratadas por corriente de aire caliente. Se envasaron en bolsas con barrera al vapor de agua y al oxígeno y se almacenaron a temperatura ambiente. Se realizaron análisis microbiológicos y fisicoquímicos durante las etapas de elaboración y almacenamiento. Se determinaron las variaciones sensoriales durante el almacenamiento y el grado de aceptabilidad del producto final por parte del consumidor.

Fue notoria la disminución de la carga microbiana inicial por los tratamientos aplicados. El producto demostró una buena aceptabilidad y una gran estabilidad durante el almacenamiento desde el punto de vista sensorial, microbiológico y respecto a los parámetros fisicoquímicos analizados.

Palabras Claves: osmodeshidratación, berenjena, vida útil

ABSTRACT

The objective of this work was to study the shelf-life and sensory acceptability of intermediate moisture eggplants, analyzing the effect of combined treatments as conservation method. It was utilized sliced eggplants, which were blanched, osmotic dehydrated and dehydrated by hot air. They were packed in bags of vapor and oxygen barrier material, and were stored at ambient temperature. It was made microbiological and physicochemical analysis during their manufacturing and storage. It was determined sensory changes during their storage and final product acceptability grade by consumers.

It was notorious the reduction of original microbial load by the applied treatments. The product had good acceptability and great stability during storage, considering sensory, microbiological and physicochemical aspects.

KEY WORDS: osmodehydration, eggplant, shelf life.

INTRODUCCION

El aumento de la popularidad del consumo de hortalizas frescas y los requerimientos mundiales de conservación de recursos, están forzando a la industria alimenticia a aplicar técnicas de preservación mínimas para obtener productos de características similares a las frescas y que demanden menos energía para la estabilización, almacenamiento y distribución.

A los fines de cumplir con lo expuesto se puede aplicar la tecnología de obstáculos mediante una combinación de factores antimicrobianos (ajuste de actividad de agua, ajuste de pH, adición de agentes antimicrobianos o conservadores químicos, tratamiento térmico) para estabilizar la hortaliza con un procesamiento mínimo (Welti Chanes, 1991).

En el caso de la osmodeshidratación, la disminución del peso y volumen permiten optimizar la operación de deshidratado en corriente de aire y mejorar el color, la estructura, la textura y aceptabilidad del producto (Schwartz y col., 1999).

El objetivo de este proyecto fue estudiar la estabilidad y aceptabilidad de una hortaliza sometida a un proceso de conservación por métodos combinados. Se eligieron berenjenas como base del producto de humedad intermedia porque actualmente en el mercado sus frutos solo se comercializan frescos, en mezclas de hortalizas congeladas, en dulces, rebozadas y en escabeches.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima:

Se trabajó con berenjena variedad negra (*Solanum melongena L.*) adquirida en el comercio. Se seleccionaron considerando el estado de madurez comestible y homogeneidad de tamaño de los frutos.

Preparación de las muestras:

La materia prima se seleccionó, lavo y despuntó. Se cortó luego en rodajas de 1 cm de espesor. Se escaldó en vapor saturado durante 2 minutos, seguido de un enfriamiento rápido. Se deshidrató osmóticamente en una solución con adición de 0.75% de ácido cítrico, 0.05% de sorbato de potasio, 0.05% de bisulfito de sodio y 3.5% de cloruro de sodio. Las cantidades se calcularon respetando los límites establecidos por el Código Alimentario Argentino (CAA). Se escurrieron y deshidrataron en estufa de aire caliente a $56.3 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Alcanzada la humedad de consigna se envasaron en bolsas flexibles

multicapa con propiedades de barrera al vapor de agua y oxígeno. El almacenamiento fue a 20 ± 2 °C.

Determinaciones fisicoquímicas:

Se realizaron análisis fisicoquímicos, en los frutos frescos (BF), luego del escaldado (BE) y a la salida del proceso de osmodeshidratación (BEO), del producto final (BF) y a distintos tiempos del período de almacenamiento (BFA1, BFA2, BFA_n). En todos los casos se informa promedio y desvío estándar.

El *contenido de humedad* se determinó por triplicado mediante el método gravimétrico en estufa de vacío (Ionomex^R) a 70°C.

El pH se determinó por triplicado, con un peachímetro digital (HANNA instruments HI 8424) con termopar para compensación de temperatura.

La *actividad acuosa* se midió por triplicado en un equipo Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc. Pullman, Washington, USA), previamente calibrado con soluciones salinas saturadas de a_w conocida. Las determinaciones se realizaron a 20 ± 2 °C .

El contenido de *anhídrido sulfuroso total* se determinó por triplicado según el método oficial 962.16 del AOAC (1995).

El contenido de *sorbato de potasio* se determinó por triplicado mediante espectrofotometría según el método oficial 974.10 del AOAC (1995).

El contenido de *cloruro de sodio* se determinó por triplicado mediante el método titulométrico según la metodología oficial 32.033 del AOAC (1982).

Análisis Microbiológico:

Sobre las mismas muestras se realizaron los controles microbiológicos pertinentes.

Recuento de Microorganismos *Aerobios Mesófilos*: se llevó a cabo por el método de recuento en placa por siembra en profundidad, según la metodología ICMSF – Método 1 (1998).

Recuento de *Coliformes Totales*: se realizó por el método de recuento en placa, según la metodología ICMSF – Método 4 (1998).

Recuento de *Hongos y Levaduras*: se utilizó el método de recuento en placa por siembra en profundidad, según la metodología ICMSF – Método por siembra en placa (1998).

Evaluación Sensorial:

Se realizó un ensayo de Aceptabilidad Sensorial del producto final (DESA-ISETA, 2001).

Para el desarrollo de la prueba se utilizó el método afectivo de la escala hedónica de nueve puntos no estructurada. Se trabajó con 38 evaluadores no entrenados. Las muestras se presentaron preparadas en escabeche, que es una de las formas en que son consumidas. Se evaluó comparándolas con berenjenas presentadas en escabeche

previamente cocidas en forma tradicional. Se calcularon los promedios, el desvío estándar y se realizó la representación grafica de la distribución de los puntajes.

El control de los atributos sensoriales durante el almacenamiento se realizó cada 30 días, durante cada etapa del análisis de vida útil. Se evaluó la apariencia, la textura y el sabor del producto, teniendo como patrón comparativo el producto recién elaborado.

Todas las determinaciones fueron realizadas durante un período de 4 meses y los ensayos a que se sometieron las muestras fueron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las Tablas I y II se muestran características composicionales relevantes del producto final y los niveles de contaminación microbiana en la materia prima y en cada etapa del proceso. La contaminación inicial predominante fue de aerobios mesófilos. El escaldado redujo la carga microbiana en un 95 % y se logró una reducción mayor al 99 % con el proceso de osmodeshidratación.

Tabla I: Caracterización de la materia prima y del producto final.

Determinación	Berenjena fresca		Berenjena de humedad intermedia	
	Promedio	Desv. Estándar	Promedio	Desv. Estándar
Humedad (%)	93,48	0.07	70,56	0.04
Cloruro de sodio (%)	---	---	6,57	0.11
Dióxido de azufre (ppm)	---	---	17,5	0.7
Sorbato de potasio (ppm)	---	---	557	30.4
aw	1,000	0.001	0,933	0.003
pH	4,96	0.02	2,96	0.01

Tabla II: Recuentos microbiológicos en materia prima, productos intermedios y producto final de berenjena.

Muestra	Recuento total de aerobios mesófilos (UFC/g)	Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	Recuento de coliformes totales (UFC/g)
Berenjena fresca (BF)	21400 x 10 ³	80 x 10 ³	4100 x 10 ³
Berenjena escaldada (BE)	900 x 10 ³	13 x 10 ³	24 x 10 ³
Berenjena salida de ósmosis (BEO)	10	40	< 10
Berenjena de humedad intermedia (BF)	< 10	< 10	< 10

En la Tabla III se muestra la estabilidad microbiana durante el período de almacenamiento. Se puede observar que no hubo crecimiento de aerobios mesófilos ni de

hongos y levaduras durante el periodo de estudio, lo que indica que las condiciones seleccionadas son capaces de asegurar la estabilidad microbiológica del producto final. Por otro lado se puede observar que el contenido de bisulfito de sodio a lo largo del periodo de almacenamiento presenta una leve disminución.

Tabla III: Recuentos microbianos, contenido de humedad y contenido de dióxido de azufre durante el tiempo de almacenamiento

Tiempo	Recuento total de aerobios mesófilos (UFC/g)	Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	Humedad (%)		Dióxido de azufre (ppm)	
			Prom.	Desv. Estánd.	Prom.	Desv. Estánd.
Inicio (BFA1)	< 10	< 10	70,56	0.04	17,5	0.7
30 días (BFA2)	< 10	< 10	71,16	0.01	17,3	0.3
60 días (BFA3)	< 10	< 10	71,69	0.11	16,9	0.5
90 días (BFA4)	< 10	< 10	71,67	0.02	17,1	0.2
120 días (BFA5)	10	< 10	70,74	0.01	16,7	0.3

Los resultados de los análisis de humedad están representados en la Figura I. En la misma se visualiza una mínima variación a lo largo del tiempo de almacenamiento. Esto indicaría que el material de envase seleccionado fue el adecuado.

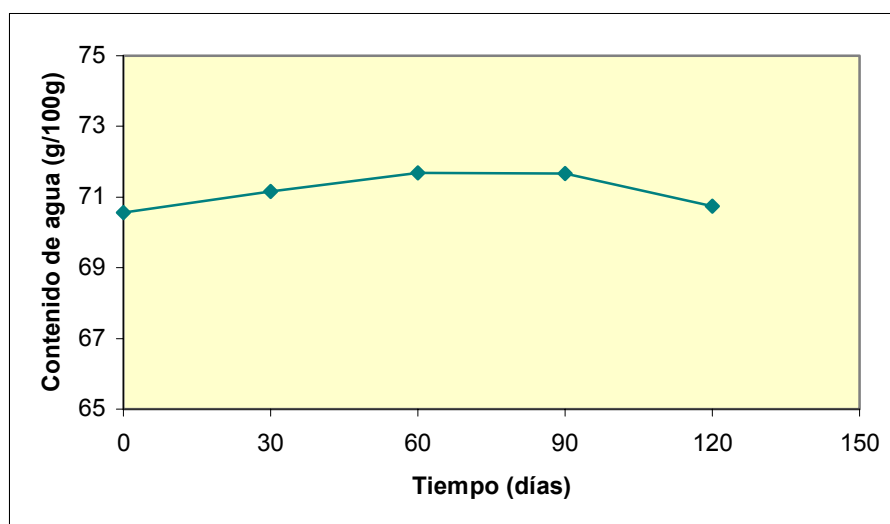


Figura I: Evolución de Humedad de las berenjenas de humedad intermedia durante el tiempo de almacenamiento a 20°C.

Los resultados del estudio de aceptabilidad se pueden observar en la Tabla IV y Figura II.

Tabla IV: Promedio y Desviación estándar del ensayo de aceptabilidad de berenjenas de humedad intermedia.

	Berenjena natural	Berenjena humedad intermedia
Promedio	7,0	5,7
Desv. Estándar	1,6	1,4

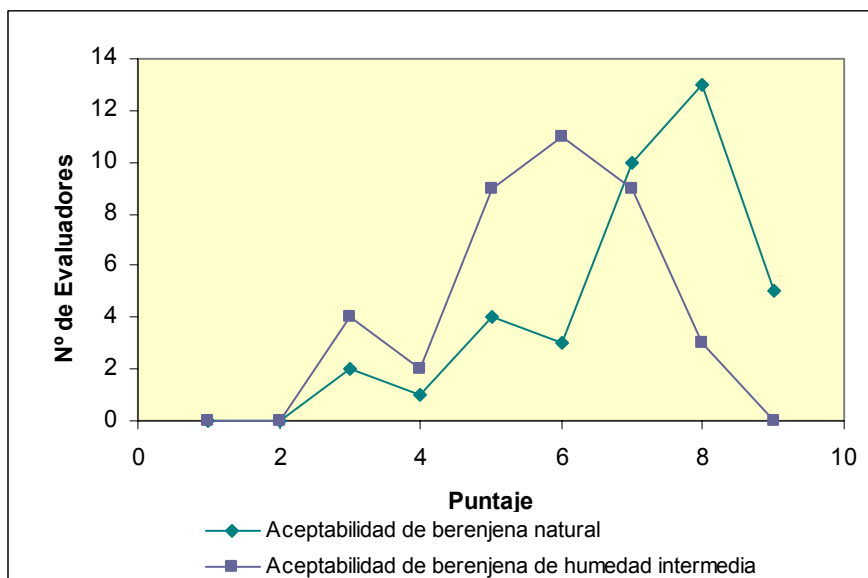


Figura II: Distribución de puntajes de aceptabilidad

Los promedios indican que ambas muestras tuvieron un buen nivel de aceptabilidad. La distribución de puntajes demuestra que hubo muy pocas respuestas por debajo del valor cinco. Esto indica que no hubo gran preferencia de un producto respecto al otro, ambos se consideran aceptables a pesar de que el producto elaborado con berenjenas de humedad intermedia conservada por factores combinados tuvo un promedio de aceptabilidad algo inferior al elaborado de forma tradicional.

El atributo más cuestionado en las berenjenas de humedad intermedia por parte de los evaluadores fue la textura de la cáscara, la cual se describió como acartonada, y se destacó la mayor preferencia de las mismas respecto a la apariencia frente a las elaboradas de forma tradicional o natural.

Respecto a los resultados de la evaluación sensorial del producto durante el período de almacenamiento no se encontraron diferencias significativas en los atributos evaluados (apariencia, textura y sabor).

CONCLUSIONES

Los factores aplicados, y la combinación de ellos, permite obtener berenjenas de humedad intermedia con una buena aceptabilidad, que presentan atributos sensoriales y microbiológicos estables durante los cuatro meses de ensayo.

Los factores de conservación empleados provocan una notable reducción de la carga microbiana respecto al producto fresco.

Existen variaciones mínimas del contenido de anhídrido sulfuroso y del contenido de humedad que se pueden atribuir a las propiedades de barrera del material de envase.

Debido a que el atributo más cuestionado por los evaluadores fue la textura de la cáscara se puede pensar en elaborarlas sin cáscara o ensayar algún tratamiento para mejorar su textura.

BIBLIOGRAFIA

Marco Schwartz, José M. del Valle, José M. Aguilera, Marcela Sepúlveda; 1999; Conservación de Frutas y Hortalizas por Métodos Combinados; Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Agroindustria y Enología.

Welti Chanes J; 1991; Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, V Centenario CYTED-D, Desarrollo de Alimentos de Humedad Intermedia Importantes para Iberoamerica, Subproyecto Frutas y Hortalizas; Universidad de las Américas – Puebla, México.

Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA) 2001., Estadística Aplicada a Evaluación Sensorial. Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria (ISETA); 9 de Julio, Buenos Aires, Argentina

ICMSF; 1998; Microorganismos de los Alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios; Vol. 1, 2º Ed.

A.O.A.C; 1995; Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed; Washington, D.C.

A.O.A.C; 1982; Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 10th ed; Washington, D.C.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Luján por facilitar las instalaciones y equipos para la realización del presente trabajo.

ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE METABISULFITO DE SODIO COMO INHIBIDOR DEL PARDEAMIENTO EN DURAZNOS DESHIDRATADOS AL SOL

DANIELE, Martín J.; URFALINO Delia P.

Estación Experimental Agropecuaria INTA Rama Caída. INTA Rama Caída, dirección: El Vivero S/N Rama Caída. San Rafael. Mendoza, teléfono/ fax: (02627)441100, correo electrónico: deliapaolaurfalino@yahoo.com.ar.

RESUMEN

Las reacciones de pardeamiento limitan la vida comercial de los frutos deshidratados, debido a ello la preservación del color a través del tiempo es uno de los objetivos principales de los productores de durazno deshidratado. Este control en la Argentina se realiza quemando azufre mineral. Los inconvenientes de este método son la discontinuidad del proceso de secado, el difícil control de la dosificación y el nivel final de residuo. El propósito de este trabajo es sustituir el azufrado convencional por tratamientos con metabisulfito de sodio para trabajar bajo condiciones controladas y poder acceder a mercados con distintas exigencias. Las variedades ensayadas fueron Bowen, Davis y Ross. La variedad Bowen mostró los mejores resultados, su mejor combinación (8% metabisulfito durante 6 minutos) mantiene buen color a los 8 meses ($L^*=52.97$, $a^*=20.25$, $b^*=53.71$) y tiene un bajo contenido residual de azufre (810 ppm).

Palabras Claves: pardeamiento, duraznos deshidratados, metabisulfito de sodio, deshidratado al sol.

ABSTRACT

Browning reactions limit the commercial shelf life of dried fruits, thus color preservation throughout storage becomes one of the main objectives for dry apricots processors. In Argentina this control is made by burning mineral sulphur. The obstacles of this method are the disruption of the drying process, the difficulty to control the dose and the final residual level. The aim of this work is to substitute conventional sulphuring by sodium metabisulphite treatments with the object of working under controlled conditions for access to different demanding markets. The tested varieties were Bowen, Davis and Ross. Bowen showed better results, the best combination (8% sodium metabisulphite during 6 minutes) had a good color after 8 months ($L^*=52.97$, $a^*=20.25$, $b^*=53.71$) and a low residual sulphur content (810ppm)

INTRODUCCIÓN

El color de los productos alimenticios tiene una gran influencia en la percepción de calidad del consumidor (Aung, 1998; Moreau-Rio-Roty, 1998). En duraznos deshidratados, el color naranja luminoso acompañado por un aroma adecuado son indicadores de una alta calidad. Cuando el producto seco está pálido u oscurecido indica que la fruta ha sido deshidratada sin la madurez adecuada o que ha permanecido en almacenaje mucho tiempo. (Ledbetter- Aung-Palmquist, 2002).

El pardeamiento en duraznos es un proceso natural, en la Argentina ha sido controlado por muchos años a través de la aplicación de dióxido de azufre. Esta aplicación se realiza quemando azufre mineral en un ambiente cerrado llamado azufradero. El método demora usualmente de 8 a 24 horas. Los principales inconvenientes de este método son la discontinuidad del proceso de secado, consecuencia del tiempo empleado en realizar el azufrado, el difícil control de la dosificación y el nivel final de residuo. El dióxido de azufre es uno de los inhibidores más efectivos de la polifenol oxidasa (pardeamiento enzimático) y por ello ha sido usado por muchos años. Sin embargo se están buscando alternativas para evitar su uso debido a que un gran número de personas, especialmente asmáticos, son sensibles a los sulfitos (FDA, 1990; Sapers, 1993)

El propósito de este trabajo es sustituir el azufrado convencional por tratamientos con metabisulfito de sodio variando tiempos y concentraciones de inmersión bajo condiciones controladas y poder así controlar la cantidad de sulfitos presentes para evitar afecciones en los consumidores y acceder a mercados con distintas exigencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con tres variedades de duraznos: Bowen, Davis, y Ross. En todas ellas se efectuaron el mismo procedimiento de muestreo, y las mismas técnicas de ensayo, con el objeto de obtener resultados comparables.

Se seleccionaron 15 ejemplares por muestra, teniendo en cuenta la uniformidad en el grado de madurez, color y evitando la presencia de defectos (daños mecánicos, monilia, grafolita).

Los duraznos enteros se pelaron con una solución de soda cáustica caliente al 2.5%, luego fueron sumergidos en soluciones de metabisulfito de sodio en distintas concentraciones y tiempos, partiendo de la base de no utilizar concentraciones inferiores a 6%, debido a que según los resultados obtenidos en ensayos previos el color en estas condiciones no fue aceptable.

Se utilizaron 4 soluciones de metabisulfito de sodio: al 6, al 8, al 10 y al 12% m/m (masa en masa); y se combinaron con tiempos de inmersión de 2, 4, 6 y 8 minutos.

La primer variedad ensayada fue Bowen, esta se trató con todas las combinaciones posibles entre las concentraciones y tiempos arriba mencionados y se observó que en concentraciones superiores al 10% el metabisulfito de sodio precipita dejando un residuo de color blanco sobre algunos frutos, por tanto en las siguientes variedades a ensayar no se utilizó la concentración del 12%.

Estas muestras fueron colocadas al sol en bandejas de madera de 0.9 x 1.2m cubriéndolas con polietileno cristal de 50 micrones, hasta alcanzar un 20% de humedad en el producto.

Una vez obtenido el producto final se lo sometió a los siguientes ensayos:

a- Determinación de **peso fresco** (balanza Moretti 30kg*200g), **peso seco** (balanza Sartorius 1000g *0.1g) y **humedad** (método Dean Stark), para determinar **rendimiento** por variedad.

b- Contenido residual de **azufre** (a través del método de Reducción directa por Yodo, CITEF), con el objeto de visualizar la variación en las ppm de SO₂ residual acorde a las distintas concentraciones y tiempos de inmersión utilizados.

c- **Color** (colorímetro Kónica-Minolta CR 400), para determinar cuales de los tratamientos ensayados se hallan dentro de niveles de color aceptables.

El color se determinó a los 8 meses de obtenido el producto final, lo cual representa la condición más desfavorable. (notable pérdida de color del mes 0 al 8). La escala de color utilizada fue CIEL *a*b*

La utilización del colorímetro permite lograr una determinación objetiva del color a través de espacios de color. Se realizaron tres mediciones por durazno de tres disparos cada una, y se tomó el valor promedio. Como ecuación de referencia se toman valores promedio de L*, a* y b* que superen los siguientes valores: L*=52, b*=50, a*=20, esta ecuación esta basada en los valores actuales de aceptación visual del mercado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ENSAYO N°1: VARIEDAD BOWEN

Peso fresco:1.97(promedio), Peso seco:0.27(promedio), Humedad:20%, **Rendimiento:**

7.4:1

***Determinación de SO₂:** Como se expuso anteriormente las nuevas exigencias de mercado tienden a comercializar productos con la menor cantidad de ppm de SO₂ residual posible. Según el Código Alimentario Argentino este no debe exceder las 1.000ppm. De*

los tratamientos efectuados aquellos que cumplen esta especificación son los tratamientos: 3, 4, 1, 2, 6, 5, 7 (ordenados en forma creciente en contenido de ppm SO₂ residual) (ver tabla 1).

Tabla 1. Contenido de SO₂ residual. Variedad Bowen.

Tratamiento	Metabisulfito de Sodio (%)	Tiempo (min)	ppm SO ₂
1	6	2	392
2	6	4	405.33
3	6	6	162
4	6	8	175
5	8	2	458.67
6	8	4	426
7	8	6	810

Tabla 4. Determinación de Color por variedades. (Valores promedio +/- desviación estándar).

Trat.	Bowen			Davis			Ross		
	L *	a *	b *	L *	a *	b *	L *	a *	b *
1	48.04+/- 3.15	20.7+/- 1.89	42.82+/- 6.43	52.26+/- 6.09	15.65+/- 2.63	44.52+/- 5.33	53.45+/- 5.45	15.81+/- 1.95	40.3+/- 4.91
2	46.09+/- 3.42	22.74+/- 2.39	34.97+/- 5.02	53.56+/- 5.18	15.26+/- 2.54	47.3+/- 5.27	48.79+/- 5.11	18.72+/- 2.39	45.45+/- 3.71
3	44.3+/- 6.22	23.52+/- 2.67	45.28+/- 5.96	55.05+/- 4.89	16.87+/- 3.65	48.09+/- 5.36	48.51+/- 5.18	18.77+/- 2.05	42.45+/- 3.52
4	46.49+/- 5.87	22.16+/- 4.07	44.08+/- 6.62	53.87+/- 5.51	17.38+/- 2.92	47.1+/- 4.9	47.68+/- 5.34	18.31+/- 2.54	40.86+/- 3.38
5	51.68+/- 2.65	19.34+/- 1.58	49.58+/- 3.88	53.2+/- 6.17	18.02+/- 2.71	46.14+/- 6.1	47.9+/- 4.2	21.5+/- 2.13	41.44+/- 4.84
6	52.5+/- 2.94	20.12+/- 2.21	47.53+/- 5.97	54.24+/- 7.4	17.6+/- 2.87	50.49+/- 6.37	51.64+/- 5.55	18.71+/- 2.71	48.83+/- 3.07
7	52.97+/- 3.76	20.25+/- 2.22	53.71+/- 4.04	51.37+/- 5.13	17.08+/- 2.2	50.78+/- 5.36	56.83+/- 5.45	18.94+/- 4.17	54.55+/- 4.88
8	52.03+/- 3.97	24.1+/- 3.27	49.66+/- 8.39	51.49+/- 6.39	19.46+/- 3.46	47.07+/- 6.19	56.71+/- 5.62	18.21+/- 2.73	53.73+/- 7.38
9	51.92+/- 3.42	24.88+/- 2.97	50.4+/- 7.81	52.72+/- 4.21	16.39+/- 2.7	51.47+/- 4.3	53.91+/- 4.29	18.86+/- 3.39	49.56+/- 5.8
10	52.35+/- 3.59	24.21+/- 3.14	50.01+/- 6.58	53.28+/- 5.76	17.32+/- 2.95	51.73+/- 6.4	52.2+/- 6.89	20.17+/- 3.51	49.23+/- 6.44
11	53.12+/- 4.07	24.86+/- 3.4	50.51+/- 8.68	50.4+/- 5.68	16.62+/- 2.25	45.2+/- 7.76	54.86+/- 4.82	21.3+/- 4.18	53.29+/- 5.52
12	52.03+/- 5.45	23.07+/- 2.68	50.62+/- 3.17	56.2+/- 3.55	18.77+/- 2.19	55.86+/- 6.93	53.2+/- 4.66	17.08+/- 3.05	47.37+/- 5.27

Determinación de color: Los tratamientos que lograron superar los límites establecidos de L^* , a^* y b^* , son: 7, 11, 12, y 10 (ordenados de forma decreciente comenzando por el mejor color logrado) (ver tabla 4).

ENSAYO N°2: VARIEDAD ENSAYADA: DAVIS.

Peso fresco:3.08(promedio), Peso seco:0.53(promedio), Humedad:20%, **Rendimiento: 5.8:1**

Determinación de SO₂: Todos los tratamientos efectuados aquellos cumplen esta especificación (ver tabla 2).

Tabla 2. Contenido de SO₂ residual. Variedad Davis.

Tratamiento	Metabisulfito de Sodio (%)	Tiempo (min)	ppm SO ₂
1	6	2	181
2	6	4	267
3	6	6	326.4
4	6	8	373
5	8	2	445.86
6	8	4	531.19
7	8	6	441.6
8	8	8	522.6
9	10	2	576
10	10	4	678.4
11	10	6	966.4
12	10	8	1115.7

Determinación de color: Los tratamientos que lograron superar los límites establecidos de L^* , a^* y b^* , son: 12, 10, 6, 3, 4, 9 y 5(ordenados de forma decreciente comenzando por el mejor color logrado). (ver tabla 4)

ENSAYO N°3:VARIEDAD ENSAYADA: ROSS.

Peso fresco:2.94(promedio), Peso seco:0.45(promedio), Humedad:20%, **Rendimiento: 6.5:1**

Determinación de SO₂: Solamente sobrepasaron el límite de 1.000ppm los tratamientos 7, 11 y 12, el resto cumple esta especificación. (ver tabla 3)

Tabla 3. Contenido de SO₂ residual. Variedad Ross.

Tratamiento	Metabisulfito de Sodio (%)	Tiempo (min)	ppm SO₂
1	6	2	352
2	6	4	524.8
3	6	6	324.26
4	6	8	369.06
5	8	2	415.99
6	8	4	358.39
8	8	8	789.32
9	10	2	639.99
10	10	4	938.65
12	10	8	1066.65

Determinación de color: Los tratamientos que lograron superar los límites establecidos de L*, a* y b*, son: 7, 8, 11, 9, 10, 12 y 6 (ordenados de forma decreciente comenzando por el mejor color logrado). (ver tabla 4)

A través de las determinaciones de contenido residual de azufre y de color, se pueden hallar los tratamientos que cumplen con las especificaciones de los mercados más exigentes, logrando un producto homogéneo y repetible en el tiempo con menores y controlados contenidos de azufre.

CONCLUSIONES

Conclusiones por variedad

Ensayo 1: (variedad: Bowen, secado: sol)

➤ El único tratamiento que cumple con las especificaciones de color y de SO₂ residual es el 7.

Ensayo 2:(variedad: Davis, secado: sol)

➤ El tratamiento 12 es la mejor combinación pero su color no es intenso, y tiene un contenido residual inicial de azufre alto.

Ensayo 3:(variedad: Ross, secado: sol)

➤ El tratamiento 8 es la mejor combinación pero el valor de a* es bajo y tiene un contenido residual inicial de azufre aceptable.

CONCLUSIONES GENERALES

- La variedad Bowen por sus condiciones naturales de color presenta los mejores resultados para los tratamientos con metabisulfito de sodio.
- Las variedades Davis y Ross presentan en general valores de a^* menores a 20, debido a que su fruto es más pálido y consecuentemente lo es el producto obtenido.

BIBLIOGRAFÍA

Aung LH. 1998. Postharvest quality aspects of fresh commodities. Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry 2:577–587.

Código Alimentario Argentino.

FDA, 1990. Sulfuring agents; revocation of GRAS status for use on “fresh” potatoes served or sold unpackage or unlabeled to consumers. Food and Drug Administration Federal Registration, 55,9826-9833.

Ledbetter, C.A., Aung, L.A., Palmquist, D.E 2002. The effect of fruit maturity on quality and colour shift of dried 'Patterson' apricot during eight months of cold storage. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. v.77(5). p 526-533.

Moreau, Rio, M. and Roty, C. (1998) L'abricot: Perceptions et attentes des consommateurs français. Ctift – Infos, 141,16-21.

Sapers, G.M. 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. Food Technol. 47(10): 75-84.

DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA DE CALOR FLUIDO PARTICULA Y GLOBAL DURANTE LA ESTERILIZACION TERMICA DE ARVEJAS FRESCAS EN LATAS SOMETIDAS A AGITACION

GARROTE, Raúl L.; SILVA, Enrique R.; ROA, Rubén D.; BERTONE, Ricardo A.

Instituto de Tecnología de Alimentos (Facultad de Ingeniería Química-Universidad Nacional del Litoral). Ciudad Universitaria. C.C. 266. (3000) Santa Fe. Argentina. Fax: 0342-4571148. Correo electrónico: rgarrote@figus.unl.edu.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto de la temperatura (110-120-130°C), la velocidad de agitación (5-10-15 rpm) y el espacio de cabeza (4-8-12 mm), durante la esterilización con agitación tapa sobre fondo de arvejas frescas enlatadas, sobre los coeficientes de transferencia de calor, utilizando un diseño de Superficie de Respuesta. Los modelos desarrollados para el coeficiente de transferencia de calor fluido partícula, h_{fp} , y el coeficiente de transferencia de calor global, U , fueron adecuados, no encontrándose falta de ajuste significativa, siendo los coeficientes de correlación satisfactorios. Para ambas respuestas, la temperatura, la velocidad de agitación y el espacio de cabeza tuvieron un efecto significativo. U varió entre 477 y 905 W/m²°C, mientras que h_{fp} fluctuó entre 480 y 1950 W/m²°C. Los valores más altos de h_{fp} y U se obtuvieron para las más altas temperaturas, velocidades de agitación y espacios de cabeza. La verificación de los modelos de superficie de respuesta fueron satisfactorios. También se desarrollaron correlaciones para h_{fp} y U en términos de los números de Reynolds, Prandtl y espacio de cabeza adimensional, las que mostraron un buen acuerdo con los resultados experimentales.

Palabras claves: coeficientes de transferencia de calor, esterilización térmica, arvejas.

ABSTRACT

The effect of temperature (110-120-130°C), agitation speed (5-10-15 rpm) and headspace (4-8-12 mm) on heat transfer coefficients to canned green peas during end-over-end sterilization was studied using Response Surface Methodology (RSM). The models developed for fluid-to-particle heat transfer coefficient, h_{fp} , and overall heat transfer coefficient, U , were adequate, showing no significant lack of fit, and satisfactory correlation coefficients. For the two responses, temperature, agitation speed and headspace have a significant effect. U , ranged between 477 and 905 W/ m² °C, while h_{fp} , fluctuated between

480 and 1950 W/ m² °C. The highest h_{fp} and U values are obtained at high temperatures, agitation speeds and headspaces. The verification of the prediction models was satisfactory. Dimensionless correlations were developed for h_{fp} and U, with equations showing a good agreement with the experimental data. Heat transfer to liquids and particles was modeled using the Reynolds number, the Prandtl number and adimensional headspace.

INTRODUCCIÓN

Normalmente se utilizan datos experimentales de tiempo-temperatura para establecer las condiciones del procesamiento térmico de alimentos líquidos conteniendo partículas. También se pueden utilizar modelos teóricos para el diseño, la optimización y la validación de los procesos de esterilización. La predicción apropiada de la temperatura, en alimentos con partículas en un medio líquido, requiere disponer de datos del coeficiente global de transferencia de calor entre el medio de calentamiento y el líquido de la lata, U, así como del coeficiente de transferencia de calor fluido-partícula, h_{fp} , además de las propiedades termofísicas relevantes del sistema (Sablani et al., 1997; Ramaswmy & Sablani, 1997). Sablani et al. (1997) desarrollaron correlaciones adimensionales para la estimación de los coeficientes de transferencia de calor por convección forzada en latas con agitación tapa sobre fondo, para diferentes condiciones de procesamiento, usando regresión múltiple para los grupos adimensionales significativos.

Los objetivos de este trabajo son determinar los valores de U y h_{fp} durante la esterilización térmica con agitación tapa sobre fondo de latas conteniendo arvejas en un líquido de cobertura, en función de la temperatura del autoclave, la velocidad de agitación y el espacio de cabeza, utilizando la Metodología de la Superficie de Respuesta, así como desarrollar correlaciones para los grupos adimensionales significativos, para tamaño y concentración de partículas no encontrados en la bibliografía.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental utiliza la Metodología de Superficie de Respuesta. Se ha adoptado un diseño experimental de 3 factores en 3 niveles con 3 repeticiones del punto central (Box & Behnken, 1960), para estudiar la transferencia de calor durante el proceso de esterilización con agitación tapa sobre fondo de latas de arvejas frescas. Las tres variables independientes fueron: la temperatura del autoclave (110, 120 y 130 °C), la agitación de las latas (5, 10 y 15 rpm), y el espacio de cabeza de las latas (4, 8 y 12 mm). Las variables dependientes fueron: el coeficiente de transferencia de calor fluido partícula,

h_{fp} , y el coeficiente global de transferencia de calor entre el medio de calentamiento y el líquido de cobertura de la lata, U .

Estimación de h_{fp} y U

La ecuación que gobierna la transferencia de calor de un sistema constituido por partículas en un medio líquido enlatado puede escribirse de la siguiente manera:

$$U A_c (T_a - T_l) = m_l C_{pl} dT_l/dt + m_p C_{pp} d\langle T_p \rangle/dt \quad (1)$$

El segundo término del lado derecho de la ecuación (1) puede expresarse así:

$$m_p C_{pp} d\langle T_p \rangle/dt = h_{fp} A_p (T_l - T_{ps}) \quad (2)$$

Para la solución de la ecuación (1) se asume lo siguiente: temperatura inicial uniforme y temperaturas transientes para el líquido de cobertura, coeficientes de transferencia de calor constantes, propiedades termofísicas constantes, tanto para el líquido de cobertura como para las partículas, y que no hay acumulación de energía en las paredes de la lata (Sablani et al., 1997).

En orden a determinar h_{fp} , se resolvió la ecuación para la conducción en estado no estacionario en una esfera, utilizando el método de diferencias finitas con esquema implícito de Crank-Nicholson. La diferencia entre los valores esterilizadores experimentales en el centro de la partícula, F_R (ecuación 3), se utilizó como función objetivo debido a su relevancia en esterilización térmica (Ramaswamy & Sablani, 1997). El procedimiento consistió en comparar inicialmente los valores esterilizadores experimentales y calculados en el centro de la partícula, para un valor asumido de h_{fp} , cambiando sucesivamente el valor de h_{fp} hasta lograr que ambos valores esterilizadores se igualaran.

$$F_R = \int_0^{t_h} 10^{(T-121.11/10)} dt \quad (3)$$

Para estimar el coeficiente global de transferencia de calor, se utilizó la forma integrada de la ecuación (1), obteniendo la ecuación (4):

$$U A_c \int_0^{t_h} (T_a - T_l) dt = m_l C_{pl} \int_0^{t_h} dT_l + h_{fp} A_p \int_0^{t_h} (T_l - T_{ps}) dt \quad (4)$$

La difusividad térmica y la conductividad térmica, de la esfera de nylon se adoptaron iguales a $1,52 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ y $0,369 \text{ W/m K}$ respectivamente (Sablani et al., 1997). La densidad de las arvejas, determinada experimentalmente, fue de 1062 kg/m^3 . La superficie medida de la lata A_c fue igual a $0,0317 \text{ m}^2$.

Correlaciones adimensionales

Los valores de h_{fp} y U se utilizaron para calcular los números de Nusselt utilizando la relación $Nu = U$ (o h_{fp}) d_{cd}/k_l , donde d_{cd} y k_l son la dimensión característica y la

conductividad térmica del líquido de cobertura, respectivamente. Otros números adimensionales, como Re , Pr , Fr y h_s/H_c se calcularon utilizando las propiedades físicas del líquido y la partícula (a la temperatura promedio del líquido), y de los parámetros operativos del sistema (Sablani et al., 1997; Heldman & Lund, 1994). Las mejores dimensiones características fueron el diámetro de la partícula, para el coeficiente de transferencia de calor fluido partícula, y el diámetro de la lata para el coeficiente global de transferencia de calor. Se empleó un análisis de regresión no lineal para obtener los valores de las constantes de las correlaciones adimensionales.

MATERIALES

Las arvejas fueron de la variedad Utrillo, adquiridas localmente, desgranadas en el día, seleccionadas y tamañadas para obtener un tamaño de entre 9,5 y 10 mm de diámetro; procesadas en el día (Garrote et al., 2001). Las arvejas (aproximadamente 660 g, en tres lotes) fueron escaldadas en agua a 100°C durante 1 min, drenadas e incorporadas inmediatamente a tres latas; a estas latas se las completaba hasta el nivel de espacio de cabeza prescripto, con líquido de cobertura (solución acuosa de NaCl al 2% y sacarosa al 1,5%) a 95-100°C; a las latas semitapadas se les hacía un exhausting en recipiente con agua caliente (95-100°C) durante 1 min aproximadamente; inmediatamente las latas eran cerradas en remachadora marca Paduch modelo RTF 20 y enfriadas en agua helada (0 - 4°C) hasta lograr una temperatura aproximada de 20°C. En dos latas se colocaba una termocupla en el centro de una esfera de nylon (de 10,05 y 9,87 mm de diámetro respectivamente) ubicadas en el centro de la lata, para seguir la evolución de la temperatura, y en la tercera la termocupla se colocaba en el líquido de cobertura; otra termocupla tomaba la temperatura del medio de calentamiento. Las tres latas, cuyas dimensiones eran: diámetro interno = 69,8 mm y altura = 107 mm se colocaban en el centro y sobre el eje de giro de la cesta giratoria del autoclave; estas tres latas estaban rodeadas por seis latas de las mismas dimensiones pero llenas de agua.

Las muestras se esterilizaron en autoclave rotatorio de planta piloto diseñado por el grupo de trabajo y construido localmente. La temperatura de respuesta de las muestras fue registrada en intervalos de 1 minuto a 110°C, 0,5 minutos a 120 °C y 0,25 minutos a 130°C, utilizando un equipo de adquisición de datos Fluke modelo 2625 A. El calentamiento fue finalizado cuando el valor de esterilización a la temperatura de referencia de 121,11°C, en el centro de la esfera de nylon fue de 5 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para las quince corridas realizadas el valor esterilizador promedio a 121,11°C de la etapa de calentamiento fue de 4,97±0,12 minutos ($P < 0,05$). Por lo tanto los tratamientos térmicos de esterilización realizados fueron equivalentes. Las respuestas, como lo muestra la Tabla 1, fluctuaron entre amplios límites.

Tabla 1 : Datos experimentales para h_{fp} y U .

Corrida	Temperatura, °C	Agitación, rpm	Espacio de cabeza, mm	h_{fp} , W/m ² °C	U , W/m ² °C
1	110	5	8	490	483
2	120	10	8	1300	750
3	130	10	12	1950	905
4	130	5	8	1130	700
5	130	15	8	1805	871
6	120	15	4	750	552
7	120	5	12	800	579
8	120	5	4	655	523
9	110	10	12	520	513
10	120	15	12	1625	851
11	120	10	8	1450	740
12	110	15	8	660	595
13	120	10	8	1220	730
14	130	10	4	1124	701
15	110	10	4	480	477

^(a) Las corridas experimentales se realizaron en un orden al azar

El coeficiente de transferencia de calor fluido-partícula varió entre 480 y 1950 W/ m² °C en tanto el global fluctuó entre 477 y 905 W/ m² °C. Los coeficientes de regresión para cada respuesta y el análisis de varianza indican que los modelos desarrollados para h_{fp} y U fueron adecuados, no presentando falta de ajuste significativa y con satisfactorios coeficientes de correlación ($r^2 = 0,9877$ y $0,9870$). Para las dos respuestas la temperatura, la agitación y el espacio de cabeza tienen un efecto significativo.

Los gráficos de contorno mostraron un comportamiento similar para ambos coeficientes de transferencia de calor. La Figura 1 muestra los gráficos de contorno de la respuesta h_{fp} en función de la temperatura y la agitación para cada uno de los espacios de cabeza del dominio experimental. Los valores más altos de h_{fp} y U se obtienen a altas temperaturas de autoclave, altas velocidades de agitación y mayores espacios de cabeza. El valor más alto de h_{fp} fue $2281 \text{ W/m}^2\text{°C}$, para las siguientes condiciones: temperatura = 130 °C , agitación = 15 rpm y espacio de cabeza = 12 mm ; para las mismas condiciones de procesamiento también se obtuvo el valor más alto de U , igual a $928 \text{ W/m}^2\text{°C}$. A fin de verificar los modelos de predicción, se realizó una corrida experimental, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. El análisis de regresión no lineal realizado a los datos experimentales de varios factores, representados en forma adimensional, eliminó al número de Froude por ser no significativo ($P < 0,05$), comparado con otros parámetros. Las correlaciones que dieron el mejor ajuste de los datos experimentales para h_{fp} y U (se incluyen algunos resultados adicionales obtenidos de los modelos de superficie de respuesta) fueron las siguientes:

$$\text{Nu} = 3,98 \text{ Re}^{0,612} \text{ Pr}^{0,35} (h_s/H_c)^{0,655} \quad (5) \quad R^2 = 0,905$$

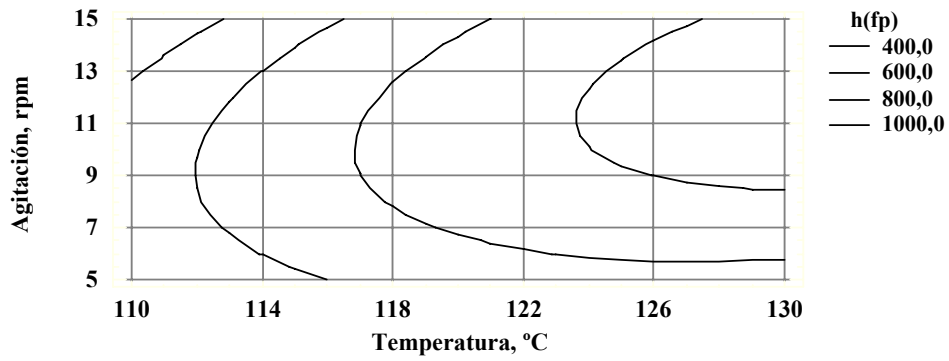
$$\text{Nu} = 8,07 \text{ Re}^{0,331} \text{ Pr}^{0,30} (h_s/H_c)^{0,350} \quad (6) \quad R^2 = 0,901$$

Diferentes correlaciones se presentan en la bibliografía (Sablani et al., 1997) para obtener los coeficientes de transferencia de calor fluido-partícula y global en latas sujetas a rotación tapa sobre fondo; dado que dichas correlaciones se basaron en partículas de diferente material, diámetro de partícula más grande y menor concentración de partículas, compararlas con la obtenidas en este trabajo es difícil; sin embargo, los exponentes de los números de Reynolds y Prandtl en las correlaciones (5) y (6) son similares a los reportados por Sablani et al. (1997).

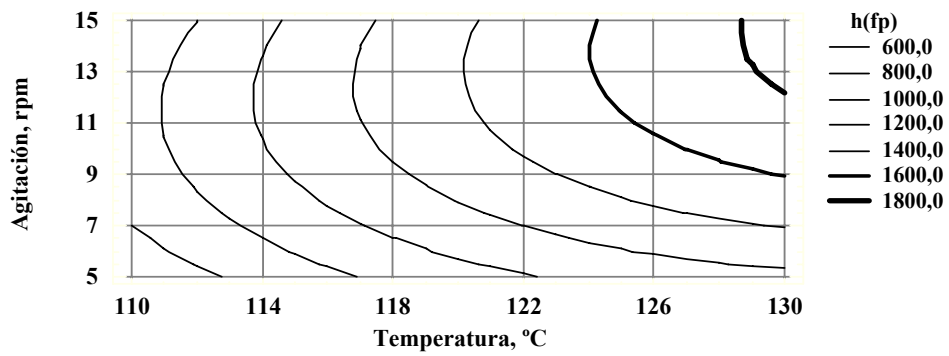
CONCLUSIONES

Los modelos de superficie de respuesta desarrollados para h_{fp} y U durante la esterilización tapa sobre fondo de arvejas enlatadas fueron adecuados, presentando falta de ajuste no significativa y coeficientes de correlación satisfactorios. Para las dos respuestas, la temperatura, la velocidad de agitación y el espacio de cabeza tuvieron efecto significativo. Las correlaciones adimensionales desarrolladas para la obtención de h_{fp} y U , mostraron un buen acuerdo con los resultados experimentales. Las correlaciones obtenidas se basaron en los números de Nusselt, como función de los números de Reynolds, de Prandtl y del espacio de cabeza adimensional.

Espacio de cabeza: 4 mm



Espacio de cabeza: 8 mm



Espacio de cabeza: 12 mm

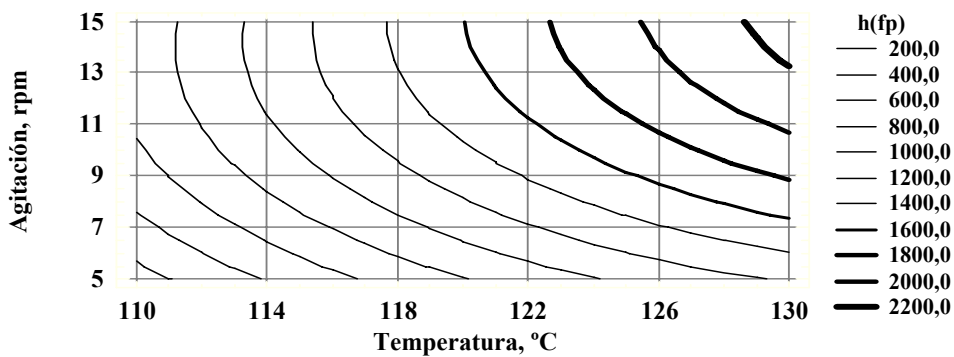


Figura 1: Coeficiente de transferencia de calor fluido-partícula, h_{fp} en función de la temperatura y la agitación, a espacio de cabeza constante.

BIBLIOGRAFIA

Box, G.E.P. & Behnken, D.W. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometr* (2):455-475.

Garrote, R.L.; Bertone, R.A.; Silva, E.R. & Avalor, A. 2001. Comparison of two rapid methods of lipoxygenase assay in blanched green peas, green beans and potatoes. *Food Science and Technology International*. 7 (2):171-175.

Heldman, D.R. & Lund, D.B. (1992). *Handbook of Food Engineering*. New York: Marcel Dekker. pp 286-290.

Ramaswamy, H.S. & Sablani, S.S. (1997). Particle shape influence on heat transfer in cans containing liquid particle mixtures subjected to end-over-end rotation. *Lebensmittel Wiss Und Technology* 30, 525-53.

Sablani, S.S., Ramaswamy, H.S. & Mujumdar, A.S. (1997). Dimensionless correlations for convective heat transfer to liquid and particles in cans subjected to end-over-end rotation. *Journal of Food Engineering* 34, 453-472.

Nomenclatura

A_c , superficie de la lata (m^2); A_p , superficie de las partículas (m^2); C_{pl} , C_{pp} , capacidad calorífica ($J\ kg^{-1}\ K^{-1}$); d_{ch} , dimensión característica (m); d_p , diámetro de la partícula (m); d_c , diámetro de la lata (m); h_{fp} , coeficiente de transferencia de calor fluido-partícula ($W\ m^{-2}\ ^\circ C^{-1}$); h_s , espacio de cabeza de la lata (m); H , altura de la lata (m); k_l , k_p , conductividad térmica del líquido y las partículas, respectivamente ($W\ m^{-2}\ ^\circ C^{-1}$); m_l , m_p , masa (kg); t , tiempo (s); t_h , tiempo de calentamiento del proceso (s); T , temperatura ($^\circ C$); T_a , temperatura del medio de calentamiento ($^\circ C$); T_o , T_i , temperatura inicial y del líquido, respectivamente ($^\circ C$); T_{ps} , temperatura superficial de la partícula ($^\circ C$); T_R , temperatura del autoclave ($^\circ C$); U , coeficiente global de transferencia de calor ($W\ m^{-2}\ ^\circ C^{-1}$).

INCIDENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS DEL SUERO DULCE DE QUESO RECONSTITUIDO EN LA FORMACION Y ESTABILIDAD DE LA ESPUMA.

TOSI, Enzo, A.; CANNA, Luis, A.; LUCERO, Héctor y RÉ, Edmundo, D.

Centro de Investigación y Desarrollo de Tecnología de Alimentos. Facultad Regional Rosario - Universidad Tecnológica Nacional. Zeballos 1341 - S2000 BQA - Rosario - Argentina - Telefax 54 (0) 341 4484909. Ce: tosienzo@ciudad.com.ar

RESUMEN

Se estudió la influencia de los tratamientos térmicos sobre las propiedades espumígenas de las disoluciones de suero dulce de queso en polvo.

Los ensayos se realizaron a partir de un diseño de experimento factorial de dos variables, temperatura y tiempo, con tres puntos centrales. La temperatura y los tiempos ensayados fueron 75, 80 y 85 °C, y 300, 750 y 1200 (s) respectivamente.

Las respuestas seleccionadas fueron Volumen de espuma, Volumen de líquido en la espuma, Poder espumante y Estabilidad.

Los tratamientos térmicos implementados modifican las propiedades de las espumas de tal forma que el volumen de espuma, con excepción de la tratada a 85 °C durante 750 s, siempre es mayor que la muestra sin tratar. La estabilidad también se comporta de la misma manera salvo la tratada a 75 °C y 300 s.

ABSTRACT

The tests were carried out starting from a factorial experiment design of two variables: temperature and time, with three central points. The tested temperatures and times were 75, 80 and 85 °C; and 300, 750 and 1200 (s) respectively.

The selected responses were Foam volume, Liquid volume in foam, Foaming power and Stability. The implemented thermal treatments modified the properties of foams in such a way that the foam volume, excepting the one treated at 85 °C for 750 s, is always higher than that of the non-treated sample.

Stability also behaved in the same way, excepting in samples treated at 75 °C and 300 s.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades funcionales del suero dependen de la interacción entre las proteínas y ésta fundamentalmente de la fuerza iónica (concentración de sales), PH, tratamientos térmicos (temperatura y tiempo de tratamiento) (Pessen et al. 1985). Así a pH comprendidos entre 5 y 8 la β -lactoglobulina existe como un dímero, a PH entre 3 y 5 como un octámero y a valores extremos (menor que 2 o mayor de 8) como monómero. A pH superior a 9 se verifica la desnaturalización irreversible (Pessen at al. 1985).

También tienen incidencia en las propiedades funcionales los tratamientos tecnológicos aplicados a la leche y los utilizados en la obtención del suero, dada su posible acción de desnaturalización, la que se verifica en distintos grados (Matsumura et al. 1994). El poder espumante de las proteínas está relacionado con las propiedades reológicas de la película interfacial, si la película es gruesa, incrementa la viscosidad interfacial y el drenaje es lento. Esta propiedad es aparentemente incompatible con las cualidades requeridas para tener un buen poder espumante (solubilidad, movilidad y flexibilidad) pero la película interfacial debe también ser viscoelástica para que la espuma tenga buena estabilidad (Damodaran, 1997).

Los factores a nivel molecular que afectan a las proteínas del suero dulce de queso para formar y estabilizar espumas son los mismos que los que están relacionados con la formación de emulsiones, esto es, una rápida difusión de la molécula en la interfase aire / agua, solubilidad y flexibilidad (Le Meste et al. 1990).

Según Damodaran (1997) la β lactoglobulina es el mejor estabilizador de la espuma, pero al calentarla por encima de los 70 °C aparecen nuevas cadenas de disulfuro que generan polimerización de la β lactoglobulina. Damodaran (1997) atribuyó a la relación entre las especies monoméricas y poliméricas la capacidad del suero dulce para formar espumas y la estabilidad de las mismas, las primeras parecen contribuir a la capacidad espumante, en tanto que las poliméricas a la estabilidad dado que la difusibilidad de las monoméricas es mayor que las poliméricas las que se adsorben y forman una película de interfase durante el burbujeo. Cuando las especies polimerizadas actúan, se adsorben en la capa de proteína preformada aumentando así las propiedades viscoelásticas de la película, evitando el drenaje gravitacional y la difusión de gas entre las burbujas. La relación proteínas monoméricas / poliméricas depende del pH y de las condiciones de temperatura y tiempo de los tratamientos térmicos. Los cambios estructurales a nivel molecular han sido evaluados, se han propuesto distintos modelos y mecanismos; (Kitabatake et al., 2001; Photchanachai et al., 2001; Dalglish et al., 1997; Schokker et al., 2000; Havea et al., 2000, 2001). Estos investigadores coinciden que a temperaturas comprendidas entre

68 y 75 °C se verifica una primera etapa de disociación de los dímeros con formación de monómeros y que por aumento de la temperatura y el tiempo de tratamiento se verifica la presencia de dímeros y otros oligómeros, como así también de polímeros y copolímeros cuando la temperatura de tratamiento es superior a 75 °C. Teniendo en cuenta que las industrias productoras de suero dulce en polvo (SDP) aplican procesos diferentes es posible que las propiedades funcionales del SDP sean algo diferentes según su procedencia. (Banavara et al. 2003). El SDP se utiliza en la industria de los alimentos por su propiedad espumante y que el poder espumante y la estabilidad de la espuma pueden modificarse mediante una desnaturalización controlada, se fijó como objetivo de este trabajo evaluar la incidencia de la temperatura y tiempo de calentamiento de las soluciones de SDP en el poder formador de espuma y la estabilidad de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó SDP provisto por la firma Verónica SA (Lehmann, Provincia de Santa Fe)

La composición del SDP era la siguiente: humedad 3.00 %, proteínas 12.5 %, lípidos 0.25 %, cenizas 8.45 % y lactosa 71,5 %, las técnicas utilizadas fueron AOAC 930.29, FIL-IDF 9C-1987, AOAC 930.30, FIL-IDF 58: 1970, FIL-IDF 28:1974, respectivamente

Métodos

Los ensayos se efectuaron sobre suero de queso reconstituido obtenido por disolución de 130 gramos de SDP y llevado a volumen final de un litro con agua destilada, el pH de la disolución resulto ser de 6,4

Tratamiento térmico del suero reconstituido

Según un diseño de experimento factorial de dos variables independientes en tres niveles (3^2) con dos puntos centrales, los valores de las variables independientes temperatura (T) y el tiempo de tratamiento en condiciones isotérmicas (t) se fijaron en 70, 75 y 80 °C y 300, 750 y 1200 (s) respectivamente. Como respuestas se fijaron los parámetros:

V_f : Volumen de la espuma después de burbujear aire durante 270 segundos (ml) (Pilosof et al. 2000),

V_{if} : Volumen de líquido en la espuma después de burbujear aire durante 270 segundos (ml) (Pilosof et al. 2000) definido como $V_{if} = V_{il} - V_{el}$

V_{il} : Volumen de líquido antes de comenzar el burbujeo (ml)

V_{el} : Volumen de líquido al finalizar los 270 (s) de burbujeo (ml)

E: Estabilidad. Tiempo en que la espuma drena la mitad del líquido contenido en ella (s) (Loisel et al., 1993 y Guillerme et al., 1993)

F_p : Poder espumante, definido como:
$$F_p = \frac{V_{el}}{V_f} \quad (1)$$

Tratamiento térmico: Los ensayos se realizaron en un sistema cerrado consistente en un serpentín de acero inoxidable de 5 mm de diámetro con capacidad de 150 cm³ provisto de una micro termocupla para medir la temperatura en el centro de la vena de suero.

Método de calentamiento: Durante el calentamiento son identificables dos estados: a) el transitorio o transiente en el cual el producto aumenta su temperatura desde la inicial (25 °C) a la correspondiente al tratamiento isotérmico y b) el isotérmico en donde la temperatura del producto se mantiene constante en el tiempo que dura el tratamiento.

Calentamiento en el estado transiente: Para todas las temperaturas ensayadas el tiempo de esta etapa se mantuvo constante e igual a 20 s. El calentamiento se realizó sumergiendo el serpentín en un baño de glicerina termostatizado. Las temperaturas del baño de glicerina se determinaron en ensayos preliminares.

Calentamiento en el estado isotérmico: Una vez alcanzada en el estado transiente la temperatura de ensayo isotérmico el serpentín se transfería a otro baño de glicerina termostatizado que se encontraba a la temperatura correspondiente al tratamiento isotérmico (70 °C, 75 °C u 80 °C) manteniéndoselo a temperatura constante durante 300, 750 u 1200 s según correspondiera. El tiempo que se utilizaba para transferir el serpentín era de aproximadamente 2 s.

Enfriamiento y retiro de la solución de suero: Al finalizar el calentamiento el serpentín se transfería a un baño de agua termostatizado a 20 °C manteniéndoselo en él hasta que la temperatura del suero fuese de 40 °C. El suero se retiraba del serpentín insuflando nitrógeno.

Determinación de las respuestas: Para determinación del P_e y de la E se adoptó el método por burbujeo con aire (Pilosof et al. 2000) el aire se insufló a razón de 20 ml / minuto a través de una placa de vidrio poroso G₄. El diámetro interior y la altura del tubo para contener el líquido y la espuma eran de 3.3 y 30 centímetros respectivamente. El volumen de líquido inicial era de 35 ml y el insuflado de aire se suspendió a los 270 segundos. Finalizado el burbujeo de aire se midieron los volúmenes de líquido residual y de espuma y el tiempo en que el 50 % de líquido contenido en la espuma drenaba de ésta. Todos los tratamientos térmicos se efectuaron por triplicado como así también las determinaciones de capacidad espumante y estabilidad de la espuma, informándose los valores medios

Statistics Analysis

Los ANOVA, las superficies de respuesta y los polinomios de segundo en temperatura y tiempo se determinaron con el soft Statgraphics Plus 4 Program (Statistical Graphics Corp., Maryland USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

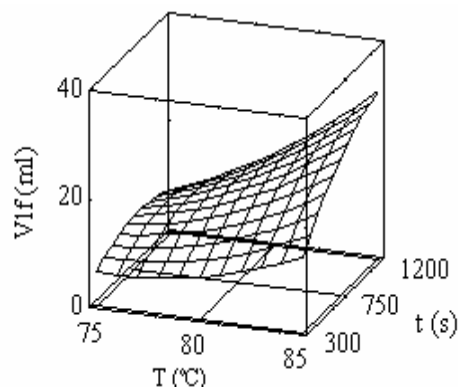
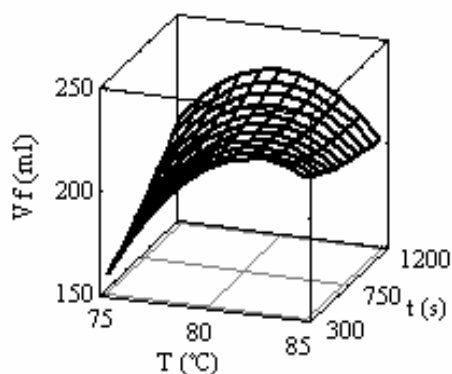


Figura 1. Superficie de respuesta del volumen de espuma en función de la temperatura y tiempo de tratamiento

Figura 2. Superficie de respuesta del volumen de líquido en la espuma en función de la temperatura y tiempo de tratamiento

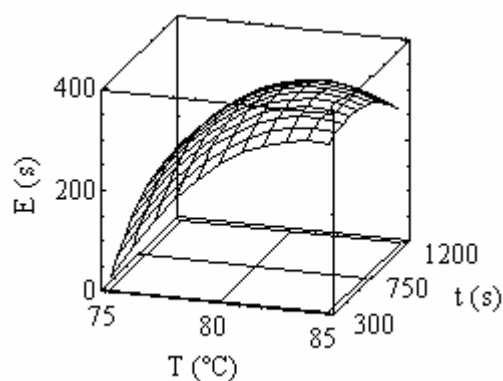
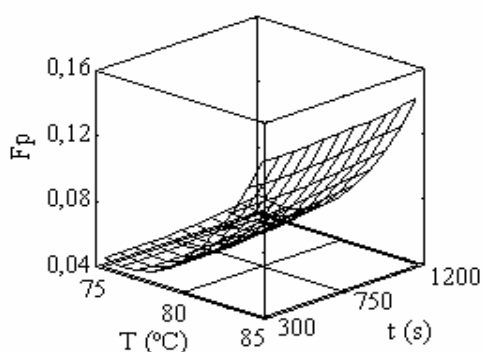


Figura 3. Superficie de respuesta del poder espumante en función en función de la temperatura y tiempo de tratamiento

Figura 4. Superficie de respuesta de la estabilidad de la espuma en función de la temperatura y tiempo de tratamiento

En la tabla 1, con un nivel de confiabilidad del 95 % se detalla la significación de los efectos temperatura y tiempo y sus interacciones.

Tabla 1 Nivel de significación de las variables T y t en las respuestas V_f , V_{lf} , F_p y E, error absoluto medio y test de Durbin-Watson

	V_f	V_{lf}	F_p	E
T	0,0463	0,023	0,0001	0,0009
t	0,9532	0,188	0,2504	0,4416
T^2	0,1278	0,2977	0,0005	0,0109
T x t	0,0621	0,0646	1,0000	0,0449
T^2	0,05607	0,2389	0,5583	0,1179
R^2	76,21	91,31	98,69	94,25
EAM ^a	10,67	1,914	0,004	20,871
DW ^b	2,9	2,50	2,29	2,20

^a Error absoluto medio ^b Durbin - Watson test

En las muestras tratadas térmicamente es evidente que se producen cambios estructurales con formación de monómeros, polimerizaciones y copolimerizaciones en distintos grados que traen como consecuencia modificaciones en las respuestas.

La muestra sin tratamiento produce el más bajo volumen de espuma pero con un volumen de líquido incorporado que hace que la espuma tenga un poder espumante de 0,15, mayor que los de las muestras tratadas térmicamente, con excepción del tratamiento a 80 °C durante 750 s. La E de espuma producida por la muestra de control es superada en todas las muestras tratadas con excepción de la correspondiente a 75 °C durante 300 s. De acuerdo a lo propuesto por Damodaran (1997) y Bals et al (2003), los mayores valores de E serían la consecuencia de haber alcanzado un cierto grado de desnaturalización y la formación de polímeros de la β lactoglobulina y copolímeros de ésta con la α lactoalbumina. Para condiciones de tratamiento a temperatura de 75 °C y tiempos comprendidos entre 300 y 1200 s, con excepción de la condición 85 °C y 1200 s, se verifica un descenso importante de E, presumiblemente debido a una desnaturalización excesiva.

Los monómeros y dímeros que según Damodaran (1997) se generan cuando el suero se calienta a 75 °C serían los responsables de los valores de V_{le} , inferiores a los del suero

sin tratar. Cuando los tratamientos se realizan a temperaturas mayores a 75 °C y tiempos comprendidos entre 300 y 1200 s la V_{le} crece con el aumento de ambas variables independientes. Esto estaría relacionado con la formación, por tratamiento térmico, de estructuras moleculares más complejas como ser polímeros de la β lactoglobulina y copolímeros de esta con la α lactoalbúmina. El suero tratado a 80 °C y 750 s produce una espuma con valores V_f , V_{if} y E cercanos a los valores medios pero con él más alto valor de F_p lo que implica que tal espuma es la que muestra la mayor densidad. Es posible que este comportamiento se deba a que en esas condiciones existen concentraciones de las distintas estructuras moleculares (monómeros, dímeros, polímeros de la β lactoglobulina y copolímeros de ésta con la α lactoalbúmina) que promueven la condición óptima de V_f , F_p y E .

CONCLUSIONES

Por lo expuesto, se concluye que es factible adecuar las propiedades espumantes del suero dulce de queso reconstituido para diversos usos mediante tratamiento térmicos adecuados.

BIBLIOGRAFIA

AOAC. American Official Analytical Chemistry (1995). Method 930.29. Sixteenth Edition.

Bals, A. and Kulozik, U. (2003) Effect of pre-heating on the foaming properties of whey protein isolate using a membrane foaming apparatus *International Dairy Journal* 13: 903-908.

Banavara, D. S.; Anupama, D. and Rankin S. A (2003) Studies on Physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. *Journal Dairy Science* 86: 3866-3875.

Damodaran, S. (1997) Protein Stabilized Foms and Emulsions. In Food Proteins and their applications. Ed. Dmodaran, S. and Paraf, A. Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp 77-94

Havea, P.; Singh, H.; and Creamer, L.. (2000). Formation a new protein structures in heated mixture of BSA and α lactoalbumin *J. Agric. Food Chem.* 48: 1548-1556

Havea, P.; Singh, H.. and Creamer, L.. (2001). Characterization of heat-induced aggregates of β lactoglobulin, α lactoalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. *Journal of Dairy Research* 68: 483-497.

- Kitabatake, N.; Wada, R.; and Fujita, Y. (2001).** Reversible conformational change in β -lactoglobulin A modified with N-ethylmaleimide and resistance to molecular aggregation on heating. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4011-4018.
- Le Bon, C.; Nicolai, T.; and Durand, D. (1999).** Growth and structures of aggregates of heat-denatured β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology* 34: 451-466.
- Le Meste, M., Colas, B., Simatos, D., Closs, B., Courthaudon, J. and Lorient, D., (1990)** Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein, *J. Food Sci.* 55:1445 – 1449.
- Matsumura, Y., Mitsui, S., Dickinson, E. and Mori, T., (1994)** Competitive adsorption of α -lactoalbumin in the molten globule state, *Food Hydrocoll.* 8:555 - 566.
- Pessen, H., Purcell, J. and Farrel, H. Jr., (1985).** Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulins. Determination of cross relaxation and correlations with structural changes by use of two genetic variants of self associating globular protein. *Biochim. Biophys. Acta* 828 : 1- 12.
- Pilosof, A. M. y Bartholomai, G. (2000).** Propiedades superficiales en *Caracterización Funcional y estructural de Proteínas*. Edit. Eudeba pp 65 - 70.
- Photchanachai, S. and Kitabatake, N. (2001)** Heating of β lactoglobulin A solution in a closed system at high temperature. *Journal of Food Science* 66: 647-652.
- Schokker, E.; Singh, H.; Pinder, D.; and Creamer, L. (2000)** Heat-induced aggregation of β lactoglobulin A and B with α lactoalbumin. *International Dairy Journal.* 10: 843-853.

DESCONTAMINACIÓN MICROBIANA EN JUGOS DE NARANJA APLICANDO RADIACIONES ULTRAVIOLETAS

STECHINA Damián⁽¹⁾, MALLERET Antonio⁽¹⁾, MAFFIOLLY Rodolfo⁽¹⁾, ALEGRE María⁽¹⁾, BONNIN Marianela⁽¹⁾, OJEDA Tania⁽¹⁾ y COUTAZ, Víctor⁽²⁾

(1) Facultad de Ciencias de la Alimentación – UNER. Mn. Tavella 1450 - 3200 Concordia – Tel. 03454231448 – Fax: 03454231442 – E-mail: alimentos@fcal.uner.edu.ar - (2) INTEC – CONICET (U.N.L.). Gûemes 3450 3000 Santa Fe

RESUMEN

El tratamiento térmico, proceso tradicional de descontaminación microbiana en jugos cítricos, consume elevada energía y altera las características fisicoquímicas del producto tratado.

Los tratamientos no térmicos, en particular las radiaciones ultravioletas, tienen efecto germicida en determinados sistemas líquidos.

Utilizando un equipo piloto de radiación UV se analiza la influencia de las variables de proceso en la descontaminación microbiana a temperatura y tiempo constantes.

El análisis de los resultados experimentales de un diseño estadístico rotacional centrado, indica que las variables significativas son el flujo energético incidente, el caudal de recirculación ($p = 0,09$), y la función cuadrática del flujo energético incidente ($p = 0,01$).

En el intervalo de las variables analizadas, el valor máximo de descontaminación microbiana se da cuando el flujo energético es de $19,6 \text{ J/cm}^2$ y el caudal de recirculación de 935 l/h

Palabras Claves: Radiaciones ultravioletas – jugo cítrico – descontaminación microbiana

SUMMARY

The heat treatment, traditional process of microbial decontamination in orange juice, consumes high energy and alters the physicochemical characteristics of the treated product. The nonthermal treatments, in individual the ultraviolet radiations, have germicidal effect in certain liquid systems. Using an equipment pilot of radiation UV one analyzes the influence of the variable of process in the microbial decontamination to constant temperature and time. The analysis of the experimental results of a statistical design rotational trim, indicates that the significant variable are the incident radiant flux, the volume of to recycle ($p = 0.09$), and the quadratic function of the incident radiant flux ($p =$

0.01). In the interval of the analyzed variable, the maximum value of microbial decontamination occurs when the radiant flux is of 19.6 J/cm² and the volume to recycle of 935 l/h

KEY WORDS: Ultraviolet radiations- orange juice- microbial reduction

INTRODUCCIÓN

El tratamiento térmico es el proceso tradicional de descontaminación microbiana e inactivación enzimática pero consume apreciable energía térmica, con la consecuente contaminación ambiental, y el inevitable daño por exceso de temperatura que sufre el producto a tratar, como es en el caso de jugos cítricos.

Las radiaciones ultravioletas de onda corta (100 a 280 nm) tienen un fuerte efecto germicida, que puede aprovecharse en la eliminación de microorganismos en ambientes específicos, utensilios de trabajo y sistemas líquidos transparentes (Alegre M., y otros. 2003, Mai Thu Thi Tran and Mohammed Farid. 2004). La hipótesis que se plantea es que las radiaciones UV-C de onda corta reducen la actividad microbiana del jugo cítrico influenciadas por variables de proceso (caudal, flujo energético incidente, temperatura, etc.) y características del producto tratado (grado opacidad o transparencia, etc.). Se aplicó un diseño estadístico rotacional centrado (Irwiwn R. 1992, Montgomery D. C. 1991), y se analizó la influencia del flujo energético incidente (F.E.I.), en función de la potencia de lámparas UV, el caudal de recirculación del líquido y el contenido de pulpa en la descontaminación microbiana logrado después de diez minutos de procesamiento, manteniendo la temperatura constante a 25 ° C .

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima: En cada experiencia se procesó 6 kilogramos de jugo de naranjas, exprimido en laboratorio, a partir de fruta variedad Valencia Late, provista por una empresa de la zona.

Determinaciones Microbiológicas: En todas las experiencias se utilizó muestras de Jugo de Naranja (t_0 , t_f), las primeras sin irradiar y diluidas 1:10, 1:100, las demás irradiadas durante 10 minutos, posteriormente se sembraron en placas de Petri (D = 90 mm). Se usó Agar Suero de Naranja y se las incubó a 30 °C durante 24 - 48 hs. El recuento de UFC/ml de hongos y levaduras, por el método (N.M.V).

Ensayo Experimental: Se realizó con un equipo piloto de diseño y construcción propia, cuyas características de construcción son: alimentación 220 V (c.a), irradiación UV-C continua, adaptado para trabajar con F.E.I. (0 a 10 unidades de lámparas UV), caudal de

recirculación y temperatura variables. Se concretaron 15 experiencias tendientes a evaluar la influencia de los parámetros de proceso elegidos, en el grado de descontaminación microbiana expresado como $\log N.M.V.(t_0) - \log N.M.V.(t_f)$ (la diferencia entre el logaritmo decimal del número de microorganismos viables al inicio menos el obtenido al final, a temperatura constante de 25 °C durante 10 minutos de procesamiento).

Análisis Estadístico: Se adoptó el diseño rotacional centrado, Box Behnekn, de tres variables (V_1, V_2, V_3) (Montgomery D., 1991); con el objeto de evaluar la influencia del F.E.I., el caudal de recirculación y el tamaño de malla de los filtros en la descontaminación microbiana. Los resultados fueron sometidos a Análisis de Regresión de Variancia, procesados con la ayuda del programa Statgraphics Versión 5.1 para Windows. (Statistical Graphics Group, TM). En la Tabla 1 se muestran los valores de las variables independientes codificadas conforme a diseño estadístico adoptado y los correspondientes parámetros de descontaminación microbiana.

Tabla 1. Diseño estadístico utilizado y valores de respuesta

Variable	Nivel superior (+1)	Nivel medio (0)	Nivel inferior (-1)
V_1 . F. E. I.	19,57 J/cm ²	13,7 J/cm ²	7,83 J/cm ²
V_2 . Caudal	935 l/h	697 l/h	458 l/h
V_3 . Tamaño malla	75 μ	50 μ	25 μ

Experiencia: (V_1) : (V_2) : (V_3)	Respuesta: Descontaminación microbiana $\log N.M.V.(t_0) - \log N.M.V.(t_f)$
(+ 1) : (+ 1) : (0)	2.94
(+ 1) : (0) : (+ 1)	2.32
(0) : (+ 1) : (+ 1)	1.56
(0) : (- 1) : (+ 1)	1.48
(+ 1) : (0) : (- 1)	3.07
(+ 1) : (- 1) : (0)	1.85
(0) : (0) : (0)	1.13
(0) : (+ 1) : (- 1)	0.69
(0) : (- 1) : (- 1)	0.3129
(0) : (0) : (0)	1.536
(- 1) : (+ 1) : (0)	2.0248
(- 1) : (0) : (+ 1)	2.193
(0) : (0) : (0)	1.4
(- 1) : (- 1) : (0)	1.75
(- 1) : (0) : (- 1)	1.907

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de regresión conduce a la siguiente superficie de respuesta ($R = 0,93$):

$$DM = 1.36 + 0,29V_1 + 0,23V_2 + 0,2V_3 + 0,2V_1V_2 - 0,26V_1V_3 - 0,07V_2V_3 + 1,07V_1^2 - 0,29V_2^2 - 0,06V_3^2$$

El análisis de variancia indica que los efectos significativos son el F.E.I., el caudal de recirculación ($\alpha < 0,09$) y la función cuadrática del F.E.I. ($\alpha < 0,01$); por lo que se descarta la significación del grado de opacidad o transparencia del jugo de naranja obtenido por tamizado con filtros de malla (25 a 75 μ) en la acción germicida penetrante de los rayos ultravioletas.

Tabla 2. Descontaminación microbiana en función del flujo energético incidente y el caudal de recirculación.

F.E.I. C.R. → ↓	458 l/h	697 l/h	935 l/h
7,83 J/cm ²	1,82	2,14	1,89
13,7 J/cm ²	0,84	1,36	1,3
19,57 J/cm ²	2	2,72	2,86

En la Tabla 2 se observa que el aumento del F.E.I. desde 7,83 J/cm² a 13,7 J/cm² produce una disminución en la descontaminación microbiana para todos los valores de caudales de recirculación utilizados.

Esta disminución alcanza al 54 % cuando el F.E.I. es 7,83 J/cm² para un caudal de recirculación de 697 l/h. Este comportamiento se corresponde con una menor descontaminación de los microorganismos aerobios totales cuando el F.E.I. equivale al valor medio de la variable en el rango codificado. No obstante, con el incremento de energía incidente desde 13,7 J/cm² a 19,57 J/cm² se eleva el nivel de descontaminación microbiana en los tres caudales de recirculación considerados, siendo éste de 138 % para cuando el caudal es de 935 l/h. Si analizamos desde otro punto de vista, el aumento de energía incidente desde 7,83 J/cm² a 19,57 J/cm² condujo a un aumento en la descontaminación microbiana, siendo del 34 % cuando el caudal de recirculación fue de 935 l/h, alcanzando un nivel de descontaminación de 2,86 (Máximo); compatible con lo

observado por Barbosa Canovas y otro (1999). Gráficamente este comportamiento observado se muestran en Figuras 1 y 2.

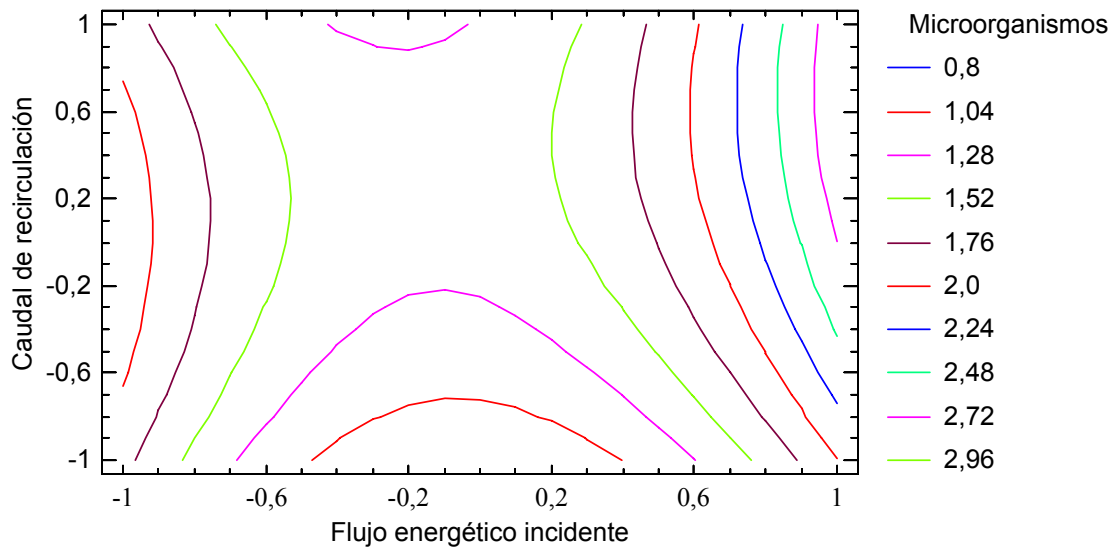


Figura 1. Contorno de superficie de respuesta para descontaminación microbiana. (Léase *Microorganismos* como $\log N.M.V.(t_0) - \log N.M.V.(t_f)$)

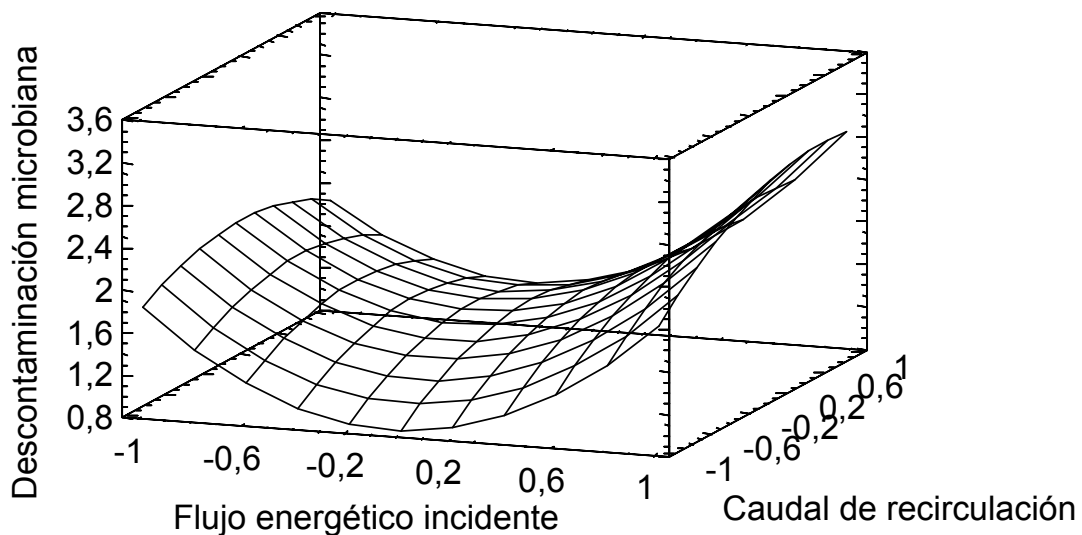


Figura 2. Superficie de respuesta para descontaminación microbiana

El incremento del caudal de recirculación desde 458 l/h a 697 l/h condujo a un aumento en el nivel de descontaminación alcanzando el 62 % a un F.E.I. de 13,7 J/cm². Cuando el caudal recirculación fue de 935 l/h y el F.E.I. de 7,83 J/cm² se produjo una disminución en la descontaminación microbiana del 12 %. Para el mismo caudal, se obtuvo una

descontaminación del 4 % para cuando el F.E.I. se mantuvo en $13,7 \text{ J/cm}^2$. Finalmente, y a igual F.E.I. se registró un incremento del 5% para un caudal de recirculación 935 l/h.

En resumen, un incremento del caudal de recirculación significa mayor cantidad de veces que el jugo fluye por el equipo y por ende mayor tiempo de exposición y el F.E.I. es la variable mas significativa, y el valor máximo de descontaminación microbiana se da cuando el flujo energético es de $19,6 \text{ J/cm}^2$ y el caudal de recirculación de 935 l/h. .

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos analizados, los resultados obtenidos coinciden con antecedentes del grupo de trabajo que con el mismo equipo, materia prima: jugo de naranja irradiado durante 18 min. y en condiciones constantes de procesamiento a F.E.I. = $19,57 \text{ J/cm}^2$, (Alegre M. y otros, 2003) demuestran que no se producen variaciones significativas en los parámetros fisicoquímicos tales como: el contenido de ácido ascórbico, pH, acidez, sólidos solubles y azúcares reductores.

Relación Costo Beneficio: Desde el punto de vista del costo beneficio, con un F.E.I. de $19,57 \text{ J/cm}^2$, para una masa de jugo de naranja tratada de 6 Kg., durante 10 minutos de exposición, y un caudal de recirculación de 935 l/h (Nº de veces que recircula: 27); la energía necesaria por unidad de volumen calculada es de $8,73 \text{ kwh/m}^3$. Este requerimiento energético es alrededor de diez veces menor que el necesario para un tratamiento térmico tradicional (a 90° C), según como lo calculado por Mai Thu Tri Tran y otros (2004), cuyo valor alcanza a $81,67 \text{ kwh/m}^3$.

CONCLUSIONES

En términos energéticos es un proceso eficiente y económico cuando se compara con el tratamiento térmico tradicional, pudiendo aplicarse en combinación o como complemento junto a otras técnicas de procesamiento.

Se propone evaluar la influencia de la temperatura en la descontaminación microbiana, y avanzar en el estudio de la calidad sensorial del producto tratado.

Coincidiendo con la bibliografía consultada (Barbosa Canovas y otros, 1999, y Shafiur Arman, 2002), se ve la necesidad de evaluar otros mecanismos de tratamientos no térmicos para la reducción microbiana y la inactivación enzimática de jugos cítricos, como pueden ser los campos eléctricos pulsados.

BIBLIOGRAFÍA

Alegre M., Malleret A. y Quinteros F. 2003. "Radiaciones ultravioletas. Evaluación de la variabilidad microbiológica y fisicoquímica en jugos cítricos". X Encuentro de Jóvenes Investigadores del Grupo Montevideo

Barbosa Cánovas G., Pothakamury U. y Palou E. 1999. “Conservación no térmica de alimentos”. Editorial Acribia S.A.

Irwin R. Miller. 1992. Probabilidad Estadística para Ingenieros. Prentice- Hall Hispanoamericano S.A.

Manual de alumbrado. 1988. Editorial Paraninfo S.A.

Mai Thu Thi Tran and Mohammed Farid. 2004. “Ultraviolet treatment of orange juice”. Innovative Food Science & Emerging Technologies. Vol. 5, pages 495-502.

Montgomery D. C. 1991. “Diseño y Análisis de Experimentos” Grupo Editorial Iberoamérica.

Shafiur Rahman M. 2002. Manual de conservación de alimentos. Editorial Acribia S.A.

AGRADECIMIENTOS

❖ Este trabajo se concretó gracias al financiamiento brindado por la Secretaría de Extensión Universitaria de U.N.E.R.; el Área de actividades científicas tecnológicas y juveniles de la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva; la Fundación YPF y la Empresa Citrícola Camba Paso de Concordia, Entre Ríos.

❖ A Nicolás Bogdanoff por su colaboración en la discusión estadística de los resultados.

❖ A veintidós docentes de la Escuela Media que, participando del Proyecto de Extensión Universitaria “Herramientas Científicas y Tecnológicas para la Enseñanza de las Ciencias en el Nivel Medio y Polimodal” colaboraron en la concreción de las actividades experimentales.

INACTIVACIÓN TÉRMICA DE *Listeria innocua* EN JUGO DE NARANJA CON AGREGADO DE VAINILLINA

CHAR Cielo D., GUERRERO Sandra N. y ALZAMORA Stella M.

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1428 Buenos Aires, Argentina.

Tel: 011- 4576 3366. cdchar@di.fcen.uba.ar

RESUMEN.

En los jugos de fruta, a pesar de su alta acidez, se han encontrado diversas cepas de *Listeria* capaces de sobrevivir. El objetivo del presente trabajo fue analizar y modelar la supervivencia de *Listeria innocua* en jugo de naranja basándose en el concepto de métodos combinados. Los sistemas se prepararon a partir de jugo concentrado (pH 3,5) reconstituido, adicionado con vainillina (0 a 1100 ppm) y tratado a diferentes temperaturas (57°C a 61°C). Se determinó el número de sobrevivientes a intervalos de tiempo regulares. Se modeló la cinética de inactivación, que en muchos casos resultó no lineal, aplicando el modelo de Gompertz modificado. A medida que aumentó la temperatura, la región del hombro disminuyó mientras que la máxima velocidad de muerte aumentó, lográndose mayor efecto al aumentar la concentración de vainillina. Se encontraron combinaciones vainillina-temperatura efectivas para lograr una reducción de 5 ciclos log en condiciones de tratamiento térmico no letales.

Palabras Clave: *Listeria*, Gompertz, vainillina.

ABSTRACT.

In fruit juices, despite its high acidity, *Listeria* has demonstrated its ability for surviving. The objective of this work was to analyze and model the survival of *Listeria innocua* in orange juice based on the hurdle technology concept. Systems were prepared from reconstituted concentrated juice (pH 3.5) supplemented with vanillin (0 to 1100 ppm) and heat treated at different temperatures (57 °C to 61°C). Survival counts were determined at regular time intervals. Inactivation kinetics, which was non linear in many cases, was modeled using the modified Gompertz equation. As temperature increased, the shoulder region diminished while the maximum growth rate significantly increased. This effect was greater as vanillin concentration increased. Many vanillin-temperature combinations were effective, achieving 5 log cycle reductions under sub lethal heat treatments.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y vegetales durante su etapa de crecimiento y cosecha están en permanente contacto con tierra, insectos y animales. Tanto los microorganismos que contaminan la superficie de la fruta, así como los provenientes del ambiente de proceso, pueden permanecer luego de la etapa de lavado y ser transferidos al jugo durante o luego de la extracción. La contaminación puede ocurrir en cualquiera de los puntos desde la producción hasta el momento de consumo (Pao y col., 2001). Aunque las bacterias patógenas no pueden crecer en jugos de fruta debido a su bajo pH, pueden sobrevivir y adaptarse al medio ácido. La mayor supervivencia de estos patógenos en alimentos ácidos y la mayor tolerancia a condiciones de crecimiento desfavorables de las células adaptadas al medio ácido, están bien documentadas (Mazzotta, 2001). Esta adaptación también aumenta la resistencia térmica de estos microorganismos, hecho que debe ser tenido en cuenta al establecer las condiciones de proceso. *Listeria monocytogenes*, una bacteria ubicua, comúnmente encontrada en la tierra, agua y vegetación, sobrevivió durante 20 días a 4 °C en caldo a pH 3,6, con períodos de tiempo lag significativos antes del comienzo de la disminución de los recuentos (Parish y Higgins, 1989).

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías de procesamiento mínimo basadas en el concepto de “obstáculos” cuyo objetivo es seleccionar y combinar factores de preservación tradicionales y/o emergentes, de forma tal que la estabilidad y seguridad microbiológica del alimento puedan ser garantizadas, reteniendo las características nutritivas y la aceptación sensorial (Leistner, 2000). Dentro de estas tecnologías, la utilización de antimicrobianos naturales en reemplazo de los aditivos sintéticos, ha cobrado particular interés recientemente (Alzamora y col, 2003). La vainillina (4-hidroxi-3-methylbenzaldehído), compuesto fenólico constituyente mayoritario de la chaucha de vainilla, se ha utilizado exitosamente en la inhibición de *Listeria monocytogenes* (Ferrante, 2004), levaduras (Cerruti y Alzamora, 1996) y hongos (López Malo, 2000).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar y modelar la respuesta de *Listeria innocua*, como surrogante de *L. monocytogenes*, en jugo de naranja adicionado con diferentes concentraciones de vainillina y sometido a un tratamiento térmico suave.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. 2.1 Preparación del inóculo: Se utilizó para este estudio una cepa de *Listeria innocua* ATCC 33090. La misma se sembró en estrías de agar tripteína soja con adición

de 0,6% de extracto de levadura (ATS-E) y se incubó a 37°C por 24 hs, almacenando luego las estrías a 4 °C. Posteriormente se hicieron subcultivos en 100 ml de caldo tripteína soja con 0,6% de extracto de levadura (CTS-E) con agitación. Luego de 24 hs de incubación los cultivos se centrifugaron a 2000 x g durante 20 minutos y el pellet se resuspendió en CTS-E para obtener recuentos iniciales de $\cong 10^7$ UFC/g.

2.2 Preparación del jugo: El jugo de naranja (pH 3,5; 11°Brix) se obtuvo a partir de un jugo concentrado preparado especialmente sin conservantes (65 °Brix, ECA Agroindustrias S.A.), por agregado de agua destilada (agua/jugo = 6:1). Con el propósito de eliminar cualquier posible carga microbiana, el mismo fue pasteurizado a 72°C por 14 segundos utilizando un intercambiador de calor UHT/HTST Lab-25DH (Microthermics, USA), recolectado de una cabina de seguridad biológica (Nuair Inc., USA), fraccionado y almacenado a -18°C hasta el momento de uso.

2.3 Inactivación microbiana: La cinética de inactivación térmica de *L. innocua* en jugo de naranja suplementado o no con vainillina, se llevó a cabo en un sistema batch. El mismo constó de un vaso de doble camisa con una capacidad total de 150 ml, con agitación continua y conectado a un baño termostático (HAAKE, modelo Rotovisco RV12, Alemania) cuya temperatura se fijó de manera de obtener 57, 59, 60 ó 61°C en el jugo. En cada ensayo se adicionó vainillina (5% p/p) a 99 ml de jugo de naranja estéril precalentado, de manera de obtener concentraciones finales de este antimicrobiano de 0, 500, 700, 900 ó 1100 ppm. Luego de la incorporación de 1 ml de inóculo, se tomaron muestras a intervalos de tiempo regulares y se hicieron los recuentos de las bacterias sobrevivientes mediante las técnicas de dilución seriada con plaqueo en superficie (por duplicado) y del número más probable (NMP). Para los recuentos se utilizaron placas y/o tubos conteniendo ATS-E y CTS-E con el agregado de 1% de piruvato de sodio con el propósito de recuperar las células injuriadas térmicamente. Los mismos se incubaron a 30°C por 5 días. Cada condición se determinó por triplicado.

2.4 Modelado matemático: Se modelaron las curvas de supervivencia de *L. innocua* aplicando la versión modificada de la ecuación general de Gompertz (Linton y col., 1995).

$$\text{Log [UFC}_{(t)} / \text{UFC}_{(0)}] = \text{Ce}^{-e(A+Bt)} - \text{Ce}^{-e(A)} \quad (1)$$

donde Log [UFC_(t) / UFC₍₀₎] representa la fracción logarítmica sobreviviente y los tres parámetros estimados (A, B y C) representan las diferentes regiones de la curva de supervivencia: el hombro inicial (A), la máxima velocidad de muerte (B) y el cambio global en el número de sobrevivientes (C).

Para la obtención de los parámetros del modelo se aplicó regresión no lineal utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus for Windows 3.0[®] (Statistical Graphics Corp.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra, a modo de ejemplo, las curvas de supervivencia de *L. innocua* obtenidas en jugo de naranja sin (fig.1a) y jugo de naranja con agregado de 900 ppm de vainillina (fig.1b) a distintas temperaturas de tratamiento térmico (57, 59, 60 y 61 ± 0,2°C).

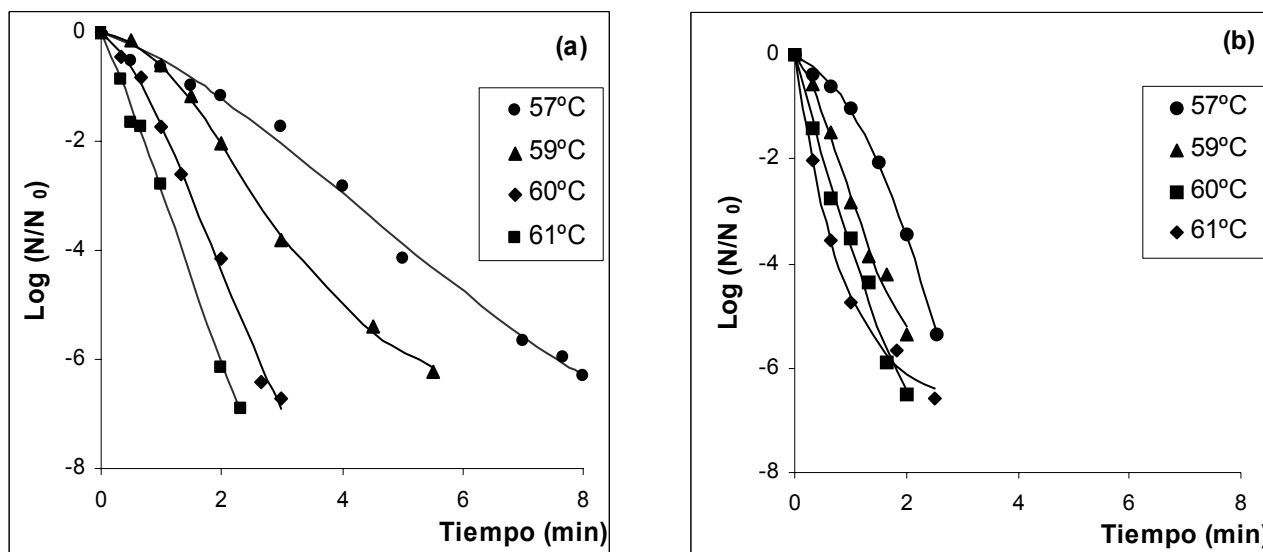


Figura 1. Curvas de supervivencia de *L. innocua* en jugo de naranja (pH 3,5) a diferentes temperaturas de tratamiento: valores predichos por el modelo de Gompertz modificado (—); datos experimentales (símbolos). a) control; b) 900 ppm vainillina.

Como puede verse, las curvas difirieron marcadamente según la temperatura del tratamiento proporcionado y la presencia de vainillina. A menores temperaturas de tratamiento térmico la región del hombro fue más notoria. A medida que la temperatura de tratamiento aumentó se generaron curvas más lineales. La presencia de 900 ppm de vainillina además de reducir el tiempo de tratamiento necesario para la inactivación de *L. innocua* a todas las temperaturas, provocó un cambio en la concavidad de la curva a la mayor temperatura evaluada (61°C). Este sistema exhibió una disminución abrupta de la población microbiana, alcanzando una reducción de 5 ciclos log en 1 minuto de tratamiento (fig. 1b). Guerrero y col. (2004) observaron un comportamiento similar de cambio en la forma de la curva de supervivencia de *S. cerevisiae* por la acción de ultrasonido de alta intensidad en presencia de quitosano.

La figura 2 ejemplifica la respuesta de *L. innocua* en jugo de naranja adicionado con diferentes concentraciones de vainillina y tratado térmicamente a 57 (fig. 2a) y 59°C (fig.

2b). El agregado de vainillina aumentó significativamente la inactivación térmica de este microorganismo, hecho que se puso de manifiesto por la diferencia observada entre las curvas control y las curvas con agregado de este antimicrobiano. Asimismo, se pudo observar que el incremento en la concentración de vainillina, disminuyó la zona del hombro y por lo tanto redujo el tiempo necesario para lograr la destrucción térmica de *L. innocua* a una dada temperatura. Este efecto fue más notorio a bajas temperaturas (fig 2.a).

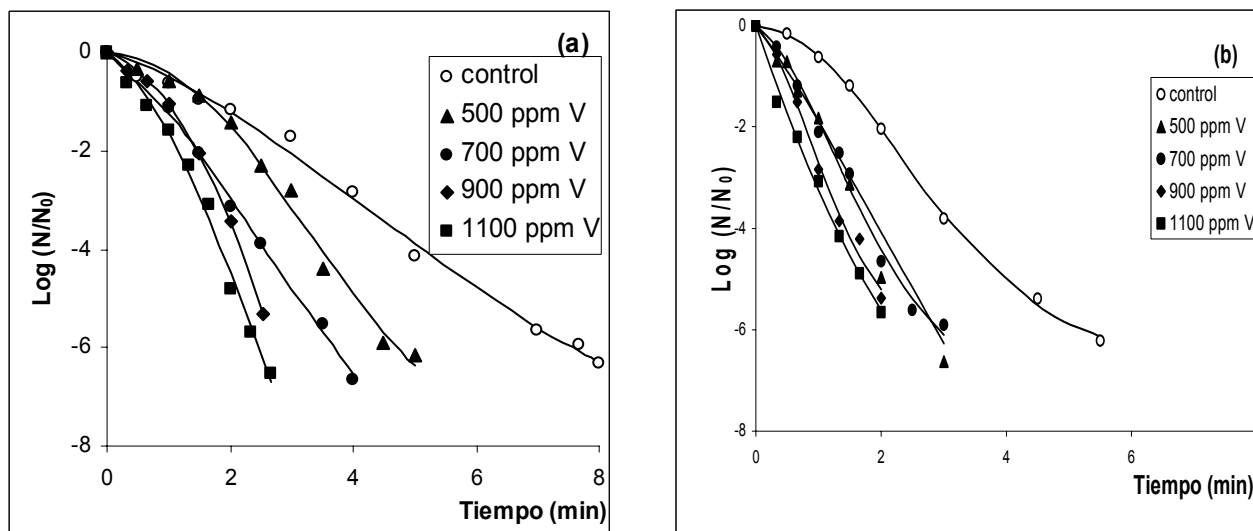


Figura 2. Curvas de supervivencia de *L. innocua* en jugo de naranja (pH 3,5) con adición de diferentes concentraciones de vainillina: valores predichos por el modelo de Gompertz modificado (—); datos experimentales (símbolos). a) 57°C; b) 59°C.

La tabla 1 exhibe los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la aplicación de la ecuación de Gompertz modificada a las curvas de supervivencia de *L. innocua* en todos los sistemas evaluados. El modelo empleado ajustó satisfactoriamente los datos experimentales aún cuando las curvas difirieron marcadamente en su forma. Se manifestó una adecuada correlación entre los valores predichos y experimentales, obteniendo elevados coeficientes de determinación ajustados (R^2). El sistema preparado con jugo de naranja conteniendo 1100 ppm de vainillina y tratado a 61°C presentó una reducción de casi 5 ciclos logarítmicos en la población de *L. innocua* en sólo 40 segundos de tratamiento, lo que imposibilitó la correcta aplicación del modelo propuesto, por disponer de escasa cantidad de puntos experimentales.

Del análisis de los parámetros cinéticos se puede inferir que en general, los valores de A disminuyeron y los de B aumentaron conforme aumentó la temperatura de tratamiento. Sin embargo, al evaluar el efecto de los diferentes niveles de vainillina para una dada temperatura, los valores de estos parámetros no siguieron una tendencia definida,

principalmente cuando se aplicaron tratamientos térmicos más severos. El parámetro C en todos los casos superó las 7 reducciones decimales, indicando que todos los tratamientos fueron efectivos destruyendo la mayor parte de la población microbiana en el tiempo que fueron aplicados. Dado que la mayoría de las curvas no presentan cola, este modelo estimó valores de cambio global en el número de sobrevivientes muy elevados.

Tabla 1. Parámetros del modelo de Gompertz correspondientes al efecto del tratamiento térmico de *L. innocua* en jugo de naranja con agregado de vainillina.

Temperatura (°C)	Vainillina (ppm)	Parámetros de Gompertz			R ² ajustado
		A	B	C	
57	<i>Control</i>	1,06	-0,25	-10,1	99,3
	500	1,60	-0,51	-9,4	98,8
	700	0,98	-0,41	-12,4	99,6
	900	1,51	-0,43	-25,7	99,8
	1100	1,25	-0,48	-19,5	98,9
59	<i>Control</i>	1,54	-0,68	-6,9	99,9
	500	0,69	-0,35	-17,3	99,5
	700	1,16	-0,93	-7,8	98,8
	900	1,13	-1,33	-6,9	98,8
	1100	-0,43	-0,53	-20,2	99,0
60	<i>Control</i>	0,64	-0,55	-15,7	99,6
	500	0,61	-0,85	-11,8	98,9
	700	0,99	-1,72	-7,8	98,3
	900	0,26	-0,79	-13,1	98,5
	1100	-0,07	-1,24	-11,2	99,3
61	<i>Control</i>	1,19	-0,67	-11,3	99,4
	500	0,30	-0,84	-10,7	98,0
	700	-0,28	-0,86	-13,6	99,7
	900	-0,59	-1,39	-15,6	99,1
	1100	-	-	-	-

La aplicación de la ecuación de Gompertz resultó conveniente dado que al emplear temperaturas subletales de calentamiento, las curvas de supervivencia estuvieron mas alejadas de la linealidad.

CONCLUSIONES

La adición de vainillina al jugo de naranja incrementó la inactivación térmica observada, resultando una buena alternativa para prolongar la vida útil de bebidas pasteurizadas. El modelo de Gompertz modificado fue adecuado describiendo los datos experimentales. Se pudieron encontrar diferentes combinaciones de concentración de vainillina-temperatura, que según el tiempo de tratamiento, permitieron una reducción de 5 ciclos en la población microbiana cumpliendo con el requerimiento de las normas de la FDA, en condiciones de tratamiento térmico no letales.

BIBLIOGRAFIA

- Alzamora, S. M., López-Malo, A., Guerrero, S. y Palou, E. (2003).** Plant antimicrobials combined with conventional preservatives for fruit products. En *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Ed. S. Roller. Woodhead Publishing Limited. Inglaterra.
- Cerruti, P. y Alzamora, S. M. (1996).** Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeast in laboratory media and fruit purées. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 379.
- Ferrante, S. (2004).** Utilización combinada de ultrasonido y antimicrobianos naturales para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en jugos frutales. Tesis de Grado. Universidad Católica Argentina.
- Guerrero, S.N., Tognon, M. y Alzamora, S.M. (2004).** Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16: 131-139.
- Leistner, L. (2000).** Hurdle technology in the design of minimally processed foods. En *Minimally Processed fruits and vegetables. Fundamental aspects and applications*. Eds. S. M. Alzamora, M. S. Tapia y A. López Malo, p. 13-27. Aspen, Publishers, Inc. Gaithersburg, USA.
- Linton, R.H.; Carter, W.H.; Pierson, M.D. y Hackney, C.R. (1995).** Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 58 (9): 946-954.
- López-Malo, A. (2000).** La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Mazzotta, A.S. (2001).** Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J. Food Prot.* 64 (3): 315-320.

Pao, S.; Davis, C.L. y Parish, M.E. (2001). Microscopic observation and processing validation of fruit sanitizing treatments for the enhanced microbiological safety of fresh orange juice. *J. Food Prot.* 64 (3): 310-314.

Parish, M.E. y Higgins, D.P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food Prot.* 52 (3): 144-147.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de Universidad de Buenos Aires, CONICET y ANPCyT (proyecto BID N° 143 955). Asimismo agradecen a ECA Agroindustrias S.A. por proveer gentilmente el jugo de naranja utilizado.

PRINCIPALES VARIABLES DE OPERACIÓN QUE AFECTAN LA CONGELACIÓN DE QUESOS MOZZARELLA POR INMERSIÓN

RIBERO, Gustavo G.; RUBIOLLO, Amelia C.; ZORRILLA, Susana E.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (CONICET-UNL). Güemes 3450, (S3000GLN) Santa Fe, Argentina. Tel. 342-4559174/7, Fax: 342-4550944, E-mail: gribero@ceride.gov.ar

RESUMEN

La congelación de quesos blandos es un proceso que permite aumentar su tiempo de comercialización. Nuestro objetivo fue evaluar la influencia de las principales variables de control durante el proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella. Cilindros de queso (radio: 1 cm; altura: 3 cm) fueron sumergidos en una solución de NaCl del 20 ó 23%, a -10, -15 ó -20°C y retirados a 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min. Se midieron: temperatura central, contenidos de NaCl y de humedad y pérdida de peso.

Los valores más altos de deshidratación fueron observados a -10°C (<4%). La pérdida de peso fue menor al 0.9%. El contenido de NaCl fue mayor a mayor temperatura o a mayor tiempo de inmersión. A -10°C se observó el fenómeno de sobreenfriamiento con un tiempo de nucleación variable. A 20% NaCl y -20°C se obtiene una solución bifásica en la que no se observó sobreenfriamiento.

Palabras claves: Mozzarella, Congelación, Salado, Inmersión.

ABSTRACT

The freezing of soft cheeses is a process that allows enlarging its commercialization time. Our objective was to evaluate the influence of the principal control variables during the process of immersion freezing of Mozzarella cheese. Cheese cylinders (radius: 1 cm; height: 3 cm) were immersed in a solution of 20 or 23% NaCl, at -10, -15 or -20°C and removed at 5, 10, 20, 30, 45, and 60 min. Central temperature, NaCl and moisture contents, and weight loss were measured.

The highest values of dehydration were observed at -10°C (<4%). The weight loss was smaller than 0.9%. It was observed that the higher temperature or time of immersion, the higher NaCl concentration obtained. The supercooling phenomenon was observed at -10°C with a variable time for nucleation. A biphasic solution is obtained at 20% NaCl and -20°C and supercooling was not observed.

Key words: Mozzarella, Freezing, Salting, Immersion.

INTRODUCCIÓN

El queso Mozzarella es una variedad de queso blando que se consume fresco y es muy popular en la elaboración de pizzas. Su principal característica es la capacidad de derretirse y fluir sobre la comida cuando es calentado (Fox, 1987). En Argentina, la mayor parte de la producción de queso Mozzarella se destina al consumo interno. Además, si bien los volúmenes de exportación son comparativamente pequeños, la exportación se realiza principalmente a países limítrofes ([SAGPyA, 2004](#)).

La exportación de queso Mozzarella a países no limítrofes implica que se debe poseer una metodología adecuada de conservación. Se ha demostrado que la congelación de queso Mozzarella es un método de conservación adecuado siempre y cuando se dejen los quesos entre 14 y 21 días a 4°C luego de la descongelación, para que recuperen las características originales (Califano y Bevilacqua, 1999; Cervantes et al., 1983; Diefes et al., 1993). Por otro lado, es bien conocido que una congelación rápida tiende a formar cristales de hielo pequeños, los cuales causan menores modificaciones en el alimento luego de la descongelación. En este sentido, una alternativa interesante puede ser la congelación por inmersión en soluciones de NaCl. Esta metodología tiene importantes ventajas, tales como cortos tiempos de proceso, menor gasto de energía, mejor calidad del producto y menor costo, pero tiene como desventaja la penetración no controlada de solutos en el alimento, por lo cual no tiene una amplia difusión en la industria (Lucas y Raoult-Wack, 1998).

La congelación de queso Mozzarella por inmersión en soluciones concentradas de NaCl podría ofrecer interesantes ventajas, tales como la disminución del tiempo de producción y la utilización de un método de congelación rápida. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar cómo influye la composición y la temperatura de la solución, y el tiempo de inmersión sobre las principales variables de control durante el proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra. Barras de queso Mozzarella comercial fueron compradas en un mercado local (peso: 3500 g, dimensiones: 28x10x10 cm, humedad: 45.79±0.04%, grasa: 23.2±0.4%, proteína: 21±2%, NaCl: 1.45±0.04%). Placas de 3 cm de espesor se cortaron en forma perpendicular al eje mayor de la barra de queso. Cilindros de 1 cm de radio (unidad de muestreo) se cortaron de cada placa con un molde metálico afilado a 1 cm del borde.

Solución de inmersión. Para cada caso estudiado, la relación de volumen

solución/sólido fue aproximadamente de 50 para no afectar la temperatura de la solución al inicio de la experiencia. Las soluciones no fueron agitadas y se colocaron en una Cámara TABAI Comstar PR 4GM (TABM ESPEC CORP., Osaka, Japón) para alcanzar la temperatura deseada. Las temperaturas de la solución y del aire se midieron con termocuplas T de 24 AWG (OMEGA Engineering, Inc., Stamford, USA).

Diseño experimental. Se usó un modelo completamente aleatorizado de tres factores: tiempo de inmersión, temperatura y concentración de NaCl de la solución. En la Tabla 1 se muestra un resumen del diseño experimental utilizado.

Tabla 1. Diseño experimental.

Factor	Tipo de Factor	Niveles
Concentración de la solución de inmersión	Fijo	20 y 23%
Temperatura de la solución de inmersión	Aleatorio	-10 , -15 y -20°C
Tiempo de inmersión	Aleatorio	5, 10, 20, 30, 45 y 60 min

Experiencia.

Para cada tratamiento se realizaron mediciones del perfil de temperatura central, contenido de humedad, contenido de NaCl y pérdida de peso.

Perfiles de temperatura central.

En cada experiencia se usaron 3 cilindros. En cada cilindro de queso se insertó una termocupla T de 30 AWG (OMEGA Engineering, Inc., Stamford, USA) siguiendo el eje principal del cilindro hasta una profundidad de 1.5 cm. El cilindro se colocó en una pequeña canasta construida con tela plástica para permitir el ingreso de la solución y evitar que el cilindro flote. Los valores de temperatura fueron obtenidos a través de un sistema de adquisición de datos Data Shuttle DS-16-8-TC (OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) con una velocidad de 1 s^{-1} . Cada experiencia fue repetida 2 veces.

Contenido de humedad, contenido de NaCl y pérdida de peso.

Dieciocho cilindros se pesaron y luego se colocaron en una canasta de tela plástica, la cual mantuvo separados a los cilindros. Las muestras se retiraron de a tres, a los 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min, se enjuagaron con agua destilada refrigerada, se secaron con papel absorbente y se pesaron. Se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en freezer a -20°C hasta la determinación de los contenidos de humedad y de NaCl. El contenido de humedad fue determinado en un horno microondas CEM AVC 80 (CEM, Mattheus, USA).

El contenido de NaCl fue determinado según Fox (1963) con un titulador automático modelo DL 40 RC (Mettler Instrumente AG, Suiza). La pérdida de peso se determinó como la relación entre la diferencia de pesos de las muestras antes y después de la congelación y el peso inicial.

Análisis estadístico. Los datos experimentales fueron estudiados mediante análisis de la variancia multifactorial usando Statgraphics Plus 3.0. El nivel de significación usado fue $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfiles de temperatura central. Se observaron valores de temperatura inicial de congelación (T_f) entre -3.7 y -5°C (Fig.1).

En las experiencias realizadas a -10°C , algunas muestras no se congelaron aunque su temperatura estaba por debajo de T_f y otras se congelaron pero a distintos tiempos. Esto fue observado tanto en la solución de 20% como en la de 23%. Este fenómeno puede ser debido a que la temperatura de la solución de inmersión es cercana a la T_f , haciendo que el proceso de congelación sea lento y que no se inicie en la superficie de la muestra (Lucas et al., 1999).

Cuando se trabajó a -15°C , se observó que la congelación se inició aproximadamente a los 6 min, para las experiencias en ambas soluciones, alcanzándose -10°C a 17 y 16 min, para 20 y 23%, respectivamente (Fig. 1).

Teniendo en cuenta el punto inicial de congelación de la solución de inmersión a -20°C , se obtiene un sistema monofásico para la solución de 23% y uno bifásico para la solución de 20%. Las muestras sumergidas en la solución de 20% no presentaron sobreenfriamiento, pero sí las sumergidas en la solución de 23%, alcanzando -10°C a los 15 y 12 min, para 20 y 23%, respectivamente (Fig. 1).

La diferencia de tiempo para alcanzar -10°C se debe a la diferencia de temperatura entre las soluciones de inmersión. La temperatura de la solución bifásica se mantuvo a -17.5°C mientras que la de la monofásica se mantuvo a -18.5°C .

Se puede inferir que cuanto más baja es la temperatura de la solución, más rápido se congelan las muestras, y en tiempos más uniformes. Además la presencia de cristales de hielo en la solución de inmersión provocaría una congelación sin la presencia de sobreenfriamiento. Esta condición necesita un mayor estudio debido a que es un factor a tener en cuenta cuando se busca obtener una congelación homogénea y más rápida.

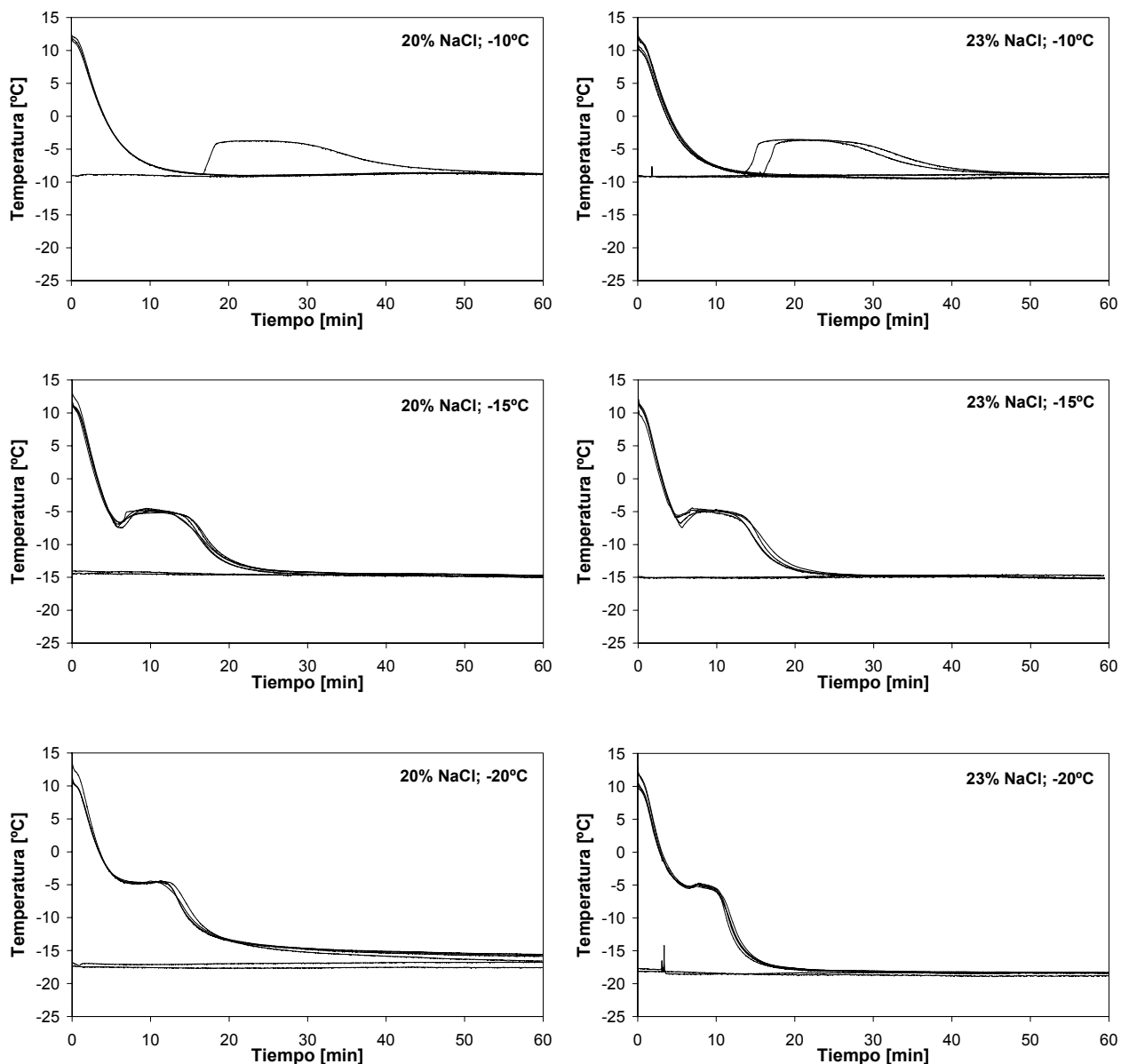


Figura 1. Perfiles de temperatura observados para las distintas condiciones estudiadas

Contenido de humedad. Se encontró que los factores tiempo y temperatura fueron significativos junto con las interacciones tiempo-temperatura-concentración, temperatura-concentración y tiempo-concentración. La mayor deshidratación se observó a -10°C ($<4\%$, Fig. 2a). Con la solución de 20%, el contenido de humedad de las muestras se mantuvo aproximadamente en 45.4%, mientras que con la solución de 23%, al cabo de 60 min se observa un contenido de humedad de aproximadamente 44.8% (Fig. 2b). Esto demuestra que sólo ocurre una deshidratación pequeña en cualquiera de las condiciones estudiadas.

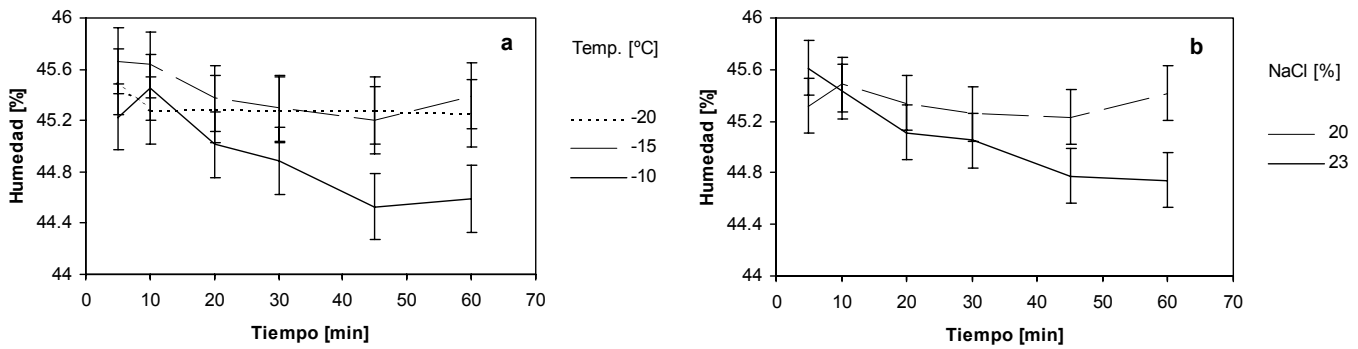


Figura 2. Gráficos de interacción entre factores principales obtenidos del ANOVA multifactorial para el contenido de humedad. Las barras corresponden a intervalos de confianza del 95%.

Contenido de NaCl. Se encontró que los factores tiempo y temperatura fueron significativos junto con la interacción tiempo-temperatura. Se observa que a -10°C se produce la mayor ganancia de soluto (Fig. 3). A los 60 min, se observan contenidos de NaCl de aproximadamente 2.3, 2.0 y 1.7% para -10 , -15 y -20°C , respectivamente. Esto demuestra que para controlar el ingreso de soluto en este proceso, las principales variables de control son la temperatura de la solución de inmersión y el tiempo de inmersión.

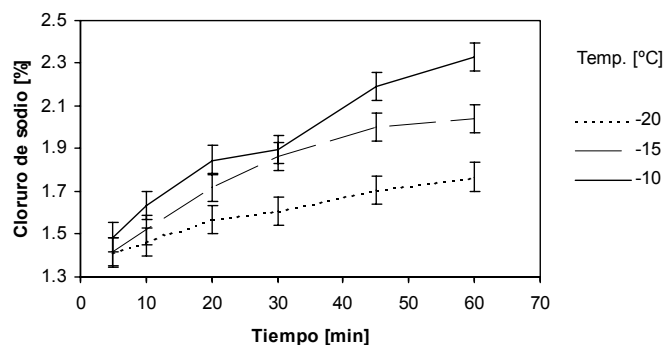


Figura 3. Gráfico de interacción entre factores principales obtenido del ANOVA multifactorial para el contenido de NaCl. Las barras corresponden a intervalos de confianza del 95%.

Pérdida de peso. Se encontró que los factores tiempo y temperatura fueron significativos, junto con las interacciones tiempo-temperatura, temperatura-concentración y tiempo-concentración. Se observó que a -20 y -15°C las muestras prácticamente no pierden peso (Fig. 4a). En la condición más deshidratante, es decir a -10°C y 60 min, sólo se observó una pérdida de peso de aproximadamente 0.4%. La mayor pérdida de peso se observó

para la solución de inmersión de 23% (Fig. 4b). Sin embargo, al disminuir la temperatura de la solución de inmersión, la pérdida de peso disminuye, alcanzándose valores cercanos a cero. Se destaca que las pérdidas de peso en ningún caso superaron el 0.9%, lo que constituye una ventaja significativa del presente método de congelación.

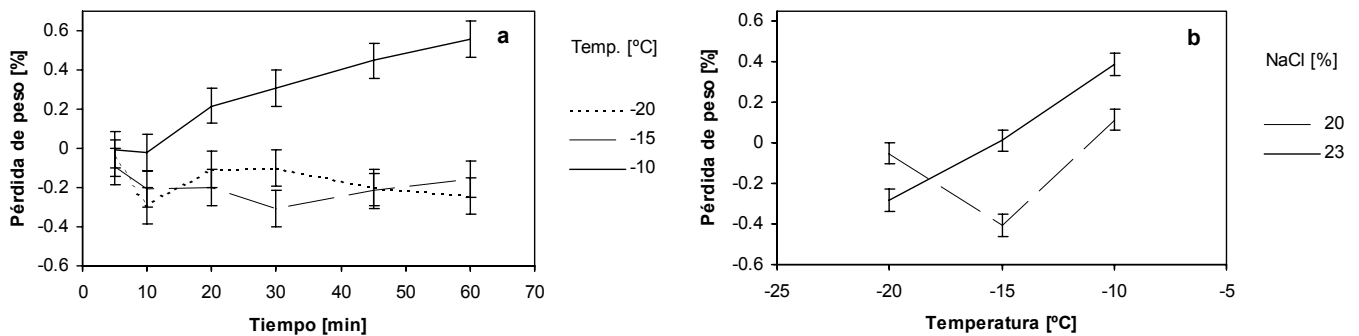


Figura 4. Gráficos de interacción entre factores principales obtenido del ANOVA multifactorial para la pérdida de peso. Las barras corresponden a intervalos de confianza del 95%.

CONCLUSIONES

Las principales variables de control del proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella son la temperatura de la solución y el tiempo de inmersión. En el centro de las muestras estudiadas se alcanzó -10°C en aproximadamente 12 min cuando se usó una solución de 23% a -20°C . No se observa una pérdida de peso excesiva, lo cual es una importante ventaja del método. La mayor pérdida de humedad y fundamentalmente la mayor ganancia de NaCl se observaron cuando se usan las soluciones de -10°C debido a la presencia del fenómeno de sobreenfriamiento que mantiene las muestras descongeladas, favoreciendo el fenómeno de transferencia de materia. La congelación de queso Mozzarella por inmersión presentó interesantes aspectos que deberán ser profundizados para su implementación como método de congelación rápida.

BIBLIOGRAFÍA

- Califano A.N. y Bevilacqua A.E. 1999.** Freezing low moisture Mozzarella cheese: Changes in organic acid content. *Food Chem.* 64: 193-198.
- Cervantes M.A., Lund D.B. y Olson N.F. 1983.** Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. *J. Dairy Sci.* 66: 204-213.

Chaves A.C.S.D., Viotto W.H. y Grosso C.R.E. 1999. Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage. *J. Food Sci.* 64: 202-205.

Diefes H.A.; Rizvi S.S.H. y Bartsch J.A. 1983. Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Food Sci.* 58(4): 764-769.

Fox P.F. 1987. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1, General Aspects. Elsevier Applied Science, London.

Lucas T. y Raoult-Wack A.L. 1998. Immersion chilling and freezing in aqueous refrigerating media: Review and future trends. *Int. J. Refrig.* 21(6): 419-429.

Lucas T., Francois J., Bohuon P. y Raoult-Wack A.L. 1999. Factors influencing mass transfer during immersion cold storage of apples in NaCl/sucrose solutions. *Lebensm-Wiss. u. Technol.* 32: 327-332.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación Argentina (SAGPyA). 2004. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>

PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LECHUGA ICEBERG FRESCA CORTADA

PIROVANI, María E.; PIAGENTINI, Andrea M.; GÜEMES, Daniel R.; MÉNDEZ, Julio C.; JIMÉNEZ, Susana M.; SALSI, María S.

Instituto de Tecnología de Alimentos - Facultad de Ingeniería Química - U.N.L. - C.C. 266 - (3000) Santa Fe (Argentina) - Tel-fax: (0342)-4571148. mpirovan@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

El desarrollo de microorganismos, así como la pérdida de calidad sensorial, determinan la vida útil de los vegetales frescos cortados. El tiempo y la temperatura son variables importantes en la velocidad del desarrollo microbiano y de pérdida de calidad sensorial. Se analizó la cinética de deterioro de lechuga Iceberg fresca cortada, a través del desarrollo de microorganismos aeróbicos y de la pérdida de calidad sensorial, a temperaturas entre 1.7 y 20 °C, aplicando distintos modelos predictivos. La funcionalidad con la temperatura se determinó aplicando el modelo de Arrhenius, resultando E_a entre 18 y 21 Kcal mol⁻¹ para los diferentes modelos microbiológicos y entre 11 y 17 Kcal mol⁻¹ para la pérdida de calidad sensorial. En el rango de temperaturas ensayado, se encontró que la vida útil de lechuga Iceberg fresca cortada está limitada por la pérdida de apariencia general.

ABSTRACT

The shelf-life of fresh cut vegetables is strongly influenced by the microbial growth and the loss of sensory quality attributes. Time and temperature are two of the most important variables on the rate of spoilage and microorganisms growth. At temperatures between 1.7 and 20 °C, kinetic models for the aerobic microflora growth and sensory quality loss of fresh cut Iceberg lettuce were analyzed. Temperature dependency of corresponding rate constants was found to be appropriately described by the Arrhenius equation. The values of E_a ranged from 18 to 21 kcal mol⁻¹ in the case of microbial growth models, and from 11 to 17 kcal mol⁻¹ for sensory quality loss models.

Within the temperature range studied, it was found that the shelf-life of fresh cut Iceberg lettuce was limited by the general appearance loss.

Palabras claves: lechuga Iceberg fresca cortada, vida útil, modelos de predicción

INTRODUCCIÓN

Los vegetales frescos cortados son productos susceptibles de sufrir principalmente dos tipos de deterioros: en primer lugar, la pérdida de calidad sensorial, debido a que en el tejido vegetal ocurren una serie de reacciones tales como deshidratación, oxidación, respiración, actividad enzimática, etc., que disminuyen la calidad del producto, y en segundo lugar, la posibilidad de desarrollo microbiano (tanto alterante como patógeno) que limita también la vida útil de los mismos. Considerando que el tiempo y la temperatura son variables importantes que afectan la velocidad del desarrollo microbiano y de pérdida de calidad sensorial, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar modelos predictivos de deterioro que tengan en cuenta la historia térmica del producto durante las etapas de distribución y comercialización hasta su consumo, el cual permitiría realizar una estimación cuantitativa de la vida útil del producto y plantear diferentes estrategias de manejo durante dichas etapas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Lechuga Iceberg fue acondicionada, cortada en tiras de 5 mm de ancho, lavada con agua clorada (100 ppm), enjuagada con agua de red, centrifugada (540 rpm- 3 min) y envasada (muestras de 50 g) en bandejas de polietileno recubiertas con láminas flexibles de PVC de 13 μm de espesor. Las muestras se almacenaron a 1.7, 4.5, 8.5 y 20.2°C. En todos los casos, la humedad relativa del espacio de almacenamiento se mantuvo entre 90-95 % HR.

Análisis microbiológicos

Para el recuento de microorganismos viables totales se utilizaron placas de Petrifilm[®], incubadas a 35°C, 48 h.

Análisis sensorial

Un panel entrenado (6-8 jueces) evaluó los siguientes atributos sensoriales: apariencia general, marchitamiento, amarronamiento y desarrollo de *off-odor*. Se indicó la intensidad de cada atributo sobre una escala no estructurada de 150 mm, con términos anclas ubicados a 10 mm de cada extremo. Los términos anclas fueron: “normal” y “nauseabundo” para olor; “muy pobre” y “excelente” para apariencia general; “ausencia” y “muy severo” para marchitamiento y amarronamiento.

Análisis estadístico

Los datos experimentales sensoriales y microbiológicos fueron modelados a través del procedimiento de regresión lineal y/o regresión no lineal, según correspondiera (utilizando

los programas MS Excel 2003 y Table Curve[®] version 1.11). Los coeficientes de correlación (R^2) fueron usados como indicadores del ajuste de la regresión a los datos experimentales.

Modelos predictivos aplicados para el crecimiento de microorganismos

Gompertz: $\log N = \log N_0 + c \cdot e^{-e^{-b(t-m)}}$

De crecimiento exponencial o de primer orden: $N = N_0 \cdot e^{k \cdot t}$

De crecimiento restringido $\log N = \log N_m + (\log N_0 - \log N_m) \cdot e^{-k \cdot t}$

donde: N: Población de microorganismos al tiempo t (UFC g^{-1}), N_0 : Población inicial (UFC g^{-1}), N_m : Población máxima de microorganismos (UFC g^{-1}), t: Tiempo (h), k: Constante de velocidad de crecimiento (h^{-1}), c: Valor asintótico del crecimiento que ocurre cuando t aumenta indefinidamente (\log UFC g^{-1}), b: Velocidad máxima de crecimiento relativa a tiempo m (h^{-1}), m: Tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h).

Modelo predictivo aplicado para la pérdida de calidad sensorial

$$\pm \quad dQ/dt = kq \cdot [Q]^n$$

donde: Q = atributo de calidad; t = tiempo; n = orden de reacción, 1; kq = constante de velocidad de deterioro de la calidad para el atributo Q. El signo (+) corresponde a los atributos de amarronamiento, marchitamiento y *off-odor*, y el signo (-) a apariencia general. **Modelo para valorar el efecto de la temperatura sobre las constantes**

Ecuación de Arrhenius : $A_i = A_0 \cdot e^{(-E_a/RT)}$

donde A_i : Constantes obtenidas a partir de los modelos, T: Temperatura absoluta (K), E_a : Energía de activación ($cal \cdot mol^{-1}$), A_0 : Factor preexponencial, R: Constante de los gases ($1.986 \text{ cal} \cdot K^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 presenta los resultados del ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos aplicados.

En microbiología predictiva, generalmente se prefiere la ecuación de Gompertz frente a los otros modelos, para representar el crecimiento de microorganismos tanto alterantes como patógenos. Para dicha ecuación se obtuvieron muy buenos coeficientes de correlación ($R^2 > 0.987$ para todas las temperaturas ensayadas). Sin embargo su aplicación requiere del uso de herramientas matemáticas más

avanzadas (regresión no lineal). En muchos casos, para una aplicación práctica sobre alimentos específicos, el uso de otros modelos más sencillos resulta posible. Este es el

caso de los vegetales mínimamente procesados, donde el crecimiento de microorganismos parecería no presentar un período *lag* acentuado, lo que desde el punto de vista biológico, significa una rápida adaptación a las nuevas condiciones de almacenamiento. Tal es el caso de los modelos de crecimiento de primer orden (Singh, 1998) y de crecimiento restringido (Willocx, *et al.* 1995) que resultaron en R² aceptablemente buenos (entre 0.720 y 0.990). En lo que respecta a los modelos de pérdida de calidad sensorial, el que resultó más adecuado para describir los cambios fue el modelo de primer orden (n=1) con R² superiores a 0.823, a las distintas temperaturas, para todos los atributos (Tabla 1). La funcionalidad con la temperatura se determinó aplicando el modelo de Arrhenius, resultando E_a entre 18 y 21 Kcal mol⁻¹ para los diferentes modelos microbiológicos y entre 11 y 17 Kcal mol⁻¹ para la pérdida de calidad sensorial.

Tabla 1. Análisis de regresión para los modelos microbiológicos (Gompertz, de 1^{er} orden y de crecimiento restringido) y para la pérdida de calidad sensorial (de 1^{er} orden) de lechuga Iceberg fresca cortada.

		Temperatura (°C)			
		1.7	4.5	8.5	20.2
Modelos Microbiológicos					
Gompertz	c	2.767	3.802	3.264	4.251
	b	0.0143	0.0101	0.019	0.084
	m	134.3	109.7	56.9	14.8
	R ²	0.989	0.978	0.981	0.992
1 ^{er} orden	k	0.487	0.712	1.018	4.017
	R ²	0.940	0.990	0.981	0.720
Restringido	k	0.0449	0.0712	0.1073	0.5376
	R ²	0.923	0.975	0.985	0.942
Modelos de pérdida de calidad					
Apariencia Gral.	k	0.065	0.161	0.235	0.576
	R ²	0.924	0.994	0.973	0.997
Marchitamiento	k	0.081	0.118	0.185	0.528
	R ²	0.887	0.977	0.915	0.971
Amarronamiento	k	0.178	0.227	0.287	0.671
	R ²	0.935	0.957	0.855	0.823
Off- odor	k	0.094	0.104	0.172	0.535
	R ²	0.828	0.862	0.833	0.983

c: [log UFC g⁻¹]; b:[h⁻¹]; m: [h]; k: [día⁻¹]

Se encontró que el atributo de falla en la evaluación sensorial fue el impacto visual de los panelistas evaluado a través de la apariencia general de la lechuga fresca cortada. A partir de los modelos, se calculó el tiempo máximo de almacenamiento para lechuga Iceberg fresca cortada a distintas temperaturas (Figura 1) hasta alcanzar el límite de aceptabilidad adoptado ($\log N=7.7$) para el deterioro de microflora aerobia (Anónimo, 1989) y de la mitad de la escala (7.5) para la pérdida de apariencia general tal como ya ha sido considerado por otros autores (Jacxsens, L. et al., 2002; Piaentini et al., 1997).

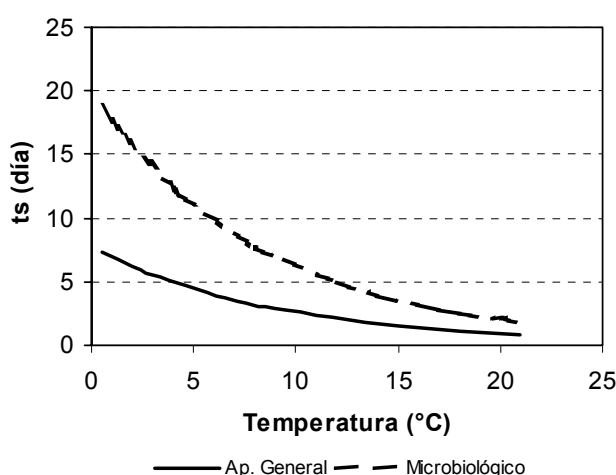


Figura 1. Tiempo de almacenamiento para lechuga Iceberg fresca cortada hasta alcanzar los límites de aceptabilidad adoptados para el deterioro de microflora alterante ($\log N= 7.7$) y para pérdida de apariencia general (7.5).

CONCLUSIONES

Tanto la ecuación de Gompertz como los modelos más sencillos estudiados resultan adecuados para representar el crecimiento de microflora alterante en el tiempo. El modelo de primer orden resulta apropiado para indicar los cambios sensoriales. El cálculo de los tiempos de almacenamiento a distintas temperaturas permitió concluir que a bajas temperaturas la vida útil sensorial será la que limitará la vida útil del producto. Sin embargo, cercano a los 20 °C podría estar limitada tanto por su apariencia como por el desarrollo de microorganismos alterantes.

BIBLIOGRAFIA

Anónimo.1989. Dispositions concernant le produit fini. En *Guide de Bonnes pratiques Hygiéniques concernant les produits végétaux dits de la IVe Gamme*. Extrait du Bulletin Officiel de la République Française. Ctifl, París, France.

Jacxsens, L.; Devlieghere, F; Debevere, J. 2002. Temperature dependence of shelf life as affected by microbial proliferation as sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biology and Technology* **26**, 59-73.

Piagentini, A.M.; Pirovani, M.E.; Güemes, D.R.; Di Pentima, J.H.; Tessi, M.A. 1997. Survival and growth of *Salmonella hadar* on minimally processed cabbage as influenced by storage abuse conditions. *Journal of Food Science* **62**, (3) 616-619, 631.

Singh, R.P.1999. Scientific principles of shelf life evaluation, p.p. 3-26. En: *Shelf life evaluation of foods*. Man, C.M.D. y Jones, A.A.(eds) Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, EEUU.

Willocx, F.; Hendricx, M.; Tobback, P. 1995. Kinetic criteria for the evaluation of microbial quality of minimally processed vegetables by product history integrators. Refrigeration and the quality of fresh vegetables. *Proceedings of the meetings of Comissions C2, D2/3. IIR*, París, Francia , 95-108.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Litoral, por su aporte financiero a través de su Programa CAI+D.

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON CALCIO Y PECTINOMETILESTERASA SOBRE LA TEXTURA Y LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES DE FRUTILLAS

GALETTO, Carolina D. ^(1,2), VERDINI, Roxana A. ^(1,2), RUBIOLO, Amelia C ⁽¹⁾

(1) INTEC (UNL- CONICET). Güemes 3450, 3000, Santa Fe, Argentina. E-mail: rverdini@intec.unl.edu.ar. (2) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR). Suipacha 531, 2000, Rosario, Argentina.

RESUMEN

La frutilla posee una textura altamente apreciada por los consumidores; sin embargo, su conservación constituye un problema para los productores y la industria. En el presente trabajo se estudiaron los efectos de la inmersión de frutillas en soluciones de pectinmetilesterasa (PME) y/o calcio sobre la textura de la fruta. Frutillas (variedad Camarosa) fueron sumergidas en soluciones de CaCl_2 , PME y PME/ CaCl_2 y fueron almacenadas a 4°C durante 6 días. Se controlaron los cambios de peso, se midió la firmeza de la fruta y se obtuvieron extractos insolubles en etanol. Se observó que la firmeza de las frutillas control aumentó durante el almacenamiento a 4°C, lo cual estaría relacionado con una mayor rigidez de los tejidos vegetales provocada por la baja temperatura. El tratamiento con calcio produjo una disminución en la firmeza, mientras que los tratamientos con PME y PME/ CaCl_2 no ocasionaron cambios en la textura respecto de las frutillas control.

ABSTRACT

Strawberry is a highly appreciated fruit for its excellent textural properties; however its reduced shelf-life becomes a problem for producers and industry. In this work the effects of pectin methylesterase (PME) and/or calcium treatments on strawberry texture were studied. Strawberries of the cultivar Camarosa were dipped in CaCl_2 , PME, and PME/ CaCl_2 solutions and afterwards were stored at 4°C for 6 days. Weight changes were monitored, fruit firmness was measured, and alcohol insoluble extracts were obtained. Results showed that firmness of untreated strawberries increased during storage at 4°C, which may be related to a tightening effect of cold temperature on fruit tissues. Strawberries treated with calcium were less firm than untreated fruits; while the firmness of strawberries treated with PME and PME/ CaCl_2 was not significantly different from untreated fruits.

Palabras clave: frutillas, calcio, pectinmetilesterasa, firmeza.

INTRODUCCIÓN

Las frutas son parte importante de la dieta humana y una materia prima de gran valor comercial para la industria de alimentos. La frutilla es una fruta no climatérica altamente apreciada por sus excelentes características organolépticas. Sin embargo, su delicada textura, elevada tasa de ablandamiento y sensibilidad al desarrollo de hongos, reducen su vida post-cosecha a menos de una semana (Cordenunsi y col., 2003; Lara y col., 2004).

Las frutillas son ampliamente utilizadas no sólo para consumo como fruta fresca sino también para la elaboración de productos tales como mermeladas, jaleas, pulpa, jugos, postres, helados y yoghurt. Dado que la producción de frutillas es estacional, los desarrollos de nuevas tecnologías relacionados con la conservación de frutillas son de particular interés.

Existe amplia evidencia de la función del calcio en el crecimiento, desarrollo, mantenimiento y modulación de diversas funciones celulares (Palta, 1996). El calcio es parte integral de la pared celular donde participa de la formación de entrecruzamientos al unirse a grupos carboxílicos de los poliuronidos adyacentes de la pared celular los cuales aportan a la rigidez de la pared celular (Main y col., 1986). Además, el calcio estabiliza la membrana celular uniéndose a los grupos fosfatos y carboxilatos de los fosfolípidos de dicha membrana. El calcio libre también actúa como mensajero secundario en la regulación de diversas funciones celulares (Palta, 1996).

La fortificación de frutillas con calcio pos-cosecha ha sido estudiada por diversos grupos de investigación para distintas condiciones operativas (Poovaiah, 1986; Main y col., 1986; García y col., 1996; Fontanarrosa, 2000; Suutarinen y col., 2000a, 2000b, 2002a, 2002b; Lara y col., 2004). García y col. (1996) informaron que el calcio ha resultado más efectivo en el mejoramiento de la firmeza de frutas sometidas a tratamientos térmicos. El calor actuaría activando la pectinmetilesterasa nativa de la fruta aumentando la disponibilidad de sitios aniónicos desmetilados (Suutarinen y col., 2000a). Es por ello que la industria alimentaria ha mostrado reciente interés en la aplicación combinada de pectinmetilesterasa y calcio con el fin de mejorar la firmeza y la integridad de las frutas.

La pectinmetilesterasa es una enzima que produce la desmetilación in situ de la pectina propia de la fruta. La pectina desmetilada se combina con calcio para formar una matriz de calcio-pectina y así reforzar la pared celular de la fruta. La industria alimentaria ha mostrado interés en la aplicación de la pectinmetilesterasa en diversos procesos; sin embargo, existen escasos trabajos científicos que profundicen sobre las bases

bioquímicas del tratamiento con pectinmetilesterasa y calcio (Suutarinen y col., 2000a, 2002a, 2002b; Degraeve y col., 2003).

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de la inmersión de frutillas en soluciones de pectinmetilesterasa y/o cloruro de calcio sobre la textura de la fruta. Además, se estudiaron los cambios en el peso y en el contenido de extractos de pared celular de las frutillas sometidas a los distintos tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon frutillas, variedad Camarosa, suministradas por productores de la zona. Las frutillas fueron transportadas en recipientes refrigerados al laboratorio, seleccionadas por tamaño y grado de maduración (tamaño mediano y 75% de madurez), lavadas con abundante agua, secadas con papel absorbente y separadas aleatoriamente en grupos de 70 frutillas c/u.

Las experiencias fueron realizadas sumergiendo las frutillas en soluciones de **a)** cloruro de calcio 8% p/v, a 38°C durante 30 minutos (CA), **b)** pectinmetilesterasa (NovoShape®) 0.05% en peso de fruta a 38°C durante 30 minutos (PME) y **c)** pectinmetilesterasa 0.05% a 38°C durante 30 minutos y luego cloruro de calcio 8% p/v a 38°C durante 30 minutos (PME+CA).

Posteriormente las frutillas sometidas a los distintos tratamientos fueron almacenadas a 4°C y 90% HR durante 6 días en cámara con control de temperatura Tabai Comstar PR 4GM (TABAI ESPEC. CORP., Osaka, Japón). Además, se trabajó con tres grupos de frutillas sin tratar almacenados a 4°C y 90% HR durante 0, 2 y 6 días (Control – 0d, Control – 2d y Control – 6d).

Los cambios de peso fueron monitoreados sobre 5 grupos de 5 frutillas c/u para cada tratamiento. Cada grupo se pesó antes y después de cada tratamiento y al final del almacenamiento.

Los extractos insolubles en alcohol (AIS) fueron obtenidos sobre 5 grupos de 5 frutillas c/u para cada tratamiento. Los tejidos fueron triturados con 5 volúmenes de etanol al 96% en un homogenizador Ultra-Turrax® T25 (IKA® Werke, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Alemania). La mezcla se incubó por 5 minutos a 60°C, luego se filtró a través de crisoles de vidrio filtrante (N° 2) y se lavó dos veces con etanol al 80% y una con etanol al 96% (modificada de Chang y col., 1993). Los extractos se secaron a 40°C constituyendo el AIS.

Se determinó la firmeza de las frutillas utilizando una máquina universal de ensayos (Schimadzu DSS 10 T-S, Tokyo, Japón). Las frutillas se equilibraron a la temperatura de ensayo de 20°C. Las mediciones se realizaron en la zona ecuatorial sobre 45 mitades de frutillas para cada tratamiento. Se empleó una celda de carga de 5 Kg y una sonda de Magness-Taylor de 0.5 mm de diámetro. Las frutas fueron penetradas 7 mm a una velocidad de 100 mm/min. La firmeza se determinó como la fuerza máxima en la curva de compresión.

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando ANOVA ($p < 0.05$) y cuando el efecto de los factores fue significativo se aplicó la prueba HSD de Tukey para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pesos de las frutillas antes y después de cada tratamiento se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Pesos de las frutillas antes y después de cada tratamiento.

Tratamientos	Pesos (g)			
	Inicial	Inmersión en PME	Inmersión en CaCl ₂	Almacenamiento
Control – 2d	62.71			58.85
Control – 6d	54.97			53.31
PME	57.98	58.72		56.23
CA	57.52		56.21	54.19
PME+CA	55.19	55.54	54.80	52.41

Luego de la inmersión en soluciones de PME no se observó cambio de peso en uno de los grupos (PME+CA), mientras se observó un aumento de peso en el otro grupo (PME). Dicho aumento estaría relacionado con la absorción de la solución de PME a través de los tejidos de la fruta durante la inmersión. Luego de la inmersión en soluciones CaCl₂ 8% p/v se observó una disminución en el peso de las frutillas para ambos grupos (CA y PME+CA). Lara y col. (2004) informaron un aumento de peso durante la inmersión de frutillas en soluciones de CaCl₂ 1% p/v. Sin embargo, la disminución de peso observado durante la inmersión en CaCl₂ 8% p/v estaría relacionada con un proceso de deshidratación osmótica debido a elevada concentración de la solución de calcio.

Las diferencias de peso durante el almacenamiento de las frutillas se presentan en la Figura 1.

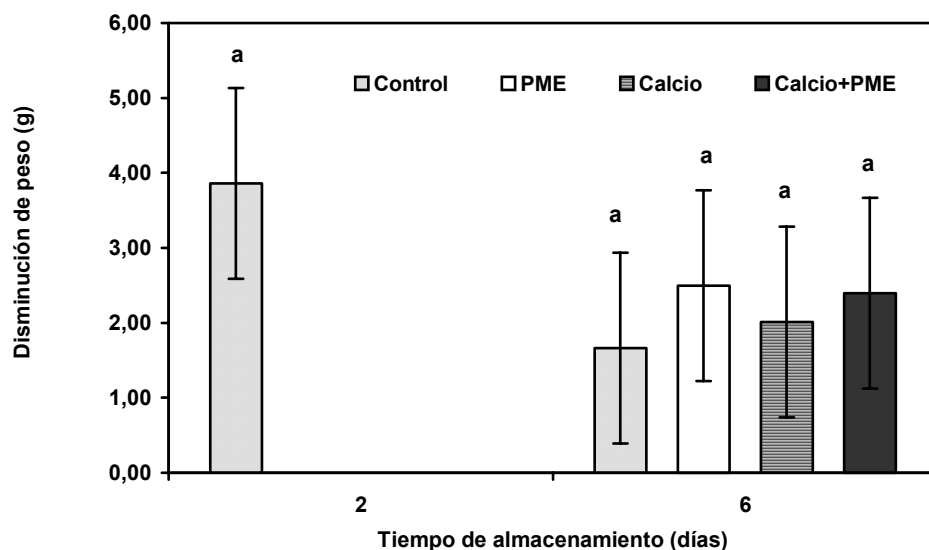


Figura 1. Disminución de peso durante el almacenamiento de las frutillas. Las barras indican el intervalo HSD de Tukey del 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los pesos de las frutillas control y de las frutillas sometidas a los distintos tratamientos disminuyeron luego del almacenamiento a 4°C, a pesar de que las frutas fueron almacenadas en condiciones controladas de humedad y temperatura (4°C y 90% HR). Además, no se observaron diferencias significativas en los cambios de peso entre las frutillas control y las frutillas sometidas a los distintos tratamientos luego de 6 días de almacenamiento (Figura 1).

El contenido de AIS, que evalúa contenido de pared celular (Lara y col., 2004) se presenta en la Figura 2.

El contenido de AIS no presentó diferencias significativas durante el almacenamiento de las frutillas control a 4°C. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el contenido de AIS de las frutillas control y de las frutillas sometidas a los distintos tratamientos luego de 6 días de almacenamiento. El contenido de AIS de las frutillas del grupo PME+CA fue mayor que el de las frutillas de los grupos Control – 6d y PME. Dicha observación estaría indicando que el tratamiento PME+CA reforzaría la estructura de la pared celular produciendo una menor solubilización de los polisacáridos pécticos y por consiguiente una mayor recuperación de AIS.

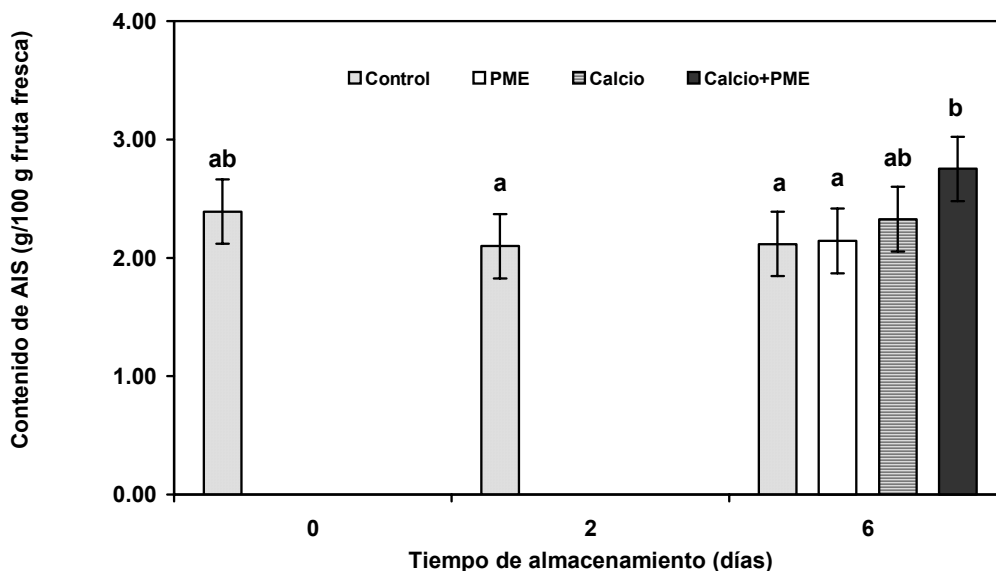


Figura 2. Contenido de AIS de las frutillas. Las barras indican el intervalo HSD de Tukey del 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los valores de firmeza determinados como la fuerza máxima en la curva de compresión se presentan en la Figura 3.

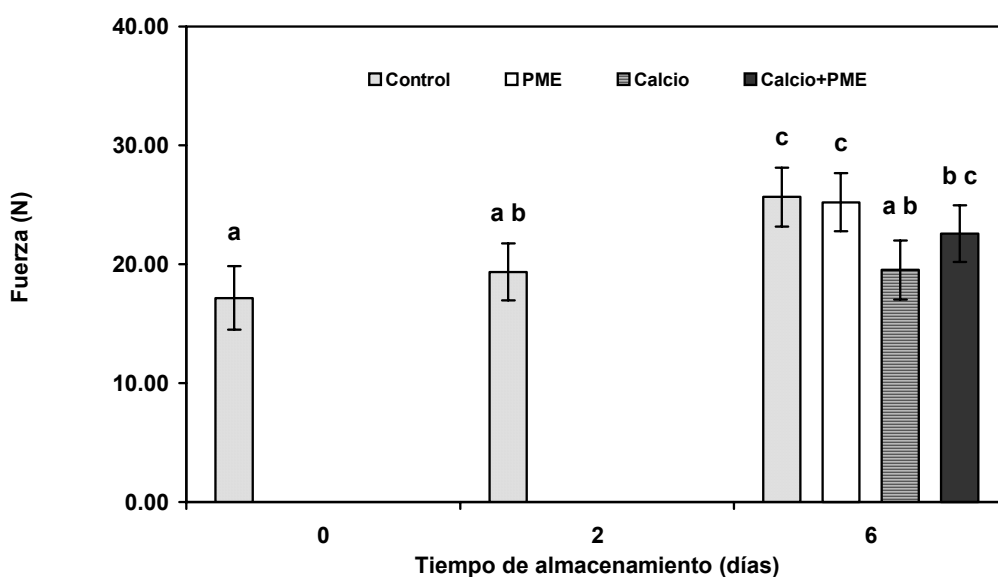


Figura 3. Fuerza máxima en la compresión. Las barras indican el intervalo HSD de Tukey del 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas.

La firmeza aumentó significativamente durante el almacenamiento a 4°C de las frutillas control, lo cual estaría relacionado con una mayor rigidez de los tejidos vegetales provocada por la baja temperatura (Lara y col., 2004). Además, se observaron diferencias significativas en la firmeza de las frutillas control y de las frutillas sometidas a los distintos tratamientos luego de 6 días de almacenamiento. El tratamiento CA produjo una disminución en la firmeza, mientras que los tratamientos PME y PME+CA no ocasionaron

cambios en la textura respecto de las frutillas control luego de 6 días de almacenamiento refrigerado. Lara y col (2004) no reportaron diferencias significativas entre la firmeza de frutillas control y frutillas tratadas con CaCl_2 1% p/v. La disminución de la firmeza observada en las frutillas tratadas con CaCl_2 8% p/v podría relacionarse con la deshidratación osmótica ocurrida durante la inmersión.

CONCLUSIÓN

Los tratamientos con pectinmetilesterasa sola o con calcio no produjeron aumento significativo en la firmeza; mientras que el tratamiento con calcio produjo una disminución de la misma. El tratamiento con calcio y pectinmetilesterasa produjo mayor rendimiento de AIS. Por lo tanto, un estudio de los cambios bioquímicos que se producen en la pared celular durante el almacenamiento de las frutillas sometidas a los distintos tratamientos puede brindar información más detallada.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con la financiación del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFIA

Cordenunsi, B. R., Nascimento, J.R.H., Lajolo, F.M. (2003). Physico-Chemical Changes Related to Quality of Five Strawberry Fruit Cultivars during Cool-Storage. Food Chem., 83, 167-173.

Chang, C. Y., Tsai, Y. R., Chang, W. H. (1993). Models for the Interactions between Pectin Molecules and other Cell Wall Constituents in Vegetable Tissues. Food Chem., 48(2), 145-157.

Degraeve, P. Saurel, R., Coutel, Y. (2003). Vacuum Impregnation Pretreatment with Pectinmethylesterase to Improve Firmness of Pasteurized Fruits. J. Food Sci., 68(2), 716-721.

Fontanarrosa, M. E. (2000). Efectos de los Factores que Influyen en los Cambios Texturales de Frutillas Congeladas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

García, J. M., Herrera, S. Morilla, A. (1996). Effects of Postharvest Dips in Calcium Chloride on Strawberry. J. Agric. Food Chem., 44, 30-33.

- Lara, I., García, P., Vendrell, M. (2004).** Modifications in Cell Wall Composition After Cold Storage of Calcium-Treated Strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) Fruit. *Postharvest Biol. Tec.*, 34(3), 331-339.
- Main, G. L., Morris, J. L., Wehunt, E.J. (1986).** Effect of Preprocessing Treatments on the Firmness and Quality Characteristics of Whole and Sliced Strawberries After Freezing and Thermal Processing. *J. Food Sci.*, 51(2), 391-394.
- Palta, J.P. (1996).** Role of Calcium in Plant Responses to Stresses: Linking Basic Research to the Solution of Practical Problems. *Hort. science*, 31(1), 51-57.
- Poovalah, B.W. (1996).** Role of Calcium in Prolonging Storage Life of Fruits and Vegetables. *Food Tech.*, May, 86-89.
- Suutarinen, J., Heiska, K., Moss, P., Autio, K. (2000b).** The Effect of Calcium Chloride and Sucrose Prefreezing Treatments on the Structure of Strawberry Tissues. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, 33(2), 89-102.
- Suutarinen, J., Honkapää, K., Heiniö, R. L., Autio, K., Mustranta, A., Kappinen, S., Kiutamo, H., Liukkonen-Lija, H., Morkkila, M. (2002a).** Effects of Calcium Chloride-Based Prefreezing Treatments on the Quality Factors of Strawberry Jams. *J. Food Sci.*, 67(2), 884-894.
- Suutarinen, J., Honkapää, K., Heiniö, R.L., Mustranta, A., Liukkonen-Lija, H., Morkkila, M. (2002b).** Modelling Calcium Chloride-Based and Pectin Methyltransferase Prefreezing Treatments of Strawberries and Jams. *J. Food Sci.*, 67(3), 1240-1248.
- Suutarinen, J., Honkapää, K., Heiniö, R-L., Autio, K., Morkkila, M. (2000a).** The Effect of Different Prefreezing Treatments on the Structure of Strawberries Before and After Jam Making. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, 33(3), 188-201.

ANALISIS ESTRUCTURAL SOBRE ALIMENTOS NO EMPAQUETADOS, DURANTE SU CONGELACION Y ALMACENAMIENTO

CAMPAÑONE, Laura A., ROCHE, Luis A. , SALVADORI, Viviana O. y MASCHERONI, Rodolfo H.

CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos)
47 y 116 (1900), La Plata, ARGENTINA. Tel/Fax: (0221) 4890741 / 4254853 / 4249287
e-mail: lacampa@ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Durante la congelación y el almacenamiento los alimentos no empaquetados expuestos al medio ambiente se deshidratan y se genera una capa porosa superficial, que afecta las cualidades organolépticas y constituye una importante pérdida de calidad. En este trabajo se empleó un modelo matemático para predecir el espesor de la capa deshidratada analizando el efecto de las condiciones de operación y las características del alimento. A partir de los resultados numéricos obtenidos se propusieron dos ecuaciones para la predicción del tamaño de la misma en función de las condiciones de operación. Además se estudió experimentalmente el almacenamiento congelado de productos cárneos durante distintos períodos (uno, dos y tres meses). Se observa que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento el tamaño de la capa superficial crece, como también lo hace el daño estructural generado en la superficie del producto congelado.

Palabras clave: Congelación, Almacenamiento congelado, Sublimación de hielo, Estructura porosa superficial; Método de predicción simplificado

ABSTRACT

During freezing and frozen storage unpackaged foods dehydrate and a porous surface layer is generated, which affects sensory attributes and implies an important quality loss. In this work, a mathematical model was used to predict the thickness of the dehydrated layer, analyzing the influence of working conditions and food characteristics. From the predicted values, two formulas were proposed for the prediction of the porous layer thickness as a function of operating conditions. Besides, the storage of food products was experimentally studied during different periods (one, two and three months). It can be seen that, as storage time increases, the size of the surface layer augments, as well the structural damage in the surface of the frozen product.

Keywords: Freezing, Frozen storage, Ice sublimation, Surface porous structure, Simplified prediction method

INTRODUCCION

Durante la congelación, y el almacenamiento congelado posterior de alimentos procesados sin empaquetar, los cristales de hielo ubicados en la superficie de los mismos subliman, generando huecos en la estructura y originando una zona porosa, parcialmente deshidratada, que se diferencia tanto en las propiedades termofísicas como en las propiedades estructurales del producto congelado original, desmereciendo el aspecto del producto final y sus propiedades texturales y sensoriales en general (color, sabor, apariencia).

En literatura se presentan distintos trabajos en los cuales se caracteriza el tamaño de los cristales de hielo en función de las condiciones de operación para distintos métodos de congelación (Bevilacqua y col., 1979; Martino y col., 1998). En ninguno de estos trabajos se analiza la estructura superficial de los alimentos sometidos a los métodos de congelación antes mencionados.

Por otro lado, desde un punto de vista del modelado numérico, el tema de la congelación y almacenamiento congelado con simultánea sublimación de hielo se ha abordado satisfactoriamente. Recientemente, Campañone y col. (2001) resolvieron un modelo matemático que describe las ecuaciones de los balances microscópicos de energía y materia durante la refrigeración, congelación y posterior almacenamiento congelado de alimentos. El modelo presta especial atención a la generación y crecimiento de la capa deshidratada superficial y a los fenómenos de transporte puestos en juego en ella. El modelo numérico constituye la única herramienta que se dispone, a nuestro entender, para realizar una predicción del tamaño de la capa deshidratada superficial en función de las condiciones operativas y del tiempo de proceso.

Si bien el método numérico brinda mucha información básica y general acerca de los fenómenos puestos en juego, desde un punto de vista ingenieril es muy útil disponer de un método simplificado para la obtención del espesor de la capa deshidratada superficial, tal como los que existen para evaluar tiempos de congelación y pérdida de peso (Cleland, 1990; Salvadori y Mascheroni, 1991; Campañone y col., 2005).

Hasta el momento no se dispone de ninguna ecuación que permita cuantificar rápidamente el efecto de las condiciones de operación en la estructura de la superficie del producto congelado.

A partir de lo mencionado los objetivos de este trabajo incluyen:

- Proponer una ecuación que describa el tamaño de la capa deshidratada en función de las condiciones de operación y de las características geométricas de los productos durante la congelación y el almacenamiento congelado posterior.
- Evaluar cualitativamente la estructura de la capa deshidratada, analizando la microestructura de las muestras cárneas con el empleo de ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy).
- Validar las predicciones de las ecuaciones obtenidas con datos observados experimentalmente.

MATERIALES Y METODOS

MÉTODO SIMPLIFICADO DE PREDICCIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo es la obtención de ecuaciones simples de predicción del espesor de la capa deshidratada superficial en función de las condiciones de operación y las características particulares del producto. En el análisis se diferenciaron dos etapas de proceso: congelación y almacenamiento congelado.

Utilizando el modelo matemático previamente desarrollado y suficientemente validado (Campañone y col., 2001) se estudió la influencia de las condiciones de operación durante la congelación (temperatura, velocidad y humedad relativa del aire) y las características geométricas del alimento en el tamaño de la capa deshidratada superficial. Se realizaron 730 corridas numéricas en el entorno de Fortran 90 (Fortran Powerstation 4.0) para cada geometría, empleando propiedades físicas de carne vacuna. El rango de las condiciones operativas estudiadas fue: $0.02 \text{ m} \leq L$ (longitud o espesor) $\leq 0.04 \text{ m}$, $0.7 \leq y_o$ (contenido inicial de humedad) ≤ 0.8 , $0^\circ\text{C} \leq T_o$ (temperatura inicial) $\leq 10^\circ\text{C}$, $0.41 \leq \text{Biot}$ (número de Biot) ≤ 2.52 , $-40^\circ\text{C} \leq T_a$ (temperatura del aire) $\leq -20^\circ\text{C}$, $0.5 \leq \text{HR}$ (humedad relativa) ≤ 0.9 y $1700 \leq \text{Re}$ (número de Reynolds) ≤ 20000 . El número de Reynolds se definió como $(\rho_a v_a L / \mu_a)$, ρ_a es la densidad del aire, μ_a es la viscosidad del aire, v_a es la velocidad y Bi es el número de Biot definido como $(hL / (2k))$, donde h es el coeficiente de transferencia de energía y k es la conductividad de la carne vacuna. Para desarrollar una ecuación que describa la dependencia del espesor de la capa deshidratada con las variables relevantes del proceso se tuvieron en cuenta dos ecuaciones simplificadas para el cálculo del tiempo de congelación y de la pérdida de materia en función de las variables operativas consideradas, obtenidas en trabajos previos (Campañone y col., 2005). En función del estudio paramétrico realizado y tomando como base las ecuaciones mencionadas se propuso la siguiente ecuación para el cálculo del tamaño de la capa deshidratada:

$$\text{Esp} = m(L)^n y_0^t \text{Re}^o (1 + pT_o)(1/Bi)(-1 - T_a)^r (1 - HR)^s \quad (1)$$

Las constantes m, n, o, p, r, s y t son los parámetros de la regresión.

Durante el almacenamiento congelado, con el empleo del modelo matemático antes mencionado, se realizó otra serie de corridas numéricas (9150 datos). Se consideraron 90 días de almacenamiento congelado de alimentos cárneos. El rango de condiciones de operación estudiado fue: $0.02 \text{ m} \leq L \leq 0.04 \text{ m}$; $-30^\circ\text{C} \leq T_a \leq -20^\circ\text{C}$; $0.5 \text{ m/s} \leq v_a \leq 1.5 \text{ m/s}$; $0.6 \leq HR \leq 0.8$ y $850 \leq Re \leq 5500$. A partir de los resultados provistos por el modelo matemático se propone la siguiente ecuación no lineal para la predicción del espesor de la capa superficial:

$$\text{Esp} = \text{Esp}_c + a(L)^b \text{Re}^c \text{st}^d (-T_a)^e (f - HR)^g \quad (2)$$

donde Esp_c es el espesor generado durante la congelación calculado a partir (1) y st (min) es el tiempo de almacenamiento. Las constantes a, b, c, d, e, f y g son los parámetros de la regresión.

Con el empleo de un software de regresión no lineal (NONLIN, SYSTAT v10.0) se calcularon los coeficientes de las ecuaciones (1) y (2).

DETERMINACIONES EXPERIMENTALES

Cada experimento consistió en la medida continua del peso de las muestras y de la temperatura interna durante la refrigeración-congelación y posterior almacenamiento congelado.

Estas experiencias se realizaron en un túnel prototipo, el cual reproduce las condiciones de operación típicas que se emplean en la industria. Una descripción completa del mismo se presenta en Campañone y col. (2003). Se emplearon muestras de carne vacuna de distintas geometrías:

-Hamburguesas de carne picada de 1.5 cm de espesor y 10 cm de diámetro y rodajas de peceto de aproximadamente 2 cm de espesor y 8 cm de diámetro.

-Cilindros de peceto (músculo semitendinoso) de 10 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro. Las bases de los mismos se aislaron con discos de poliestireno de 5 mm de espesor para evitar la transferencia de materia y energía al medio a través de esas superficies y permitir sólo transferencia en sentido radial.

-Esferas de carne picada de 4 cm de diámetro.

El contenido inicial de humedad fue de 66% para la carne picada vacuna y 74% para el peceto.

Para uniformizar la temperatura inicial, las muestras se colocaron el día anterior a la congelación en una cámara a 10 °C. La temperatura ambiente, tanto durante la congelación como el almacenamiento congelado fue de -20 °C. La humedad relativa promedio del aire durante toda la experiencia fue de 75 %. La misma se midió regularmente por medio de un higrómetro (Omega HX48). La velocidad de aire se fijó en 1 m/s.

Las experiencias tuvieron una duración total de tres meses. Se tomaron muestras al final de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento, que fueron analizadas con el empleo de ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy), utilizando un microscopio electrónico ambiental (Philips XL 30 Esem). Además se tomaron fotografías con una cámara digital de distintos cortes efectuados en las muestras congeladas.

RESULTADOS Y DISCUSION

ECUACIONES SIMPLIFICADAS

En las Tablas 1 y 2 se muestran los valores de los coeficientes obtenidos para cada geometría estudiada. En todos los casos se obtuvieron valores muy altos de los coeficientes de correlación.

Tabla 1. Parámetros de la ecuación de predicción (1) para las tres geometrías regulares simples

Parámetro	Placa plana	<i>Cilindro</i>	Esfera
m	165.580	4.482	4.807
n	1.414	1.000	0.978
o	0.311	0.412	0.378
p	0.009	0.002	-0.005
r	-1.203	-1.013	-1.092
s	0.021	0.006	-0.010
t	-0.524	-0.78	-1.097
r ²	0.999	0.999	0.989

Tabla 2. Parámetros de la ecuación de predicción (2) para las tres geometrías regulares simples

Parámetro	Placa plana	Cilindro	Esfera
a	0.246	0.173	0.273
b	-0.127	-0.197	-0.157
c	0.067	0.080	0.067
d	0.648	0.64	0.608
e	-1.526	-1.493	-1.434
f	0.978	0.977	0.981
g	0.549	0.540	0.522
r ²	0.999	0.999	0.999

ANÁLISIS DE ESTRUCTURAL

En primera instancia, se analizó la estructura macroscópica de las muestras al finalizar los distintos períodos de almacenamiento. En la Figura 1 se muestran fotografías digitales obtenidas de las distintas muestras (bifes de peceto, cilindros de peceto y albóndigas) almacenadas durante 3 meses. En todas la figuras se pueden distinguir zonas de distinto color, la zona interna (congelada) es más oscura que la zona superficial, esto implica que la muestras cárneas cambian de color al estar expuestas a la deshidratación por sublimación del hielo, debido fundamentalmente al cambio de estructura física.

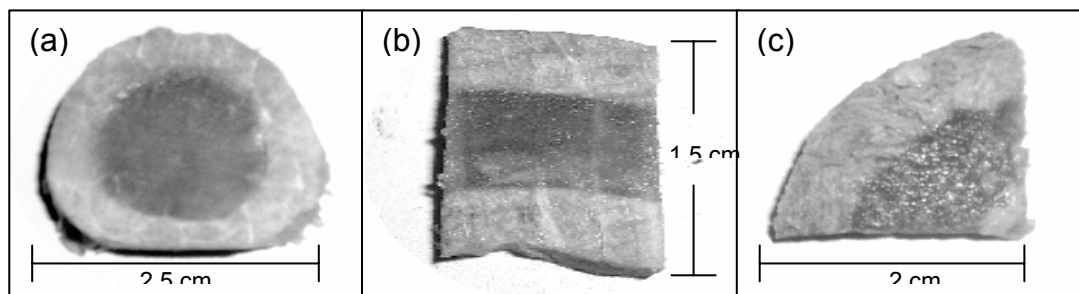


Figura 1: Fotografías digitales obtenidas en muestras cárneas sometidas a tres meses de almacenamiento congelado: (a) cilindro de peceto (vista perpendicular al eje), (b) bife de peceto, (c) esfera de carne picada (vista de un cuarto de esfera).

En la Figura 2 se muestran micrografías obtenidas de la superficie de los cilindros de peceto para distintos tiempos de almacenamiento congelado (uno, dos y tres meses) empleando ESEM. Los cortes se realizaron en dirección perpendicular al eje de los cilindros y a la dirección de las fibras. En las micrografías se distinguen, dentro de la capa superficial, zonas de distinto color: una clara que corresponde a las fibras cárneas, mientras que aparecen sectores oscuros correspondientes a los huecos generados por el hielo sublimado. Se puede observar que la estructura de la capa es de tipo porosa y el tamaño de los poros crece a medida que lo hace el tiempo de almacenamiento.

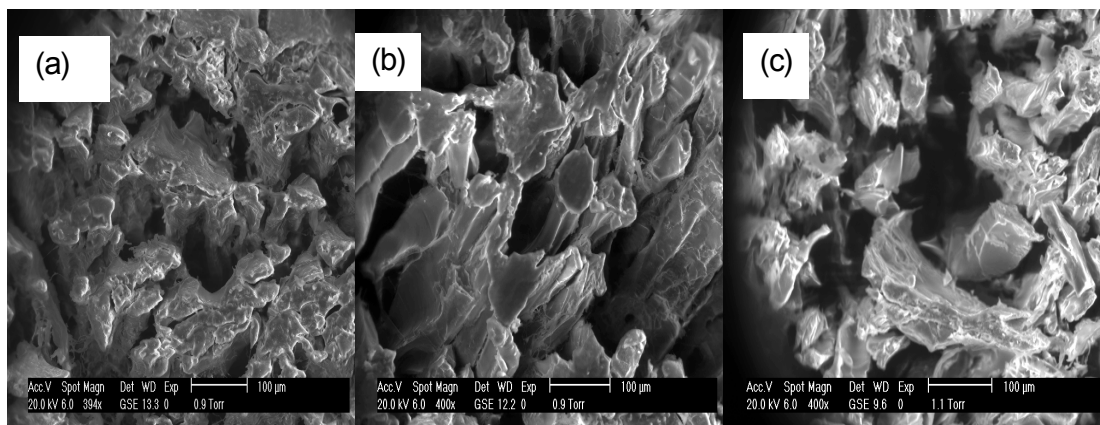


Figura 2: Micrografías de la superficie de cilindros de pecetos (cortes transversales al eje longitudinal): (a) 1 mes, (b) 2 meses y (c) tres meses de almacenamiento.

Con el empleo del software Global Lab se determinó el espesor de la capa superficial para cada producto a partir de las fotografías obtenidas con la cámara digital (Figura 1).

En la Figura 3 se muestra la evolución del espesor de la capa deshidratada con el tiempo de almacenamiento congelado para los distintos tipos de muestra. Los valores observados se emplearon para verificar las predicciones de las ecuaciones simplificadas (1) y (2).

El error relativo promedio calculado entre los valores experimentales y los predichos por las ecuaciones (1) y (2) es de 5.35%, existiendo muy buena concordancia entre los mismos.

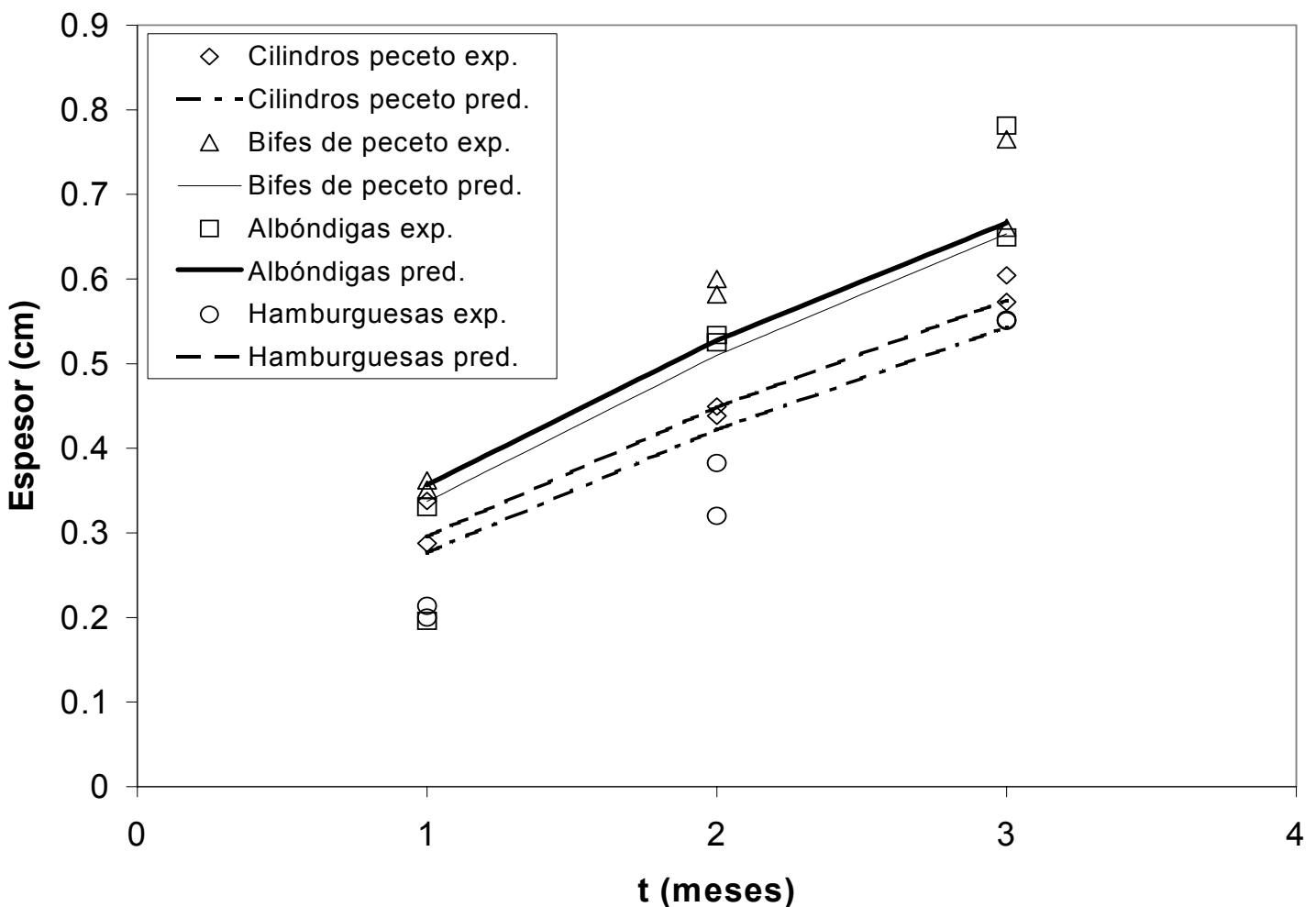


Figura 3: Evolución del espesor de capa deshidratada observado en distintos productos cárneos: valores experimentales (símbolos) y predichos (líneas) con el empleo de las ecuaciones simplificadas (1) y (2).

CONCLUSIONES

Mediante el empleo de un modelo numérico que resuelve los balances microscópicos de energía y materia se pudo observar el efecto de las condiciones de operación y geometría y tamaño de los alimentos en el tamaño de la capa deshidratada superficial. Los resultados numéricos permiten observar la dependencia del espesor de la misma con el tamaño de producto, con su contenido inicial de humedad, así como también con las condiciones del aire a través de la humedad relativa y de los números de Biot y Reynolds. Se propusieron dos ecuaciones simplificadas y los coeficientes de las mismas se obtuvieron con un alto valor de coeficiente de correlación. Las predicciones de las mismas se validaron con el empleo de valores experimentales obtenidos en nuestro laboratorio. A partir de las fotografías y de las micrografías se puede concluir, que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, el tamaño de la capa superficial crece, como también lo hace el daño estructural interno generado en la superficie del producto congelado.

BIBLIOGRAFIA

- Bevilacqua A., Zaritzky N.E. y Calvelo A. (1979).** Histological measurements of ice in frozen beef. *Journal of Food Technology*, 14, 237.
- Campañone L.A., Salvadori V.O. y Mascheroni R.H. (2001).** Weight loss during freezing and storage of unpackaged foods. *Journal of Food Engineering*, 47, 69.
- Campañone L.A., Roche L.A., Salvadori V.O. y Mascheroni R.H. (2003).** Monitoring of weight losses in meat products during freezing and frozen storage. *Food Science and Technology International*, 8(4), 229.
- Campañone L.A., Salvadori V.O. y Mascheroni R.H. (2005).** Freezing and frozen storage with simultaneous surface dehydration. Approximate prediction of weight losses. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 48 (6), 1195.
- Cleland A.C. (1990).** Food refrigeration processes. Analysis, design and simulation. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London.
- Martino M.N., Otero, L., Sanz P.D. y Zaritzky N.E. (1998).** Size and location of ice crystals in pork frozen by high pressure assisted freezing as compared to classical methods. *Meat Science*, 50 (3), 303.
- Salvadori V.O. y Mascheroni R.H. (1991).** Prediction of freezing and thawing times of foods by means of a simplified analytical method. *Journal of Food Engineering*, 13, 67.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido realizado con fondos aportados por CONICET, UNLP y Proyecto ANPCyT 99/9-7169.

VIDA UTIL DE MUSCULOS ADUCTORES DE VIEIRA (ZYGOCHELAMYS PATAGÓNICA) DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRIO.

MASSA, Agueda E.^{1,4}, PAREDI, María E.^{2,3}, CRUPKIN, Marcos^{2*}

¹ Instituto Nacional de Tecnología Industrial, ² Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP; ³ Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires (CIC); ⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científica y Técnica (CONICET). INTI- Mar del Plata, Marcelo T. de Alvear 1168, (7600) Mar del Plata, Argentina. Tel/FAX.2234891324. *Email: mcrupkin@mdp.edu.ar

RESUMEN

Se investigó la vida útil de músculos aductores de vieira patagónica almacenados a 2-4°C, mediante la determinación de distintos índice químicos de frescura y evaluación sensorial. Los índices de frescura valor K, valor K', carga energética de adenilato (A.E.C.) y la relación Hx/AMP fueron calculados a partir de las concentraciones ATP y de sus productos de degradación. El valor K, el contenido de Hx y la relación Hx/AMP se incrementaron significativamente con el tiempo de almacenamiento y reflejaron adecuadamente los cambios sensoriales. El valor K' se incrementó rápidamente, alcanzo un valor máximo el segundo día y posteriormente permaneció constante. El A.E.C solo resultó útil para monitorear el estado inicial de los ejemplares. De acuerdo a esto solo el valor K, la Hx y la relación Hx/AMP, podrían ser utilizados como índices de frescura de estos productos. Según estos resultados, la vieira patagónica permanecería fresca hasta el tercer día de almacenamiento a 2-4°C y alcanzaría el límite de rechazo a los 6 días.

Palabras Claves: Músculo Aductor Vieira, Almacenamiento 2-4°C, Índices Químicos de Frescura, Evaluación Sensorial.

ABSTRACT

The shelf life of adductors muscles from patagonian scallop stored to 2-4°C was examined by means of chemical assessment of freshness and sensory evaluation. The index of freshness K, K' and adenylate energy charge (A.E.C.) values, besides Hx/AMP ratio were calculated from the level of ATP and compounds related with its breakdown. The K value, the Hx content and the Hx/AMP ratio were increased significantly with the time of storage and reflected adequately the sensory changes. The K' value increased rapidly to maximum value up to the second day of storage and thereafter remained constant. A.E.C value was useful to monitor the initial stage of specimens. These results suggested that the K value, the Hx and the Hx/AMP ratio might be used as freshness indices for these products.

Therefore, in these work conditions, the Patagonian scallop would remain fresh until the 3 day of storage to 2-4°C and could reach the limit of rejection to 6 days.

INTRODUCCION

La vieira patagónica (*Zygochlamys patagónica*) es un bivalvo marino que se distribuye desde Tierra del Fuego hasta los 35° L.S. Esta especie constituye una nueva pesquería en el ámbito nacional. La principal forma de comercialización son los músculos aductores aislados (callos) frescos y/o congelados. El creciente interés por estos productos hace indispensable establecer la vida útil de los músculos aductores aislados durante el almacenamiento a 2-4°C.

Los productos pesqueros son, en general, alimentos muy perecederos. Luego de la captura, los componentes químicos del pescado sufren procesos autolíticos y microbiológicos que afectan la vida útil del mismo (Jones y col., 1964). Estos cambios bioquímicos dan lugar a diferentes etapas de deterioro y por consiguiente diferentes grados de frescura.

Dentro de los cambios bioquímicos postmortem que ocurren en las especies marinas, la degradación de adenosín trifosfato (ATP) ha sido ampliamente estudiada. El ATP se degrada por una serie de reacciones de defosforilación y desaminación a inosina monofosfato (IMP), y este continua degradándose a inosina (HxR) e hipoxantina (Hx). Distintos autores han sugerido que la cantidad de HxR e Hx pueden ser utilizados como parámetros objetivos de frescura dada su alta correlación con paneles de evaluación sensorial (Saito y col., 1959; Ryder, 1985). Sin embargo el uso de un solo catabolito de la degradación del ATP como indicador de frescura no resulta apropiado, debido a que la velocidad de las reacciones enzimáticas implicadas en esta degradación varían apreciablemente entre especies (Ryder, 1985), con el tipo de músculo (Obatake y col., 1988), con la condición biológica de los ejemplares (De Vido de Mattio y col., 2001), y con las condiciones de almacenamiento (Surette y col., 1987). En este sentido, el valor K, propuesto por Saito y col., (1959) definido como el porcentaje de HxR e Hx con respecto a la suma de ATP y todos sus compuestos de desdoblamiento, constituye un indicador más conveniente y ampliamente utilizado en este tipo de estudios. Karube y col. (1984) propusieron el valor K', dicho índice no tiene en cuenta las concentraciones de ATP, ADP o AMP. Ohashi y col., (1991) determinaron que la relación entre el contenido de Hx y AMP como un buen indicador de frescura en invertebrados marinos, especialmente en calamar. Por otro lado, la carga energética de adenilato o valor A.E.C es un índice propuesto por Atkinson (1968) como un parámetro del control metabólico, que se ha utilizado como un índice de frescura en distintos moluscos marinos (Yokoyama y col., 1994). El propósito del

presente estudio fue investigar la vida útil de músculos aductores de vieira patagónica almacenados a 2-4°C, mediante la determinación de distintos índices químicos de frescura y evaluando los cambios sensoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *Zygochlamys patagónica* fueron recolectadas del banco Reclutas (39°24'S-55°56'W) del océano Atlántico por buques de investigación pertenecientes al INIDEP. Se utilizaron ejemplares maduros de 55-65 mm de altura total de valva. Inmediatamente después de la muerte, los músculos aductores (callos) fueron aislados y almacenados a 2-4°C por 9 días. Durante el almacenamiento, se realizaron muestreos periódicos, para determinar los cambios en el contenido de nucleótidos y en las características sensoriales.

Determinación de Nucleótidos. El contenido de ATP y en sus productos de degradación se cuantificaron en extractos perclóricos preparados a partir de homogenatos de músculos aductores tomados a cada tiempo de almacenamiento, por HPLC de acuerdo a lo descrito por Ryder (1985).

Índices Químicos de Frescura. El valor K fue determinado según Saito, y col. (1959) mediante la siguiente ecuación: $K(\%) = ([\text{HxR}] + [\text{Hx}] / [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{HxR}] + [\text{Hx}]) * 100$. El valor K' es un índice propuesto por Karube y col. (1984) con la siguiente ecuación: $K'(\%) = ([\text{HxR}] + [\text{Hx}] / [\text{IMP}] + [\text{HxR}] + [\text{Hx}]) * 100$. La carga energética de adenilato o valor A.E.C. se calculó según la siguiente formula: $\text{A.E.C}(\%) = ([\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}] / [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]) * 100$. La relación Hx/AMP a partir del contenido de AMP y Hx también fue determinada.

Análisis Sensorial. El análisis sensorial de la vieira patagónica fue realizado por panelistas entrenados. Los músculos aductores aislados fueron almacenados a 2-4 °C y examinados a distintos tiempos de almacenamiento. Los descriptores utilizados (olor, color, textura y aspecto general) fueron seleccionado según el criterio de Bremer y Statham (1983) con algunas modificaciones (Tabla 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambios en el Contenido de Nucleótidos. En un trabajo previo se ha mostrado los cambios en el contenido de nucleótidos en el músculo aductor de la vieira patagónica almacenados por 5 días a 2-4 °C (Massa y col., 2002). En el presente trabajo, esos cambios fueron estudiados para un período mayor (9 días). Para cada uno de los

distintos tiempos de almacenamiento se encontraron niveles similares de nucleótidos, a los observados previamente (Massa y col., 2002).

Cambios Sensoriales e Índices Químicos de Frescura. En la Figura 1 se muestran los cambios sensoriales y los índices químicos de frescura determinados en músculo aductor de vieira almacenado a 2-4°C. Durante el almacenamiento los músculos experimentaron cambios significativos en el color y en el olor. Un olor nulo o leve a algas marinas y un color típico de la especie, blanco brillante, fueron observados durante los tres primeros días de almacenamiento. Estas cualidades fueron consideradas como atributos de frescura de los ejemplares. Posteriormente y hasta el sexto día de almacenamiento, los músculos presentaron un olor ligeramente a pescado y una leve tendencia al oscurecimiento. Estas características definieron el estado inicial del deterioro, en este segundo periodo los ejemplares se mantuvieron aceptables para su consumo. Luego del séptimo día de almacenamiento a 2-4° C, los músculos presentaron un color marrón opaco y un olor fuertemente amoniacal, muy desagradable lo que determinó el estado avanzado de deterioro y su rechazo para el consumo (inaceptable).

Tabla 1: Esquema de evaluación utilizado para identificar la calidad de vieira

Olor	(x)	Color	(x)	Textura	(x)	Estado General	(x)
Agradable nulo	o	Color típico de la especie		Firme		Fresco	
Propio no-desagradable		Color típico de la especie con tendencia al oscurecimiento		De moderada consistencia		Aceptable	
Fuerte abiertamente desagradable	y	Pigmentación natural prácticamente desaparecida. Color marrón.		De escasa consistencia		Inaceptable	
Descripción		Descripción		Observaciones		Observaciones	
Nulo		Blanco					
Algas marinas		Amarillo					
Pescado		Marrón					
Amoniacal		Nacarado					
Rancio		Brillante					
H ₂ S		Opaco					

Análisis Estadísticos. Los análisis estadísticos fueron realizados usando Microsoft Excel Windows 95 – Versión 7 (Microsoft Corp. Redmond, Wash. USA). Los coeficientes de correlación entre los distintos parámetros fueron calculados usando Statistica / MAC.1994.

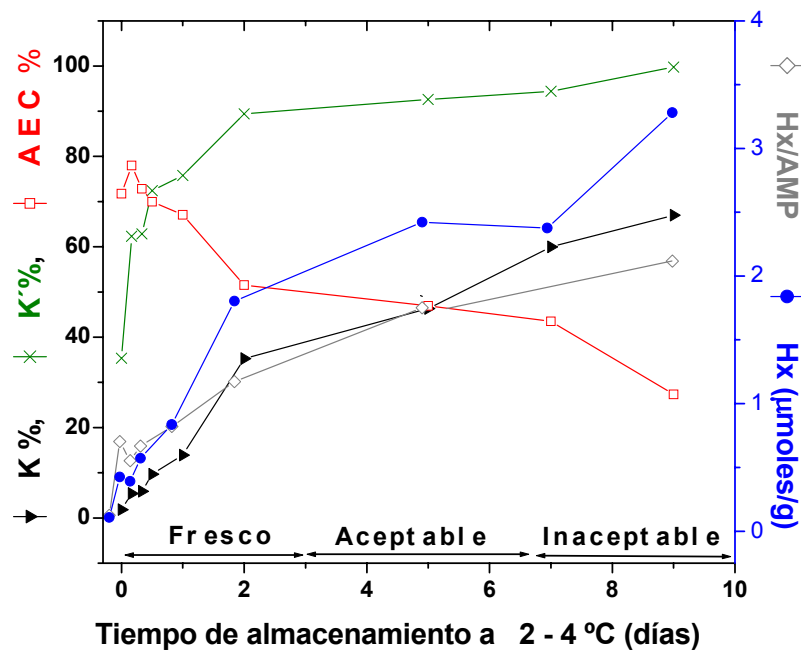


Figura 1. Cambios en el valor K, K', la carga energética de adenilato (A.E.C.), relación Hx/AMP y el contenido de Hx en músculo aductor de vieira (*Zigochlamys patagónica*) durante el almacenamiento a 2-4 °C. Cada punto representa el valor medio de seis ejemplares (desviación estándar relativa 5%).

En la Figura 1 también se puede observar los índices químicos ensayados para evaluar la frescura de la vieira patagónica. El valor K al inicio del almacenamiento fue de 1,8% y posteriormente aumentó en forma lineal ($r^2= 0.94$), alcanzando un valor cercano al 30% al iniciar la fase de deterioro (tercer día de almacenamiento). Al finalizar el periodo de almacenamiento el valor K fue 67.0%. Valores similares fueron descritos en músculo aductor de vieira itaya-gai almacenado en frío (Suwidji y Yamanaka,1998). El valor K' alcanzó un valor de 89.9% durante los dos primeros días de almacenamiento y posteriormente permaneció constante. Dado que este índice alcanza valores máximos rápidamente, no puede ser considerado como un índice confiable de frescura. La relación Hx/AMP aumentó gradualmente durante el almacenamiento. La carga energética de adenilato o valor A.E.C se ha utilizado en distintos estudios de moluscos como un índice de frescura (Yokoyama y col., 1994). En este trabajo, el valor A.E.C descendió linealmente ($r^2 = 0,94$) desde 71,7% hasta 27,3%, presentando una alta correlación negativa con el tiempo de almacenamiento ($r = -0,95$). El alto valor inicial de A.E.C indicó una muy buena condición fisiológica de los ejemplares al iniciar los experimentos. Valores similares de A.E.C. fueron informados en otras especies de moluscos bivalvos (Yokoyama y col., 1994).

Los niveles de Hx se han utilizado ampliamente como un indicador de frescura (Jones y col., 1964). Los resultados del análisis sensorial determinaron que la frescura de los ejemplares se extendió hasta el tercer día de almacenamiento. La concentración de Hx al finalizar dicho periodo fue de 2.0 $\mu\text{mol/g}$. Este valor puede ser considerado como límite para la aceptabilidad del músculo aductor de vieira patagónica almacenado a 2-4 °C. Este valor límite de aceptación de Hx se encuentra dentro del rango propuesto para otros invertebrados marinos, de 2 a 3 $\mu\text{mol/g}$ para el calamar (Licciardello, 1985) y 2 $\mu\text{mol/g}$ para el langostino *Panaeus merquierisis* (Fatima y col., 1981) almacenados en hielo.

CONCLUSIONES

El valor K, la acumulación de Hx y la relación Hx/AMP y podrían ser buenos indicadores de frescura en la vieira patagónica ya que se correlacionaron positivamente con el tiempo de almacenamiento y reflejaron adecuadamente los cambios de las características sensoriales. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, la vieira patagónica permaneció como un producto fresco hasta el tercer día, aceptable hasta el día 6 de almacenamiento a 2-4°C y posteriormente inaceptable.

BIBLIOGRAFIA.

- Atkinson, D. 1968.** The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7: 4030
- Bremer, H., Statham, J. (1983).** Effect of potassium sorbate on refrigerated storage of vacuum packed scallops. *J. Food Sci.*, 48: 1042.
- De Vido de Mattio, N., Paredi, M., Crupkin M. 2001.** Influence of the gonadal cycle and food availability on postmortem change in glycogen, ATP, hypoxanthine and 260/250 absorbance ratio in adductor muscle from scallop *Aequipecten tehuelchus* (D'orbigny, 1846). *J. Shellfish Res.*, 20:111
- Fatima, R., Faroqui B., Qadri R. 1985.** Inosine monophosphate and hypoxanthine as indices of quality of shrimp (*Panaeus merquierisis*). *J. Food Sci.*, 46: 1125.
- Jones, N., Murray, J., Livingston, E., Murray, C. 1964.** Rapid estimations of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill stored fish. *J. Sci. Food Agric.*, 15: 763.
- Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., and Toyama, K. 1984.** Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J. Agric. Food Chem.*, 32: 314.

Licciardello, J., Ravesi, E., Gerow, S., D'entremont, D. 1985. Storage characteristics of iced whole *Loligo* squid. Pages 249-257 in Proc. Meet. Storage lives of chilled and frozen fish and fish products. Aberdeen, October 1-3.

Massa, A., Paredi M., Crupkin, M. 2002. Nucleotide catabolism in cold stored adductor muscle scallop (*Zygochlamys patagonica*). J. Food Biochem., 26: 295.

Obatake, A., Doi, T., Ono, T. 1988. Post-mortem change in inosine monophosphate concentration and related enzyme activity in the dark muscle fish. Bull Jpn. Soc. Sci. Fisheries, 54: 283.

Ohashi, E. Okamoto, M., Ozawa, A., Fujita T. 1991. Characterization of common squid using several freshness indicators. J. Food Sci., 56: 1 61.

Ryder, J. M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. J Agric. Food Chem., 33: 678.

Saito T., Arai K., Tanaka T., Matsuyoshi, M. 1959. A new method for estimating the freshness of fish. Bull. Jap. Soc. Fish., 24: 749.

Statistica/Mac, 1994. Statistica for Macintosh , StantSoft, Inc.,Tilsa, OK, USA.

Surette, M., Gill, T., Le Blane P. 1988. Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cold (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. J. Agric. Food Chem., 36: 19.

Suwidji, W., Yamanaka H. 1998. Extractive components of the adductor muscle of Japanese Baking Scallop and changes during refrigerated storage. J. Food Sci., 63: 772.

Yokoyama, Y., Sakaguchi, M., Kawai, F., Kanamori, M. 1994. Chemical indices for assessing freshness of shellfish during storage. Fisheries Sci., 60(3): 329.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), a la Universidad Nacional de Mar del Plata, y al Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI-MDP. Este trabajo fue parcialmente financiado por FONCYT (PICT O3794/98).

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO CONGELADO SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE ALETAS DE CALAMAR (*Illex argentinus*).

MIGNINO^{1,3}, Lorena A., CRUPKIN^{1,2}, Marcos y PAREDI^{1,2,3}, María E.

¹(INTI-MDP). M. T de Alvear 1168. 7600. Mar del Plata. Argentina.Tel. (0223) 480-2801

²Facultad Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata.

³Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires (CIC) meparedi@mdp.edu.ar

RESUMEN

Se investigaron las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la actomiosina (AM) de aletas de calamar almacenadas congeladas. Se realizaron determinaciones de viscosidad reducida (VER), SDS-PAGE 10%, hidrofobicidad superficial (SoANS), índice de actividad emulsificante (IAE) y estabilidad de la emulsión (EE). El perfil en SDS-PAGE 10% de la AM mostró una disminución de la cadena pesada de miosina (MHC) y un incremento en las bandas de 155 kDa y 55 kDa. El porcentaje relativo de miosina disminuyó significativamente a los 60 y 150 días de almacenamiento, mientras los de actina y paramiosina mostraron una tendencia a aumentar. La VER disminuyó significativamente ($p<0,05$) a los 90 días. La hidrofobicidad de la AM y la solubilidad de proteínas no mostraron cambios significativos. El IAE y la EE de la AM se incrementaron significativamente ($p<0,05$) a los 30 días, para luego disminuir significativamente ($p<0,05$) hacia el final del almacenamiento.

Palabras claves: actomiosina, propiedades fisicoquímicas, propiedades funcionales, calamar, aletas, almacenamiento congelado.

ABSTRACT

The physicochemical and functional properties of actomyosin (AM) from frozen stored squid fin were investigated by determinations of reduced viscosity (VER), SDS-PAGE 10%, surface hydrophobicity (SoANS), emulsifying activity index (IAE) and emulsion stability (EE). SDS-PAGE 10% pattern of AM showed a decrease in myosin heavy chain (MHC) and an increment in 155 kDa y 55 kDa components during storage. The relative percentage of myosin significantly ($p<0.05$) decreased at 60 and 150 days and those of actina and paramyosin showed a trend to increase. The viscosity significantly ($p<0.05$) decreased at 90 days. The hydrophobicity of AM and the solubility of proteins remained

unchanged. The IAE and EE of AM significantly ($p < 0.05$) increased at day 30 and then a significantly ($p < 0.05$) decreased up to the end of storage.

INTRODUCCION

El calamar (*Illex argentinus*) es una de las especies de cefalópodos más importantes del litoral marítimo argentino, ocupando el segundo lugar en volúmenes de capturas anuales (Redes, 2004). Las propiedades tecnológicas de la carne de especies pesqueras son afectadas fuertemente por la congelación y el almacenamiento congelado (Sikorski, 1978; Matsumoto, 1980; Mackie, 1993). Dichas modificaciones fueron relacionadas principalmente con cambios en las proteínas miofibrilares (Sikorski, 1976; Shenouda, 1980; Mackie, 1993). Existen diversos estudios sobre el manipuleo, industrialización y almacenamiento de calamar congelado (Joseph y col., 1977; Moral y col., 1983). Algunos estudios realizados sobre manto congelado de distintas especies de calamar han informado sobre una pérdida de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de las proteínas miofibrilares con el almacenamiento (Iguchi y col., 1981; Paredi y Crupkin, 1997). Modificaciones en las propiedades funcionales por efecto de la congelación y almacenamiento congelado han sido recientemente informadas (Ruiz-Capillas, 2002). Existen trabajos acerca del efecto de la congelación sobre el manto o tentáculos de diferentes especies de calamar (Iguchi y col., 1981; Paredi y Crupkin, 1997; Ruiz-Capillas y col., 2002). Sin embargo no se cuenta con información sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de aletas calamar y su comportamiento por el almacenamiento congelado.

El objetivo de éste trabajo fue investigar las modificaciones en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de aletas de calamar almacenadas congeladas.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron aletas de hembras maduras de calamar (*Illex argentinus*) procedentes de buques comerciales. Los ejemplares fueron eviscerados y las aletas congeladas a -25°C y luego almacenadas a -30°C durante 150 días. A diferentes tiempos de almacenamiento se tomaron 4-6 aletas para su análisis cada muestra estuvo compuesta por una aleta. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Preparación de actomiosina: La extracción y purificación de actomiosina (AM) se realizó según lo descrito por Paredi y col (1990). Los precipitados de AM purificada fueron resuspendidos en Buffer fosfato 0,01M; (pH 7) conteniendo 0,6M ClNa.

Preparación del extracto proteico: 8 gramos de músculos, fueron homogeneizados, en un Omni-Mixer Sorvall 17106, con 160 ml de solución de buffer fosfato 50mM, conteniendo 0,6M ClNa ajustando el pH 6,8-7,0.

Cuantificación de proteínas: La concentración de proteínas de la actomiosina y del extracto de proteínas, fue determinado por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Solubilidad de proteínas: Se homogeneizaron 8 gramos de músculo de aletas de calamar en un Omni-mixer Sovall 17106 x 1min con 160 ml de solución de buffer fosfato 50mM, conteniendo 0,6M ClNa ajustando el pH 6,8-7,0. Luego los homogenatos fueron centrifugados por 20 min a 5000 x g a 0-4°C en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-26 Plus.

El sobrenadante (fracción soluble en sal), fue expresado como porcentaje de proteína total, determinado por el método de Lowry (Lowry y col, 1951).

Viscosidad reducida (VER): La viscosidad reducida de la actomiosina de las aletas congeladas en los distintos tiempos de almacenamiento, fue determinada a $20 \pm 0,1$ °C utilizando un viscosímetro de Ostwald según el método descrito por Crupkin y col. (1979).

Hidrofobicidad superficial: La hidrofobicidad superficial de la actomiosina (So ANS) fue determinada utilizando 1-anilino-8-naftalensulfonato según lo descrito por Li-Chan y col.(1985).

El valor relativo de la intensidad de la fluorescencia (RFI) del ANS-conjugado fueron medidos en un espectrofluorómetro Shimadzu RF- 5301PC a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 470 nm. Las pendientes iniciales (So) del gráfico de RFI versus concentración proteica (%) fueron calculados por análisis de regresión lineal y fueron definidas como SoANS según método de Li-Chan y col. (1985).

Indice de actividad emulsificante (IAE) y estabilidad de la emulsión (EE): El IAE se determinó en el extracto proteico y en la actomiosina purificada de acuerdo al método descrito por Pearce y Kinsella (1978). Se homogeneizaron 2ml de aceite de girasol puro y 6 ml de 0,1% solución proteica (extracto proteico o actomiosina) en un Omni-Mixer Sorvall 17106 x 1min, adaptado con un micro-homogeinizador a 5000 rpm. Se tomaron 50µl de la emulsión de la base del recipiente a 0 y 10 min y fueron diluidos con 5 ml de buffer fosfato 0,01M, pH 7, conteniendo 0,1% (p/v) de dodecilsulfatosódico (SDS). La lectura de la absorbancia a 500nm inmediatamente después de preparar la emulsión fue expresada como Indice de Actividad Emulsificante (IAE). La Estabilidad de la Emulsión (EE) fue determinada como: $EE=T/T_0$ donde T y T_0 representan los valores de turbidez a

tiempo 10 y 0 min respectivamente (Xie y Hettiarachchy, 1997). De cada muestra analizada se realizaron 2 emulsiones y para cada emulsión las lecturas se realizaron por triplicados.

Electroforesis en geles de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE): La electroforesis de los geles SDS-PAGE fue realizada según el procedimiento de Laemmli (1970) en un equipo minislab Sigma. La composición cuantitativa de la actomiosina fue determinada por fotodensitometría de los geles a 620 nm en un equipo Shimadzu CS 910. Los porcentajes relativos de miosina (M) ($M = \text{suma de las áreas correspondientes a MHC y cadenas livianas de miosina (MLCs)} / \Sigma \text{ total de áreas}$), paramiosina (PM) y actina (A) y las relaciones M/A y M/PM, fueron calculados según lo descrito por Paredi y col (1990).

Análisis estadístico: Se realizó un Análisis de Varianza y el Test de Duncan de rangos múltiples, usando el programa Statistica/MAC (Statistica/Mac, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil electroforético de las actomiosinas obtenidas de aletas frescas (sin congelar) y de las almacenadas congeladas, se muestra en la Figura 1. A tiempo cero (sin congelar), se pueden observar las bandas polipeptídicas características del complejo miofibrillar mayoritario. El perfil electroforético fue semejante al obtenido para actomiosina de manto de *Illex argentinus* y de otras especies de calamar (Paredi y Crupkin, 1997; Iguchi y col., 1981).

Durante el almacenamiento congelado, se observó una disminución de la intensidad de la banda de cadena pesada de miosina (MHC) y la aparición y/o incremento de bandas correspondientes a 155 kDa, 104 kDa y 55 kDa (Figura 1). Estos cambios podrían ser debidos a la presencia de actividad proteolítica. Iguchi y col., (1981) observaron una caída en el porcentaje de miosina y un incremento en componentes polipeptídicos de menor peso molecular, durante el almacenamiento congelado del calamar (*Ommastrephes sloani pacificus*). En mantos de *Illex argentinus* almacenados congelados, también se observó una disminución de MHC pero sin evidencias de proteólisis (Paredi y Crupkin, 1997).

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes relativos de M, PM y A y las relaciones M/A y M/PM en AM proveniente de aletas frescas y congeladas. Se puede observar una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje relativo de miosina a los 60 y 150 días y una tendencia a incrementar en el porcentaje relativo de actina y paramiosina a partir de los 30 y 60 días, respectivamente. Los porcentajes relativos de las bandas polipeptídicas correspondientes a los componentes de 155 kDa y 55 kDa se incrementan a partir de los 30 días y luego disminuyen hacia el final del almacenamiento (datos no mostrados). La

presencia de estas bandas polipeptídicas podría ser debida a actividad proteolítica. Rodger y col. (1984) observaron actividad proteolítica en manto de calamar que produce degradación de MHC. Paredi y Crupkin (1997) observaron una caída en el porcentaje relativo de miosina en la actomiosina de manto de calamar (*I. argentinus*) almacenado congelado, la que fue relacionada con un proceso de desnaturalización-agregación de la miosina. De acuerdo a los resultados de la Figura 1 y Tabla 1 no puede descartarse que tenga lugar proteólisis durante la primera etapa de almacenamiento y un fenómeno de desnaturalización-agregación en la etapa posterior.

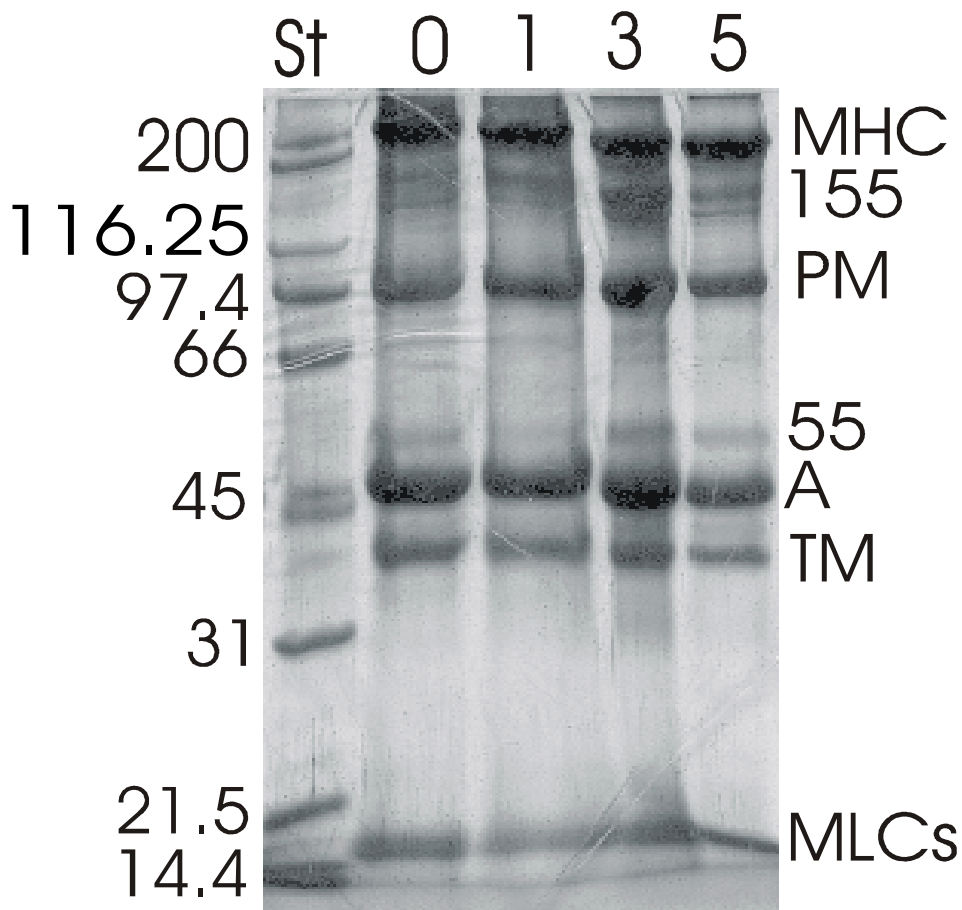


Figura 1. Perfiles electroforéticos de los geles en SDS-PAGE 10 % de la actomiosina de aletas de calamar almacenadas congeladas a -30°C , MHC: cadena pesada de miosina, 200kDa; PM: paramiosina, 100kDa; A: actina, 45kDa; TM, tropomiosina: 35kDa; MLCs: cadenas livianas de miosina, 17-20kDa. St: estándares de peso molecular. 0 (sin congelar), 1, 3, 5 (30; 60 y 150 días de almacenamiento congelado, respectivamente).

Tabla 1. Porcentajes relativos de miosina (M), actina (A), paramiosina (PM); relaciones M/A y M/PM de la actomiosina de aletas de calamar almacenadas congeladas.

Tiempo(días)	Relación ^a				
	M	A	PM	M/A	M/PM
0	43.65±0.5 b	22.74±4.9 ^b	13.14±1.4 ^b	2.12±0.6	3.35±0.5
30	41.77±0.7 b	23.33±2.6 ^b	19.46±4.9 ^b	1.81±0.3	2.29±0.7
60	32.35±0.4 c	25.54±3.1 ^b	20.70±2.0 ^c	1.38±0.2	1.57±0.2
90	36.08±4.1 b	27.65±2.8 ^b	14.59±3.4 ^b	1.37±0.4	2.17±0.1
150	31.69±0.8 c	26.41±2.5 ^b	16.79±3.1 ^b	1.21±0.2	1.96±0.5

^a Valores promedios ± SD (n=4)

^{b-c} Diferentes supraíndices indican diferencias significativas entre datos de cada columna (p<0,05)

Los resultados de solubilidad de proteínas se muestran en la Figura 2. La solubilidad de las proteínas no cambia significativamente (p>0,05) durante el periodo de almacenamiento analizado. Otros autores han detectado un aumento de la solubilidad con posterior caída durante el almacenamiento de manto de calamar (*Illex coindetii*) congelado (Ruiz-Capillas y col, 2002). Una caída en la extractabilidad de actomiosina del manto de distintas especies de calamar con el almacenamiento congelado, ha sido previamente descrita (Iguchi y col, 1981; Paredi y Crupkin, 1997).

En la Tabla 2 se muestran los valores de hidrofobicidad superficial y de viscosidad reducida de la actomiosina obtenida de aletas de calamar a tiempo cero (frescas) y a distintos periodos del almacenamiento. La hidrofobicidad superficial no mostró cambios significativos con el tiempo de almacenamiento congelado. En cambio, la VER disminuyó significativamente (p<0,05) a los 90 días. Resultados similares fueron informados para actomiosina aislada periódicamente del manto del calamar (*Ommaastrephes sloani pacificus*) (Iguchi y col, 1981). Una caída semejante en la viscosidad aparente del extracto proteico del manto del calamar *Illex coindetii*, también ha sido observada (Ruiz-Capillas y col, 2002).

Tabla 2. Hidrofobicidad superficial (So ANS) y viscosidad reducida (VER) de actomiosina de aletas de calamar almacenadas congeladas a -30°C .

TIEMPO(días)	VISCOSIDAD ^a	HIDROFOBICIDAD ^a
0	3.84 ± 0.38^b	$23,15 \pm 5,19^b$
30	$3,26 \pm 0,70^b$	$22,32 \pm 0,27^b$
90	2.17 ± 0.21^c	$22,59 \pm 2,37^b$
150	2.48 ± 0.42^c	$20,98 \pm 3,98^b$

^a Valores promedios \pm SD (n=4) ^{b-c} Diferentes supraíndices indican diferencias significativas entre datos de cada columna ($p < 0,05$)

En la Figura 3 se observa el comportamiento del IAE y EE de la AM de aletas durante el almacenamiento congelado. El IAE se incrementó significativamente ($p < 0,05$) a los 30 días de almacenamiento congelado y luego disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) a los 150 días. El incremento en el IAE podría deberse a

A la presencia de actividad proteolítica (Figura 1 y Tabla 1). Este incremento en la actividad proteolítica podría actuar mejorando ésta característica funcional (Figura 3). No se observaron cambios en la EE con el tiempo de almacenamiento congelado. Un resultado similar fue recientemente informado para actomiosina purificada de manto de calamar (*Illex argentinus*) almacenado congelado (Mignino y col., 2004). A tiempo cero el IAE y EE de los extractos proteicos de las aletas de calamar fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los correspondientes de actomiosina. Estos valores no mostraron cambios significativos con el tiempo de almacenamiento (Datos no mostrados). Algunos autores han atribuido estos altos valores a la presencia de las proteínas sarcoplásmicas, las cuales actuarían favoreciendo la capacidad emulsificante (Borderías y Montero, 1985; Tsai y col, 1972).

CONCLUSIONES

La desnaturalización de la AM de aletas de calamar durante el almacenamiento congelado esta relacionada, en una primera etapa, con la presencia de actividad proteolítica que favorece el incremento en el IAE. En la etapa siguiente tiene lugar un proceso de desnaturalización- agregación de la AM.

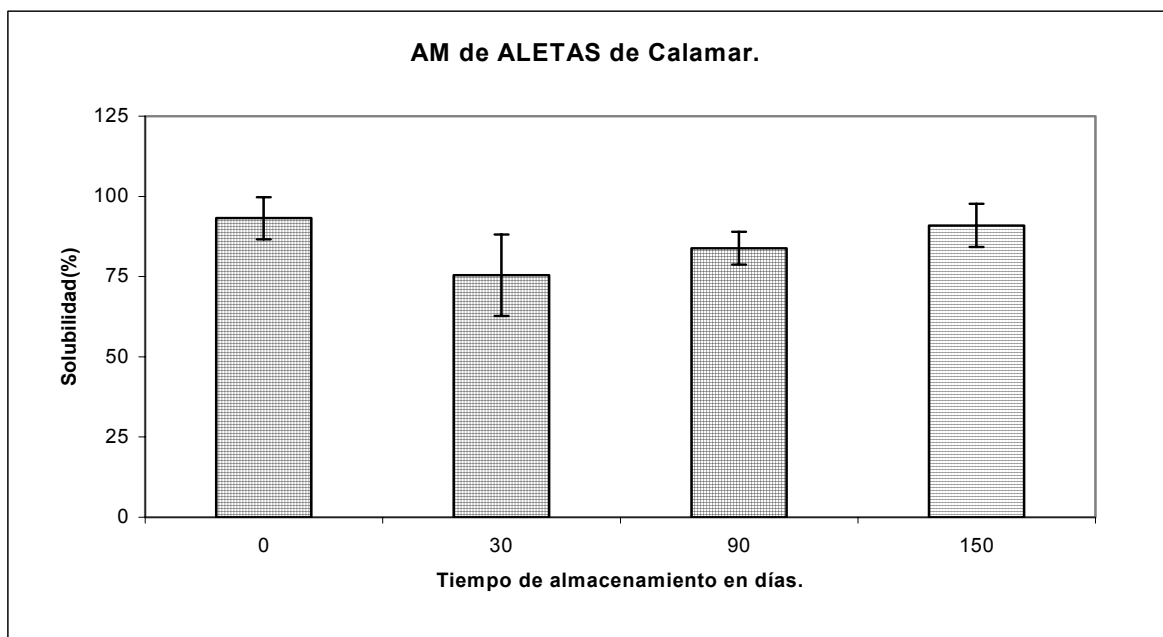


Figura 2. Solubilidad de proteínas de aletas de calamar almacenadas congeladas a -30°C . Se representan los valores promedios \pm SD (n=4)

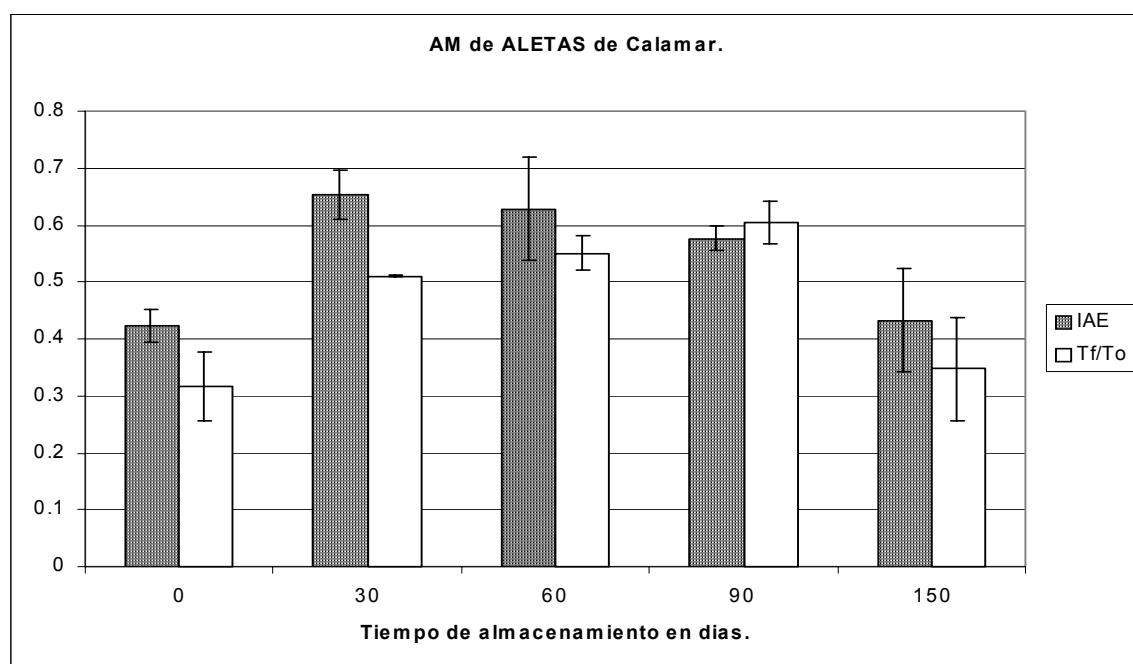


Figura 3. Índice de Actividad Emulsificante (IAE) y Estabilidad de la Emulsión (EE) de actomiosina de aletas de calamar almacenadas congeladas a -30°C . Se representan los valores promedios \pm SD (n=4)

BIBLIOGRAFIA

Borderías, A.J. Y Montero, P. (1985) Changes in fish muscle collagen during

frozen storage. Storage lives of chilled and frozen fish and fish products. In: Storage lives of fresh and frozen fish and fish products. International Institute of Refrigeration. Ed. Refrig. Sci. and Tech, 85-92.

Crupkin, M; Barassi, C.; Martone, C. B.; Trucco, R.E. (1979). Effect of storing hake (*M. hubbsi*) on ice on the viscosity of the extract of soluble muscle protein. J. Sci. Food Agric. 30, 911-914.

Iguchi, S.M.M.; Tsuchiya, T. y Matsumoto, J.J. (1981). Studies on the freeze denaturation of squid actomyosin. Bull. Jpn. Sc. Sc. Fish. 47: 1499- 1506.

Joseph, J.; Varma, P.R.G.; Venketaraman, R. (1977) Iced and frozen storage of squid (*Loligo sp.*) Fish Technology. 12. 13-20

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage, T4. Nature 227, 680-685

Li-chan, E., Nakai, S. y Wood, D.F. (1985). Relationship Between Functional (Fat Binding, Emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. J.Food Sci. 50, 1034-1040.

Lowry, O.H.; Rosebrought, N.J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275

Mackie, J. M. (1993). The effect of freezing of flesh proteins. Food Rev. International 9 (4), 575-610.

Matsumoto, J. J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. In Chemical Deterioration of proteins; Whitaker, J., Fujimaki, M., Eds.; ACS Symposium Series 123; American Chemical Society: Washington, DC, 95-109

Mignino, L.; Crupkin, M.; Paredi, M.E.(2004). Efecto del almacenamiento congelado sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de manto de calamar (*Illex argentinus*). Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los alimentos. 24-26noviembre, 2004. Córdoba, Argentina.

Moral, A.; Tejada, M.; Borderias, A. (1983) Frozen storage behaviour of squid (*Loligo vulgaris*). Int. J. Refrig.

Paredi, M.E.; De Vido De Mattio, N. ; Crupkin , M. (1990). Biochemical properties of actomyosin of cold stored striated adductor muscle of *Aulacomya ater ater* (Molina). Journal of Food Sci. 55 (6), 1567-1570.

Paredi, M. E.; Crupkin, M. (1997). Biochemical properties of actomyosin from frozen stored mantles of squid (*Illex argentinus*) at different sexual maturation stages. J. Agric. Food Chem. 45, 1629-1632

Pearce, K.; Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation

of a turbidimetric technique. J. Agric. Chem. Vol. 26, N3, 716-726.

Redes, (2004). Revista de la Industria Pesquera Argentina. Mayo/ Junio, N°136

Rodger, G.; Weddle, R. B.; Craig, P.; Hasting, R.(1984) Effect of alkaline protease activity on some properties of comming squid. J. Food Sci. 49(1): 117-123.

Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J. ; Montero, P. (2002).The effect of frozen storage on the functional properties of the muscle of volador (*Illex coindetti*). Food Chemistry.78.(2), 148-156.

Shenouda, Y.K. (1980). Theorie of the protein denaturation duiring frozen storage of fish flesh. Adv. Food. Res., 26: 275-311.

Sikorski, Z. E.; Olley, J ; Kostuch, S. (1976). Protein changes in frozen fish. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 8(1), 97-129.

Sikorski, Z.E. (1978). Protein changes in muscle foods due to freezing and frozen storage. International Journal of Refrigeration.1, 173-175

Statistics/Mac (1994). Statistica for Macintosh; Sttatsoft Inc.: Tulsa, OK.

Tsai, R, Cassens, R.G. y Briskey, E.J. (1972). Emulsifying properties of purified muscle proteins. J. Food Sci. 37, 286-288.

Xie, Y.R. Y Hettiarachchy, N.S. (1997). Xantham gum effects on solubility and emulsification properties of soy protein isolate. J.Food Sci. 62, N°6, 1101-1104.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), a la Universidad Nacional de Mar del Plata, y al Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI-MDP.

ALMACENAMIENTO REFRIGERADO DE ESPINACA (*Spinacia oleracea L.*) ORGÁNICA

MOYANO, Patricia C.¹, SALVADORI, Viviana O.^{1,2}, MASCHERONI, Rodolfo H.^{1,2}

¹CIDCA) - Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - CONICET

Calle 47 y 116 (B1900AJJ) La Plata - ARGENTINA

Tel. / Fax: (0221) 4890741 / 4254853 / 4249287 - e-mail: pmoyano@exa.unrc.edu.ar

²MODIAL - Facultad de Ingeniería, UNLP

RESUMEN

Los productos orgánicos son obtenidos a partir de sistemas agropecuarios cuyo principal objetivo es producir alimentos sanos y abundantes, respetando el medio ambiente sin el agregado de pesticidas y fertilizantes químicos. La gran demanda y el creciente interés por ellos ha estimulado el estudio de diferentes tratamientos postcosecha con el fin de prolongar la vida útil del producto en forma natural. El propósito del presente trabajo es la determinación de características físicas y microbiológicas de espinaca orgánica almacenada por 15 días, evaluando además los efectos de un pretratamiento de lavado con agua. El tratamiento produjo claras ventajas respecto a la apariencia e higiene de las espinacas, principalmente los primeros días de almacenamiento, ya que proporcionó una mayor estabilidad en el color, sin afectar la textura y disminuyendo el número de microorganismos de las distintas poblaciones evaluadas. La población de las Enterobacterias fue la más afectada descendiendo 250 veces su cantidad.

Palabras claves: Espinaca; Almacenamiento refrigerado; Alimentos orgánicos.

ABSTRACT

Organic products are obtained from agricultural systems whose principal aim is to produce healthy and abundant food, respecting the environment without the aid of chemical pesticides and fertilizers. The great demand and the increasing interest of consumers for them have stimulated the study of different post harvest treatments in order to prolong the product's shelf-life in natural form. The objective of this work is the determination of physical and microbiological characteristics of organic spinach stored by 15 days, evaluating the effects of a water washing treatment. The treatment produced clear advantages with regard to spinach appearance and hygiene, principally during the first days of storage, since it provided color stability, without texture modification and reduced

the microorganism number of the different evaluated populations. The enteric bacteria group was the most affected, diminishing 250 times.

Keywords: Spinach, Refrigerated storage, Organic foods.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales orgánicos son obtenidos a partir de un sistema agropecuario cuyo principal objetivo es producir alimentos sanos y abundantes, respetando el medio ambiente sin el agregado de pesticidas y fertilizantes químicos. La gran demanda y el creciente interés por los productos vegetales obtenidos por cultivos orgánicos ha estimulado el estudio de diferentes tratamientos postcosecha, con el fin de prolongar la vida útil del producto en forma natural.

La espinaca (*Spinacia oleracea L*) es una hortaliza muy perecedera debido a su rápida senescencia, deshidratación y ataque de patógenos. La apariencia del producto fresco determina, en gran medida, la elección del consumidor y está dada principalmente por rasgos de tamaño, forma, textura, color y frescura (1).

La textura de los alimentos se define como el "conjunto de características físicas percibidas por el sentido del tacto, se relaciona con la deformación, desintegración y flujo del alimento bajo la aplicación de fuerza y es medida objetivamente por funciones de fuerza, tiempo y distancia" (2). El color percibido por el ojo está dado por los pigmentos, clorofilas y carotenos, junto con factores morfológicos de la superficie que reflejan y refractan la luz visible. La frescura incluye las condiciones físicas del producto, principalmente el contenido o porcentaje de humedad. En la mayoría de frutas y vegetales, una disminución de sólo 5-10% en la humedad es suficiente para hacer que el producto pierda posibilidades de comercialización (1).

El tipo y cantidad de microorganismos presentes en los vegetales es, sin duda, uno de los principales factores relacionados directamente con su vida útil, además de representar, muchas veces, una amenaza a la salud del consumidor.

El número de microorganismos Mesófilos y Psicrófilos es indicador de las características higiénicas generales del alimento, mientras que altos valores de Enterobacterias se relacionan con la presencia de patógenos y pueden acarrear riesgos para el consumidor (3). Por este motivo, son muy valorados los tratamientos que disminuyen la carga microbiana, sin afectar la sanidad ni la calidad del vegetal.

El número y clase de microorganismos en productos frescos es ampliamente variable, por ejemplo los microorganismos mesófilos se pueden encontrar en un rango de 10^3 - 10^9 UFC/g (4). En nuestro país la Legislación no especifica acerca del número máximo de

microorganismos permitidos para comercializar este tipo de productos, mientras que la legislación francesa indica un máximo de 5×10^4 UFC/g en la fase de producción y de 5×10^7 en la fase de consumo (5).

El propósito del presente trabajo es determinar características físicas, tales como textura, color y humedad, y el número de microorganismos de cuatro grupos principales en espinaca orgánica, almacenadas por 15 días y evaluando, además, los efectos de un pretratamiento de lavado con agua de red.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Espinacas

Las espinacas (*Spinacia oleracea L*) fueron recibidas el mismo día de cosecha directamente de quintas dedicadas a la producción de vegetales orgánicos ubicadas en el cinturón hortícola de la ciudad de La Plata.

2.2 Tratamiento

Las hojas de espinacas se dividieron en dos grupos. El primero fue sumergido 2 veces durante 2 minutos en agua de red, quitando la mayor parte de tierra y residuos de hojas muertas, posteriormente fue centrifugado con centrífuga de mano y almacenado. El segundo grupo se utilizó como control sin realizarle ningún tratamiento. Ambos grupos fueron almacenados por 15 días a 5°C realizando periódicamente estudios físicos y microbiológicos.

2.3 Análisis Físicos

2.3.1 Textura

Para las mediciones de textura se utilizó un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems. Durante cada ensayo se realizaron medidas de fuerza en compresión utilizando guillotina como sonda. La velocidad de los mismos fue de 1.0 mm/s en una distancia de 10.0 mm y con una fuerza de 5 g. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software “Texture Expert Excede” para obtener los valores de fuerza máxima requerida para realizar la prueba.

Las mediciones de textura se realizaron el 1º, 4º y 14º día de almacenamiento .

2.3.2 Color

El color superficial de las hojas de espinaca se midió con colorímetro Minolta CR 300 Series (Japón), utilizando el sistema de color $L^*a^*b^*$. En este sistema el parámetro L^* de luminosidad se asocia al brillo de la muestra y varía entre 0 para el negro mate a 100 para el blanco. El parámetro a^* representa la variación rojo-verde, tomando valores positivos para el primero y negativos para el segundo, mientras que el parámetro b^* representa la

variación amarillo-azul, siendo positivo para el primero y negativo para el segundo. Los valores de a^* y b^* obtenidos se utilizaron para calcular el Hue (Tono) y el Chroma (Intensidad).

2.3.3 Porcentaje de Humedad

El porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia de masa entre la muestra fresca y seca a peso constante, utilizando una estufa de vacío GALLENKAMP a 80°C.

2.4 Análisis Microbiológico

En el análisis microbiológico se determinó el número de microorganismos pertenecientes a cuatro grupos (Mesófilos, Psicrófilos, Enterobacterias y Hongos-Levaduras). Las bacterias mesófilas y psicrófilas fueron cultivadas en Agar Recuento en Placa durante 24-48 hs. a 37°C y 5-7 días a 10°C, respectivamente. Las Enterobacterias fueron incubadas en Agar Violeta-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa por 24 hs a 37°C. El recuento de Hongos y Levaduras se realizó en Agar Glucosa Cloranfenicol luego de incubar durante 3-5 días a 25°C. Todas las determinaciones microbiológicas se realizaron en tres diluciones decimales consecutivas de las muestras y por duplicado.

2.5 Análisis Estadístico

Se analizaron los datos estadísticamente mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un α de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis físicos

3.1.1 Textura

Si bien la Tabla 1 muestra que las espinacas tratadas son más tiernas (valores menores de fuerza) que las muestras control, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los grupos, como así tampoco se apreció variación dentro de cada grupo en los sucesivos días de almacenamiento (Tabla 1). Esto puede deberse a que la variación en el tamaño y forma de las hojas de espinaca dentro de cada muestra provocó grandes desviaciones entre los replicados y de allí el análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre los grupos de espinacas lavadas y sin lavar.

3.1.2 Color El color de las muestras (Figura 1) se midió periódicamente. La mayor diferencia entre espinacas tratadas y control se vió a la semana de almacenamiento (día 7) en los tres parámetros (L^* , Hue y Chroma). Por otra parte, se observó mayor estabilidad durante el almacenamiento en las espinacas sometidas a lavado que en las control.

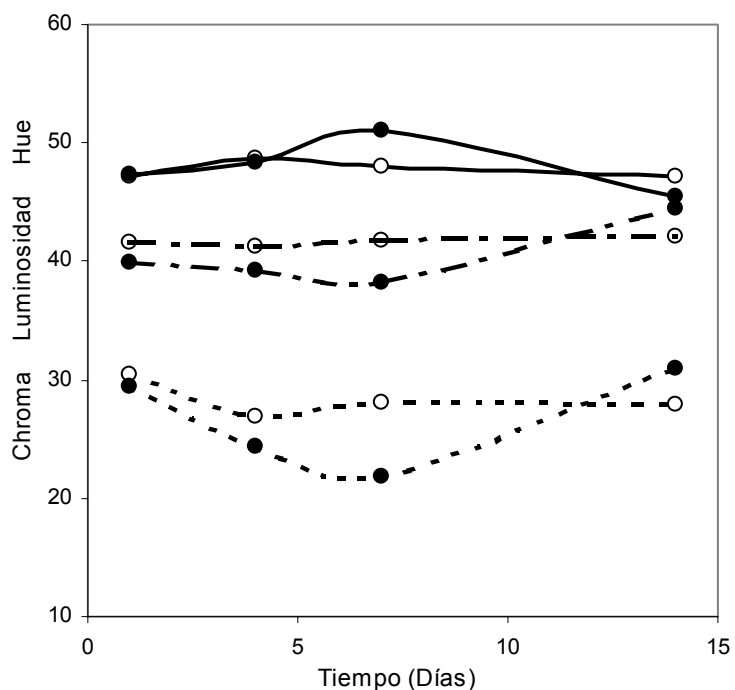


Figura 1: Valores de Luminosidad (L^*) (—), Hue (---) y Chroma (- -) en espinacas tratadas (o) y control (•) en los sucesivos días de almacenamiento.

Tabla 1: Textura (expresada en gramos) de los grupos de espinacas tratadas y control, en el 1°, 4° y 14° día de almacenamiento. Las medidas se realizaron por quintuplicado

Días de almacenamiento	Grupo Tratado	Grupo Control
1	223 ± 53	288 ± 106
4	237 ± 84	308 ± 133
14	182 ± 60	256 ± 81

3.1.3 Porcentaje de Humedad

Se determinó el contenido de humedad de las espinacas al momento de ser recibidas (día 0) y de los grupos de espinacas lavadas y sin lavar el 4°, 7° y 14° día luego del tratamiento (Tabla 2).

El porcentaje de agua de las espinacas lavadas aumentó un 1.6% en los primeros días de almacenamiento y disminuyó en los días posteriores hasta no registrarse diferencias significativas entre los grupos tratado y control.

Esto puede deberse a una absorción de agua durante el lavado o del agua residual de la centrifugación y una posterior pérdida hacia el ambiente, equilibrándose de esta manera con el grupo control.

Tabla 2: Porcentaje de humedad de las espinacas al momento de ser recibidas (Día 0) y de los grupos de muestras tratadas y control en los días posteriores de almacenamiento (Días 4, 7 y 14).

Día 0	Día 4		Día 7		Día 14	
Inicial	Grupo tratado	Grupo control	Grupo tratado	Grupo control	Grupo tratado	Grupo control
91.6	92.9	91.8	92.9	92.3	92.1	92.0

Nota: Las muestras se analizaron por triplicado y mostraron desviaciones estándar menores a 0.01.

3.2 Análisis Microbiológico

Se cuantificó el número de microorganismos Psicrófilos, Mesófilos, Enterobacterias y Hongos-Levaduras cada tres días de almacenamiento durante 15 días.

En la Figura 2 se muestra el número de microorganismos Mesófilos, Psicrófilos, Enterobacterias y Hongos-Levaduras en función del tiempo de almacenamiento.

El número inicial de microorganismos en las espinacas del grupo control fue de 2.3×10^5 UFC/g, 1.1×10^7 UFC/g, 1.3×10^6 UFC/g, 8.8×10^5 UFC/g para Mesófilos, Psicrófilos, Enterobacterias y Hongos-Levaduras, respectivamente. Luego del tratamiento de inmersión en agua se encontró 1.8×10^4 UFC/g, 2.1×10^6 UFC/g, 5.0×10^3 UFC/g, 2.9×10^5 UFC/g en los respectivos grupos, mostrando en todos los casos una reducción en el número de microorganismos.

El tratamiento de lavado con agua disminuyó el número de microorganismos de las poblaciones en distinta medida según su tipo. Claramente, el grupo más afectado fue el de las Enterobacterias descendiendo aproximadamente 250 veces, mientras que en los restantes grupos el número de microorganismos se redujo 13 veces para Mesófilos, 5 veces para Psicrófilos y 3 veces para Hongos-Levaduras.

Las diferencias iniciales entre el número de microorganismos de espinacas tratadas y control se hicieron menores con los sucesivos días de almacenamiento, alcanzando concentraciones similares y del orden de 2.5×10^8 UFC/g, 2×10^7 UFC/g, 7×10^6 UFC/g para Psicrófilos, Enterobacterias y Hongos-Levaduras, respectivamente. En el caso de las

bacterias mesófilas se encontraron diferencias significativas incluso al finalizar el almacenamiento, el grupo tratado presentó 1.6×10^6 UFC/g, mientras que el grupo control alcanzó 1.4×10^7 UFC/g, aproximándose al límite de 5×10^7 UFC/g establecido por la legislación francesa, para vegetales en etapa de consumo.

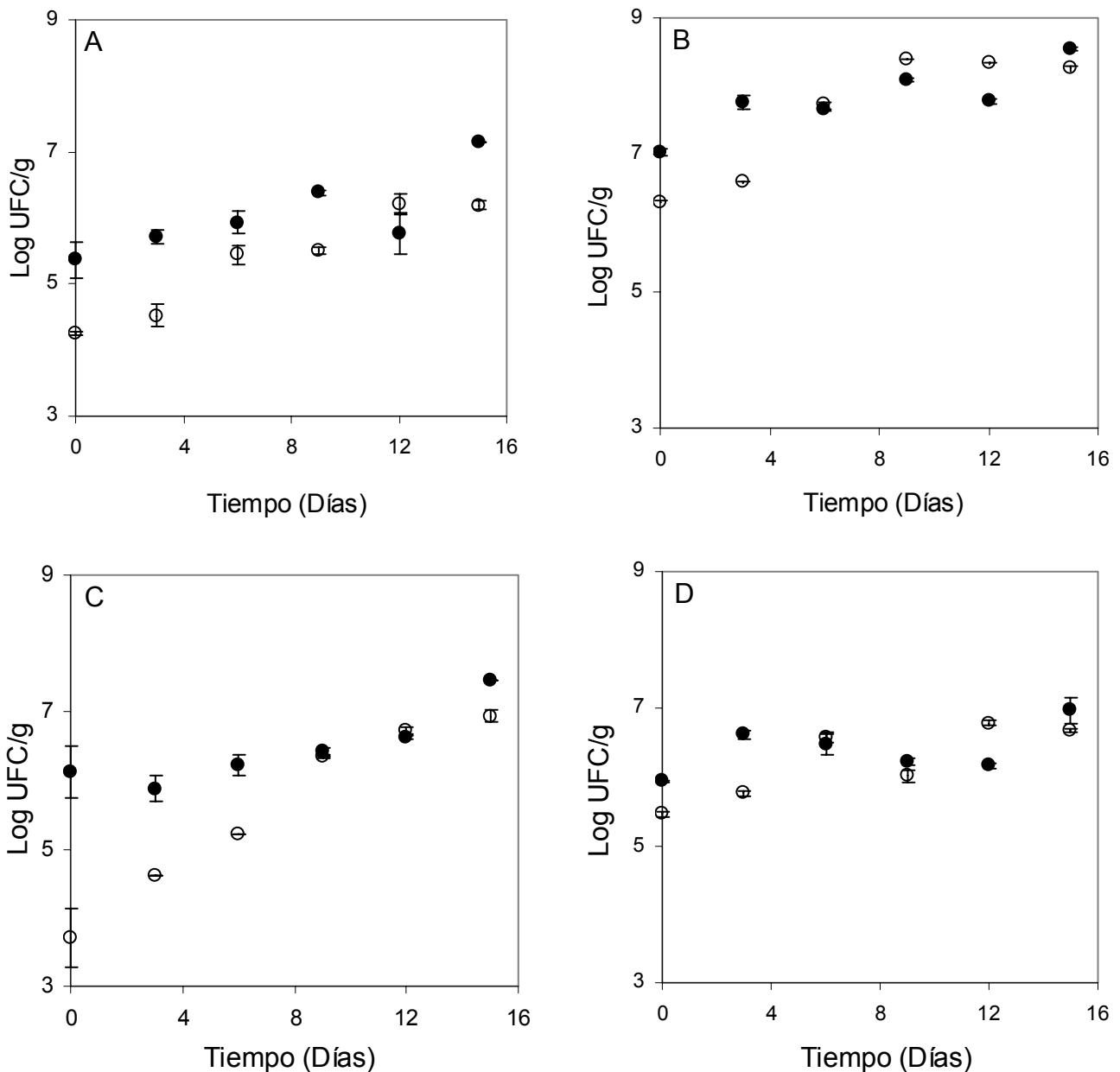


Figura 2 (A) Mesófilos (B) Psicrófilos (C) Enterobacteria y (D) Hongos-Levaduras en espinacas tratadas (o) y control (●) durante 15 días de almacenamiento refrigerado a 5°C.

CONCLUSIONES

El tratamiento de lavado con agua de espinacas orgánicas conduce a diferencias en el color, contenido de humedad y carga microbiana durante el amacenamiento refrigerado.

Los parámetros L*, Hue y Chroma que definen el color, se mantienen más estables a través del tiempo cuando las espinacas son lavadas. Esto podría estar relacionado con el aumento en el porcentaje de humedad observado, el que estimularía la continuidad de los procesos fisiológicos del vegetal, retardando la senescencia y deshidratación, prolongando la vida útil del producto.

En coincidencia con lo afirmado por Zagory (4), encontramos que los efectos del tratamiento con agua sobre las distintas poblaciones microbianas difieren según el tipo de microorganismos, probablemente esto se deba a que las bacterias epifíticas son más perjudicadas que las que están dentro del tejido del vegetal.

Podemos concluir que el tratamiento de lavado con agua de red proporciona claras ventajas respecto al color, porcentaje de humedad y carga microbiana en espinacas orgánicas almacenadas a 5°C, principalmente durante los primeros días, luego de este tiempo las diferencias disminuyen equilibrando la calidad de ambos grupos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kays, S. (1999). "Preharvest factors affecting appearance" *Postharvest Biology and Technology*, **15**: 233-247.
- (2) Sams, C. (1999). "Preharvest factors affecting postharvest texture" *Postharvest Biology and Technology*, **15**: 249-254.
- (3) http://www.unavarra.es/genmic/programa%20microbiologia_general.htm.
- (4) Zagory, D. (1999). "Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations". *Postharvest Biology and Technology*, **15**: 313-321.
- (5) Moreira, M.; Roura, S.; del Valle, C. (2003). "Quality of Swiss chard produced by conventional and organic methods". *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **36**: 135-141.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con fondos provenientes de CONICET, ANPCyT (PICT 99/09-7134) y Universidad Nacional de La Plata.

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE PROTEINAS DE MUSCULO DE SALMON DE MAR DURANTE EL ALMACENAMIENTO REFRIGERADO

TIRONI, Valeria A.; TOMAS, Mabel C. y AÑÓN, Maria C.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (UNLP - CONICET) - 47 y 116, La Plata, tel/FAX: 0221-4254853. E-mail: vtironi@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

El salmón de mar es un recurso pesquero muy apreciado por la calidad de su carne. El objetivo de este trabajo fue analizar cambios en las proteínas musculares durante el almacenamiento refrigerado. Se almacenó músculo picado a 1 ± 1 °C, realizándose estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC), solubilidad proteica, electroforesis (SDS-PAGE), lisina disponible y gelación térmica (80 °C, 45 min). Se registró una disminución en la estabilidad térmica de la miosina y la actina y una desnaturalización de la miosina en función del tiempo de almacenamiento. La concentración de proteínas totales y miofibrilares solubles disminuyó a los 6 días, aumentando posteriormente, mientras que sus perfiles electroforéticos mostraron un incremento en la intensidad de bandas correspondientes a polipéptidos de baja masa molecular, disminuyendo los de alta masa. El contenido de lisina disponible disminuyó durante el almacenamiento. La firmeza de los geles aumentó a los 7 días de almacenamiento.

ABSTRACT

Sea salmon is a very appreciated seafood. The aim of this work was to analyze changes in muscle proteins during the chilling storage. Minced muscle was stored at 1 ± 1 °C and differential scanning calorimetric (DSC), protein solubility, electrophoresis (SDS-PAGE), available lysine content and thermal gelation (80 °C, 45 min) studies were performed. A decrease in myosin and actin thermal stability and myosin denaturation were recorded. Solubility of total proteins and myofibrillar proteins decrease after 6 days of storage, increasing after this time. Electrophoretic profile of soluble fractions showed an increase of the intensity of low molecular weight polypeptides and a decrease of the high molecular mass species. Available lysine content decrease along chilling storage. Gels showed a hardness increase after 7 days of storage.

Palabras clave: salmón de mar, proteínas musculares, almacenamiento refrigerado

INTRODUCCIÓN

La actividad microbiana es el principal factor de deterioro del pescado refrigerado. Sin embargo, existe otro tipo de deterioro dado por la actividad de enzimas endógenas, el cual puede preceder u ocurrir junto con el proceso microbiano (1). Las proteínas musculares pueden sufrir distintos tipos de alteraciones durante el almacenamiento refrigerado. Así, el músculo de pescado contiene proteasas capaces de hidrolizar diferentes proteínas, tales como las colagenasas que degradan el tejido conectivo, conduciendo a cambios indeseables de la textura (2); las catepsinas lisosomales responsables de la degradación de proteínas miofibrilares y tejido conectivo en áreas de daño (1) y las calpaínas que degradan la cadena pesada de miosina (3). La autólisis proteica se relaciona con ablandamiento del tejido, formación de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que generan cambios organolépticos y pueden, en algunas especies, acelerar el crecimiento de las bacterias del deterioro (4). Dichas bacterias pueden, asimismo, poseer actividad proteolítica. Otros factores de deterioro de la fracción proteica están relacionados con la producción de formaldehído por algunas especies y la oxidación lipídica que genera compuestos que reaccionan con las proteínas, produciendo alteraciones estructurales y funcionales (5).

El salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) es una especie pesquera local muy apreciada por la alta calidad de su carne. En función de ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios estructurales y funcionales de las proteínas musculares de salmón de mar durante el almacenamiento refrigerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ejemplares de salmón de mar provenientes del puerto de Mar del Plata, los cuales fueron procesados según mediante: lavado externo con agua de red, separación del músculo y de la piel para obtener dos filetes, lavado de los filetes por inmersión, picado de la carne. Se envasaron muestras de 30 g en bolsas de polietileno y se almacenaron en cámara a $1 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un tiempo superior a su período de vida útil.

A distintos tiempos de almacenamiento se realizaron los siguientes análisis:

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): Muestras de 18-22 mg de músculo, calorímetro Polymer Laboratories (Rheometric Scientific, U.K.) provisto de un software Plus V5.41, rango de temperatura = $15 - 100^\circ\text{C}$, velocidad de calentamiento $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$. Se obtuvo la masa seca de las muestras por secado en estufa a 105°C .

Proteína total extraíble y proteínas miofibrilares solubles: Se homogeneizaron 2,50 g de músculo con 50,0 ml de buffer Tris-HCl 0,03 M, KCl 0,6 M, pH = 7. Se centrifugó (30

min, 1500 g, 4 °C) separándose el sobrenadante (*proteínas extraíbles totales PT*). A 10,00 ml del mismo se le agregaron 90,0 ml de agua destilada permaneciendo a 4 °C (16-24 h). Se centrifugó (30 min, 2100 g, 4 °C) descartando el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 5,00 ml de solución buffer Tris-HCl, KCl 0,6 M, (pH = 7) (*proteínas miofibrilares solubles PM*) (6). La concentración de proteínas solubles fue determinada por el método de Biuret.

Electroforesis: Ambas fracciones solubles fueron analizadas mediante SDS-PAGE, utilizando un gel separador en gradiente (3-15 % de poliacrilamida) y un gel apilador (3 %). Las muestras fueron tratadas con SDS, urea y 2-mercaptoetanol (ME). Las corridas fueron realizadas en un equipo Mini Protean II (BIO-RAD).

Lisina disponible: A 20 mg del sedimento proteico -obtenido por precipitación con etanol y posterior tratamiento con acetona- se agregaron 1,50 ml de metanol, 1,50 ml de buffer borato (0,5 M – pH = 9,2) y 0,20 ml de ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (20 mg/ml), agitándose durante 1 h. Se agregaron 0,20 ml de solución saturada de alanina, se agitó 20 min y se agregaron 2,00 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10 %, centrifugando a 1500 g (10 min, 15 °C). Se realizó una dilución 1/10, leyendose la absorbancia a 345 nm contra un blanco (sin muestra y sin alanina). El porcentaje de lisina disponible se calculó según:

$$\% \text{ lisina (sedimento)} = \frac{(\text{Abs r} - \text{Abs m}) \times m_{\text{TNBS}} \times M_{\text{lisina}} \times 100}{\text{Abs r} \times M_{\text{TNBS}} \times m_p}$$

donde: Abs m = absorbancia de la muestra, Abs r = absorbancia del reactivo, m_{TNBS} = masa de TNBS en el tubo de reacción (4 mg), M_{lisina} = masa molecular de la lisina, M_{TNBS} = masa molecular del TNBS, m_p = masa de precipitado proteico. A partir del contenido de proteínas del precipitado (obtenido por Kjeldhal), se calculó el porcentaje de lisina disponible con respecto a la masa de proteínas totales (7).

Gelación térmica: El músculo picado fue lavado 3 veces con agua destilada (4 °C) (5 partes de agua/parte de músculo, agitación suave, 10 min), separando el líquido mediante un colador y prensando posteriormente con gasa triple. Se agregó 2,5 % p/p de NaCl homogeneizando la pasta y manteniéndola a 4 °C (24 h) (8). Para la obtención de los geles, se colocó la pasta en tubos de vidrio tapados calentando a 80 °C, 45 min y enfriando a temperatura ambiente y luego a 4 °C. Se realizó un análisis de perfil de textura (TPA) en un texturómetro TA-TX2i (Stable Micro Systems, U.K., software Texture Expert versión 1.2). Se aplicó una compresión del 20 % (veloc. de compresión: 1 mm/seg, 5 seg entre los dos ciclos de compresión). Se calcularon los parámetros Firmeza (F), Elasticidad (E) y Cohesividad (C).

Análisis estadístico: Se realizó un análisis de varianza (ANAVA), y se compararon las medias mediante el test de LSD de Fisher ($p < 0,05$), utilizando el programa SYSTAT (9)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): El músculo de salmón de mar presentó dos endotermas. La primera de ellas -atribuida principalmente a la desnaturalización de la miosina (10)- mostró una temperatura de pico $T_{m\acute{a}x} = 50,6 \pm 0,9$ °C, mientras que para la segunda -atribuida principalmente a la desnaturalización de la actina- ésta fue de $76,6 \pm 1,0$ °C (Figura 1.a.). El cambio en la entalpía de desnaturalización proteica presentó los siguientes valores: $\Delta H_{mio} = 8,8 \pm 1,6$ J/g; $\Delta H_{act} = 1,6 \pm 0,7$ J/g; $\Delta H_{total} = 10,4 \pm 1,6$ J/g. Luego de 7 días de almacenamiento refrigerado, la miosina no presentó cambios en su $T_{m\acute{a}x}$ aunque pudo observarse la aparición de un pequeño hombro entre los 54 y 55 °C, mientras que, la actina mostró una temperatura de desnaturalización menor ($72,9 \pm 0,4$ °C) (Figura 1.b). A los 9 días de almacenamiento, la primera transición se desdobló en dos picos ($49,9 \pm 0,3$ y $54,0 \pm 0,3$ °C), mientras que la correspondiente a la actina disminuyó aún más su $T_{m\acute{a}x}$ ($67,7 \pm 0,4$) (Figura 1.c).

Luego de 13 días, los termogramas registrados fueron similares aunque la temperatura correspondiente al primer pico de miosina fue levemente menor (Figura 1.d).

Los perfiles térmicos registrados en la última etapa del almacenamiento son similares a los correspondientes a las proteínas miofibrilares aisladas (11), sugiriendo que los cambios en la estabilidad térmica detectados estarían relacionados principalmente con una ruptura de la estructura normal de los miofilamentos. Por otra parte, se observaron cambios en las entalpías de desnaturalización en función del tiempo de almacenamiento (Figura 2), presentando la miosina una disminución significativa ($p < 0,05$) a los 7 días; permaneciendo aproximadamente 40 % de esta proteína en estado nativo (calculado como el cociente entre el ΔH correspondiente y el ΔH al inicio del almacenamiento). Dicho porcentaje disminuyó a 20 y 15 % para 9 y 13 días de almacenamiento, respectivamente. La actina no mostró cambios significativos en su entalpía de desnaturalización en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

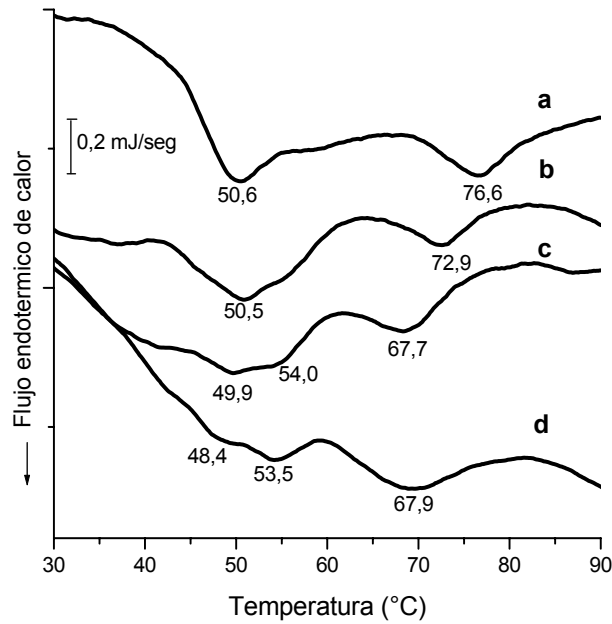


Figura 1. Termogramas DSC de músculo de salmón de mar correspondientes a distintos tiempos de almacenamiento: a) día 1, b) día 7 c) día 9 d) día 13.

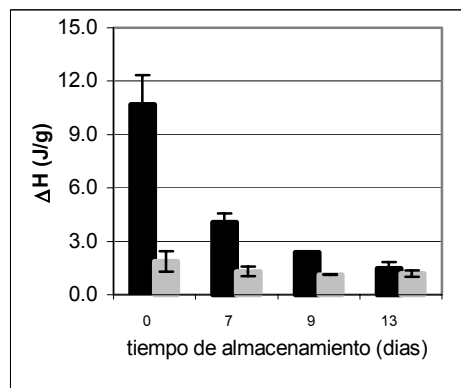


Figura 2. Cambio en las entalpías de desnaturalización de la miosina (barras negras) y la actina (barras grises) en función del tiempo de almacenamiento refrigerado

Solubilidad de proteínas: Los valores de solubilidad al inicio del almacenamiento fueron (g/100 g de músculo): $PT = 7,6 \pm 0,5$; $PM = 1,3 \pm 0,2$. La relación de PM/PT % fue de $16,9 \pm 3,3$ %. Este valor es muy inferior al esperado y está dado por una baja solubilidad de las PM , indicando que una proporción importante de dichas proteínas no fueron extraídas en las condiciones de ensayo empleadas. La concentración de la fracción PT disminuyó durante los primeros 6 días de almacenamiento refrigerado, aumentando levemente luego sin alcanzar los valores iniciales (**Figura 3.a**). Las PM mostraron una disminución marcada (> 40 %) durante los primeros 6 días de almacenamiento y un aumento posterior, alcanzando valores superiores a los iniciales (**Figura 3.b**). La proporción PM/PT mostró un descenso a los 6 días de almacenamiento aumentando posteriormente (**Figura 3.c**).

Dicho aumento de *PM* a los 9 días sugiere un proceso de degradación proteica, concordantemente con perfiles térmicos similares a los de las proteínas miofibrilares aisladas.

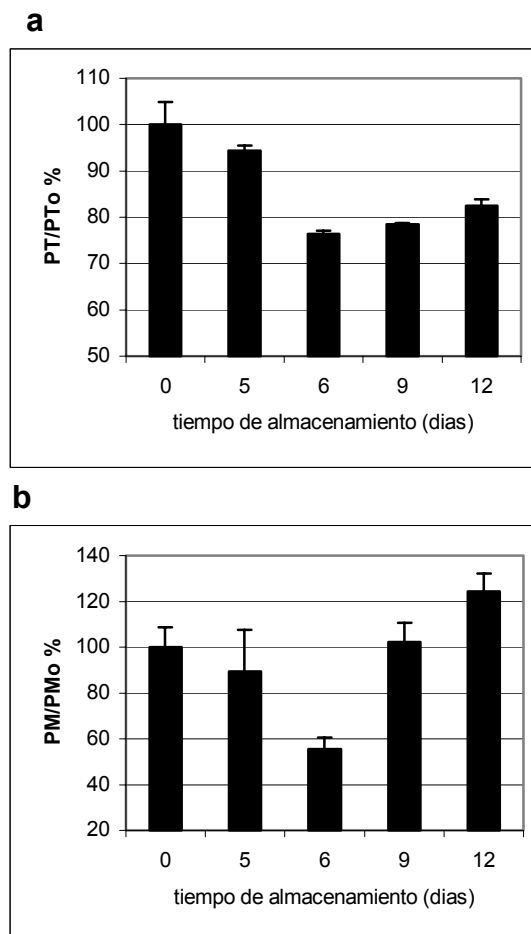


Figura 3. a y b

Figura 3. Solubilidad de las distintas fracciones proteicas: a) proteínas extraíbles totales PT; b) Proteínas miofibrilares solubles PM, expresada con respecto al valor inicial PTo, PMo respectivamente

Electroforesis: El perfil electroforético correspondiente a la fracción *PT* del día 6 no presentó diferencias con respecto a $t = 0$ (**Figura 4 - calles 2 y 3** respectivamente), sugiriendo que la insolubilización registrada involucraría a todas las especies proteicas por igual. A los 9 días de almacenamiento, se registraron algunas diferencias, tales como una disminución de la intensidad de la banda 3 (aprox. 140 kD) y aumento de la banda 4 (aprox. 90 kD) y un aumento de la intensidad de bandas de muy bajo peso molecular (menores que las cadenas livianas de miosina) (**Figura 4 - calle 4**). Dichas bandas corresponden a la fracción de proteínas sarcoplásmicas dado que no aparecen en los

perfiles de *PM*. A dicho tiempo, la fracción *PM* presentó una disminución en la intensidad de la banda 2 (entre el gel apilador y el separador), aumentando la intensidad de la MHC, de bandas entre 80 - 200 kD y otras de menor peso molecular (actina, banda 8 y MLCs) (**Figura 4 - calle 6**). Asimismo, se observó una disminución en la intensidad de la banda 5 (aprox. 81 kD) aumentando la banda que aparece inmediatamente debajo de ésta. Teniendo en cuenta el aumento de solubilidad de *PM* a los 9 días de almacenamiento y los resultados de las electroforesis, puede sugerirse una degradación de polipéptidos de alta masa molecular en sus proteínas constituyentes.

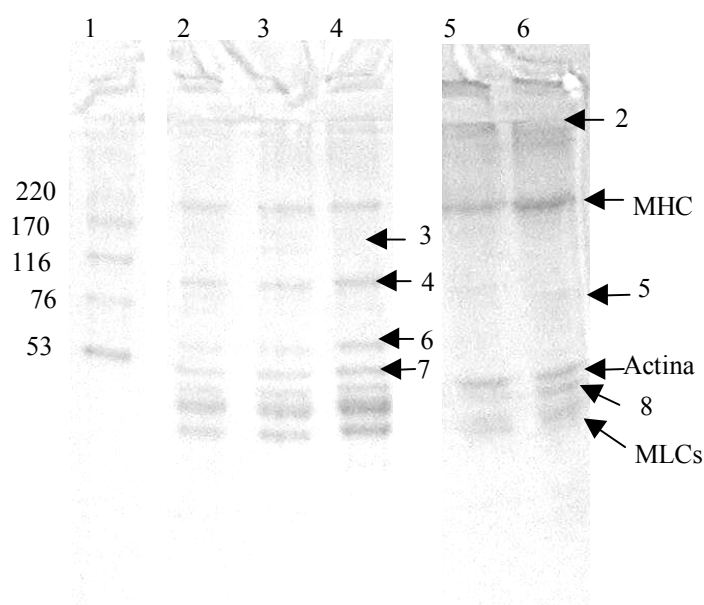


Figura 4. SDS-PAGE (en presencia de ME) de las fracciones proteicas solubles en función del tiempo de almacenamiento. Calle 1: patrón de alto peso molecular; calle 2, 3 y 4: PT (día 0, 6 y 9 respectivamente); calle 5 y 6: PM (día 0 y 9 respectivamente)

Lisina disponible: El contenido de lisina disponible de las proteínas musculares disminuyó en función del tiempo de almacenamiento refrigerado (**Figura 5**). Dicho cambio no fue significativo a los 7 días de almacenamiento pero si a los 12 días ($p < 0,05$).

Gelación térmica: Las propiedades de los geles obtenidos por tratamiento térmico del músculo lavado fueron analizadas mediante su perfil de textura TPA. Los parámetros de textura calculados pueden observarse en la **Tabla 1**. Luego de 7 días de almacenamiento a 1 °C, los geles presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) en su firmeza F, mientras que la elasticidad y cohesividad no presentaron diferencias. Las diferencias en la firmeza podrían deberse a cambios estructurales sufridos por las proteínas miofibrilares, principalmente por la miosina, tales como la desnaturalización parcial y agregación previamente mencionados.

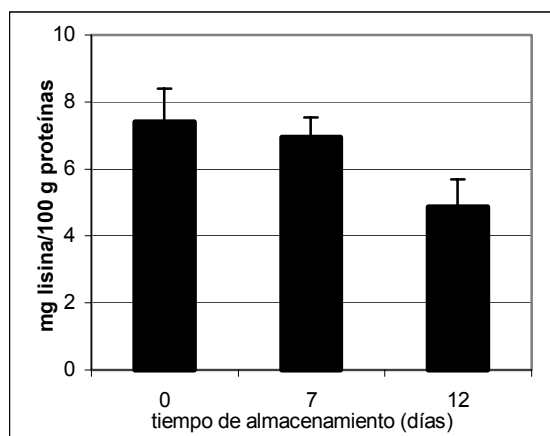


Figura 5. Lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento refrigerado de salmón de mar.

Tabla 1. Parámetros de textura de geles de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

Tiempo (días)	F (N)	E	C
0	3,80 ± 0,61	0,92 ± 0,01	0,62 ± 0,01
7	7,40 ± 1,77	0,92 ± 0,06	0,63 ± 0,01

CONCLUSIONES

Durante el almacenamiento refrigerado de músculo picado de salmón de mar ocurrieron modificaciones estructurales y funcionales de las proteínas musculares, registrándose cambios significativos durante el período de vida útil microbiológico, el cual ha sido determinado en alrededor de 6 días en las presentes condiciones de almacenamiento. En dicho período, los cambios se encuentran relacionados con una disminución en la estabilidad térmica y una desnaturalización parcial de la miosina, una insolubilización de las proteínas miofibrilares y un aumento en la firmeza de los geles obtenidos por tratamiento térmico. Sin embargo, en etapas posteriores del almacenamiento, se observaron otras alteraciones probablemente vinculadas con una desorganización de la estructura de los miofilamentos.

BIBLIOGRAFÍA

Huss, H (1998). *El pescado: su calidad y cambios de su calidad.* FAO Documento Técnico de pesca N ° 348. Roma.

Bremner, A. H. y Hallet, I. C. (1985). Muscle fiber-connective tissue junctions in the blue grenadier (*Macruronus novaezelandie*). A scanning electron microscope study. *J. Food Sci.* 50, 975-980.

Muramoto, M.; Yamamoto, Y. Y Seki, N. (1989). Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 55, 917-923.

Asknes, A. y Brekken (1988). Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin. *J. Sci. Food Agric.* 45, 53-60.

Aubourg, S. P. (1999). Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 4: 409 - 19.

Awad, A.; Powrie, W. D. y Fennema, O. (1969). Deterioration of fresh-water whitefish muscle during frozen storage at -10 °C. *J. Food Sci.*, 34, 1-9.

Contreras Guzmán, E (2003). Determinación de lisina disponible (comunicación oral).

Roussel, H.; Cheftel, J.C. (1988). Characteristics of surimi and kamaboko from sardines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23, 607 – 623.

Wilkinson, L. (1990). *Systat. The system for statistics;* SYSTAT, Inc.; Evaston, IL,.

Poulter, R. G.; Ledward, D. A., Godber, S. Hall, G. y Rowlands, B. (1985). Heat stability of fish muscle proteins. *J. Food Tech.*, 20, 203-217.

Tironi, V.A.; Tomás, M.C. and Añón M.C. (2002). Structural and functional changes in myofibrillar proteins of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*) by interaction with malonaldehyde. *J. Food Sci.*, 67, 3, 930-935.

ESTUDIOS SOBRE EL FUNCIONAMIENTO DE UN REFRIGERADOR DOMESTICO

ROCHE, Luis A., SALVADORI, Viviana O. y MASCHERONI, Rodolfo H.*

CIDCA (CONICET – UNLP). Calle 47 y 116. (1900) La Plata – ARGENTINA. Tel./Fax: (0221) 4890741/4254853/4249287. *e-mail: rhmasche@ing.unlp.edu.ar. MODIAL (Facultad de Ingeniería, UNLP). 115 e/48 y 49. (1900) La Plata

RESUMEN

Se determinó la performance de una heladera doméstica estándar nueva, de una puerta, de 294L de capacidad, descongelación semiautomática y compartimiento para congelados de "una estrella". Se midió la distribución de temperaturas con el refrigerador vacío y con la mitad de su volumen útil ocupado, a régimen normal y a régimen máximo y a dos temperaturas ambientes. Se determinó una variación de sólo 4 °C a lo largo del refrigerador vacío para ambos regímenes de funcionamiento. El funcionamiento en máximo frío disminuyó en 2 °C la temperatura promedio. Ante una apertura de puerta de un minuto, las temperaturas en los distintos compartimientos retornaron al valor anterior en 18 min (frío máximo) y 25 min (frío normal). En el refrigerador con mitad de carga las fluctuaciones en la temperatura ambiente fueron mínimas y la temperatura promedio fue algo inferior a la del refrigerador vacío. La temperatura en el compartimiento para congelados fue de -11 y -17 °C en el refrigerador vacío para frío normal y máximo, respectivamente, y de -13 °C en el refrigerador parcialmente cargado.

Palabras Clave: Refrigerador doméstico, Funcionamiento, Temperaturas, Fluctuación

ABSTRACT

The performance of a brand-new, standard one-door domestic refrigerator, with loading capacity of 294 dm³; semiautomatic defrosting and upper one-star freezing compartment, was determined. Inner temperature distribution was measured in empty and half-filled refrigerator, at normal and maximum regime and at two ambient temperatures. A variation of only 4 °C alongside the empty refrigerator, for both regimes, was determined. Operation at maximum cold lowered average temperature by 2 °C. After an one-minute door opening, temperatures in the different compartments recovered their original values within 18 min (maximum cold) and 25 min (normal cold). Temperature fluctuations in the half-filled refrigerator were minimal; average temperature was slightly lower than that of the empty one. Temperatures in the frozen food compartment were -11 and -17 °C in the

empty refrigerator for normal and maximum regime and -13 °C in the partially filled refrigerator.

Keywords: Domestic Refrigerator, Performance, Temperatures, Fluctuation

INTRODUCCION

La seguridad de los alimentos refrigerados depende primariamente de la temperatura, durante todas las etapas de su manejo, desde su producción al consumo. En la cadena de frío el refrigerador doméstico es un eslabón importante y, probablemente, al que se le ha prestado menor atención a sus condiciones de operación y el que sufre un peor control. El estándar ISO 7371 recomienda 5 °C o menos para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos. Esta exigencia así como las condiciones reales de operación del refrigerador son generalmente desconocidas por el usuario doméstico, pero también - a nivel técnico - existe muy escasa información sobre distribución de temperaturas internas, tiempo de recuperación ante apertura de puertas o carga de nuevos productos, funcionamiento ante distinta regulación del termostato, diferentes temperaturas ambientes o distinto grado de carga, etc.¹⁻⁷ Normalmente, fabricantes de equipos de refrigeración, asociaciones de consumidores, etc., proveen de folletos con indicaciones – muchas veces bien detalladas – de buenas prácticas de manejo de productos refrigerados, principalmente de distribución de alimentos en los distintos compartimientos, apertura y cierre de puertas, carga de nuevos productos, etc.^{8,9} Aún así, las conclusiones de los estudios citados son que no existe control sobre las actitudes de los consumidores y, probablemente, los alimentos son almacenados en los refrigeradores domésticos a temperaturas muy altas, con consecuencias indeseables.

En vista de lo previamente expuesto, en este trabajo – que es parte de un estudio más amplio sobre refrigeradores y congeladores domésticos - se pretende:

- **Determinar las temperaturas de un refrigerador doméstico común ante distintas temperaturas externas y regímenes de funcionamiento;**
- Verificar la influencia de distintas políticas de operación (como apertura de puertas, distinto grado de carga) sobre la respuesta térmica del sistema;
- Comprobar si se cumplen las recomendaciones sobre temperaturas en los distintos compartimientos del refrigerador.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un refrigerador doméstico de una puerta marca Electrolux, modelo 310. Sus características principales son: capacidad de carga: 294 dm³; altura total: 1499 mm;

ancho: 601 mm; profundidad: 618 mm. El descongelamiento es semiautomático (se debe actuar sobre el termostato). Posee compartimiento para congelados superior, bandeja para carnes debajo del mismo, compartimiento para frutas y vegetales en la parte inferior y anaqueles para huevos y bebidas en la puerta. La distribución es característica de las heladeras domésticas de este tipo. La Figura 1 muestra un esquema del mismo.

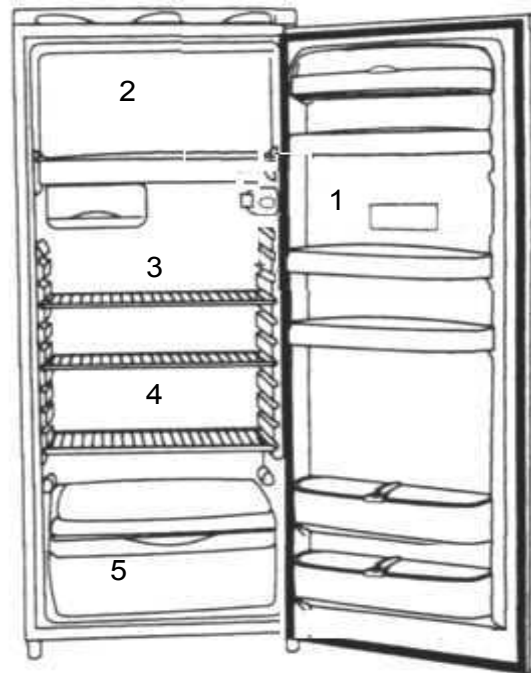


Figura1. Esquema de la heladera estudiada: 1 anaquel de la puerta; 2 compartimiento de congelados; 3 estante superior; 4 estante inferior; 5 compartimiento verduras y frutas

Este refrigerador es de los del tipo “una estrella”, es decir que su compartimiento para congelados debe tener una temperatura menor a -6°C , la que en modo alguno puede considerarse como adecuada para congelar alimentos o conservarlos por largos períodos. Las experiencias detalladas más abajo se realizaron en dos etapas: La primera en invierno, sobre el refrigerador sin uso y la segunda, en verano con el refrigerador con seis meses de uso.

En todos los casos la medida de temperaturas se realizó utilizando termocuplas de Cu-Constantan colocadas en los sitios de medida y conectadas a un equipo de adquisición de datos que permite, simultáneamente, adquirir datos a intervalos de tiempo programables, convertir la señal eléctrica a temperaturas y archivarlas en computadora para su posterior manejo.

Se realizaron distintos tipos de determinaciones:

A) Perfil de temperaturas con el refrigerador vacío, en frío máximo (7 en la escala del termostato, recomendado para temperatura ambiente mayor a 28 °C) y frío medio (3 en la escala del termostato, para temperaturas ambientes entre 18 y 28 °C) y a dos temperaturas ambientes promedio (16 y 29 °C), típicas de invierno y verano, respectivamente.

Las determinaciones se realizaron en 5 puntos de la heladera (identificados en la Figura 1): Un anaquel en la mitad superior de la puerta (1), el compartimiento para congelados (2), el estante superior (3), el estante inferior (4) y el compartimiento para verduras (5).

Las experiencias en invierno se hicieron con la heladera alejada de las paredes del recinto, mientras que las de verano lo fueron con la parte trasera de la heladera muy cercana a la pared, caso típico de la instalación doméstica. El objetivo era ver como se desempeñaba la misma en condiciones típicas del uso en el hogar, fundamentalmente verificar si se cumplen las recomendaciones habituales para almacenamiento refrigerado^{8,9}, que se pueden resumir, según las distintas posiciones en la heladera como:

- Compartimiento para congelados: Temperatura igual o inferior a -6 °C;
- Zona interior más fría (debajo del congelador): Rango de temperatura de 0 a 4 °C, fundamentalmente para carnes, embutidos, leches, cremas, quesos y postres frescos, jugos de frutas frescas;
- Zona intermedia (parte media e inferior del volumen): Rango de temperatura de 4 a 6 °C, para preparaciones caseras (como carnes cocidas), frutas y vegetales cortados, yogurs, etc.;
- Compartimiento de verduras y frutas (parte inferior del refrigerador): temperatura de alrededor de 6 °C, para frutas y vegetales frescos y quesos en maduración (empaquetados).

B) Tiempo de recuperación del refrigerador vacío ante aperturas de puertas. Se simularon las aperturas de puertas que se realizan para tomar o guardar algún alimento (más cortas) y las que corresponden a carga o reordenamiento en la heladera (más largas). Por ello se realizaron aperturas de 1, 2 y 3 minutos, con la heladera funcionando en las distintas condiciones ya citadas y se midió el ascenso de temperatura y el tiempo de recuperación hasta menos de 1 °C de la temperatura previa, para los distintos puntos del refrigerador ya señalados.

El tiempo de recuperación es una medida de la capacidad de refrigeración del equipo de frío.

C) Respuesta térmica de productos almacenados: Se trabajó a una temperatura ambiente media de 18 °C, con el refrigerador parcialmente lleno en todos sus niveles y

con el termostato en la posición 3 (frío medio). Se utilizaron tres bandejas plásticas, cada una con 750 g de carne picada, una en el compartimiento de congelados (termocuplas A en la superficie y B en el centro), otra en la bandeja para carnes (termocuplas C en la superficie y D en el centro) y la tercera en el compartimiento para frutas y verduras (termocupla E). Se registraron las temperaturas en las tres bandejas, determinándose la temperatura media durante el almacenamiento y las fluctuaciones registradas durante el funcionamiento normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Perfil de temperaturas con el refrigerador vacío. En la Tabla 1 se presenta un resumen de las determinaciones efectuadas.

Tabla 1. Funcionamiento de la heladera vacía en distintas condiciones de operación. Respuesta de distintos puntos de medida

Condiciones de operación	Temperatura Externa promedio: 16°C		Temperatura Externa promedio: 29°C	
	Frío máximo	Frío normal	Frío máximo	Frío normal
Compartimiento de congelados	-17.0 °C	-11.0°C	-6.0°C	-2.8°C
Estante superior	-1.8°C	0.2°C	-1.4°C	3.7°C
Estante inferior	-2.6°C	-0.8°C	-0.7°C	4.0°C
Compartimiento de frutas y verduras	0.9°C	3.5°C	5.0°C	9.3°C
Anaquele en la puerta	-2.2°C	0.4°C	0.4°C	5.3°C
Tiempo para recuperar a menos de 1°C de la temperatura previa, ante apertura de puerta de 1 minuto	Frío máximo	Frío normal	Frío máximo	Frío normal
Compartimiento de congelados	8 min	11 min	40 min	18 min
Estante superior	13 min	15 min	40 min	22 min
Estante inferior	8 min	9.5 min	37 min	31 min
Compartimiento de frutas y verduras	*	*	26 min	38 min
Anaquele en la puerta	18 min	25 min	39 min	16 min

*Aumento de temperatura <1 °C

Respecto de las temperaturas promedio, analizaremos los casos de frío normal en invierno (1) y frío máximo en verano (2), que son las condiciones de operación recomendadas.

Para el compartimiento de congelados, en (1) se supera con creces la exigencia de -6°C , pero en (2) apenas se cumple.

El perfil de temperaturas en el interior del refrigerador muestra una variación apenas mayor a 4°C en (1) y a 6°C en (2). Estos resultados están de acuerdo a los datos de bibliografía⁵.

Tanto en (1) como en (2) se cumple con las recomendaciones de temperaturas para los distintos compartimientos. Por lo tanto no se justifica trabajar en régimen máximo en invierno (acorde a esto, la Tabla 1 muestra que las temperaturas son más bajas en todos los compartimientos). Lo mismo no ocurre durante el funcionamiento en frío normal en verano (ver Tabla 1), donde no se cumplen las especificaciones ni para el compartimiento de congelados ni para el de frutas y verduras.

En lo que respecta a las fluctuaciones de temperatura propias del ciclo normal de funcionamiento del refrigerador: Para el caso (1) éstas están en el orden de 5°C en el compartimiento de congelados, de unos 4°C en el interior del refrigerador y de menos de 0.5°C en el compartimiento de verduras y en el anaquel de la puerta. Para la operatoria (2) fueron del mismo orden en el compartimiento de congelados y en anaquel de la puerta, algo menores en el interior (de 1.7 a 2.9°C) y mucho más amplias en el compartimiento de verduras (del orden de 5°C). En general, estos valores están en el rango de los reportados en la bibliografía.

B) Tiempo de recuperación del refrigerador vacío ante aperturas de puertas.

Si se analiza una apertura típica de un minuto se observa en (1) que el compartimiento de verduras no sufre variación de temperaturas y los otros sitios se recuperan en menos de 25 min. Para el modo de operación (2) los tiempos de recuperación son más altos, de entre 26 y 40 min. En ambos casos, se trata de valores normales que muestran un buen funcionamiento del refrigerador. Es de resaltar que para funcionamiento en verano y en régimen normal, los tiempos de recuperación son menores que para el régimen (2) (ver Tabla 1), pero ello se debe a las temperaturas más altas en el interior del gabinete refrigerado para este caso.

Es de hacer notar que aperturas de puertas por períodos mayores (2 o 3 minutos) provocan ascensos muy importantes en las temperaturas de los distintos puntos del refrigerador, alcanzándose para los 3 minutos temperaturas en el interior del refrigerador del orden de 15°C para el régimen (1) y de unos 20 a 22°C en el caso (2). En estos casos los períodos de recuperación son más largos y están en el orden de 40 min en (1) y de 50 a 55 min en (2).

C) Respuesta térmica de productos almacenados. Durante el funcionamiento normal las fluctuaciones de temperatura en los productos son mínimas, mucho menores que las del ambiente (Tabla 1). La Figura 2 muestra que en la bandeja del compartimiento de congelados (termocuplas A y B) las fluctuaciones son menores a 0.5°C , en la del de carne (C y D) menores a 0.2°C y en la del compartimiento de verduras (E) son indetectables.

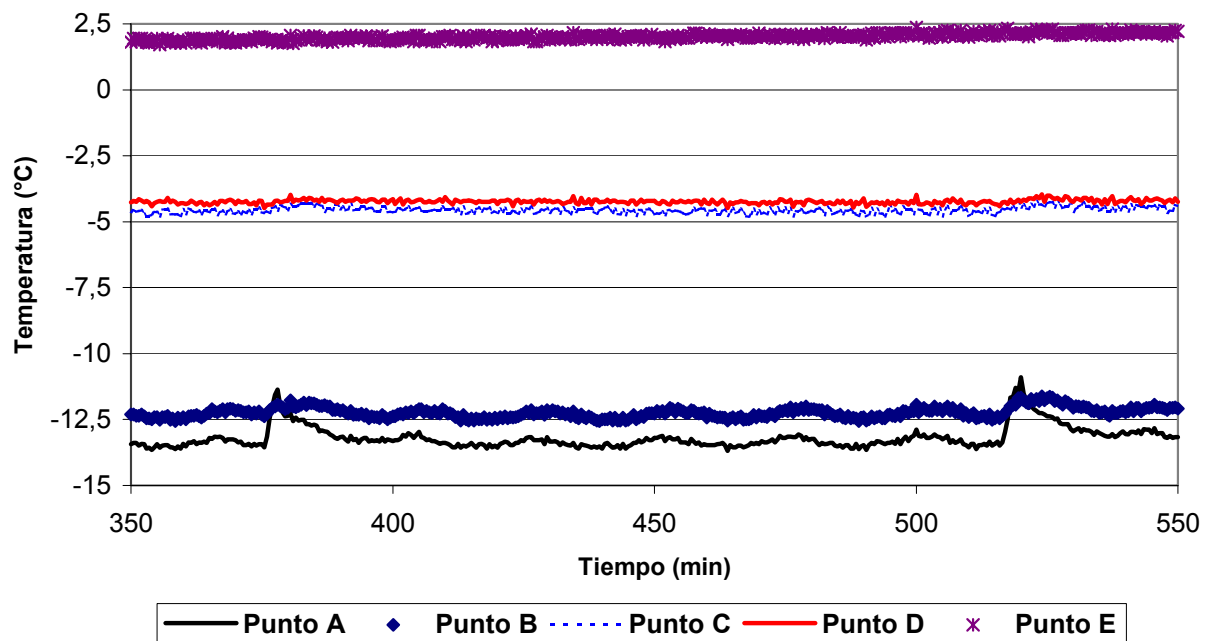


Figura 2. Respuesta térmica de bandejas de carne en heladera en régimen normal

Por otra parte, las temperaturas promedio de la heladera cargada (Figura 2) son inferiores a las de la heladera vacía funcionando en las mismas condiciones (Tabla 1). Esta observación coincide con lo publicado en bibliografía⁴, suponiéndose que los productos almacenados actúan como reserva de frío que compensa parcialmente las ganancias de calor del exterior, que son las que influyen fundamentalmente en el balance de temperatura interior para una dada condición de operación.

La respuesta térmica ante apertura de puertas también se presenta muy amortiguada en los productos almacenados, respecto de lo que ocurre en el refrigerador vacío (ver Tabla 1). Así, ante aperturas mayores a 1 minuto (ver Figura 2), la superficie de la bandeja en el compartimiento congelado eleva su temperatura menos de 2.5°C y el centro de la misma sólo 0.3°C ; en el compartimiento de carnes se eleva 0.35°C en la superficie y 0.25°C en el centro y en el compartimiento de vegetales el aumento es indetectable. El rango de estas

variaciones está de acuerdo con las detectadas en el refrigerador vacío para los distintos puntos de medida.

Se concluye que las aperturas de puertas no inciden de manera importante en la temperatura de los productos almacenados.

Como **CONCLUSIONES GENERALES** de lo observado en este trabajo se tiene que:

- El refrigerador estudiado cumple con los requerimientos de temperaturas en todos los compartimientos internos;
- Es imprescindible cumplir con las instrucciones del fabricante y operar en ambientes con alta temperatura con el termostato en la posición de frío máximo;
- Las aperturas normales de puertas no tienen incidencia importante en la temperatura de los productos almacenados y, por tanto, tampoco en la vida útil de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

S. James, J. Evans. Int J Refrig 15:290-306, 1992.

Flynn, I. Blair, D. McDowell. Int J Refrig 15:307-312, 1992.

Laguerre, E. Derens, B. Palagos. Int J Refrig 25:653-659, 2002.

S. James, J. Evans. Int J Refrig 15:313-319, 1992.

Laguerre, J. Gahartian, S. Srour. Rev Gen Froid, 1037:22-28, 2003.

B. Shixiong, X. Jing. Proceedings of IIR Meeting of Commissions B2, C3, D1, D2/3, Dresden, 1990, pp. 411-415.

K. Fukuyo, T. Tanaami, H. Ashida. Int J Refrig 26:249-255, 2003.

Anónimo. Manual del Comprador 2. Electrolux S.A., Argentina, 1999.

Anónimo. La chaîne du froid des produits alimentaires. Association Française du Froid, Francia, 1998.

UNTABILIDAD DE QUESO TIPO MASCARPONE Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE GRASA

GARCÍA, Alejandra I. ⁽¹⁾; HERNÁNDEZ PEZZANI, Carolina ⁽¹⁾; VIDALES, Susana L. ⁽¹⁾ y ALZAMORA, Stella M. ⁽²⁾

Universidad Nacional de Luján – Departamento de Tecnología-C.C 22-Luján-Bs.As. Argentina. TE (54-2323)423979; FAX (54-2323) 425795. aigarcia@unlu.edu.ar. (2) UBA – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Ciudad Universitaria-Bs. As. Argentina

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la influencia del contenido de grasa de la materia prima sobre la untabilidad del queso tipo mascarpone argentino.

El queso se elaboró a partir de crema de leche con distintos contenidos de grasa (22, 32, 37, 41 y 46% p/p), generando las muestras QM22, QM32, QM37, QM41 y QM46. La untabilidad se determinó mediante ensayos de retroextrusión en un equipo Instron y se la definió como la inversa de la fuerza de extrusión ($1/F_{ex}$). Se determinó el contenido de grasa, proteínas y viscosidad a cada una de las muestras. La fuerza de extrusión varió entre $6,18 \pm 0,37$ y $0,35 \pm 0,07$ kgf y la viscosidad entre $293 \cdot 10^5$ y $540 \cdot 10^4$ cp. Se observó que la untabilidad aumentó mientras que la viscosidad disminuyó al aumentar el contenido de grasa del queso.

Palabras clave: queso mascarpone, untabilidad, textura

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the influence of raw material fat content on the mascarpone cheese spreadability.

Cheese was made with cream with different fat contents (22, 32, 37, 41, 46% p/p) and the following samples were obtained: QM 22, QM32, QM41 and QM46. The spreadability was determined using an Instron Testing Machine by back extrusion tests and it was defined as the inverse of the extrusion force ($1/F_{ex}$).

Fat content, proteins and viscosity were measured in every sample. The extrusion force varied from 6.18 ± 0.37 to 0.35 ± 0.07 kg and viscosity varied from $295 \cdot 10^5$ to $540 \cdot 10^4$ cp. It was observed that spreadability increased and viscosity decreased with the cheese fat increment.

Key words: mascarpone cheese, spreadability, texture.

INTRODUCCIÓN

El queso mascarpone es un producto originario de Italia. Si bien en la actualidad se elabora a partir de crema de leche de vaca, originalmente se utilizaba leche de búfala, y debido a su difícil conservación, se preparaba únicamente en el período invernal. Es un producto muy graso, sin corteza y de muy rápida maduración. Se caracteriza por su color blanco, su sabor suave y ligeramente ácido y su consistencia cremosa.

En los últimos años, su consumo se ha extendido y en la Argentina ha comenzado a elaborarse a escala artesanal e industrial.

El principio de elaboración se basa en la coagulación mediante calor en medio ácido producida por la adición de ácidos orgánicos permitidos.

En términos físicos, el queso es un material viscoelástico y todas sus características texturales responden a una combinación medible de propiedades reológicas y mecánicas. El comportamiento reológico de cada tipo de alimento depende o tiene su base en la estructura y ésta no es estática en el tiempo. La mayoría de las interacciones entre sus elementos estructurales no son permanentes.

Diferentes variedades de queso tienen un amplio rango de características texturales y esto cambia debido a la proteólisis, variación del contenido de humedad, incorporación de sal, cambios en el pH y disolución lenta del calcio residual asociado a las partículas de caseína (Lucey y col. 2003).

El queso mascarpone argentino se clasifica como queso de pasta blanda y el contenido de grasa sobre el extracto seco no debe ser menor al 80% según el Código Alimentario Argentino (CAA) (www.anmat.gov.ar/codigooa). Su consistencia hace que su utilización por parte del consumidor sea en productos elaborados que necesiten cremosidad, propiedad altamente requerida en este tipo de queso.

La untabilidad (U) puede ser descripta como la facilidad con la que un producto puede ser distribuido sobre una superficie. Se han realizado numerosos trabajos sobre la U de manteca y margarina pero muy pocos sobre quesos untables. La U puede medirse o ser evaluada, según los casos, por diferentes métodos como la utilización de conos de distintos ángulos o puntas de distinto diámetro, los cuales penetran en el producto por su propio peso o por aplicación de una fuerza que es generalmente expresada en términos de profundidad de penetración o energía necesaria para penetrarlo. Otra forma es cortar la muestra con un alambre de acero o extruirlo a través de un orificio calibrado con cierta velocidad y peso constante. Puede ser cuantificada como la inversa de la fuerza requerida para cortar o extruir el producto (FIL, 1991).

Como todas las grasas, la grasa de leche provee lubricación e imparte sensación de cremosidad. La temperatura de untabilidad de una grasa de manteca oscila en un rango de 16 a 24 °C y no es untable a temperatura de refrigeración

Los aspectos organolépticos y especialmente texturales de los quesos recaen fundamentalmente en las características de las materias primas y en algunas condiciones de la elaboración. La mayor viscosidad de la crema de leche con respecto a la leche, se debe al contenido de grasa, a los tratamientos térmicos, a la maduración y a la homogenización.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia del contenido de grasa de la materia prima sobre la untabilidad del queso tipo mascarpone argentino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Elaboración del queso tipo mascarpone argentino: Se utilizó crema de leche con un contenido de grasa inicial de 46% y mediante el agregado de leche entera se obtuvieron mezclas con los siguientes contenidos de materia grasa: 22, 32, 37, 41 y 46%. Se generaron las muestras Q22, Q32, Q37, Q41 y Q46. Las distintas mezclas fueron calentadas hasta 89 ± 2 °C y acidificadas con ácido cítrico al 2%. Luego de la coagulación, se extrajo el suero en una primer etapa a temperatura ambiente y luego a temperatura de refrigeración (8-10 °C). Se envasó el producto en recipientes plásticos de 250 ml. Se almacenó refrigerado (6-8 °C) hasta su análisis.

Análisis fisicoquímicos:

Contenido de humedad: Se determinó por un método gravimétrico utilizando una estufa de vacío Oven, Model 280A, Fisher Scientific. Se pesó con precisión de décima de miligramo de 4 a 6 gramos de muestra en un pesafiltro, previamente secado y tarado. Se colocó en estufa y se aplicó un vacío de 700 mm de Hg a una temperatura de 80 ± 2 °C. La muestra se mantuvo en esas condiciones hasta peso constante. Se informa promedio y desvío estándar.

Determinación del contenido de grasa: Tanto para la materia prima como para el producto final, se determinó el contenido de grasa por el método de Gerber. Se informa promedio y desvío estándar.

Contenido de nitrógeno total: Se realizó según el método de Kjeldhal, modificación Winkler. Se utilizó el factor de conversión $f = 6,38$ para proteínas lácteas. Se informa el promedio y desvío estándar.

Medición de pH: Se realizó por duplicado con un peachímetro HANNA Modelo HI 9017 con electrodo para semisólidos con termocompensador a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Medición de la viscosidad aparente: fue determinada en un equipo Brookfield DV-II + LV S25, a 0,01rpm y 25°C , según Holcomb y col. (1990).

Medición de la Fuerza de extrusión (F_{ex}) y la untabilidad (U): Se realizaron ensayos de retroextrusión en un texturómetro universal Instron Testing Model 1011 (Instron Corporation, Canton, MA, USA). Se utilizó el dispositivo Puncture Probe Assay A372-15, W/C 0.069. Para cada muestra se realizaron 5 ensayos. Las condiciones experimentales fueron: Velocidad del cabezal: 100 mm/min; Transductor: 50 kg; Rango de carga: 20 kg; Velocidad del registrador: 100 mm/min. Para estos ensayos, las muestras se envasaron directamente en los recipientes cilíndricos de 4,7 cm de diámetro interno por 7,3 cm de altura, con un espacio interior angular de 0,3 cm. En cada celda se colocó muestra hasta aproximadamente el 50% de su volumen. Se fijó, mediante ensayos previos, en 0,5 cm la distancia entre la base de la celda de extrusión y el tope de bajada del dispositivo de compresión. Se informa, como medida de la U, la inversa del valor promedio de la fuerza de extrusión (F_{ex}) en la meseta de la curva, expresado en kgf. El error se expresa por la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización de la materia prima y el producto final para cada ensayo se observa en la Tabla 1.

Tabla 1: Contenido de humedad, materia grasa y proteínas de los quesos tipo mascarpone argentino.

Muestra	Materia prima		QUESO MASCARPONE		
	% Grasa	% Proteína	% Humedad	% Grasa bs	% Proteína bs
QM 22	22±2	2,5±0,1	38,9±0,4	77±2	9,7±0,1
QM 32	32±2	2,0±0,1	38,4±0,6	89±2	4,7±0,1
QM 37	37±2	1,8±0,1	40,4±1,1	91±2	4,5±0,1
QM 41	41±2	1,7±0,1	40,0±0,7	92±2	4,1±0,1
QM 46	46±2	1,5±0,1	41,0±0,5	97±2	4,0±0,1

El contenido de grasa de las mezclas lácteas se estandarizó utilizando leche entera y el contenido de proteína varió en función de ello. En cuanto a los productos obtenidos, el contenido de proteína mantuvo relación con la proteína presente en cada mezcla, a

excepción del QM22, que tuvo una relación de proteína (bs)/proteína de la mezcla mayor que para el resto de las muestras. A partir de un contenido de grasa inicial de 32% el contenido de proteína final osciló entre 4,7 y 4,0.

El contenido final de grasa (bs) en las distintas muestras se adecua a las reglamentaciones vigentes en todas las muestras, salvo QM22.

El contenido de humedad estuvo por debajo de las exigencias establecidas en el CAA, lo que indica que debe ajustarse el tiempo de drenado en el proceso de elaboración para alcanzar un mínimo de 46%.

En Europa se ha reportado que el queso mascarpone ha sido responsable de generar intoxicación en seres humanos por botulismo (Aureli, 1999); por este motivo, la autoridad sanitaria italiana ha debido emitir circulares que apunten a una mayor seguridad e inocuidad del producto. Uno de los parámetros a controlar es el pH, que debe estar por debajo de 5,0. Este requerimiento lo cumplen todas las muestras obtenidas excepto la QM22. Por otra parte se comprobó mediante pruebas organolépticas no formales que el pH no debería ser inferior a 4,6 para mantener el sabor característico del producto original. Esto lo cumplen todas las muestras salvo la QM41.

Tabla 2: pH, rendimiento y viscosidad de los quesos tipo mascarpone argentino

Muestra	pH	Rendimiento %	Viscosidad (cp)
QM 22	5,0±0,5	42	193*10 ⁵ ± 5*10 ⁵
QM 32	4,8±0,5	38	181*10 ⁵ ± 6*10 ⁵
QM 37	4,9±0,5	40	160*10 ⁵ ±7*10 ⁵
QM 41	4,2±0,5	60	576*10 ⁴ ±5*10 ⁴
QM 46	4,5±0,5	57	540*10 ⁴ ±4*10 ⁴

Si bien para las muestras QM22, QM32, QM37 y QM41 la viscosidad disminuyó al incrementarse el contenido de grasa, no se encontró un modelo de ajuste adecuado que relacione directamente estas variables.

En la Figura 1 se muestra el comportamiento característico observado en las muestras de queso ante el ensayo de extrusión. Respecto de la forma de la curva se puede decir que, al iniciar el contacto con el producto se opone una mínima resistencia inicial que aumenta en forma sigmoidea para luego alcanzar un valor constante durante todo el recorrido de la celda y finalmente el quiebre de la meseta indica que ha finalizado el ensayo. Este plateau

indicaría que la muestra sufre cizallas o extrusión y adhesión a las paredes del recipiente (Bourne, 2002).

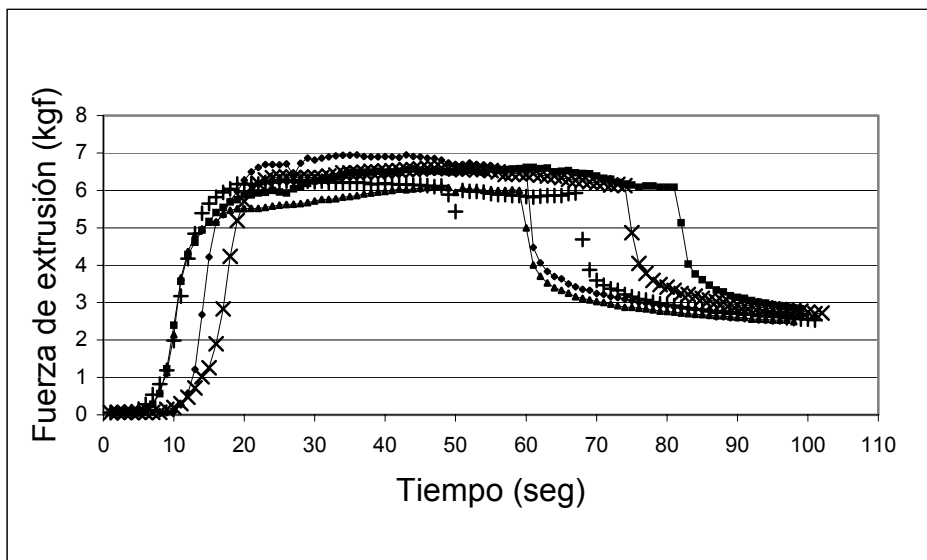


Figura 1: Comportamiento típico del queso tipo mascarpone argentino en ensayos de retroextrusión.

En la Figura 2 pueden observarse los datos correspondientes a la untabilidad versus el contenido de grasa del producto final. Estos datos ajustan con un modelo exponencial con un $R^2 = 0,9246$. Esto pone en evidencia la influencia del contenido de grasa sobre la posibilidad de distribución del producto sobre una superficie, siendo esta una de las características organolépticas más deseadas por el consumidor.

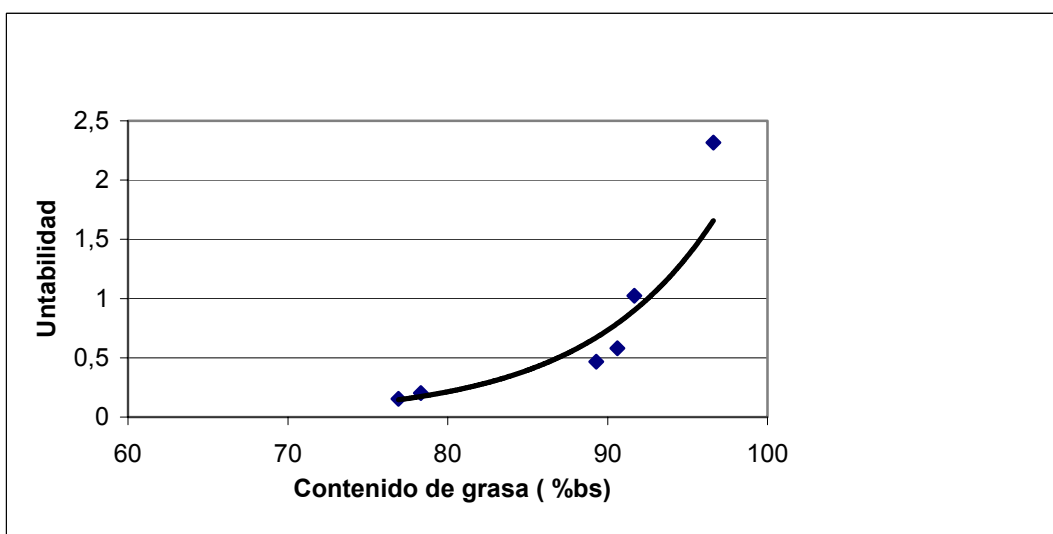


Figura 2: Untabilidad versus contenido de grasa (b.s) de los quesos tipo mascarpone argentino.

CONCLUSIONES

Como resultado de este estudio se puede inferir que el método utilizado es adecuado para evaluar la untabilidad de quesos tipo mascarpone argentino. En trabajos posteriores se comparará el mismo con paneles de evaluadores entrenados.

El contenido de grasa de la materia prima define la cremosidad para los distintos tratamientos e influye en el contenido de proteínas tanto de la materia prima como del producto final.

El contenido de humedad de las muestras estudiadas no se modificó sustancialmente por lo que no se considera un factor determinante para los resultados obtenidos en el estudio. Sin embargo, deberá modificarse el tiempo de drenado para obtener un contenido de humedad mayor o igual que un 46%.

BIBLIOGRAFÍA

Aureli, P.; Fenica, L.; Franciosa, G. (1999) “Formas clásicas y emergentes de botulismo: situación actual en Italia” [on line]. Eurosurveillance 1999. 4:7-9. <http://eurosurveillance.org> 25 de julio de 2002.

Bourne, M. (2002) Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. Second Edition. Geneva, New York. Academic Press.

Código Alimentario Argentino actualizado 2004. Disponible en www.anmat.gov.ar/codigoa

Federation International of Laiterie, (1991) Bulletin of the International Dairy Federation N 268/1991. Rheological fracture properties of cheese.

Holcomb, D. N. Ford, L. D. y Martin, R.W. (1990) Dressings and Sauces en Food Emulsions, Larsson, K. Y Friberg, S.(Ed). Marcel Dekker, Inc. New York

Lucey, J. A; Johnson M. E and Horne D. S. J. (2003). Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. Dairy Sci. 8:272-2743.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Luján por el soporte financiero del proyecto y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, por el uso de instalaciones y equipamiento.

CARACTERIZACION FISICOQUÍMICA DE LA YERBA MATE COMPUESTA CON HIERBAS Y DE SUS COMPONENTES

SCIPIONI, Griselda P.; FERREYRA, Darío y SCHMALKO, Miguel E.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales-Universidad Nacional de Misiones
Félix de Azara 1552 – 3300 – Posadas. e-mail: mesh@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

La yerba mate compuesta es un producto muy consumido en el MERCOSUR y se obtiene al mezclar la yerba mate elaborada con hierbas aromáticas. Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar las características fisicoquímicas de las principales hierbas utilizadas y de las principales marcas comercializadas de yerba mate compuesta. Se determinaron el contenido de humedad, el extracto acuoso, las cenizas totales e insolubles en HCl y la cafeína. Se utilizaron las técnicas analíticas dadas en las normas IRAM de la Argentina para yerba mate elaborada. Para determinar el contenido de cafeína por cromatografía líquida se realizaron ensayos previos de mezclas de yerba mate con las hierbas para comprobar la validez de la misma.

En las determinaciones realizadas en las hierbas se encontraron valores muy diferentes a los de la yerba mate, destacándose los valores muy elevados de contenido de humedad, cenizas totales e insolubles y bajos de extracto acuoso.

Al realizar las determinaciones en marcas comerciales de yerba mate compuesta, se encontró que las mismas cumplen con la normativa vigente en los respectivos países, las que tienen muy pocos requisitos, con excepción de la normativa paraguaya. Las diferencias entre ellas es muy importante, principalmente en la definición del producto, ya que en Brasil se permite adicionar hasta un 10% de hierbas, en Paraguay hasta un 15% y en la Argentina hasta un 40%. Sería muy importante elaborar una normativa común para los tres países, y que en la misma se fijen los mismos parámetros fisicoquímicos requeridos para la yerba mate elaborada pero con diferentes niveles de requerimiento.

INTRODUCCIÓN

La yerba mate (*Ilex paraguarienses* Saint Hilaire) es un producto muy consumido en Sudamérica en la región del MERCOSUR (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). La forma tradicional de consumo es el mate (aproximadamente un 97% del consumo total),

infusión que se prepara generalmente con agua caliente, aunque en los meses de verano en las regiones más cálidas se utiliza agua fría (De Bernardi y Prat Krikum, 2001).

El producto elaborado se puede presentar con caracteres organolépticos diferentes. En Argentina, Paraguay y Uruguay se prefiere la yerba mate con molienda gruesa y estacionada; en Brasil con molienda fina y sin estacionar.

En los últimos años un producto derivado de la yerba mate que fue ganando mercado es la yerba mate compuesta con hierbas. Se la obtiene adicionado hierbas sápido-aromáticas a la yerba mate. Estas hierbas le confieren un sabor diferente al sabor tradicional y la mezcla obtenida tiene buena aceptación en una franja importante de consumidores.

Los códigos alimentarios o sus normativas equivalentes difieren en cuanto a las características de la yerba mate compuesta. La normativa Argentina permite adicionar hasta un 40% de estas hierbas (CAA, 2000), la legislación Paraguaya permite adicionar hasta un 15% (INTN 3500201, 2002) y la legislación Brasileira hasta un 10 % (Mazuchowski et al, 2000; Resolución RDC N° 303,2002). Las normas Chilena y Uruguay no definen a este tipo de producto (Decreto 287/02, 2002; Decreto 315/94, 1994)

En cuanto a las hierbas utilizadas en la elaboración de yerba mate compuesta, la normativa Argentina (CAA, 2000) menciona que las mismas deben ser de reconocida inocuidad fisiológicas en la forma habitual de su uso, citando 7 de ellas con sus nombres comunes y además permite adicionar otras que apruebe la autoridad sanitaria nacional. La disposición 1637/2001 (ANMAT, 2001) menciona 35 hierbas y las partes de las mismas que se pueden consumir. La normativa Brasileira autoriza la adición de 48 hierbas, indicando el nombre científico y común y la parte que puede utilizarse (Resolución RDC N° 303, 2002). La normativa Paraguaya expresa que pueden adicionarse hierbas de reconocida inocuidad fisiológica y que estas deben estar autorizadas por el órgano de aplicación (INTN 350021, 2000).

En cuanto a los requisitos generales que deben cumplir, la normativa Paraguaya es la más completa ya que fija requerimientos en cuanto a parámetros organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos (tabla 1). Los requisitos fisicoquímicos son similares a los solicitados para yerba mate; mientras que las tolerancias microbiológicas son mayores (INTN 3500193, 1995). La normativa Argentina fija como requisitos un valor máximo de contenido de humedad del 9,5% (base seca), similar al de la yerba mate, y de cenizas insolubles del 2 % (1,5% para la yerba mate elaborada). La normativa Brasileira fija

requisitos organolépticos similares a las establecidas en Paraguay y un máximo de contenido de humedad del 10%.

Tabla 1: Requisitos que deben cumplir la yerba mate compuesta en el Paraguay

Parámetros Organolépticos		Observaciones			
Olor		Característico			
Color		Característico			
Sabor		Característico			
Parámetros Físicoquímicos		Valores porcentuales (%)			
		Mínimos		Máximos	
Humedad a 105°C±0,5°C		-		10,3	
Cenizas a 550 °C		-		9,00	
Cenizas insolubles en HCl al 10 % a 1000°C		-		1,50	
Extracto Acuoso		25		-	
Cafeína		0,6		-	
Finura	Hojas secas y pulverizadas de yerba mate	65,0		-	
	Ramas, palos, hierbas y otros componentes	-		35,0	
Impurezas		-		1	
Semilla de yerba mate		-		1	
Parámetros Microbiológicos					
Microorganismos		Valores de referencia			
		n	c	m	M
Hongos y levaduras UFC/g		5	2	3.500	5000
Coliformes totales NMP/g		5	2	90	200
Coniformes NMP/g a 44 ± 1°C		5	2	7	15
E. coli/g		5	0	0	0
Salmonella sp25/g		5	0	0	0
n= número de muestras analizadas; c= número de unidades que pueden presentar valores entre m-M; m= valor mínimo aceptable; M= valor máximo; UFC= unidad formadora de colonia; NMP= número más probable					

Se han realizado varios estudios sobre las características físicoquímicas de la yerba mate (Schmalko et. al,1995; Ramallo et al, 1998); pero se conocen muy pocas publicaciones

respecto a las características fisicoquímicas de las hierbas utilizadas en la yerba mate compuesta. En la Portaria 519 (1998) se pueden encontrar lagunas características fisicoquímicas de algunas hierbas utilizada en la elaboración de infusiones preparadas como té. Es importante conocer las características fisicoquímicas de las principales hierbas utilizadas en la elaboración de la yerba mate compuesta, ya que a partir de estas determinaciones se podrían modificar apreciablemente sus normativas, especialmente en el caso de la comercializada en la Argentina que puede tener hasta una 40% de ellas.

También se han realizado estudios de las isotermas de sorción de la yerba mate en las diferentes etapas del procesamiento (Kanzig et al.,1985; Kanzig et al.,1987), concluyéndose que el contenido máximo de humedad que podría contener la misma para evitar el crecimiento de microorganismos es de un 9,5% en base seca. Scipioni et al. (2002 y 2003) determinaron las isotermas de adsorción de 5 hierbas y las mismas podrían ser utilizadas para determinar el contenido máximo de humedad que podrían contener sin que pueda producirse crecimiento de microorganismos. Sería por lo tanto necesario determinar las demás propiedades fisicoquímicas.

Este trabajo tiene como objetivo global el estudio de la yerba mate compuesta con hierbas para determinar sus parámetros fisicoquímicos para su normatización, para lo cual deberían cumplirse los siguientes objetivos parciales:

- a) Determinar los parámetros fisicoquímicos de las hierbas.
- b) Comprobar si en el método cromatográfico (HPLC) de determinación de cafeína, la adición de hierbas no produce interferencias.
- c) Determinar estos parámetros en muestras comerciales de los tres países productores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Hierbas

Las hierbas a ser analizadas se seleccionaron considerando la composición declarada en los envases de yerba mate compuesta con hierbas y seleccionando las más utilizadas. Las muestras analizadas fueron provistas por un establecimiento industrial que elabora este tipo de producto y son: boldo (*Pneumus boldo* Molina), cedrón (*Aloysa mapidia*), incayuyo (*Virginal exalcis* L.), menta (*Mentha piperita*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*), peperina (*Micromeria boliviensis*), poleo (*Lippia fissicalyx*), poleo fuerte (*Mentha plegium*), tilo (*Tilia arciostaphylos uva-usi* L.) y la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) utilizada en las mezclas por esa empresa.

Yerba mate compuesta con hierbas

Las muestras analizadas de 9 marcas comerciales conocidas, fueron adquiridas en góndolas de supermercados de la ciudad de Posadas (Argentina), Encarnación (Paraguay) y Camboriú (Brasil). La composición de hierbas declaradas en los paquetes se puede observar en la tabla 2 con los nombres comunes y en la tabla 3 se da la equivalencia de los nombres científicos y comunes.

Tabla 2. Composición declarada en los paquetes de yerba mate compuesta

Marca	Composición
1 (Argentina)	Yerba mate: 50%, boldo: 15%, menta: 13% y cardo santo: 7%
2(Argentina)	Yerba mate, poleo, rosa mosqueta, hinojo, fucus, menta, cedrón, boldo, saborizante de manzana
3(Argentina)	Yerba mate: 95%, peperina: 1%, poleo: 1%, incayuyo: 1%, boldo: 1%, menta: 0,375%, cedrón: 0,375%, tilo: 0,25%
4(Argentina)	Yerba mate: 95%, menta: 1,5 %, poleo: 1,5%, peperina: 1%, melisa: 1%
5(Argentina)	Yerba mate: 81%, té verde: 4%, algas marinas: 3%, cedrón: 3%, cola de caballo: 3%; hisopo: 3%; Peperina: 3%.
6 (Brasil)	Yerba mate: 90%, otras especies vegetales: 10% (naranja, cedrón, carmonilla, hortella).
7 (Brasil)	Yerba mate: 90%, otras especies vegetales: 10% (2,33% carmomila o manzanilla: 2,33%, cidreira (melissa officitreats L.): 2,33%, erva duce (foemiculum vulgare L.): 2,33%, azucar: 3%.
8 (Paraguay)	Yerba mate, menta, burrito, cedrón
9 (Paraguay)	Yerba mate: 91,7%, boldo: 8%, aceite esencial de menta: 0,3%.

MÉTODOS

Contenido de humedad

Se utilizó el método de la Norma IRAM 20503 (1995), secando el material en estufa a 103 ± 2°C, durante 6 h.

Extracto acuoso

Se pesaron 2 g de la muestra y se agregaron 200 ml de agua destilada. Se hirvió a reflujo durante 1h, se filtró y se transfirió el total del filtrado a un cristizador previamente tarado. Se evaporó en estufa a $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante (aproximadamente 24 h). Se enfrió en un desecador y se pesó. El extracto acuoso se determinó por diferencia de peso (Escalada et al., 1998).

Cenizas totales e insolubles

Se calcinaron 2 g de la muestra en una cápsula de porcelana y se llevó a una mufla a 550°C durante 5 horas. Se dejó enfriar el material y se pesó. De esta forma se determinaron las cenizas totales (IRAM 20505, 1996). Este material se disolvió en una solución de HCl al 10 %, y se llevó a ebullición durante 1 hora. Se filtró con un papel libre de cenizas, se lavó con agua, se colocó en una cápsula de porcelana y se calentó en una mufla a 550°C durante 5 horas. Se enfrió y se pesó el residuo sólido. De esta forma se determinaron las cenizas insolubles (IRAM 20507, 1996).

Tabla 3. Nombre científico y común de las hierbas utilizadas en la yerba mate compuesta

Aloysia mapidia: cedrón	Foeniculum vulgare: hinojo	Mentha pulegium: poleo fuerte
Aloysia polystachya: burrito	Hyssopus officinalis L.: hisopo	Micromeria boliviensis: peperina
Camelia sinensis: té verde	Ilex paraguariensis: yerba mate o erva mate	Pimpinella anisum L: erva duce
Citrus aurantium: naranja	Limpia fissicalys: poleo	Pneumus boldo M.: boldo
Cruces peaedictus L.: cardo santo	Matricaria recutita: manzanilla o carmomila	Rosa caninal L.: rosa mosqueta
Chlorella vulgaris: algas marinas, fucus	Melissa officitrals L: melisa o cidreira	Tilia arciostaphylos uva ursi: tilo
Equisetum arvense L.: cola de caballo	Mentha piperita: menta, hortella	Virginal exalsis L.: incayuyo

Cafeína

Para la determinación de la cafeína se utilizó un método de cromatografía líquida HPLC, dado por la Norma IRAM 20512 (2003).

Una porción de muestra de 1 g se extrajo con 300 mL de agua y 4,5 g de MgO a 90°C durante 1 h en baño de agua con agitación. Luego se filtró y el filtrado se inyectó en un

cromatógrafo líquido KNK (Konic Instrument, España) equipado con una columna Hewlett-Packard Lichospher 100, RP-18 (5 µm).

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: fase móvil: mezcla de acetonitrilo/agua (30:70 en volumen); flujo de 1 mL/min y detector UV-Visible a 272 nm.

Las determinaciones en todas las experiencias se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hierbas

Los resultados obtenidos de contenido de humedad, extracto acuoso, cenizas totales, cenizas insolubles y cafeína para las diferentes hierbas se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido de humedad, extracto acuoso, cenizas totales, cenizas insolubles y cafeína (% base seca) de las diferentes hierbas. Valor medio \pm desviación estándar de 3 mediciones.

Hierba	Contenido de humedad	Extracto acuoso	Cenizas totales	Cenizas insolubles
Boldo	11,55 \pm 0,137	35,38 \pm 0,297	9,99 \pm 0,043	5,53 \pm 0,051
Cedrón	12,60 \pm 0,063	32,47 \pm 0,942	10,48 \pm 0,228	0,87 \pm 0,140
Incayuyo	11,48 \pm 0,015	21,13 \pm 0,813	5,58 \pm 1,022	1,63 \pm 0,647
Manzanilla	12,19 \pm 0,174			
Menta	13,82 \pm 0,185	32,94 \pm 1,004	13,73 \pm 0,572	1,72 \pm 0,520
Peperina	11,78 \pm 0,140	13,58 \pm 0,919	5,08 \pm 0,303	0,50 \pm 0,130
Poleo	13,10 \pm 0,079	27,66 \pm 0,491	15,54 \pm 0,935	5,12 \pm 0,642
Poleo fuerte	11,04 \pm 0,055	28,29 \pm 0,727	15,34 \pm 0,297	1,98 \pm 0,346
Tilo	14,64 \pm 0,223	29,37 \pm 0,380	8,53 \pm 0,235	0,81 \pm 0,231
Yerba Mate	6,10 \pm 0,100	38,02 \pm 0,828	6,37 \pm 0,360	0,42 \pm 0,060

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede apreciar que se encuentran valores muy dispersos en las diferentes hierbas estudiadas y muy diferentes a los de la yerba mate. Los valores de extracto acuoso son bajos en peperina e incayuyo; mientras que en las otras hierbas esta variable es del orden del encontrado en diferentes marcas de yerba mate (Schmalko et al., 1995), aunque sean menores a las de la yerba mate analizada en este trabajo. Las cenizas totales resultaron mayores a las permitidas para la yerba mate en varias hierbas (boldo, cedrón, menta, poleo y poleo fuerte) como así también resultaron mayores las cenizas insolubles de boldo, incayuyo, menta, poleo y poleo fuerte,

triplicando en algunos casos los valores máximos permitidos de la yerba mate. Por lo tanto, deberían ser diferentes los valores de estos parámetros en la yerba mate compuesta, principalmente en la Argentina debido a los elevados porcentajes de hierbas permitidos en las mezclas.

Determinación de cafeína

Con el objeto de comprobar si en el método cromatográfico (HPLC) de determinación de cafeína la adición de hierbas no produce interferencias, se realizaron determinaciones de contenido de cafeína en yerba mate elaborada y en mezclas de esta con las diferentes hierbas. En primer lugar se realizaron 5 determinaciones en la yerba mate elaborada, obteniéndose un valor promedio de 0,823 % y una desviación standard de 0,037. Luego se determinó este porcentaje en tres mezclas de yerba mate-hierbas: 10%, 25% y 40%, cubriendo el rango de valores encontrados en las mezclas (tabla 2) y permitido en el CAA. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 1, obteniéndose el mejor ajuste con la ecuación:

$$Y = 0,844 - 0,0069 * X$$

donde Y es el % de cafeína y X es el % de las hierbas en la mezcla. La ecuación tuvo un ajuste significativo con $P < 10^{-5}$.

De acuerdo al valor de la ordenada al origen (muy similar al valor obtenido para la yerba mate), que los datos se pueden ajustar a una línea recta y a la observación de los cromatogramas, se concluyó que la adición de hierbas no produjo interferencias en el método dado por la norma IRAM 20512

Yerba mate compuesta

Los resultados obtenidos de contenido de humedad, extracto acuoso, cenizas totales, cenizas insolubles y cafeína para las diferentes marcas de Yerba Mate compuesta se resumen en la tabla 5. En la misma se puede observar que varias marcas (1,2,5) superan los valores máximos permitidos de contenido de humedad en los Códigos respectivos. Esto se debe a que los valores encontrados de contenido de humedad de las hierbas (tabla 4) son más elevados que los de la yerba mate. De las isotermas de adsorción de éstas (Benítez et al., 2004, Scipioni et al., 2003) se observa que el valor de contenido de humedad para una actividad de agua igual a 0,6 (límite para el crecimiento de hongos) supera en la mayoría de los casos el valor de 9,5% del CAA e inclusive el 10,3 % dado en la norma paraguaya (Peperina, Incayuyo, manzanilla, poleo, menta) y en otras dos (carqueja, kaá-heé) se encuentra por debajo de los mismos. Para las mezclas donde se

incorporan hierbas que superan el contenido de humedad de equilibrio de la yerba mate debería utilizarse este valor como límites (9,5 o 10,3%); mientras que en mezclas con hierbas que tienen valores inferiores, debería utilizarse un valor menor, principalmente en Argentina donde el porcentaje permitido es elevado.

Los valores obtenidos de extracto acuoso fueron en casi todos los casos superiores al 25% dado por la norma paraguaya para yerba mate compuesta y para yerba mate elaborada en los tres códigos, con excepción de la marca 1. La misma se caracteriza por tener un porcentaje elevado de hierbas; pero en la mezcla declara que incluye al boldo y la menta que tienen valores de extracto acuoso superiores al 25% (tablas 2 y 4). Los valores bajos de extracto acuoso también pueden deberse a una relación no adecuada de hojas y palos.

Todas las muestras presentan valores de cenizas totales dentro de los valores establecidos en la norma Paraguaya para yerba mate compuesta y en las otras normas para yerba mate elaborada; aunque las hierbas individuales superan estos valores (tabla 4). Los resultados obtenidos para cenizas insolubles indican que la marca 1 (tabla 5) supera el máximo valor establecido por las reglamentaciones Argentina, Brasileira y Paraguaya, esto podría deberse a su alto contenido en boldo y menta (tabla 2). Estas hierbas presentaron un valor elevado de cenizas insolubles (tabla 4).

Debido a que las hierbas utilizadas en la yerba mate compuesta no contienen cafeína el valor mínimo para este parámetro debería estar relacionado al % de yerba mate que contienen las mezclas. En Argentina y Paraguay el contenido mínimo de cafeína en la yerba mate elaborada es de 0,6 %; mientras que en el Brasil el mínimo es de 0,5%. Si se permite adicionar hasta un 40% de hierbas el contenido mínimo en la yerba mate compuesta debería ser de 0.36% en la Argentina; mientras que en Brasil que permite adicionar hasta un 10% de hierbas, este valor debería ser de 0.45%. El Paraguay fija un contenido mínimo para la yerba mate compuesta similar a la de la yerba mate elaborada.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten arribar a las siguientes conclusiones:

El estudio de los parámetros fisicoquímicos en 9 hierbas utilizadas en la elaboración de yerba mate compuesta en los países del MERCOSUR indican que las mismas poseen contenidos de humedad superiores a los establecidos por las legislaturas para yerba mate elaborada y compuesta; esto podría ocasionar deterioros organolépticos por la acción de microorganismos en las mezclas donde se autorizan utilizar porcentajes elevados de hierbas. Los contenidos de extracto acuoso son menores a los de yerba mate

elaborada en 2 de las hierbas estudiadas (incayuyo y peperina); las cenizas insolubles, por el contrario superó el 1% (valor máximo permitido en Brasil) en 5 hierbas (boldo, incayuyo, menta, poleo y poleo fuerte). Estos tres parámetros, que difieren con las reglamentaciones vigentes, deberían ser revisados por las respectivas autoridades competentes.

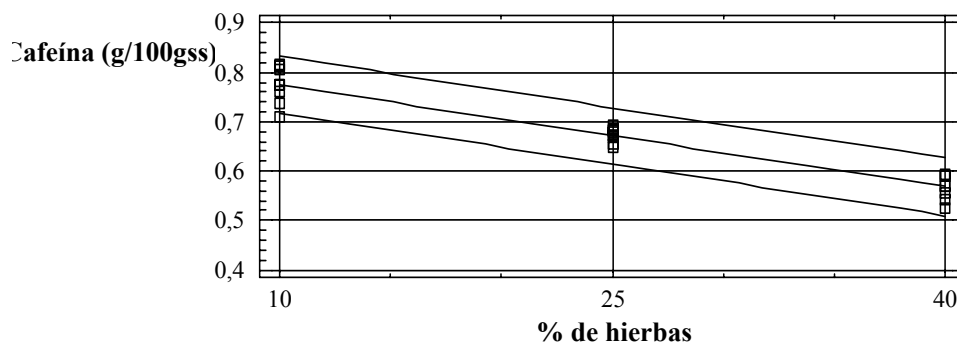


Figura 1: Línea que relaciona el contenido de cafeína (g/100g de sólido seco) y el porcentaje de mezclas de hierbas.

Tabla 5. Contenido de humedad, extracto acuoso, cenizas totales, cenizas insolubles y cafeína (% base seca) de diferentes marcas de yerba mate compuesta. Valor medio \pm desviación estándar.

Marca	Contenido de humedad	Extracto acuoso	Cenizas totales	Cenizas insolubles	Cafeína
1	10,82 \pm 0,053	23,89 \pm 0,954	7,33 \pm 0,382	2,15 \pm 0,201	0,494 \pm 0,0191
2	9,93 \pm 0,051	32,02 \pm 0,545	6,20 \pm 0,310	0,30 \pm 0,057	0,492 \pm 0,0222
3	6,73 \pm 0,079	33,02 \pm 0,597	7,16 \pm 0,214	0,77 \pm 0,060	0,447 \pm 0,0130
4	8,03 \pm 0,006	34,55 \pm 0,843	6,30 \pm 0,285	0,25 \pm 0,070	0,488 \pm 0,0195
5	10,20 \pm 0,125	32,86 \pm 0,358	6,33 \pm 0,180	0,62 \pm 0,090	0,494 \pm 0,0228
6	5,41 \pm 0,150	35,99 \pm 0,734	6,97 \pm 0,186	0,71 \pm 0,075	0,910 \pm 0,036
7	8,05 \pm 0,061	34,20 \pm 0,501	5,66 \pm 0,029	0,34 \pm 0,070	0,949 \pm 0,040
8	8,78 \pm 0,146	40,01 \pm 0,337	7,51 \pm 0,194	0,72 \pm 0,135	0,789 \pm 0,029
9	9,08 \pm 0,170	37,60 \pm 0,910	7,17 \pm 0,259	0,79 \pm 0,132	1,199 \pm 0,021

En cuanto a la determinación del contenido de cafeína por HPLC se observó que el método no presenta interferencias con otros compuestos orgánicos de las hierbas y que el contenido de cafeína aumenta en relación lineal con el porcentaje de yerba mate presente en la mezcla. Las muestras presentaron valores acordes a los exigidos por la reglamentación vigente para yerba mate elaborada en el país de origen.

Las determinaciones fisicoquímicas realizadas en las diferentes marcas de yerba mate compuesta indicaron que las marcas 1, 2 y 5 de origen argentino no se ajustan a la reglamentación respectiva en el máximo de contenido de humedad. Una de ellas (marca 1) no cumple además con el máximo permitido de cenizas insolubles y mínimo de extracto acuoso. Al observar la composición declarada en los envases se concluye que esto podría deberse a los porcentajes altos (mas del 40% en la marca 1) y al tipo de hierbas agregadas. Los valores bajos de extracto acuoso también podrían deberse a una relación no adecuada de hojas y palos de yerba mate. Las marcas provenientes de Brasil y Paraguay se ajustan satisfactoriamente a la reglamentación vigente en esos países.

Considerando que este tipo de producto se consume en los países del MERCOSUR sería importante tanto para las empresas productoras como para los consumidores que las normativas vigentes en los diferentes países tienda a una común.

BIBLIOGRAFIA

ANMAT. 2001. Administración nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Argentina. Disposición N° 1637/2001.

CAA. Código Alimentario Argentino. 2000. Art. 1194-1198. Ediciones La Rocca. Buenos Aires, 348-349.

De Bernardi, L.A. y Prat Krikum, S.D. 2001. Cadena alimentaria de la Yerba Mate. Diagnóstico de la región yerbatera. En [www.sagpya.mecon.gov.ar /0-3/inFusion/diagnóstico/diagnost_YM.htm](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0-3/inFusion/diagnóstico/diagnost_YM.htm)

Decreto 315/94. 1994. Reglamento Bromatológico Nacional de Uruguay. Sección 3. Yerba mate. P. 290.A.

Decreto 287/02. 2002. Ministerio de Salud de Chile. Párrafo II. De la Yerba Mate. P. 102.

Escalada, M.A.; Schmalko, M.E.; y Känzig, R.G. 1998. El extracto acuoso como una medida del contenido de palos en la yerba mate. Revista de Ciencia y Tecnología 1, N° 1, pp. 40-44.

INTN. Instituto Nacional de Tecnología y Normalización. Norma Paraguaya 3500193.1995. Yerba mate. Especificaciones. 2da Edición. Asunción. Paraguay.

INTN. Instituto Nacional de Tecnología y Normalización. Norma Paraguaya 3500201.2002. Yerba mate elaborada compuesta. Requisitos generales. 1ra edición. Asunción. Paraguay.

IRAM 20503. 1995. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de la pérdida de masa a 103°C.

IRAM 20505. 1996. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate. Determinación de las cenizas totales.

IRAM 20507. 1996. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba mate. Determinación de las cenizas insolubles en ácido.

IRAM 20512. 2003. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba mate. Determinación del contenido de cafeína. Método HPLC

Känzig, R.G.; Novo, M.A. y Schmalko, M.E. 1985. Isotermas de adsorción de la Yerba Mate estacionada. Revista de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Misiones 1, 47-51.

Känzig, R.G.; Novo, M.A. y Schmalko, M.E. 1987a. Comparación estadística de las isotermas de adsorción de la Yerba Mate. Revista de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Misiones 5, 13-24.

Mazuchowski, J.Z; Maccari Junior, A.; y Bracht, M.J. 2000. Portaria MS 233 (Compostos da erva-mate) Normativa Legais e as prioridades para pesquisas tecnológicas na cadeia productiva da erva-mate. Câmara Setorial da Cadeia Productiva de erva-mate do Paraná. Pp 58.

Portaria MS Nº 519. 1998. Chá Maté e outros Chás- Anexo: Regulamento técnico para fixacao de identidade e qualidade de chás-plantas desinadas á preparacao de infusoes ou decoccoes. PP 74-81

Ramallo, L.A.; Smorczewski, M.; Valdez, E.C.; Paredes, A.M. y Schmalko, M.E. 1998. Contenido nutricional del extracto acuoso de la Yerba Mate en tres formas diferentes de consumo. La Alimentación Latinoamericana 225, 48-52.

Resolución RDC 303. 2002. Secretaría de Vigilancia Sanitaria-Ministerio de Salud de Brasil. Regulamento Técnico para Fixacao e Identidade e Qualidade do Composto de erva-mate.

Schmalko, M.E. ; Ramallo, L.A.; Herrera, J.L. ; Valdez, E.C. ; Paredes, A.M. ; Morawicki, R.O. ; Grosso, S.M. ; Smorczewski, M.; Benitez Britez, S. y Escalada, A. 1995. Programa Eco Mate. Reconocimiento de Calidad. Análisis de Composición General, Minerales y Vitaminas en yerba mate. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Inédito.

Scipioni, P.G.; Benitez, J.B. y Argüello, B.V. 2002. Isotermas de adsorción de hierbas utilizadas en infusiones. IX Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Buenos Aires, Argentina, 7-9/08/2002.

Scipioni, P.G.; Benitez, J.B.; Meza, B.E. y Argüello, B.V. 2003. Isotermas de adsorción de hierbas utilizadas en la elaboración de yerba mate aromatizada. 3º Congreso Sul-Americano da Erva-Mate, chapecó, brasil, 16-19/11/03.

Tenorio Sanz, María Dolores y Torija Isasa, María Esperanza. 1991. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. XLI, N° 2, pp 441-453.

EL COLOR COMO UNA MEDIDA DEL PORCENTAJE DE PALOS EN LA YERBA MATE

SCHMALKO, Miguel ; DEL VALLE, Cristian; ESCALADA, Gustavo y RAMIREZ, María F.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales-Universidad Nacional de Misiones
Félix de Azara 1552 – 3300 – Posadas. TE: 03752422186- I. 142 e-mail:
mesh@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Un parámetro importante en la calidad de la Yerba mate es su contenido de palos. El Código Alimentario Argentino establece como método analítico para determinar este parámetro la técnica del zarandeo, la cual no detecta el palo molido, que es utilizado como adulterante. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la utilización de parámetros de color (L,a,b) como método alternativo para estimar el porcentaje de palos en la Yerba mate.

Se analizaron muestras con diferentes porcentajes de palos (entre 0 y 100%, con intervalos del 10%).

El parámetro de color "L" fue el único que tenía una correlación significativa, variando entre 38 (0% de palos) y 62 (100%). El error de estimación fue del $\pm 4\%$ para una muestra particular. La correlación con todos los datos ajustó significativamente a una línea recta, pero con error de estimación muy elevado ($\pm 15\%$), resultando poco precisa su aplicación como método general de medición.

Palabras Claves: yerba mate, color, palos.

ABSTRACT

An important parameter of Yerba mate quality is its twig content. Argentine Food Code establishes the screening technique as an analytical method to determine this parameter, which cannot detect milled twig usually added as an adulterant. The objective of this research was to study the use of colour parameters (L, a, b) as an alternative method to estimate twig percentage in yerba mate.

Samples with different twig percentage, varying between 0 and 100%, with a range of 10%, were analysed.

Parameter "L" was the unique with significant correlation, varying between 38 (0% of twigs) and 62 (100% of twig). Estimation error was about $\pm 4\%$ for a singular sample.

Correlation with all data fitted in a significant form to a straight line, but with an estimation error too high ($\pm 15\%$), finding that its application presents low precision as a general measuring method.

INTRODUCCIÓN

Un parámetro importante en la calidad de la yerba mate es su contenido de palos. De acuerdo al Código Alimentario Argentino (CAA), la yerba mate elaborada con palos debe contener “no menos del 65% de hojas desecadas y no mas del 35% de palos grosera y finamente triturados, astillas y fibras del mismo”. La metodología sugerida por el CAA para determinar el porcentaje de palos, denominada técnica del zarandeo, se transcribe de la siguiente manera: “ Se utilizarán los tamices de abertura 1x20mm y N° 40 (40 mallas por pulgada). La fracción retenida por el tamiz 1x20 mm será considerada palo en su totalidad y no deberá ser inferior al 12,5% en peso de la muestra analizada. La fracción que pasa el tamiz N° 40 será considerada hoja. Con una alícuota de la fracción retenida en el tamiz N° 40 proveniente de sucesivos cuarteos, se procederá a extraer con pinza las astillas y cáscara de palos presentes, con lo que se cuantificará la cantidad de palo en la fracción. Este porcentaje mas el retenido en el tamiz de 1x20 mm conformará el porcentaje de palo de la muestra analizada” (Código Alimentario Argentino, 2000).

Con este método no puede ser detectado el palo molido adicionado que puede pasar el tamiz N° 40. Por este motivo se han estudiado métodos analíticos alternativos para reemplazar la técnica del zarandeo.

Una de las técnicas alternativas estudiadas para determinar el porcentaje de palos es el de la fibra cruda. Esta técnica fue aplicada a la yerba mate por profesionales de la Comisión Reguladora de la Yerba Mate (CRYM) entre los años 1980-83. El estudio tenía por objetivo estudiar la correlación existente entre el contenido de fibra cruda y el % de palos. Si bien los resultados no fueron publicados, se pudo conocer que este método podía ser aplicado para estimar el % de palos con un error no muy elevado. Pero su aplicación tuvo la oposición de gran parte del sector industrial, alegando que el grado de dificultad y la prolongada duración de la técnica, hacían imposible su aplicación en un control rutinario. Posteriormente en el año 2002, profesionales de la Dirección de Industria de la Provincia de Misiones, Argentina, sugirieron aplicar la misma a la fracción que pasaba la malla N° 40 y la técnica del zarandeo a las otras fracciones. Esta técnica tiene la misma duración que la técnica anterior; pero el error es estimación es menor, ya que se aplica solo a una fracción del producto que normalmente es menor al 20% (IRAM, 2004).

Otro método estudiado para determinar el % de palos en la yerba mate elaborada fue el del extracto acuoso (Escalada et al., 1998). Esta técnica es mas simple que la utilizada para la determinación de la fibra cruda. Los resultados obtenidos en mezclas de un molino en particular fueron muy buenos, es decir que se encontró una alta correlación y bajos errores de estimación. Pero cuando se aplicaba a muestras de diferentes orígenes con el objeto de obtener una curva de calibrado de aplicación general; los errores de estimación resultaron muy elevados ($\pm 13\%$).

El presente trabajo plantea la medición del color como una técnica para determinar el % de palos en la yerba mate elaborada. La medición del color, como un parámetro de calidad es de aplicación usual en el control de alimentos (Känzig, 1995; Schmalko y Alzamora, 2001; Steet and Tong, 1996). El método que actualmente se utiliza para medir el color, consiste en dar tres valores de coordenadas: "L"= eje blanco-negro; "a"= eje verde-rojo y "b"= eje azul-amarillo. En trabajos previos realizados en el laboratorio, se encontró que las hojas y los palos tenían diferencias importantes en los parámetros cuando las mediciones se realizaban en el material finamente molido (Woniaczuk et al, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica analítica para determinar el porcentaje de palos en la yerba mate elaborada utilizando las técnicas de medición de color.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizaron 7 muestras de yerba mate canchada provenientes de diferentes establecimientos industriales localizados en diferentes regiones de la Provincia de Misiones. Se separaron manualmente las hojas de los palos y se molieron en un molino de cuchillas de laboratorio con malla de salida de 1 mm de abertura. Luego se prepararon mezclas con diferentes porcentajes de palos (entre 0 y 100% con intervalos del 10%).

Método de medición del color

El color se determinó utilizando un colorímetro marca HunterLab, modelo D25-9 (Hunter Associates Laboratory, Reston, Virginia). Para la determinación, las muestras se colocaron en cajas de Petri de 58 mm de diámetro y 10 mm de altura. Antes de realizar cada medición, el equipo se calibró utilizando sus correspondientes patrones (blanco y negro). Las determinaciones se realizaron utilizando 3 recipientes y en cada recipiente se realizó la lectura en 3 puntos diferentes. Se utilizó la escala de color HunterLab (L, a, b).

Métodos estadísticos

Se utilizó el método de regresión lineal con los parámetros de color como variable dependiente y los % de palos como variable independiente (Statgraphics, 1993)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores del parámetro de color "L" variaron entre 38,18 y 44,61 en los hojas y entre 57,79 y 62,88 en los palos; los valores del parámetro "a" variaron entre -4,19 y -2,34 en los hojas y entre -4,18 y -2,98 en los palos y los valores del parámetro "b" variaron entre 14,65 y 17,66 en los hojas y entre 17,31 y 17,83 en los palos. De acuerdo a estos valores las variaciones mas significativas fueron del parámetro "L".

Se realizó un análisis de regresión lineal de primer orden considerando como variable dependiente a los parámetros de color y como variable independiente al porcentaje de palos. El parámetro "L" tuvo un ajuste significativo (con $P < 0,0001$) en todos los casos, mientras que los parámetros "a" y "b" no tuvieron una regresión significativa. En la figura 1 se puede observar el ajuste que presentaron los puntos a la línea recta en un caso particular (muestra 2).

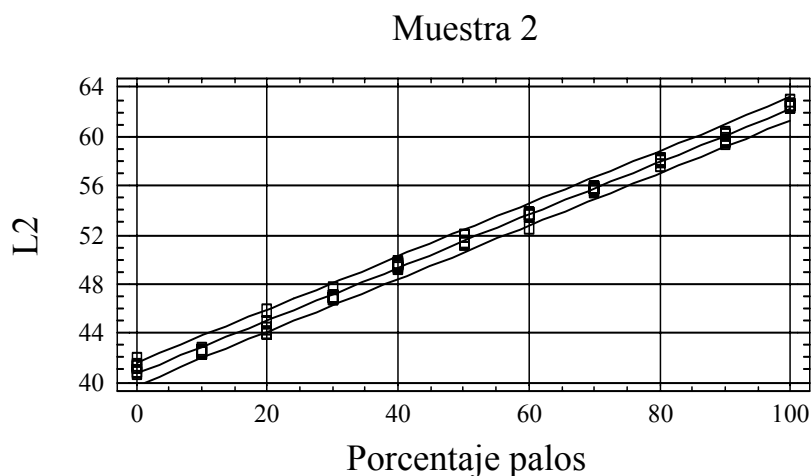


Figura 1. Parámetro de color "L" en función del contenido de palos para la muestra 2. Valores experimentales, línea del ajuste y sus límites de confianza al 95%.

En la misma también se observan los límites de confianza al nivel de significación del 95%. Si se utiliza esta línea para estimar el porcentaje de palos midiendo el valor de "L" para una muestra desconocida, se tendría un error aproximado de $\pm 4\%$ en la estimación. Este valor puede ser considerado bajo al comparar este método con los otros existentes, como ser el del extracto acuoso (Escalada et al., 1998) y el de fibra cruda. Por lo tanto, el mismo podrá ser utilizado como un método de estimación del porcentaje de palos en un

establecimiento industrial y presentaría ventajas respecto a los otros dos métodos por su bajo costo y tiempo de medición.

En la tabla 1 se presentan los valores de las constantes y las ordenadas al origen con sus límites de confianza para cada una de las muestras analizadas considerando el parámetro "L". De acuerdo a esta tabla se puede observar que los límites de confianza de la ordenada al origen presentan valores diferentes en solo 3 casos; mientras que los límites de confianza de las pendientes se solapan en 2 grupos de 3 y 4 muestras respectivamente.

Tabla 1. Ordenada al origen y pendiente y sus respectivos límites de confianza obtenidas al ajustar el parámetro de color "L" en función del porcentaje de palos de yerba mate a una línea recta.

MUESTRA	PENDIENTE		ORDENADA AL ORIGEN	
	Valor Estimado	Límites de confianza	Valor Estimado	Límites de confianza
1	0,22	0,23	40,68	40,91
		0,21		40,45
2	0,20	0,21	41,07	41,38
		0,19		40,76
3	0,18	0,19	43,23	43,66
		0,17		42,80
4	0,18	0,19	42,38	42,63
		0,17		42,13
5	0,19	0,20	38,43	39,01
		0,18		37,85
6	0,21	0,22	40,31	41,04
		0,21		39,58
7	0,23	0,24	39,75	40,68
		0,22		38,82

También se realizó el análisis de regresión lineal considerando todos los datos obtenidos con el parámetro "L" en función del porcentaje de palos. Los resultados se pueden observar en la figura 2. El ajuste resultó también significativo ($P < 0,0001$), pero el error de estimación fue bastante elevado: $\pm 15\%$. Por lo tanto, este método no podría utilizarse como un método general aplicable a muestras de yerba mate no conocidas.

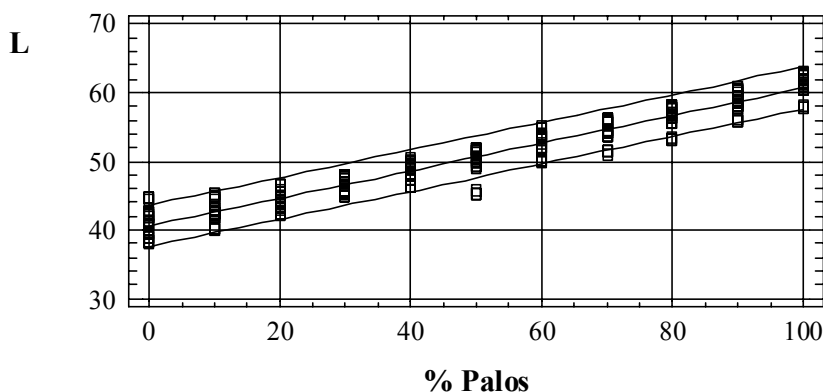


Figura 2. Parámetro de color “L” en función del contenido de palos para todas las muestras. Valores experimentales, línea del ajuste y sus límites de confianza al 95%.

CONCLUSIONES

Al considerar la aplicación de los parámetros de color para estimar el porcentaje de palos en la yerba mate, se encontró que el parámetro “L” era el único que presentaba variaciones importantes en las hojas y los palos. Al realizar un análisis de regresión lineal se encontró que presentaba un ajuste significativo y un error de estimación relativamente bajo y por lo tanto podría ser utilizado como un método de estimación del porcentaje de palos para una marca particular.

Al realizar un análisis de regresión lineal considerando todas las marcas, el ajuste resultó significativo, pero con un error de estimación relativamente elevado ($\pm 15\%$), concluyéndose que no se podrá aplicar como un método general en marcas no conocidas.

BIBLIOGRAFIA

Código Alimentario Argentino. 2000. Art. 1194-1198. Ediciones La Rocca. Buenos Aires, 348-349.

Escalada, M.A.; Schmalko, M.E. y Känzig, R.G. 1998. El extracto acuoso como una medida del contenido de palos en la yerba mate. *Revista de Ciencia y Tecnología* 1 (1), pp. 40-44.

IRAM 20512. 2004. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de porcentaje de palos.

Känzig, R.G. 1995. Erva Mate. *Biología e Cultura no Cone Sul*. Sección: Composicao química e controle da qualidade, pp. 257-259.

Schmalko, M.E. y Alzamora, S.M. 2001. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing. *Drying Technology* 19 (3&4), pp. 599-610.

Statgraphics Plus (Versión 7 for DOS) STATGRAPHICS User manual. Manugistics, Inc. Rockville, Maryland. U.S.A. 1993.

Steet, J.A. y Tong, C.H. 1996. Degradation kinetics of green color and chlorophylls in peas by colorimetry and HPLC. J. Food. Sci. 61 (5), pp. 924-927.

Woniaczuk, M.I.; Zielke, L.E.; Kotik, A.B y Schmalko, M.E. 2003. Control estadístico de parámetros de calidad de la yerba mate elaborada. Actas del 3º Congreso Sul-Americano da Erba-Mate, chapecó, Brasil, 16-19/11/03.

VARIABILIDAD DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA YERBA MATE ELABORADA EN DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS

WONIATCZUK, Mariela I. y SCHMALKO, Miguel E.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales-Universidad Nacional de Misiones
Félix de Azara 1552 – 3300 – Posadas. TE: 03752422186- I. 142 e-mail:
mesh@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar diferentes parámetros de calidad de la Yerba Mate elaborada en paquetes (color, extracto acuoso, porcentaje de palos y contenido de humedad) para determinar las variaciones que tienen en diferentes establecimientos industriales. Se seleccionaron 4 establecimientos, con dos tipos de molienda: la diferencial y la integrada. Se utilizaron métodos analíticos sugeridos por el CAA y las normas IRAM. Se analizaron 18 muestras de los establecimientos 1 y 2 y 36 del 3 y 4 (2 marcas).

Las coordenadas de color “L” y “b” casi no presentaron variaciones obtuyéndose un coeficiente de variación (CV) < 2%; mientras la coordenada “a” tuvo CV% entre el 6 y el 20%. El extracto acuoso, presentó rangos de valores de hasta un 13% y CV% > 10%. Los contenidos de humedad variaron en diferentes épocas y el porcentaje de palos mostró variaciones en un rango del $\pm 9\%$.

Palabras claves: calidad, yerba mate, extracto acuoso, contenido de humedad

ABSTRACT

The objective of this research was the study of different quality parameters of packaged yerba maté (color, water extract, twig percentage and moisture content) in order to determine their variation at different Industries. Four industries, with two different types of milling: differential and integral, were selected. Analytical methods suggested by Argentine Code Food and IRAM standards were used. Eighteen samples of industries I and II and thirty six samples of industries III and IV (two trade marks in each one) were analysed.

Color coordinates *L* and *b* had low changes and presented a variation coefficient (CV%) < 2%; while *a* coordinate had a CV% that varied between 6 and 20%. Water extract had range values until 13% and a CV% > 10%. Water content varied at different periods and twig percentages show variations in a range of $\pm 9\%$.

INTRODUCCIÓN

Si bien existen algunos establecimientos industriales en donde se realiza el procesamiento completo de la yerba mate; la gran mayoría de los molinos procesan materia prima proveniente de diferentes cultivos. Los molineros tratan de mantener sus proveedores y las proporciones que éstos aportan con el fin de mantener el gusto de su producto. Una vez envasado el mismo es transportado a los centros de venta al público y es consumido en periodos que pueden variar de unos días a unos meses.

Uno de los principales problemas que encuentran los consumidores de yerba mate es la poca uniformidad en el gusto. Es bastante usual que los establecimientos reciban reclamos de los compradores por variaciones en el gusto de paquetes comprados en forma consecutiva. Estas variaciones que presenta el producto pueden ser debidas a su vez a diferentes causas. Una de ellas puede ser el diferente grado de estacionamiento de las diferentes partidas, ya que por lo general provienen de distintos depósitos que no siempre son controlados por la empresa. Otra posible causa puede ser que la variación de las condiciones de estacionamiento (humedad relativa, temperatura) produzca variaciones en el contenido de humedad, color y otros factores fisicoquímicos. Una tercera causa de esta variabilidad, además de la natural, podría ser que en el envasado se mezclen diferentes proporciones de fracciones de hojas y palos.

La industria yerbatera utiliza dos tipos diferentes de molienda: la diferencial en la que se muelen los palos y las hojas en forma separada y la integral, en la que la molienda se realiza en forma conjunta. Ambos tipos de molienda podrían producir variaciones diferentes del producto.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar diferentes parámetros de calidad de la yerba mate elaborada (color, extracto acuoso, porcentaje de palos y contenido de humedad) en cuatro establecimientos dedicados a la industrialización de la yerba mate (dos de ellos con molienda integrada y dos con molienda diferencial) y de esta forma determinar las variaciones a lo largo del año y sus valores standards.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizaron paquetes de yerba mate elaborada de 1/2 kg de 4 establecimientos industriales de la Provincia de Misiones. Las muestras eran tomadas de la línea de producción luego del envasado. Se sacaban 3 paquetes por día en horas diferentes. Se analizaron 18 muestras de los establecimientos I y II y 36 muestras del III y IV (2 marcas).

Las muestras de los establecimientos I y II se obtuvieron entre los meses de marzo y mayo de 2003; mientras que las de los establecimientos III y IV se obtuvieron entre julio y setiembre de 2003

Las muestras para medición de color eran molidas con un molino de cuchillas que tenía un tamiz de malla 40 a la salida; mientras que para las otras determinaciones se utilizaron las muestras sin moler.

Determinación del color

El color se midió utilizando un medidor de color para sólidos marca HunterLab D25-9. La coordenada L mide el grado de blancura y tiene los valores de $L = 0$ para el negro y $L = 100$ para el blanco. La coordenada a presenta la escala del verde (negativo) al rojo (positivo). La coordenada b presenta la escala del azul (negativo) al amarillo (positivo).

La muestra era colocada en cajas de Petri de 5,50 cm de diámetro y 0,7 cm de altura. Antes de realizar cada medición el equipo era calibrado utilizando los colores blanco y negro. Las determinaciones fueron realizadas con tres recipientes y por triplicado.

Para determinar las condiciones de trabajo se realizaron ensayos previos en los que se minimizó el error de la determinación. Para ello se ensayaron recipientes de diferentes alturas y tamaños de partícula. La técnica se seleccionó considerando la menor altura del material y el mayor tamaño de partícula en los que no se producía un aumento del error de medición. Las condiciones seleccionadas fueron: altura de 0,7 cm y tamaño de partícula que pasa por malla 40.

Determinación del porcentaje de palos

Con el fin de determinar la cantidad total de palo, se realizó un tamizado de la muestra utilizando tamices de 1x20 mm y n°40 (cuarenta mallas por pulgada).

La fracción retenida sobre el tamiz de 1x20 mm era considerada palo; mientras que la fracción que pasa por el tamiz n°40 era considerada hoja. Con una alícuota de la fracción retenida en el tamiz n°40 proveniente de sucesivos cuarteos, se procedió a extraer con pinza las astillas y cáscaras de palo presentes con lo que se cuantificó la cantidad de palo en dicha fracción.

Este porcentaje, más el retenido por el tamiz de 1x20 mm, se consideró el porcentaje total de palo de la muestra analizada. Se trabajó con una muestra de 200 g en cada caso, realizando luego la extracción de una alícuota (de lo retenido por el tamiz n°40) de 40 g (CAA, 1990).

Determinación del extracto acuoso

A 2g de muestra preparada se le agregaron 200ml de agua caliente, se mantuvo en ebullición suave en un balón con refrigerante a reflujo durante 1 h, agitándose periódicamente y se transfirió a un erlenmeyer de 500 ml, en caliente. Se filtró utilizándose papel de filtro, y se transfirió a un cristizador. El mismo se mantuvo en estufa a 105°C (por 16 horas aproximadamente), hasta sequedad; luego se retiró de la estufa, se enfrió y se pesó (Escalada et al., 1998).

Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó calentándose el material en una estufa a 103 +/- 2°C hasta pesada constante (6 hs). La pérdida de peso se considera como una medida del contenido de humedad (IRAM 20503).

Análisis estadístico

Para comparar las variaciones de los diferentes parámetros en los diferentes días, se utilizó un análisis de varianza de 1 factor. En el cálculo del valor medio, desviación standard y el coeficiente de variación se utilizaron todos los datos del establecimiento, considerándose una variación importante cuando el coeficiente de variación era mayor del 5%. Al realizar el análisis de correlación de las diferentes variables se consideró un nivel de significación del 5% para considerar si existía correlación entre ellas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron los análisis a 18 muestras de cada establecimiento, en dos de ellos se hicieron los análisis a las dos marcas que comercializan. Los valores medios de las variables para los 4 establecimientos están dados en la Tabla 1.

Se encontraron valores del parámetro de color L entre 46,92 y 50,82, con coeficientes de variación de (1,15% y 1,69%, para los establecimientos IVb y IIIb, respectivamente). El parámetro "b" tuvo muy poca variación durante el periodo de control. Debido a la variación que tienen otros parámetros es posible que estos dos parámetros no tengan variaciones importantes en diferentes tipos de yerba mate. Sin embargo, se encontraron variaciones importantes en el parámetro "a" (entre -2,85 y -3,96), con coeficientes de variación de 6,89% (I), 6,96%(II) 6,55%(IIIa), 9,13%(IIIb) 17,27%(IVa), y 20,46%(IVb). Pero se espera que estas variaciones no puedan ser detectadas por los consumidores al comparar dos paquetes comprados en forma consecutiva.

Tabla 1. Valores medios y desviación standard de los parámetros de color L, a y b, del % de palos, extracto acuoso y del contenido de humedad en los establecimientos I, II, IIIa, IIIb, IVa y IVb.

Establecimiento	L	a	b	% palos	Extracto acuoso	Contenido de humedad
I	47,00 ±0,55	-3,51 ±0,24	15,90 ±0,20	22,39 ±2,41	36,32 ±3,78	6,89 ±0,39
II	47,50 ±0,78	-3,96 ±0,27	16,27 ±0,27	20,74 ±2,16	35,10 ±2,82	5,65 ±0,44
IIIa	48,78 ±0,91	-3,48 ±0,23	16,71 ±0,27	24,30 ±4,10	34,63 ±0,98	8,26 ±0,48
IIIb	50,82 ±0,86	-3,90 ±0,36	16,88 ±0,25	29,21 ±4,57	32,60 ±2,81	7,95 ±0,83
IVa	47,07 ±0,74	-3,11 ±0,54	16,64 ±0,33	19,67 ±1,80	37,73 ±1,61	8,92 ±0,82
IVb	46,92 ±0,54	-2,85 ±0,58	16,70 ±0,37	20,14 ±2,69	37,60 ±2,64	9,97 ±0,97

En la Figura 1 se puede observar esta variación durante el tiempo de medición. Las mismas se dieron tanto a lo largo del día como al comparar diferentes días.

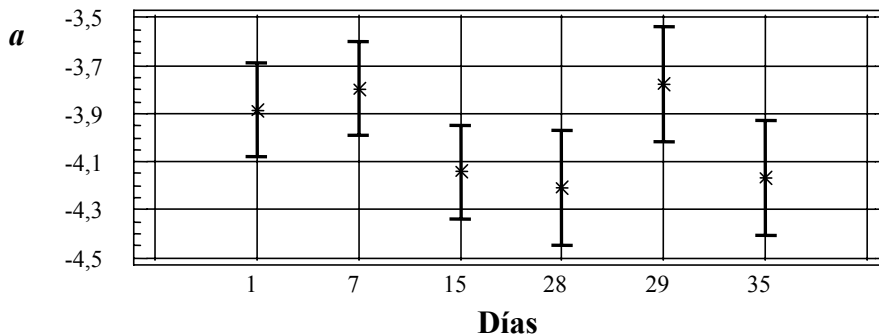


Figura 1. Variaciones del parámetro de color a para el establecimiento I en diferentes días

El extracto acuoso presentó variaciones muy importantes. Se encontraron valores que variaron entre 32,60 y 37,73 g/100 g de sólido seco, con coeficientes de variación de 8,62% (IIIb) y 4,24%(IVa). Esta podría ser una de las variaciones detectadas por los consumidores, ya que la misma está fuertemente relacionada al sabor.

El % de palos varió entre un 19,67% y 29,21% con coeficientes de variación en los establecimientos entre 9,10% y 15,67%. Esta podría ser una de las causas de variación del gusto debido a las diferencias de propiedades que tienen las hojas y los palos y además está correlacionada generalmente al extracto acuoso (Escalada et al., 1998).

El contenido de humedad varió entre 5,20 y 7,96 %, base seca con coeficientes de variación de 5,64%(I) y 10,44%(IIIb). Esta variabilidad podría esperarse, ya que su valor depende de las condiciones ambientales en los depósitos de estacionamiento natural.

Al realizar un análisis de correlación entre las diferentes variables se encuentra que no existe correlación significativa entre las mismas a un nivel de confianza del 95%. Este resultado es llamativo debido a que en la bibliografía se encuentra que existe correlación entre el extracto acuoso, las coordenadas de color y el % de palos (Escalada et al., 1998; Woniaczuk et al., 2003).

Al comparar los coeficientes de los dos establecimientos con molienda diferenciada con respecto a los dos establecimientos con molienda integral (6,04% y 7,50%) se puede concluir que el tipo de molienda produce variabilidades diferentes en los parámetros estudiados.

CONCLUSIONES

Al analizar las mediciones de parámetros de calidad de la yerba mate elaborada en 4 establecimientos industriales y en diferentes épocas, se encontraron grandes variaciones en el parámetro de color *a*, el extracto acuoso, el porcentaje de palos y el contenido de humedad.

Las variaciones encontradas en el porcentaje de palos y el extracto acuoso (generalmente correlacionados entre sí) podrían ser la causa de variación del gusto que encuentran los consumidores de yerba mate, ya que esta última variable está relacionada al mismo.

También se compararon las variabilidades de los parámetros en establecimientos con diferentes tipos de molienda encontrándose que las mismas producen variabilidades diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

CAA. Código Alimentario Argentino. 1990. Yerba Mate. Artículos 1193-1198.

Escalada, M.A.; Schmalko, M.E. y Känzig, R.G. 1998. El extracto acuoso como una medida del contenido de palos en la yerba mate. Revista de Ciencia y Tecnología 1 (1), pp. 40-44.

IRAM N° 20501 (Instituto de Racionalización de Materiales) 1997. Yerba Mate: Muestreo.

IRAM 20503 (Instituto de Racionalización de Materiales) 1995. Yerba Mate: Determinación de la pérdida de Masa a 103 °C.

Woniaczuk, M.I.; Zielke, L.E.; Kotik, A.B y Schmalko, M.E. 2003. Control estadístico de parámetros de calidad de la yerba mate elaborada. Actas del 3º Congreso Sul-Americano da Erba-Mate, chapecó, Brasil, 16-19/11/03.

VARIACIONES DEL COLOR Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE "VINO DE NARANJA" CON LA TEMPERATURA

SCHVAB, Maria del C., FERREYRA, María M.; DALLAZUANA, Andrea E.; VAZQUEZ, Maria C.; ZAPATA, Luz M. Hours, R.

Fac. de Cs. de la Alimentación, UNER. Mñor. Tavella 1450, (3200) Concordia, Entre Ríos Argentina Tel.: (345) 423-1458. Fax: (345) 423-1442. E-mail: schvabm@fcal.uner.edu.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto de la temperatura sobre color y capacidad antioxidante (CA) de "vino de naranja", elaborado con mosto natural y pasteurizado, fermentados y madurados a dos temperaturas, (20 y 10 ° C). Se determinó: CA mediante técnicas espectrofotométricas; color midiendo absorbancia a cuatro longitudes de onda calculando los parámetros CIELab (L^* , a^* , b^*), índice de amarronado, ($A_{\lambda 420}$) y concentración de Ác. Ascórbico (HPLC AOAC, 1984) Los valores de b^* y L^* aumentaron con el tratamiento térmico del jugo al igual que con las temperaturas más altas de fermentación y maduración. El ácido ascórbico, y CA disminuyeron para los vinos de mostos tratados térmicamente fermentados y madurados a 20° C. La temperatura del proceso influyó sobre la concentración de ácido ascórbico lo que correlaciona con la variación observada de CA, los cambios de color e índice de amarronado.

Palabras Claves: "Vino de naranja"- antioxidante-color-temperatura

ABSTRACT

The effect of temperature on color and antioxidant activity (CA) of "orange wine", made from natural and pasteurized must, at two fermentation and maturation temperatures (20 and 10 ° C) was studied. Determinations were carried out: CA by spectrophotometric techniques, color by measuring absorbance at four wavelengths calculating CIELab (L^* , a^* , b^*), browning index, ($A_{\lambda 420}$) and ascorbic acid concentration (HPLC AOAC, 1984). The b^* and L^* values increased during thermal treatment of the juice as well as with higher fermentation and maturation temperatures. Ascorbic acid and CA decreased in wines from thermally treated must, fermented and matured at 20° C. The process temperature influenced ascorbic acid concentration. This correlates with the AC observed variation, color changes and browning index.

INTRODUCCIÓN

El color es uno de los más obvios atributos de calidad de los vinos y depende de factores tales como: características del mosto, técnicas de vinificación y numerosas reacciones que ocurren durante el almacenado.

Por otra parte en los últimos años han cobrado creciente interés los efectos beneficiosos del consumo moderado de vino; demostrándose la disminución del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares debido a la presencia de sustancias antioxidantes (van Golde, 2004)

La evaluación de estas características cobra gran importancia cuando se trata de un producto nuevo como es el caso de "vino de naranjas"

En el jugo de naranja los compuestos fenólicos solubles identificables son hesperidina y narirutina, pero el principal antioxidante es el ácido ascórbico (87% de la actividad antioxidante total). (Millar and Rice-Evans 1996)

La oxidación del ácido ascórbico además de pérdida nutricional también produce compuestos con radicales carbonilos que reaccionan con grupos aminos y por polimerización producen pigmentos oscuros (Correa Neto e Faria. 1999)

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura durante el proceso de elaboración de "vino de naranjas" (un producto obtenido por fermentación de jugo de naranja usando cepas de *Saccharomyces* spp.), sobre el color y la actividad antioxidante

MATERIALES Y METODOS

La variedad de naranja seleccionada para la vinificación fue la W. Navel. Se trabajó con dos mostos, natural y pasteurizado (90°C. 5 min) dos temperaturas de fermentación y de maduración 10 y 20°C.

Para la determinación del color (CIE. L*, a*, b*) se utilizó el Programa MSCV propuesto por el Grupo de color. Universidad de La Rioja - Universidad de Zaragoza 2002 mediante la medida de la absorbancia a cuatro longitudes de onda (450, 520, 570, 630 nm) y cubetas de 10mm. Se determinó índice de amarronado mediante $D_{\lambda 420}$ y se monitoreó el contenido de ácido ascórbico en mg/100 ml (AOAC 43.064, 1984).

Para determinar la actividad antioxidante las técnicas ensayadas fueron:

Método 2,2-difenil-1-picryl hidrayl DPPH (Brand-Williams) según el protocolo de Cavin (1998). Como standard se utilizó ácido ascórbico en un rango de concentraciones desde 0,05 hasta 0,4 $\mu\text{g/mL}$ se lee la $A{\lambda 517}$.

-Método FRAP (ferric reducing antioxidant power) curva estándar con una solución de Fe_2SO_4 expresando el resultado en ácido ascórbico lo cual se obtiene multiplicando la lectura de $A_{\lambda 593}$ por 2. (Benzie and Strain 1996)

Las muestras de vino de naranja provenientes de mosto natural se diluyeron $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$, mientras que las de vino provenientes de mosto pasteurizado se ensayaron sin diluir presumiendo una menor actividad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las características cromáticas determinadas para los "vinos de naranja" jóvenes a 10 y 20° C (vinos 1 y 2) y después de 120 días de maduración a 10 y 20 °C (vinos 3 y 4); para los dos mostos (jugo natural y jugo pasteurizado de naranja) se muestran en las Figuras 1 y 2.

Los valores absolutos de a^* para los vinos de mosto de jugo natural madurados durante 120 días a las dos temperaturas experimentaron una leve disminución. Para los vinos de mosto pasteurizado este parámetro evolucionó de la misma manera, aunque sus valores absolutos son algo mayores.

En los vinos finales el parámetro a^* tomó valores muy pequeños mayoritariamente negativos tanto para los dos mostos, como para las temperatura de fermentación y maduración estudiadas. La variación del color rojo fue casi imperceptible.

Las variaciones de b^* desde el vino joven hasta el final para todas las condiciones estudiadas también fueron leves y en la mayoría de los casos disminuyó.

Los valores medios de b^* fueron de 7.3 y 10.9 para los vinos de mosto natural y de 12.2 y 18.5 para los vinos de mosto pasteurizados, considerando las dos temperaturas de fermentación y de maduración. Esto marca una mayor contribución del color amarillo en los vinos de mosto pasteurizado.

El parámetro L^* presentó una tendencia a aumentar después del almacenamiento. Esta coordenada arrojó valores ligeramente superiores para los vinos de mosto natural, evidenciándose una mayor claridad, siendo los valores medios de 95.5 y 98 y de 79 y 94 para ambas temperaturas de fermentación y mostos. En todos los casos se observaron pocos cambios entre las dos temperaturas de maduración, siendo menores para 20 °C. Fig. 1 y 2

Este comportamiento concuerda con el observado por Muñoz *et al* (1998) respecto a la acción de la temperatura sobre este parámetro de color en los vinos.

En los vinos de naranja se han encontrado valores de las coordenadas de color similares a lo que se espera para un vino blanco.

Se observó que las pérdidas de vitamina C por la pasteurización del jugo no son tan importantes (10%), y están dentro del orden común de la práctica.

En cambio se detectó que las pérdidas durante el proceso fermentativo fueron de mayor cuantía, sobre todo en el tramo que va desde el primer trasiego y la obtención del vino joven. Fig 3 y 4.

Las pérdidas fueron de alrededor del 30% para el mosto natural y del 54% para el mosto pasteurizado.

La temperatura de fermentación es la que más influyó en la concentración final de vitamina C. En la fig. 3 se observa la variación de este ácido con el tiempo y las temperaturas de proceso para el mosto pasteurizado. Para los fermentados a 20°C las pérdidas fueron de un 67% durante los primeros 40 días, esto es, desde el inicio de la fermentación hasta la obtención del vino joven. Cuando la temperatura de fermentación fue de 10°C la merma fue de 45%.

En cuanto a los vinos de mosto de jugo natural (fig. 4) las mermas fueron de 46% y 28% respectivamente.

En conclusión, la mayor temperatura durante la fermentación aceleró la degradación del ácido ascórbico. La influencia de la temperatura de maduración fue prácticamente despreciable.

El ensayo estadístico arrojó diferencias significativas con un 95% de confianza entre las concentraciones de vitamina C considerando las dos temperaturas de fermentación tanto para los mostos de jugo natural como para el pasteurizado.

Este comportamiento de la vitamina C está relacionado con los respectivos aumentos en el índice de amarronado.

La correlación entre la concentración del ácido ascórbico y el índice de amarronado tiene signo negativo. (Fig. 5)

La temperatura de fermentación parece haber influido en el incremento de este índice ya que se registraron valores superiores cuando la fermentación se realizó a 20 °C. Sin embargo, con la temperatura de maduración no se observó un comportamiento similar. Los valores obtenidos para este parámetro son semejantes a los reportados por Selli, S; *et al* (2002).

Es de hacer notar que los vinos de mosto pasteurizados han presentado un mayor índice de amarronado desde el vino joven, lo que podría atribuirse a la formación de compuestos oscuros durante el proceso de pasterización (Roig *et al*, 1999).

Rodríguez *et al*, (1991) reportaron que el incremento en el tiempo y temperatura de almacenamiento aumenta el índice de amarronado de los vinos elaborados a partir de

jugo de naranja para temperaturas de almacenamiento de 25 °C, relacionado con el contenido de ácido ascórbico y azúcares.

Selli, S; *et al* (2002).determinaron el efecto que el color de las botellas ejerce sobre el índice de amarronado de los vinos de naranja almacenados 150 días a 24 °C reportando valores de $A_{\lambda 420}$ para vinos contenidos en envases de vidrio verde de 0,27, valores concordantes con los obtenidos para los vinos obtenidos a partir de mosto natural

La variación de la actividad antioxidante frente a los iones ensayados evidenció el efecto del tratamiento térmico del jugo sobre algunas sustancias termolábiles, observándose una marcada disminución con todas las condiciones ensayadas. Fig 6 y 7.

Respecto de las temperaturas de fermentación y maduración, se podría decir que la combinación de ambas es la determinante de la disminución de la capacidad antioxidante presentando distintos patrones de variación según el método utilizado para su determinación, a saber:

Para el método FRAP la temperatura de fermentación fue la de efecto más marcado, presentando mayor actividad los vinos fermentados a menor temperatura; tanto para los mostos de jugo pasteurizado como para el natural. La mayor actividad antioxidante frente a este ión la presentaron los vinos fermentados y madurados a 10 °C para ambos mostos .Fig. 7

Para el método DPPH los vinos de mosto natural se comportaron de manera similar a lo descrito anteriormente. En cambio en los vinos de mosto de jugo pasteurizado se observó mayor influencia de la temperatura de maduración, siendo los vinos fermentados y madurados a 20 ° C los que presentaron mayor actividad antioxidante; hecho que podría deberse a la formación de algún compuesto coloreado que absorba a la longitud de onda de trabajo Fig. 6-

CONCLUSIÓN

El tratamiento térmico del jugo influyó sobre el parámetro de color b^* (aumentó para los pasteurizados) y en menor cuantía sobre el L^* del sistema CIELAB. En cuanto a la temperatura de fermentación y maduración, los colores más intensos se obtuvieron para las temperaturas más altas. .

De los resultados obtenidos podríamos concluir que el "vino de naranja" presenta actividad antioxidante frente al ión DPPH* lo que nos daría una idea de la capacidad captadora de radicales libres del producto..

Esta propiedad se asocia con la capacidad de ciertos compuestos de secuestrar especies reactivas del oxígeno y nitrógeno que podrían causar graves daños celulares en el organismo.

También actúa reduciendo el complejo TPTZ-Fe⁺³, en el método FRAP, lo que estaría relacionado con la capacidad de actuar en el organismo protegiendo las defensas antioxidantes con las que este cuenta.

Estas características de los vinos estudiados son atribuidas tanto al ácido ascórbico como a los compuestos fenólicos presentes, provenientes de la fruta.

El tratamiento térmico efectuado influyó en la disminución de ácido ascórbico, lo que correlaciona con la variación observada de actividad antioxidante y los cambios en el color y en el índice de amarronado.

BIBLIOGRAFIA

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power". The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* . 239, 70-76.

Cavin, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O. (1998). Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa* . *Planta Med.*, V 64, 393-396

Correa Neto, R. e Faria, J. (1999). Factores que influem na qualidade do suco de laranja. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. Vol 19, N° 1.

Millar N. and Rice-Evans C. (1996). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*. Vol: 60, N° 3; 331-337

Muñoz ; R.; Gomez, E.; Martinez, A.; Lopez, J.M. (1998). Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during winefermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Science and Technology*. Vol 30, N° 9. 699-705.

Rodriguez, M.; Sadler, G.C.; Sims, C.A. y Braddock, R.J. (1991). Chemical Changes during Storage of an Alcoholic Orange Juice Beverage. *Journal of Food Science*. Vol 56, N° 2: 475-493.

Roig, M.G.; Bello, J.F.; Rivera, Z.S. y Kennedy, J.F. (1999). Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juices. *Food Research International*, 32: 609-619.

Selli, S.; Canbas, A. y Ünal, Ü. (2002). Effect of Bottle Colour and Storage Condition on Browning of Orange Wines. *Nahrung/ Food*. Vol. 46, N° 2: 64-67.

van Golde, P. (2004) Characteristics of piraltrin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life Science*, Vol. 74, issue 9, 1159-1166.

Programa informático MSCV propuesto por el Grupo de color. Universidad de La Rioja -
Universidad de Zaragoza 2002

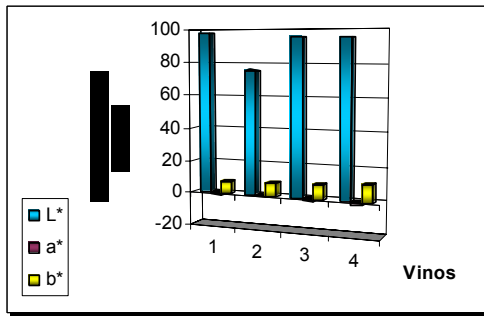


FIGURA 1: Características Cromáticas de los "Vinos de Naranja", para mosto de jugo natural.

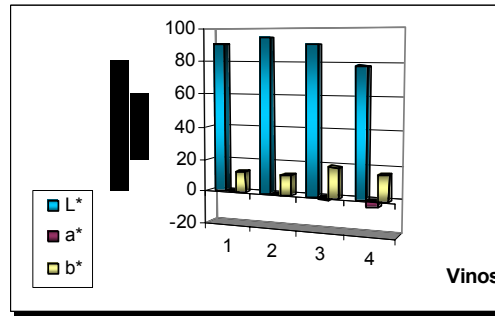


FIGURA 2: Características Cromáticas de los "Vinos de Naranja", para mosto de jugo pasteurizado.

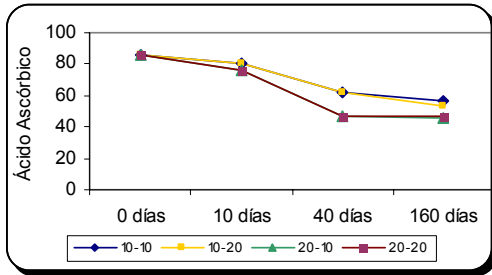


FIGURA 3: Variación del contenido de Vitamina C durante el proceso, para mosto de jugo natural.

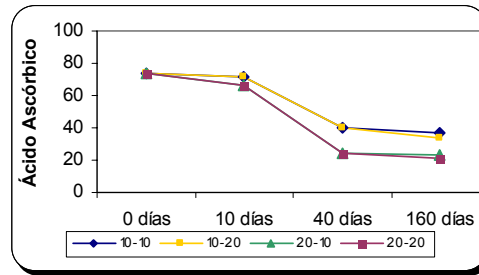


FIGURA 4: Variación del contenido de Vitamina C durante el proceso, para mosto de jugo pasteurizado.

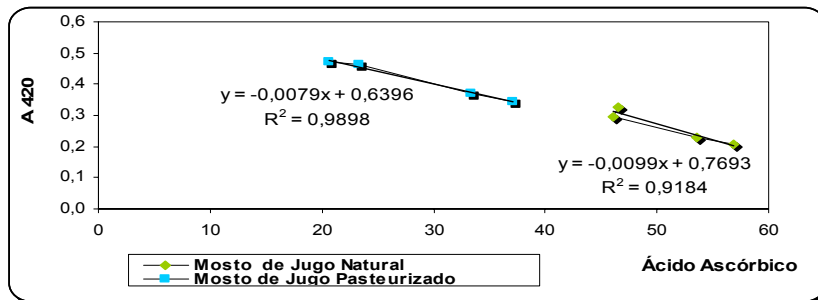


FIGURA 5: Correlación entre el contenido de ácido ascórbico y el Índice de amarrado.

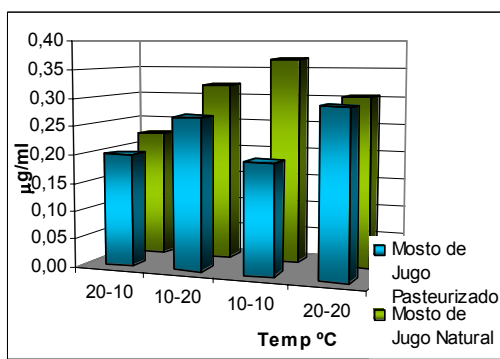


FIGURA 6: Actividad Antioxidante del "Vino de Naranja" expresado en equivalentes de ácido ascórbico por el método DPPH.

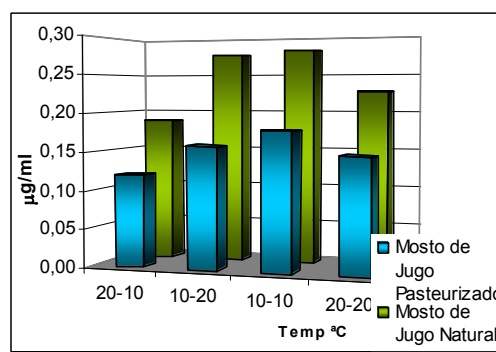


FIGURA 7 Actividad Antioxidante del "Vino de Naranja" expresado en equivalentes de ácido ascórbico por el método FRAP.

YERBA MATE ELABORADA EN SAQUITOS: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA GANANCIA DE HUMEDAD

RAMALLO, Laura A.y DRESCH, Griselda

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – Universidad Nacional de Misiones
Felix de Azara 1552 – (3300) Posadas, Misiones. iram@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Se estudió la ganancia de humedad en yerba mate destinada al consumo en infusiones, en dos tipos de envases: cajas de saquitos ensobrados y cajas de saquitos sin ensobrar. El estudio se llevó a cabo a dos humedades (72% y 91% RH) y dos temperaturas (30°C y 40°C). Se utilizó el modelo empírico de Page para describir la variación en el contenido de humedad del producto en función del tiempo de almacenamiento, en condiciones ambientales (humedad y temperatura) constantes. Se observó que el parámetro N depende del tipo de envase mientras que el parámetro K aumenta con la temperatura y la humedad relativa del ambiente de exposición. Los valores del error relativo porcentual de la estimación fueron inferiores al 2% en todos los casos.

Palabras clave: yerba mate, almacenamiento, ganancia de humedad, Modelo de Page.

ABSTRACT

The moisture gain in yerba mate destined to consumption in infusions was studied, in two types of packages: boxes of envelope bags and boxes of bags without envelope. The work was carried out at two humidity (72% and 91% RH) and two temperatures (30°C and 40°C). The Page's empirical model was used to describe the variation in moisture content of the product in function of the storage time, in constant environmental conditions (humidity and temperature). It was observed that parameter N depends on the type of package whereas parameter K increases with the temperature and relative humidity of room exposition. The values of the mean relative error of the estimation were inferior to 2% in all the cases.

INTRODUCCIÓN

El contenido de humedad es un factor determinante de las reacciones de deterioro de los alimentos. En la yerba mate, dicho deterioro es percibido por el consumidor a través de cambios en la calidad organoléptica del producto (Surkan et al., 2004), por lo que tiene

especial interés el estudio de la ganancia de humedad durante el almacenamiento del alimento.

En los alimentos envasados semi-secos, la ganancia de humedad durante el almacenamiento se puede estudiar como el resultado final de dos mecanismos acoplados: el pasaje de humedad a través del envase (permeabilidad) y la absorción de la misma por parte del alimento (fenómeno regido por la isoterma de absorción) (Robertson, 1993).

La yerba mate elaborada y envasada destinada al uso tradicional (mate), se puede encuadrar perfectamente dentro de estos sistemas físicos. Así, bajo un enfoque matemático de estas características se ha estudiado la ganancia de humedad de hojas semi secas y molidas de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (yerba mate), envasada en paquetes con diferentes características barrera a la humedad, en condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura) constantes (Ramallo and Albani, 2004)

El planteo matemático de los mecanismos de ganancia de humedad de la yerba mate envasada en saquitos, es bastante más complejo ya que el sistema de envase está constituido por: un film polimérico, una caja de cartón y los saquitos de papel de filtro, que a su vez pueden estar contenidos en sobres de papel kbm. El sistema de adsorción de humedad no es menos complejo ya que cada uno de estos elementos (cartón, papel, etc) tiene su propia isoterma de sorción que se combina es estado de pseudo-equilibrio con la isoterma de la yerba mate. Es necesario, además, considerar el mecanismo de difusión de agua dentro de cada saquito. Sin embargo, un modelo que incorpore tantos efectos físicos podría tornarse prohibitivamente complicado de aplicar desde el punto de vista matemático y por la cantidad de parámetros físicos-químicos requeridos a tal fin.

Ello justifica la aplicación de modelos empíricos simples, tales como la ecuación de Page, para predecir la ganancia de humedad en yerba mate envasada en saquitos.

Se tienen antecedentes de la aplicación del modelo de Page para describir el movimiento de agua durante la deshidratación de diferentes alimentos: secado de arroz (Ramesh and Rao, 1996; Chandra and Singh, 1984); secado de semillas de girasol (Syarief et al., 1984); deshidratación osmótica de peras (Park et al., 2002); etc.

Es objetivo del presente trabajo cuantificar la ganancia de humedad de la yerba mate envasada en saquitos, expuesta a diferentes condiciones ambientales y utilizar la ecuación de Page para describir la cinética de ganancia de humedad del alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Procedimiento experimental

El material en estudio consistió en cajas de cartón conteniendo 25 saquitos de 3g de yerba mate. Este producto se comercializa en dos tipos de envases interiores: saquitos ensobrados y saquitos sin ensobrar. Para una mejor descripción del producto, 3 g del alimento están contenidos en una bolsita de tela de filtro, que a su vez puede estar contenida en un sobre de papel kbm (saquitos ensobrados) o sin el mismo (saquitos sin ensobrar). Los saquitos se alinean dentro de una caja de cartón recubierta con un film polimérico (PVC termocontraíble de 0.025 mm en las muestras analizadas y papel celofán, en otros casos).

Las dimensiones de las cajas son: 15.5 cm x 8 cm x 7 cm cuando contienen saquitos ensobrados; y 14.5 cm x 6.5 cm x 6 cm cuando contienen saquitos sin ensobrar. Estas dimensiones se verificaron uniformes con cinco marcas comerciales diferentes.

Las cajas se colocaron en celdas cerradas conteniendo soluciones salinas saturadas, de manera de mantener la atmósfera a humedad relativa (aw) constante. Dichas celdas se almacenaron en estufa a temperatura controlada ($\pm 2^\circ\text{C}$). Se trabajó a dos humedades (72% y 91% RH) y dos temperaturas (30°C y 40°C).

Se registró el aumento de peso de las muestras en función del tiempo de exposición. El contenido de humedad a cada tiempo se evaluó en función a la ganancia en peso de cada muestra y al contenido inicial de humedad. Para cuantificar el contenido inicial de humedad en la yerba mate se tomaron, en cada caso, dos cajas de la misma partida: una se destinó al ensayo de ganancia de humedad en condiciones de almacenamiento controladas y la otra se abrió para cuantificar el contenido de humedad del alimento.

Al cabo de un cierto tiempo de almacenamiento (más de 45 días) se cuantificó el contenido de humedad real de la yerba mate contenida en las cajas. Se procedió de esta manera para examinar posibles errores debido a la ganancia de humedad por parte del material de envase.

El contenido de humedad de la yerba mate se determinó empleando el método gravimétrico, en estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 8 horas hasta peso constante (Normas IRAM 20503).

Metodología de cálculo

Se utilizó el modelo de Page para describir la variación en el contenido de humedad del producto en función del tiempo de almacenamiento, en condiciones de humedad y temperatura constantes.

La ecuación (1) fue desarrollada para explicar la pérdida de agua durante el secado en capa fina (Page, 1949).

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = \exp(-K t^N) \quad (1)$$

Los valores del contenido de humedad de equilibrio (M_e) se obtuvieron de las isotermas de absorción de hojas y palos de yerba mate (Kanzig et al., 1987; Scipioni et al., 2002).

M_0 representa el contenido de humedad inicial de la yerba mate ($t=0$) y M , el contenido de humedad del alimento a cada tiempo.

Las curvas de $\ln(MR)$ como una función del tiempo de exposición fueron construidas a partir de los datos experimentales y los valores de K y N se determinaron mediante análisis de regresión de la ec. (2):

$$\ln(MR) = -K t^N \quad (2)$$

donde K se definió como la pendiente de la recta resultante y N fue el parámetro de ajuste; resultando aquel valor de N que arrojase el mejor valor de coeficiente de correlación (r^2).

El criterio aplicado para evaluar la bondad de la estimación fue el error promedio porcentual (Epp).

$$Epp = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{M_{\text{exp}} - M_{\text{estimado}}}{M_{\text{exp}}} \quad (3)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conociendo la relación de humedad (MR) en función del tiempo, se pudieron determinar los valores de K y N para diferentes condiciones ambientales, en los dos tipos de muestras en estudio. El error relativo promedio porcentual (Epp) de la estimación varió entre 0.624% y 2.02%, como se muestra en la Tabla 1. El parámetro N adoptó valores en rangos diferentes de acuerdo al tipo de muestras: para cajas con saquitos ensobrados estos valores variaron entre 1.0 y 1.19. En tanto para cajas con saquitos sin ensobrar los valores de N variaron de 0.76 a 0.82.

El parámetro K puede ser considerado como una medida de la velocidad de ganancia de humedad cuando se comparan experiencias con idénticos valores de N , puesto que N determina la escala del eje de abscisas (t^N) en el análisis de regresión (Ec.(2)). De esta manera se pueden cotejar valores K entre muestras del mismo tipo y así se observó que K aumenta con la temperatura y con la humedad ambiente.

El efecto del ensobrado de los saquitos como barrera al pasaje de humedad depende de las condiciones de almacenamiento (Figura 1).

Tabla 1: parámetros de la ecuación de Page y el error promedio porcentual (Epp) de la estimación.

	Caja saquitos ensobrados			Caja saquitos sin ensobrar		
	K	N	Epp	K	N	Epp
30°C 72%RH	0.0014	1.19	0.98			
40°C 72%RH	0.002	1.0	1.28	0.0155	0.76	2.020
30°C 91%RH	0.0019	1.1	0.624	0.0063	0.82	1.341
40°C 91%RH	0.0036	1.0	0.786	0.0121	0.82	1.858

El efecto del ensobrado de los saquitos como barrera al pasaje de humedad depende de las condiciones de almacenamiento (Figura 1).

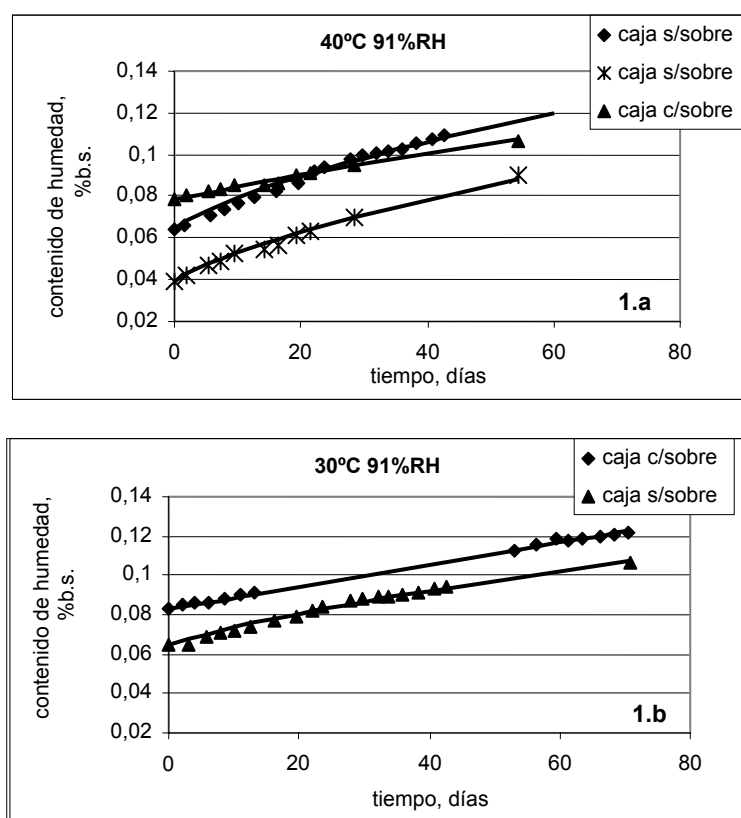


Figura 1: Evolución del contenido de humedad (g de agua/100 g de masa seca) en cajas conteniendo saquitos de yerba mate con diferentes características: saquitos ensobrados y saquitos sin ensobrar, expuestas a 40°C-91%RH (1.a) y 30°C-91% RH (1.b). Las líneas continuas señalan los valores predichos por el Modelo de Page.

Aquí las líneas continuas representan los valores estimados con la ecuación de Page y los símbolos (♦, ▲, *), los valores experimentales. La Figura 1.a representa el contenido de humedad, en g de agua por 100g de sólido seco, de cada muestra (caja) en función del tiempo, durante el almacenamiento a 40°C y 91%RH. Puede verse que muestras con el mismo tipo de envase (saquitos sin ensobrar) pero con diferente contenido inicial de agua (Mo), presentan idéntica pendiente. Como era de esperar, se aprecia una menor

velocidad de ganancia de humedad (pendiente de las curvas) en las cajas con saquitos ensobrados.

La Figura 1.b muestra que la existencia de los sobres de papel como envoltorio de los saquitos no ejercen efecto barrera al pasaje de humedad a 30°C y 91%RH., puesto que no existen diferencias significativas en las pendientes de las dos curvas experimentales de contenido de humedad en función del tiempo de exposición.

Ensayos realizados a la misma temperatura (40°C) y a dos humedades ambientales diferentes (72% RH y 91% RH) muestran dependencia de la velocidad de ganancia de humedad con la humedad relativa del ambiente de exposición, tanto para las cajas de yerba mate en saquitos ensobrados como para cajas de yerba mate en saquitos sin ensobrar (Figura 2).

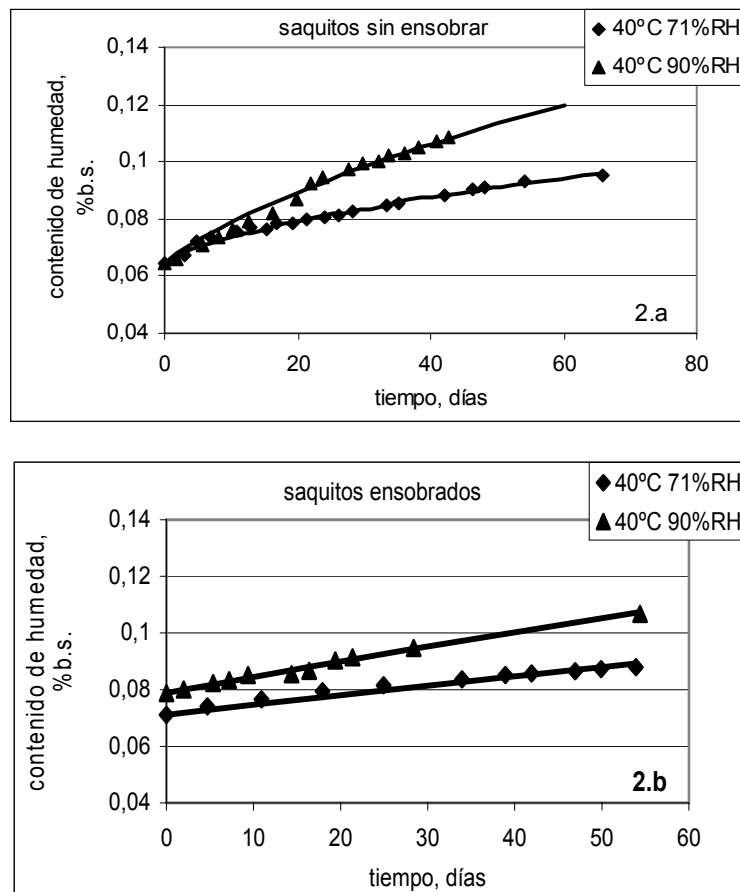


Figura 2: influencia de la humedad relativa del ambiente durante el almacenamiento de cajas de yerba mate envasada en saquitos ensobrados y sin ensobrar, a temperatura constante. Las líneas continuas señalan los valores predichos por el Modelo de Page.

CONCLUSIONES

La evaluación de los resultados muestra que el modelo de Page predice adecuadamente la ganancia de humedad en yerba mate envasada en saquitos en función del tiempo de

almacenamiento. Los valores del parámetro N del modelo varían con el tipo de envase utilizado y son independientes de las condiciones de almacenamiento.

El Código Alimentario Argentino establece que el límite legal del contenido de humedad de yerba mate envasada es del 9.5% b.s. Valores predichos a partir del modelo propuesto indican que en las condiciones de almacenamiento más desfavorables (alta temperatura y humedad) el envase con saquitos ensobrados cumple una importante función de protección del alimento respecto del envase con saquitos sin ensobrar, aunque es insuficiente barrera al pasaje de humedad como para garantizar que dicho límite legal pueda ser respetado durante el almacenamiento o la exposición en góndolas.

BIBLIOGRAFÍA

Kanzig, R.; Novo, M. y Schmalko, M. (1987) Comparación estadística de las isotermas de porción de yerba mate. Revista de la SGCyT-UNaM. 5:13-24.

Sciopioni, P.; Meza, B. y Arguello, B. (2002) Estudio de las humedades de equilibrio de adsorción de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*. Libro de actas del IX Congreso CYTAL, Buenos Aires.

Robertson, G. (1993) Food Packaging. Marcel Dekker Inc., New York.

Ramallo, L.A. and Albani, O.A. (2004) Prediction and determination of water uptake in packaged yerba mate. Food Science and Technology International; 10(1):35-40.

Ramesh, M.N. and Rao, P.N. (1996) Drying studies of cooked rice in a vibrofluidised bed dryer. Journal of Food Engineering; 27: 389-396.

Park, K.; Bin, A.; Reis Brod, F. and Park, T. (2002). Osmotic dehydration kinetics of pear D'anjou (*Pyrus communis* L.). Journal of Food Engineering; 52: 293-298.

Page, G.E. (1949) Factors influencing the maximum of air drying shelled corn in thin layer. M.Sc. Thesis, Purdue University, Indiana, USA.

Chandra, P.K. and Singh, R.P. (1984) Thin layer drying of parboiled rice at elevated temperatures. J. Food Sc., 49(3):905-909.

Syarief, A.M.; Morey, R.V. and Gustafson, R.J. (1984) Thin- layer drying rates of sunflower seed. Trans. ASAE, 27(1):195-200.

IRAM (1996) Yerba mate: determinación de la pérdida de masa a 103°C. Norma 20503. Buenos Aires.

Surkan, S.; Albani, O. y Ramallo, L. (2004). Pérdida de calidad sensorial durante el almacenamiento de la yerba mate. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina.

EVALUACION NUTRICIONAL DE HARINA DE CHIA COMERCIAL

MARCHESICH, Claudia¹; CABRERA, Mildred¹; MARCHINI, Mariano¹; CLOSA, Sara¹;
MEDANICH Marina²; DE LANDETA Cristina³; PIGHIN Andrés³

(1) Departamento de Tecnología. Nutrición. (2) Estudiante de Ing. en Alimentos,
(3) Departamento de Cs. Básicas. Química Analítica. Universidad Nacional de Luján.
C.C. 221 (6700) Luján. Bs.As. ARGENTINA. E-mail: mccmnut@mail.unlu.edu.ar

RESUMEN

Con el objetivo de generar datos para poder incorporar la harina de chía a la formulación de productos alimenticios se realizó la evaluación nutricional de lo que actualmente se comercializa como harina de chía parcialmente desengrasada, que resulta ser la torta remanente de la extracción del aceite de las semillas de chía triturada hasta un nivel de partícula uniforme.

Se determinaron los porcentajes de sólidos totales, cenizas, proteínas, grasa, fibra dietaria e hidratos de carbono asimilables, valor calórico, perfil de ácidos grasos, sodio, potasio, calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre, zinc y manganeso. Los análisis se realizaron siguiendo las técnicas del AOAC.

Los resultados obtenidos muestran que la harina de Chia posee una composición en nutrientes de gran interés actual, particularmente por el contenido de ácidos grasos omega 3, fibra, potasio y otros nutrientes. Por lo tanto la Chia tiene buenas posibilidades para ser utilizado como ingrediente para mejorar la calidad nutricional de alimentos tradicionales.

Palabras claves: Evaluación nutricional, harina de chía, enriquecimiento, fortificación.

ABSTRACT

With the aim of generating data to incorporate Chia flour into food product formulations, nutritional evaluation of partially defatted Chia flour was done. This product is the remanent cake of the oil extraction from Chia seeds, triturated in order to get uniform particle size.

Total solids, ash, protein, total fat, dietary fiber, digerable carbohydrates, caloric value, fatty acids profile, sodium, potassium, calcium, phosphorous, magnesium, iron, copper, zinc and manganese content were determined. Analyses were done according to AOAC techniques.

Results obtained show Chia flour has nutrient composition with great current interest, specifically omega 3 fatty acids, fiber and potassium content as well as some other nutrients. Chia has good possibilities to use as ingredient improving nutritional quality of traditional foods.

INTRODUCCION

La chía, el amaranto, la quinoa, los porotos y el maíz constituyeron la base de la alimentación de las poblaciones precolombinas de la zona Andina.

La conquista española sometió a los nativos, suprimió sus tradiciones e inutilizó la mayor parte de la producción agrícola existente y su sistema de comercialización. Muchos cultivos que tuvieron una posición preponderante en las dietas de estas poblaciones fueron reemplazados por otras especies traídas del viejo mundo como trigo y cebada, que tenían una gran demanda entre los conquistadores. La ciencia moderna ha llegado a la conclusión de que las dietas precolombinas eran superiores nutricionalmente a las que se consumen hoy en día en la misma región (Seia Goñi 2004).

Por esta razón, en la actualidad hay una revalorización de las cualidades nutricionales de algunos de estos viejos cultivos olvidados como amaranto, quinoa, chía y otros.

En este trabajo se seleccionó la chía cuyo nombre científico es *Salvia hispánica L.*, para su evaluación nutricional, principalmente por ser considerada una de las fuentes naturales con mayor concentración de ácido linolénico, superior al contenido de alimentos aportadores tradicionales como el lino, pescados y otros frutos del mar. Las semillas de chía son sembradas en la región del NOA en el período enero – febrero y cosechados en los meses de mayo y junio. Las mismas son procesadas en nuestro país.

De los productos comerciales de chía se tomó la harina desengrasada, que resulta ser la torta remanente de la extracción del aceite, molida y tamizada hasta un nivel de partícula uniforme, por considerarlo el de mayor versatilidad para la industria de alimentos

Las semillas de chía aún luego de la extracción en frío del aceite, contienen cantidades importantes de esta materia grasa tal manera que la harina de chía comercial es una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Cabe recordar que los AGPI en los vegetales son el ácido linoleico (18 :2 w6) y el ácido linolénico (18:3 w3) son esenciales para los organismos animales.

Cumplen con la función de dar fluidez y estructura adecuada a las membranas biológicas (e! w3 se ubica en los fosfolípidos de retina y cerebro) y son prescursores en la biosíntesis de las diferentes prostaglandinas (prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) (FAO 2000).

Las prostaglandinas actúan como moduladoras de reacciones importantes en el organismo y pueden tener una acción que varía según el precursor del que proceden

Los AGPI w6 generan prostaciclina y tromboxanos de la serie 1 y 2 y los AGPI w3 la serie 3. Las prostaciclina actúan como vasodilatadoras y antiagregantes de plaquetas en tejidos vasculares mientras que los tromboxanos son agregantes plaquetarios y vasoconstrictores (FAO 2000).

Los tromboxanos de la serie 3 (precursor los AGPI w3) son agregantes leves de plaquetas, en cambio, los de la serie 2 (precursor AGPI w6) son muy potentes por ello se requiere un consumo adecuado de AGPI w3 para disminuir el riesgo de trombosis (FAO 2000).

Dado que las grasas son los nutrientes más ligados a las enfermedades cardiovasculares hay recomendaciones de organismos internacionales (3) sobre el consumo de grasas, tanto en cantidad como en tipo de ácidos grasos que debe aportar la dieta

El consumo de grasas no debe superar el 30% de la ingesta calórica diaria. La meta nutricional es restringir la ingesta de ácidos grasos saturados hasta menos del 10% de la ingesta energética diaria, proporcionar una cantidad adecuada de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), lo que significa un 6% - 10 % con una relación óptima entre el consumo AGPI w3 y AGPI w6, de alrededor de 1/3, completando la ingesta energética diaria de grasas con ácidos grasos monoinsaturados (OMS 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material: Se analizó harina de chía desengrasada, que se define como el producto más o menos granuloso que responde a una molienda gruesa de la torta de extracción del aceite de la semilla de chía. Envasada en bolsas de material laminado de aluminio recubierta en ambas caras por polietileno, cerradas herméticamente.

Muestreo Las muestras fueron suministradas por una empresa comercializadora de este producto en envases de un kilogramo, de diferentes lotes de elaboración.

Preparación de la muestra: Se homogeneizaron por mezclado en sus envases originales de donde se tomaron directamente las porciones analíticas exactamente pesadas.

Métodos analíticos:

Agua: por desecación hasta peso constante en estufa a 98-100 °C según técnica AOAC 2000 (945.38B)

Proteínas: se determinó nitrógeno total por método de Kjeldahl, según AOAC 2000 (979.09) y Manual FAO 1986, en equipo semi - automático Tecator mod. 1002. Para obtener el valor de proteína bruta (Nxf) se multiplicó por el factor de conversión 6,25.

Lípidos: según el Método Soxhlet, AOAC 2000 (945.38F) .

Cenizas: carbonización en mechero e incineración en mufla a 550° C, según técnica de AOAC 2000 (945.38C).

Fibra dietaria: según Método enzimático AOAC 2000 (985.29).

Perfil de ácidos grasos: se prepararon los metilésteres de los ácidos grasos según Normas IRAM 1982 . Se determinaron por cromatografía gaseosa con las siguientes condiciones de corrida: Columna SP 2340 de 60 m, 0,25 mm ID, Temperatura de horno 190° C (isotérmica), Temperatura de inyección 220° C. Split 1 : 50. Flujo de nitrógeno 1,2 ml/min, flujo de Hidrógeno 40 ml/min. Make up 40ml/min.

Para convertir los metilésteres en ácidos grasos se usó el factor de conversión de 0,72 (Greenfield 1992).

Las muestras se pesaron en balanza analítica Mettler y las determinaciones se realizaron por duplicado.

Minerales: se pesaron exactamente en balanza analítica alrededor de 1 g de harina de chía. Las porciones analíticas se calcinaron en mufla a 500°C hasta cenizas blancas que luego fueron solubilizadas con HNO₃ y trasvasadas a matraces aforados de 10.0 ml llevando a volumen con agua ultrapura (18 MΩ)

Las determinaciones se hicieron en un espectrofotómetro de absorción atómica (457 AA/AE Instrumentation Laboratory). Se operó en condiciones estándar, usando el modo de absorción atómica para determinar Na, K Ca, Mg. Fe, Cu, Mn y Zn..Para la determinación de Na y K se agregó CsCl y para la de Ca se agregó La(NO₃)₃ tanto a las muestras como a los estándares. El P se determinó por el método colorimétrico (Gomori 1942).

Se obtuvieron por cálculo los hidratos de carbono asimilables y el valor calórico de la siguiente manera:

Hidratos de Carbono asimilables: 100 - (Agua + Proteínas + Lípidos + Cenizas + Fibra)

Energía: Aplicando los factores de conversión establecidos en la legislación vigente (CAA actualizado) (9 Kcal/g para lípidos y 4 Kcal/g para proteínas y carbohidratos) al contenido de macronutrientes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos del análisis, que se presentan en las Tabla I, II y III muestran que la harina de chía es una aportadora importante de nutrientes que contribuyen a la salud cardiovascular como la fibra, los ácidos grasos omega 3 y el potasio.

Con respecto a la composición centesimal (Tabla I) se observa que la harina aporta cantidades importantes de proteína (23,65 %) de mejor calidad que la de cereales (Fernandez 2004). La harina desengrasada posee un contenido interesante de lípidos (21,7%) y de fibra cuyas propiedades y efectos son beneficiosos para la salud (Closa 2001). La ingesta de 10 g de harina aportaría el 20 % (4g) del requerimiento diario de fibra dietaria.

TABLA I : Composición Centesimal y Valor Energético de la harina de chía.

Macronutriente	g/100g ± DS
Humedad	2.37 ± 0.03
Proteína	23.65 ± 0.44
Lípidos	21.7 ± 0.32
Cenizas	5.7 ± 0.04
Fibra	42.3 ± 0.23
H de C	4.3 ± 0.92
Energía	307.5 ± 0.94

El perfil de ácidos grasos (Tabla II) muestra que la fracción lipídica está conformada por un 84% de AGPI, de los cuales el 64% es de ácido linolénico (w3). Esta característica hace que la harina de chía sea una aportadora especial para elevar el consumo de omega 3 mejorando así la relación omega 6 / omega 3 en la dieta, de forma que puedan alcanzarse las metas de ingesta de ácidos grasos w6 y w3 establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2003). Un consumo diario de 10 g de harina cubriría la ingesta adecuada (1 a 2 g) de AGPI w3, en base a una ingesta de 2000 Kcal.

El contenido de AGMI (AG monoinsaturados) es del 6,8%, casi en su totalidad ácido oleico, que es el más importante desde el punto de vista nutricional, ya que junto con los AGPI reducen las concentraciones de colesterol total y LDL en plasma (OMS 2003).

Los AGS (AG saturados) están representados por el ac. palmítico (6%) y el ac. esteárico (2%). Si bien el primero tiene un efecto en el organismo de elevar el colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el contenido es mucho menor que en otros alimentos como lácteos y carnes (22%) (Souci 1989/90), por otro lado no se ha demostrado que el ácido esteárico aumente la colesterolemia y además se convierte in vivo rápidamente en ácido oleico (OMS 2003).

La composición de minerales se detalla en la Tabla III.

TABLA II: Perfil de ácidos grasos esenciales por cromatografía gaseosa. Factor de conversión de metilésteres a ácidos grasos: 0,72.

Acidos Grasos	Harina de Chia	
	% de la materia grasa	g / 100 g de harina
Ac. Palmítico (16:0)	6.60	1.03
Ac. Estearico (18:0)	2.20	0.34
Ac. Araquídico (20:0)	0.08	0.01
Total Saturados	8.90	1.39
Ac. Palmitoleico (16:1)	0.13	0.02
Ac. Oleico (18:1)	6.69	1.05
Total monoinsaturados	6.82	1.07
Ac. Linoleico (18:2)	20.52	3.21
Ac. Linolénico (18:3)	63.73	9.98
Total polinsaturados	84.25	13.19

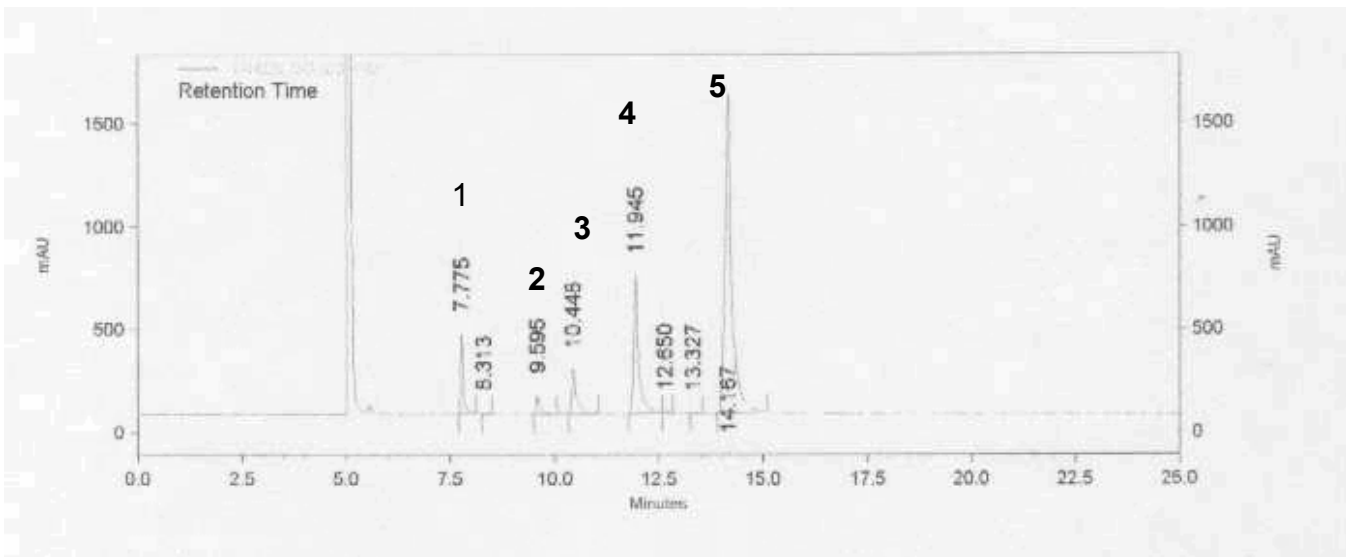
Teniendo en cuenta los valores de referencia para las recomendaciones nutricionales (Resolución GMC 2003) y las reglamentaciones vigentes en materia de rotulación nutricional complementaria (CAA actualizado), se puede decir que la harina de chía presenta alto contenido de calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre, cinc y manganeso, es una buena fuente de potasio (similar a la banana y la carne) y tiene un muy bajo contenido de sodio

Si bien tiene un contenido elevado de calcio (730 mg) la relación Ca / P no es la recomendada. En cuanto a la relación Na / K, es importante el bajo contenido de sodio (39 mg) y el alto contenido de potasio (549 mg).

TABLA III. Composición de Elementos Minerales en Harina de Chía
mg / 100 gramos de harina de Calificación del contenido*
chía

Na	39	muy bajo
K	549	buena fuente
Ca	730	Alto
P	930	Alto
Mg	349	Alto
Fe	6.52	Alto
Cu	1.64	Alto
Zn	6.71	Alto
Mn	4.55	Alto

*según las reglamentaciones vigentes (8) (12)



- 1.- Ac. Palmítico (16:0)
- 2.- Ac. Esteárico (18:0)
- 3.- Ac. Oleico (18:1)
- 4.- Ac. Linoleico (18:2)
- 5.- Ac. Linolénico (18:3)

FIGURA I : Corrida cromatográfica de los metilésteres de la materia grasa de la harina de chia. Columna SP 2340, 60 m, 0,25 mm ID, Temperatura de horno 190 ° C (isotérmica), Temperatura de inyección 220 ° C. Split 1 : 50. Flujo de nitrógeno 1,2 ml/min, flujo de Hidrógeno 40 ml/min. Make up 40ml/min.

CONCLUSIÓN

Las grasas influyen sobremanera en el riesgo de enfermedades crónicas cardiovasculares (ECV) como la cardiopatía coronaria y el accidente cerebrovascular. Estos riesgos pueden verse disminuidos si se modifica la composición cualitativa de las grasas de la dieta haciéndola más rica en AGPI w3. También se asocia con un menor riesgo de ECV a los alimentos ricos en fibra y potasio (OMS 2003).

Hay que considerar la posibilidad de una disminución de la biodisponibilidad de nutrientes minerales, especialmente elementos traza por la capacidad de algunas fracciones de la fibra de captar o intercambiar cationes, por lo tanto, correspondería realizar un estudio de biodisponibilidad de minerales dado el elevado contenido de fibra dietaria que presenta la harina.

La harina de chíá presenta una composición rica en nutrientes de gran interés en la actualidad por lo que resulta ser un componente atractivo para la suplementación y fortificación de alimentos tradicionales como panificados, productos cárnicos, fideos, cereales compuestos y otros

BIBLIOGRAFIA

AOAC 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. 17th edición Washington DC

Closa, Sara 2001. Ficha “Hidratos de Carbono en Nutrición”. Nutrición. Ingeniería en Alimentos .UNLu.

Código Alimentario Argentino Actualizado. De La canal y Asoc.

FAO 1986. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Nutrition Paper 14/7.

FAO-OMS 2000. Conocimientos actuales en nutrición.

Fernandez, I y otros. 2004. “Estudio de la calidad proteica de una fuente no tradicional” Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Cordoba. Argentina

Gomori, G. 1942. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. J. Lab. Clin. Med.27: 955 – 960.

Greenfield H and Southgate 1992. FOOD COMPOSITION DATA - Production, Management and Use. Elsevier App. Sc. London and New York.

Norma IRAM 5650.1982. Parte II. Método rápido para la preparación de metilésteres en aceites y grasas

OMS 2003. Serie de informes técnicos 916. Dieta, nutrición y Prevención de enfermedades crónicas. Cap 5

Resolución GMC 46/2003. Reglamento técnico Mercosur sobre Rotulado Nutricional de alimentos envasados.

Seia Goñi Enrique 2004. Seminario “Los nuevos viejos cultivos” Bolsa de cereales Buenos Aires.

Souci, Fachmann, Kraut. 1989/90. Foods Composition and Nutrition Tables. 4th revised and completed edition.

EFFECTO DE LA INMERSIÓN A 100 °C EN NaOH ACUOSO Y MACERACIÓN CON CuCl₂ SOBRE EL COLOR Y LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS EN HOJAS DE YERBA MATE

SCIPIONI, Griselda P.; RIVEROS, Claudia E.; BENITEZ, Julieta B.; ANTONINI, Fabricio y ARGÜELLO, Beatriz del V.

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico – CIDET- Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – UNaM - Félix de Azara 1552 – 3300 – Posadas, Misiones. TE/Fax: 03752-425414 – e-mail: arguello@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto del sapecado con soluciones de NaOH (entre 1 y 2 %p/v) a 100 °C durante 30 s, y macerado (desde 5 hasta 12 horas) con soluciones de CuCl₂ (entre 10 y 30 ppm), sobre el color y las propiedades fisicoquímicas en hojas de Yerba Mate, a través de un diseño central compuesto de 17 experiencias. Como testigo, se trató una muestra con agua a 100 °C. Durante el estacionamiento, se siguió la variación del color (-a/b) en escala Lab. Tanto a la muestra testigo como a una de las del tratamiento con mejor verdor se les determinaron pH, contenido de cafeína, cenizas totales y extracto acuoso, siendo todos los valores inferiores, para la tratada, excepto el pH. Del análisis estadístico de los resultados se pudo establecer que fueron significativos la concentración de NaOH y el tiempo de macerado ($P < 0,05$), y no el Cu⁺² ($P > 0,05$).

Palabras claves: yerba mate, cobre, sapecado, color

ABSTRACT

The effect of *sapecado* with NaOH solutions (between 1 and 2% w/v) at 100 °C during 30 sec. and soaking in CuCl₂ solutions (between 10 and 30 ppm) during 5 to 12 hours, on the color and physicochemical properties of Mate leaves, was studied through a 17 assays CCD. A sample was treated with boiling water as standard. Changes in color (-a/b) in the Lab scale were followed during seasoning. Both, standard and treated, with the best greenness samples, were analyzed for pH, caffeine content, total ash and aqueous extract, being the lowest values for the treated sample, except for the pH. From the statistical analyses of the results, it was established that NaOH concentrations and soaking time had significant effect ($P < 0.05$) while Cu⁺² had not ($P > 0.05$).

INTRODUCCIÓN

El color, en los alimentos deshidratados, es uno de los atributos más importantes. El estado físico del alimento distorsiona la absorción, reflexión y cantidad de luz que llega a los ojos del observador. También influyen la estructura y la textura de la superficie del producto (Lewicki & Duszczuk, 1998). Las clorofilas son los pigmentos naturales responsables del color verde. Su estructura puede ser modificada por reacciones enzimáticas, químicas y por altas temperaturas. En la Yerba Mate, las preferencias respecto al color del producto, varían en los diferentes países, desde el verde intenso al verde oliváceo. Esta coloración es fruto del procesamiento y puede atribuirse a la degradación de las clorofilas (Schmalko y Alzamora, 2001).

Diversas estrategias han sido propuestas para evitar la degradación de las clorofilas y/o conservar un color verde atractivo (Leunda et al., 2000; von Elbe y Schwartz, 1996). Entre ellas se encuentran: tratamientos HTST; control de pH; adición de sales de cloruro (sodio, magnesio o calcio) y tratamientos osmóticos con sales de Zn^{+2} y Cu^{+2} que conducen a verdes más brillantes.

El objetivo del presente trabajo es lograr la preservación del color verde de la yerba mate mediante el tratamiento por inmersión a 100 °C en NaOH acuoso (proceso equivalente al sapecado) y macerado con soluciones de $CuCl_2$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de Yerba Mate consistieron en 50 g cada una de hojas frescas. Las experiencias previas se realizaron mediante diseños factoriales. Inicialmente, las hojas se maceraron en soluciones de Cu^{+2} de concentración entre 10 y 50 ppm durante 24 hs. Con estos resultados se planteó un diseño central compuesto de 13 experiencias. Los factores en estudio fueron la concentración de Cu^{+2} entre 10 y 30 ppm y el tiempo de inmersión en la solución a 100 °C (proceso que equivale al sapecado). Luego las muestras se secaron en secadero de flujo transversal a menos de 65 °C, se molieron y acondicionaron en condiciones similares a una cámara de estacionamiento acelerado (T: 50 °C; HR: 60 %). La degradación del color se siguió con un colorímetro Hunterlab D25-9 en escala L, a, b durante varias semanas.

Con la finalidad de mejorar el tratamiento, se rediseñaron nuevos diseños factoriales, en los cuáles se reemplazó el Cu^{+2} , en la solución de inmersión en caliente, por NaOH en concentraciones que variaron de 1 al 5 % p/v. En estos ensayos el macerado en las soluciones de Cu^{+2} fue posterior al tratamiento térmico. Los resultados obtenidos permitieron plantear un diseño central compuesto de 17 experiencias. Los factores en

estudio fueron: concentración de NaOH en la solución de inmersión a 100 °C entre 1 y 2 % p/v; concentración de Cu⁺² en las soluciones de macerado entre 10 y 30 ppm; y tiempo de macerado entre 5 y 12 horas. Luego las hojas se sumergieron inmediatamente en agua fría para detener el tratamiento térmico y se lavaron para eliminar restos de NaOH. El Cu⁺² residual también se eliminó por lavados. El procesamiento posterior de las muestras (secado y estacionamiento) fue similar al descrito para el diseño de 13 experiencias. Los resultados se evaluaron mediante el programa Statgraphycs plus 3.0. En todas las experiencias realizadas se preparó una muestra testigo, sumergiendo 50 g de hojas en agua a 100 °C durante 30 s. Esta muestra sirvió de patrón de comparación para seguir la degradación del color. Se tomó como final del estacionamiento el momento en que la muestra testigo presentó una degradación importante del color verde (color amarillo). Una muestra, del grupo de las que tuvieron menor variación de a/b, fue preparada en mayor cantidad, y junto a la muestra testigo se le realizaron las siguientes determinaciones fisicoquímicas:

* pH: 1 g de muestra se colocó en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada. Se tapó con vidrio de reloj y se llevó a ebullición. Luego se enfrió a 25 °C y se determinó el valor del pH mediante electrodo combinado.

* Cafeína: Se utilizó el método descrito por la norma IRAM 20512.

* Cenizas totales: Se utilizó el procedimiento dado por la norma IRAM 20505.

* Extracto acuoso: Se determinó de acuerdo a la norma IRAM 20510.

* Contenido de humedad: Se utilizó el método de la Norma IRAM 20503, secando el material en estufa a 103 ± 2°C hasta peso constante.

Para detectar la presencia de complejos de clorofila - Cu⁺², se realizaron ensayos de cromatografía sobre papel. A una porción de muestra se le agregó acetona y a otra porción se le agregó cloroformo. Se agitó y se dejó reposar aproximadamente 1h. El sobrenadante, libre de sólidos, se cromatografió en papel Whatman N° 3 con una mezcla de acetona:hexano 1:9 como solvente de desarrollo. Un procedimiento similar se llevó a cabo con la muestra testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las observaciones iniciales realizadas durante 24 horas, de las hojas maceradas en soluciones de Cu⁺²; permitieron establecer que las concentraciones más convenientes oscilaban entre 10 y 30 ppm. En el diseño de 13 experiencias, la relación de a/b para las muestras tratadas varió entre -0,591 a -0,665 (color verde intenso) y entre -0,258 a -0,317 (color amarillo verdoso en diferentes tonos) desde el inicio hasta el final del

estacionamiento. Para la muestra patrón varió de - 0,668 (color verde) a -0,270 (color amarillo). El análisis estadístico de los resultados permitió establecer que, a partir de los 7 días, el tiempo de sapecado tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) a través de su término cuadrático.

En los ensayos de inmersión en NaOH acuoso en caliente, las hojas presentaron coloraciones de verde a verde oscura muy intensa luego del macerado. A concentraciones elevadas de NaOH, hubo desprendimiento de parte del tejido epidérmico. En el diseño central compuesto de 17 experiencias, al inicio del estacionamiento, a/b se incrementó en los puntos extremos de las concentraciones de Cu^{+2} (Fig.1).

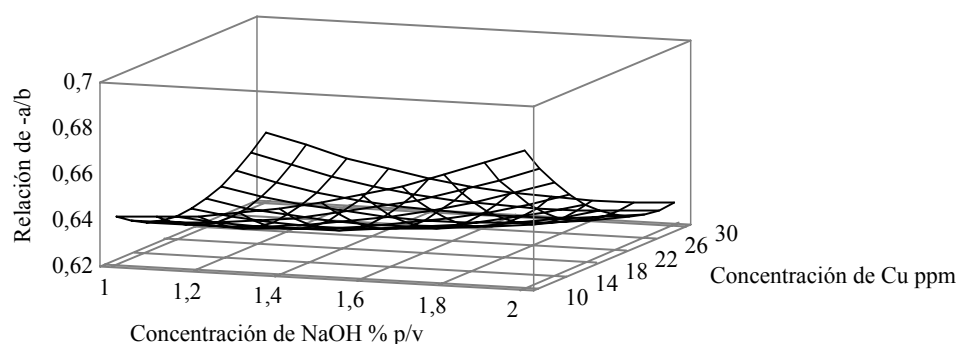


Fig.1 Efecto de la concentración de Cu^{+2} y la concentración de NaOH sobre la relación de a/b . Inicio del estacionamiento acelerado

Experimentalmente varió desde - 0,706 a - 0,575. La testigo tuvo un valor de a/b de - 0,650. Al finalizar el estacionamiento, a/b mantuvo valores importantes para concentraciones altas de NaOH en el rango de concentraciones de Cu^{+2} estudiadas (Fig. 2). Se observó una gran diversidad de colores desde el amarillo, para la muestra testigo (a/b : -0,255); hasta el verde azulado intenso observado en un grupo de muestras. Otro grupo de muestras permaneció verde con tono azulado suave (verde diferente al natural) variando su relación de a/b de -0,678 hasta -0,452 desde el inicio al final del estacionamiento. Una de estas se procesó para las determinaciones fisicoquímicas. El análisis estadístico demostró que, al final del estacionamiento, ejercen un efecto significativo la concentración de NaOH utilizada en el sapecado en sus términos lineal y cuadrático y el tiempo de macerado en las soluciones de Cu^{+2} en su término lineal ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de las determinaciones fisicoquímicas efectuadas sobre la muestra tratada y la testigo, se informan en la tabla 1.

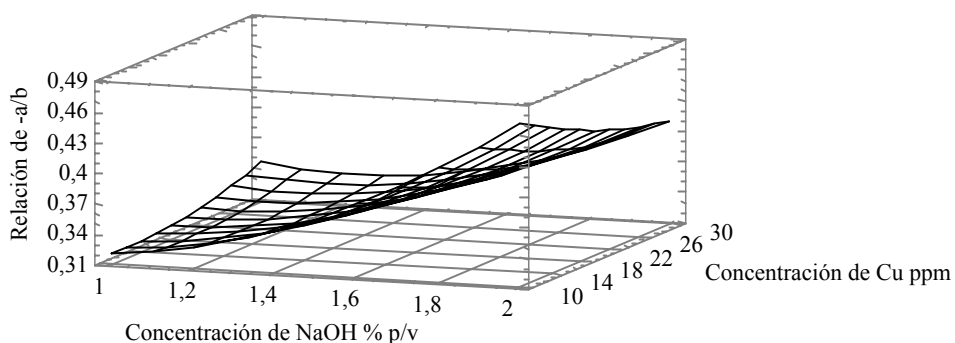


Fig.2 Efecto de la concentración de Cu^{+2} y la concentración de NaOH sobre la relación de a/b.. Final del estacionamiento acelerado.

Tabla 1. Contenido de humedad (% bs); cenizas totales (% bs); pH; cafeína (% bs) y extracto acuoso (% bs) en hojas de yerba sapecadas en agua a 100 °C y hojas de yerba sapecadas en NaOH al 2 %p/v a 100 °C y maceradas en solución de cobre 10 ppm.

	Sapecado en agua	Sap-Mac NaOH- Cu^{+2}
Humedad (% bs)	11,54 \pm 0,49	6,74 \pm 0,11
Cenizas Totales (% bs)	6,49 \pm 0,10	4,93 \pm 0,14
pH	5,73 \pm 0,10	7,21 \pm 0,10
Extracto Acuoso (% bs)	44,70 \pm 4,76	27,39 \pm 2,67
Cafeína (% bs)	1,11 \pm 0,01	0,57 \pm 0,23

Las separaciones cromatográficas no permitieron observar complejos de clorofila cúprica. Al comparar los valores de los parámetros fisicoquímicos en hojas de yerba sapecadas en agua caliente, y aquellas sapecadas con una solución alcalina y luego maceradas en una solución de Cu^{+2} , se vio que el efecto del tratamiento provocó la disminución de los valores de cafeína, cenizas totales y extracto acuoso, incluso por debajo de los observados para la yerba mate tradicional, a excepción del pH, que se incrementó. Este comportamiento está de acuerdo con el análisis estadístico de los resultados, que señalan

que la concentración de NaOH tiene un efecto significativo en el tratamiento. El color de la yerba tratada al hidratarse fue de un verde más brillante que el natural, y concuerda con la descripción de algunos autores que sostienen que los complejos de clorofila-Cu son de un verde brillante (Guzmán y col. 2002).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten arribar a las siguientes conclusiones. Estadísticamente, las concentraciones ensayadas de los iones Cu^{+2} no tienen efecto significativo sobre el color de las hojas, aunque los tonos de verde a simple vista difieren unos de otros y no son iguales al verde natural. En las separaciones cromatográficas, la no observación de complejos de clorofila cúprica no asegura que no se hallen presentes, probablemente la extracción o la separación fueron deficientes. Al comparar los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos, la disminución de los valores podría ser a consecuencia de la destrucción de la capa cerosa que recubre a las hojas, por la acción de la solución alcalina, que favorecería el ingreso de los iones cobre pero también permitiría la pérdida de compuestos solubles en medio acuoso durante el macerado. El valor del pH se incrementó hacia valores de neutralidad por la acción del NaOH sobre los componentes de la yerba que tienen reacción ácida. Este comportamiento concuerda con el análisis estadístico de los resultados que mostró que la concentración de NaOH tiene una acción importante en el tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Guzmán, G.R., Dorantes, A.L., Hernández, U.H., Hernández, S.H. Ortiz, A., Mora E.R. 2002. *“Effect of zinc and copper chloride on the color of avocado puree heated with microwaves”*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol 3, pp 47 – 53.

IRAM 20503. 1995. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de la pérdida de masa a 103°C.

IRAM 20512. 2004. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de cafeína por HPLC.

IRAM 20510. 1995. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación del extracto acuoso.

Krokida, M.K., Kiranoudis, C.T., Maroulis, Z.B. y Marinos-Kouris, D. 2000. *“Effect of pretreatment on color of dehydrated products”*. Drying Technology, 18 (6), 1239 – 1250.

- Lamikanra, O y Watson, M.A. 2001.** *“Effects of ascorbic acid on peroxidase and polyphenoloxidase activities in fresh-cut Cantaloupe Melon”*. J. Food Sci. 66 (9), 1283 – 1286.
- Leunda, M.A., Guerrero, S.N. y Alzamora, S.M. 2000.** *“Color and Chlorophyll content changes of minimally processed kiwifruit”*. J. Food Processing Preservation, 24, 17 – 38.
- Lewicki, P.P.& Duszczuk, E. 1998.** *“Color change of selected vegetables during convective air drying”*. International Journal of Food Properties, vol 1 (3), pp 263 – 273.
- Schmalko, M.E. y Alzamora, S.M. 2001.** *“Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during yerba maté processing”*. Drying Technology, 19 (3&4), 599 – 610.
- Von Elbe, J.H. y Schwartz, S.T. 1996.** *“Colorants”* in Food Chemistry (Editor O. Fennema) 3^{era} edición. Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp 651 - 722.

EVALUACION DE LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA TOTAL DE ALGUNAS MIELES ARGENTINAS.

IURLINA, Miriam O. y FRITZ, Rosalía

Dpto de Química. Bromatología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNMdP. Funes 3350. (C.P. 7600). Te: 54-223-4756167. Fax: 54-223-4753150. Mar del Plata. Bs. As. Argentina. E-mail: miurlina@mdp.edu.ar

RESUMEN

Se evaluó la variación en la actividad antimicrobiana total de 14 mieles de producción orgánica (mono, di- y poliflorales) de distintas regiones de Argentina. La actividad se evaluó frente a *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar en placa para soluciones con 0, 1, 5, 10, 25 y 50 % p/v de miel. Todas las mieles inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. Con soluciones al 50% p/v los halos de inhibición fueron de 28 a 42 mm de diámetro. La mayor inhibición se obtuvo con soluciones al 50 y 25% (p/v) de una miel polifloral, correspondiendo a 42 y 38 mm respectivamente. La evaluación de la actividad antibacteriana de mieles permitiría seleccionar aquellas con una actividad inhibitoria potencial en relación a diferencias regionales, estacionales y/o de manejo de las mieles.

Palabras claves: actividad antimicrobiana, miel, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

This study assessed the total antimicrobial activity of 14 organic production honeys (mono, di- and polifloral) obtained from different geographical regions of Argentina. Solutions containing 0, 1, 5, 10, 25 y 50 % p/v of each honey were tested against *Staphylococcus aureus* in an agar well diffusion assay. The 14 honeys inhibited the growth of *S. aureus* in different levels. The inhibition of growth in 50% p/v solution of honeys ranged between 28 to 42 mm. The highest inhibition haloes were obtained with 50 and 25% p/v solutions of one polifloral honeys, being 42 and 38 mm respectively. The evaluation of the total antibacterial activity of honeys would permit to select those with a potential inhibition activity related to the geographical and seasonal sources and different handling.

Key words: antimicrobial activity, honey, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCCIÓN

La actividad antimicrobiana de la miel se relaciona con su alta osmolaridad, acidez, generación de peróxido de hidrógeno y presencia de componentes fitoquímicos (Molan 1992-1). En mieles diluidas, esta actividad se atribuye principalmente a la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es generado por la acción de la enzima glucosa oxidasa que las abejas adicionan al néctar ($glucosa + H_2O + O_2 \rightarrow \text{ácido glucónico} + H_2O_2$) actuando como sustancia antagónica frente a los microorganismos. Su efecto preservador se daría solamente durante la maduración de la miel, dada la escasa estabilidad del peróxido de hidrógeno frente a iones metálicos y/o ácido ascórbico presentes en el producto (Dustmann, 1979; Allen y col. 1991; Molan, 1992-1), y frente a la enzima catalasa la cual se origina desde el polen y se incorpora también en la miel. Por otro lado, componentes fotoquímicos presentes en el néctar, tales como flavonoides y ácidos aromáticos, se incorporarían en la miel contribuyendo a sus propiedades antimicrobianas (Molan, 1992-1; Russell y col. 1988; Tomás-Barberan, 1997; Martos y col., 2000; Weston y col. 2000; Serra Bonvehi y col. 2001). Si bien se ha reconocido que la miel tiene actividad antibacteriana, existe una amplia variación en la potencia antibacteriana de diferentes mieles, siendo importante considerar que ésta propiedad puede ser perdida por un manejo y almacenamiento inapropiado del producto (Molan, 1992-2). Teniendo en cuenta el interés regional de la apicultura y la revalorización de éstos productos en el sector apícola el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana total de mieles producidas en distintas regiones de la Argentina a fin de considerar la influencia de variaciones regionales, tipo de miel y manejo del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de miel

En este estudio se analizaron 14 mieles de producción orgánica provenientes de apiarios localizados en distintas regiones de Argentina, correspondiendo a mieles monoflorales (4), mieles diflorales (2) y mieles poliflorales (8), Tabla 1. Las muestras correspondieron a mieles extraídas por centrifugación de los cuadros no siendo sometidas a calentamiento y/o pasteurización posterior, representando las cosechas de los años 2003-2004. Las mismas se recolectaron en recipientes estériles y almacenaron a 10° C hasta ser analizadas.

Preparación de las soluciones de miel

Se prepararon en forma aséptica soluciones con 0, 1, 5, 10, 25 y 50 % (p/v) de miel. Para ello, cada muestra de miel libre de cualquier resto de cera o panal fue disueltas en agua destilada estéril y homogeneizadas en vortex (Decalab fbr ® a 37° C durante 30 minutos.

Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana total se evaluó frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión en agar en placa (Allen y col., 1991) para las soluciones con 0, 1, 5, 10, 25 y 50 % (p/v) de miel. Las placas de petri fueron preparadas por adición de 100 µL de un cultivo de 18 horas de *S. aureus*, en caldo nutritivo a 150mL de agar nutritivo estéril mantenido a 45° C, y almacenadas a 4°C durante 24 horas. Sobre el agar solidificado en las placas se cortaron pocillos de 8 mm de diámetro, los cuales se completaron con 100 µL de cada solución de miel, siendo las placas incubadas a 35 ± 2° C durante 18 horas. La actividad antibacteriana total fue registrada como la extensión radial (expresada en milímetros) del área clara de crecimiento bacteriano alrededor del pocillo.

Tabla 1. Origen floral, origen geográfico y año de producción de las mieles estudiadas.

Miel	Origen floral	Origen geográfico	Año
Caatay	<i>Polygonum</i> sp	islas del Delta del Paraná	2003
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i> sp.	sudeste de la prov. de Bs As	2003
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Entre Ríos	2004
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	sudeste de la prov. de Bs As	2004
Aliso y quebracho colorado	<i>Alnus glutinosa</i> L. y <i>Schinopsis balansae</i>	Chaco	2003
Citrus y eucalipto	<i>Citrus</i> sp. y <i>Eucalyptus</i> sp.	Entre Ríos	2004
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2004
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2004
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2004
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2003
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2003
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2004
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2003
Praderas	polifloral	sudeste de la prov. de Bs As	2004

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las mieles mostraron una acción antimicrobiana total frente a *S. aureus*. La Tabla 2 muestra los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo para diferentes concentraciones de miel.

Tabla 2. Actividad antibacteriana total de mieles. Las mieles se agrupan según su origen floral. La actividad antibacteriana total se expresó como la extensión radial (en milímetros) del área clara de crecimiento bacteriano alrededor del picillo.

Miel	Concentración de miel % (p/v)				
	50	25	10	5	1
Caatay	30	24	14	0	0
Eucalipto	33	32	22	0	0
Girasol	40	30	25	15	0
Girasol	33	30	23	13	0
Aliso y quebracho colorado	34	30	22	20	0
Citrus y eucalipto	31	30	21	13	0
Praderas	39	28	0	0	0
Praderas	32	28	22	0	0
Praderas	41	30	18	0	0
Praderas	40	35	10	0	0
Praderas	28	25	20	13	0
Praderas	36	31	21	12	0
Praderas	42	38	21	20	0
Praderas	31	22	22	13	0

Las soluciones de miel ensayadas dieron inhibiciones variables del crecimiento de *S. aureus*, a excepción de soluciones al 1% (p/v) las cuales no afectaron el crecimiento del microorganismo. En general, las mieles consideradas en el presente estudio tuvieron halos de inhibición considerablemente mayores que los obtenidos por Nzeako y Hadmi (2000) quienes con soluciones al 10% de miel no detectan acción antimicrobiana frente a *S. aureus*. La zona de inhibición del crecimiento de *S. aureus* en mieles poliflorales fue ligeramente mayor que en mieles monoflorales siendo de 28 a 42 mm y de 30 a 40 mm, respectivamente. Los distintos grados de inhibición podrían asociarse con tipos de néctares, contenidos de peróxido de hidrógeno y/o a la presencia de factores antimicrobianos no-peróxido de hidrógeno (Molan, 1992-1). Las mieles de girasol, mostraron actividades antibacterianas variables, lo cual podría asociarse al origen geográfico diferente de las mismas. Si bien las mieles mono, di y poliflorales mostraron actividades inhibitorias similares, los mayores halos de inhibición se obtuvieron para soluciones al 50 y 25% p/v de mieles poliflorales, correspondiendo a 42 y 30 mm respectivamente. Para 4 mieles poliflorales se observaron halos de inhibición inferiores a

20 mm con soluciones al 5% (p/v) de miel. Mientras que no se obtuvieron inhibiciones con las 4 mieles restantes. Estas diferencias en la acción antimicrobiana no parecerían asociarse con la edad de la miel, ya que algunas de las mieles cosechadas en la estación 2003 mostraron tener actividades antimicrobianas mayores que otras cosechadas en la estación 2004. Estos últimos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Allen y col. (1991) quienes tampoco encuentran una relación entre la edad de la miel y su actividad antibacteriana. En la Figura 1 se observa la distribución de la actividad antimicrobiana para el total de muestras evaluadas.

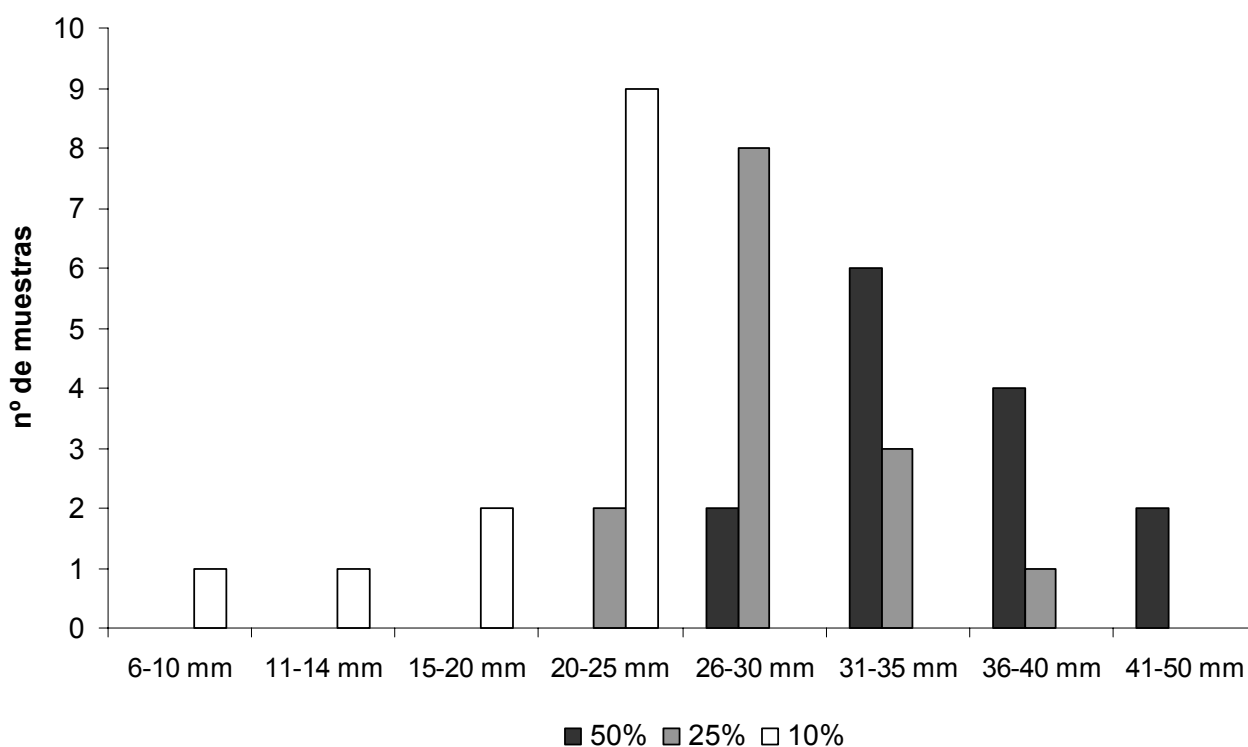


Figura 1. Distribución de la actividad antibacteriana total de las 14 mieles evaluadas con soluciones al 50, 25 y 10% (p/v) de miel.

Con soluciones al 25% (p/v) se observa un ligero desplazamiento en la distribución de la actividad inhibitoria de las mieles en relación al 50% (p/v). Mientras que a 10% (p/v) la mayor parte de las muestras se concentra en rangos de inhibición de 21 a 25mm. En relación a estos resultados no se observa una disminución proporcional en la actividad antibacteriana de las mieles, ya sean mono, di y/o poliflorales con sucesivas diluciones de la miel. La detección de una acción inhibitoria podría entonces asociarse a la acción de peroxido de hidrogeno presente en la miel, la cual se activa con diluciones de la miel, pero también a la presencia de componentes fotoquímicos que no se verían afectados aun en

las mayores diluciones de miel. La Figura 1 muestra también que el mayor número de muestras con actividad antimicrobiana, de 20-30 mm correspondió a diluciones del 10 y 25% de miel. La evaluación de la actividad antibacteriana de mieles mostró diferencias en la actividad inhibitoria frente a *S. aureus* que permitiría una selección de las mismas aportando conocimientos de las distintas regiones del país, reflejando diferencias regionales, estacionales y/o de manejo

BIBLIOGRAFÍA

Allen, K.L ; Molan, P.C.; Reid, G.M. 1991. The variability of the antibacterial activity of honey. *Apiacta* 26: 114-121

Martos, I. ; Ferreres, F. y Tomás-Barberán, F.A. 2000. Identification of flavonoids markers for the botanical origin of eucalyptus honey. *J Agric. and Food Chemistry* 48 (5): 1498-1502.

Molan, P.C. 1992-1. The antibacterial activity of honey. 1- The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5-28

Molan, P.C. 1992-2. The antibacterial activity of honey. 2- Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 59-76

Nzeako, B. C. & Hadmi, J. 2000. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. *Medical Sciences*. 2, 75-79.

Russell, K.M.; Molan, P.C.; Wilkins, A.L.; Holland, P.T. 1988. The identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. *J. Agric. and Food Chem.* 38: 10-13.

Serra Bonvehí, J.; Soliva Torrentó, M., Centelles Lorente, E. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honey bee-collected pollen produced in Spain. *J. Agric. and Food Chem.* 49 (4): 1848-1853.

Tomás-Barberán, F.A. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis *J. Agric. and Food Chem.* 45 (8): 2824-2829.

Weston, R.J., Brocklebank, L.K., Lu, Y. 2000. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem.* 70, 427-435.

SEMILLAS DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze: ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE AZÚCARES

FERREYRA, Ricardo M., VIÑA, Sonia Z., CHAVES, Alicia R. y MUGRIDGE, Alicia.

CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) CONICET-Facultad de Ciencias Exactas UNLP. Calle 47 y 116, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.
Tel / Fax: (0221) 424-9287 / 425-4853. E-mail: amugridg@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

Los compuestos antioxidantes vegetales son principalmente vitaminas y polifenoles, entre ellos flavonoides. Las semillas de *Araucaria angustifolia*, utilizadas como alimento por grupos aborígenes, son ricas en almidón. Sin embargo, poco se conoce sobre su valor nutritivo; el objetivo de este trabajo fue estudiar distintos componentes que en mayor medida contribuyen al mismo.

Se utilizaron semillas recolectadas de rodales implantados en Misiones, se analizaron los contenidos de almidón, azúcares, fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante.

Los resultados, expresados sobre 100g de tejido fresco, mostraron que los azúcares fueron fructosa, glucosa y sacarosa, siendo este último el azúcar predominante tanto en el embrión como en el gametofito. Las semillas brotadas presentaron 44% menos sacarosa que las no brotadas. El contenido de almidón en el gametofito fue 72,9%. La actividad antioxidante como los niveles de fenoles y flavonoides totales fueron muy superiores en el tegumento ovular, respecto al gametofito y embrión.

Palabras clave: *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze; azúcares; fenoles; flavonoides; actividad antioxidante

ABSTRACT

Plant antioxidant compounds are mainly vitamins and polyphenols, including flavonoids. *Araucaria angustifolia* seeds, used as food by different aboriginal groups, are rich in starch. However, little is known about their nutritional value. Thus, the objective of this work was to study several components that contribute to the nutritional value of the seeds. Seeds coming from planted fields placed in Misiones were used, measuring sugars, starch, total phenols and flavonoids contents and antioxidant activity.

The results, expressed by 100g of fresh tissue, showed that present sugars were fructose, glucose and sucrose. Sucrose was the predominant sugar either in the embryo as in the gametophyte. Sprouted seeds had 44% less sucrose than non-sprouted ones. Starch

content in the gametophyte was 72,9%. The highest antioxidant activity was found in the ovular tegument, being very superior than the gametophyte's one. This fact was in correspondence with high levels of total phenols and flavonoids.

Keywords: *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze; sugars; phenols; flavonoids; antioxidant activity

INTRODUCCIÓN

Los compuestos químicos con capacidad antioxidante presentes en las plantas son, principalmente, vitaminas y polifenoles de diferentes estructuras químicas, entre ellos flavonoides. Es sabido que dichos compuestos contribuyen eficientemente a disminuir los riesgos de enfermedades de diferentes etiologías tales como cáncer, cardíacas, etc. (Hertog et al., 1993; Miller y Rice-Evans, 1997). Su modo de acción estaría relacionado al hecho de proteger las células de los daños producidos por radicales libres, tales como las especies reactivas de oxígeno.

Las semillas de *Araucaria angustifolia*, utilizadas como alimento por grupos aborígenes en América del Sur, son ricas en glúcidos, principalmente almidón. Sin embargo, poco se conoce sobre su valor nutritivo.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar distintos componentes que contribuyen al valor nutritivo de semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, analizando su distribución en las distintas partes que las constituyen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: las semillas fueron recolectadas de rodales implantados provenientes del Campo Anexo Manuel Belgrano (EEA Montecarlo-INTA), San Antonio, provincia de Misiones. De allí fueron trasladadas a los laboratorios del CIDCA (CONICET-Fac.Cs.Exactas, UNLP) ubicados en la ciudad de La Plata (provincia de Buenos Aires).

Determinaciones:

Preparación de las muestras: Se partió de 10 kg de semillas y se realizaron cuarteos sucesivos, mezclando, homogeneizando y descartando fracciones, hasta reducir la muestra a un total de 100 semillas (aproximadamente 550 g). De esta cantidad, para llevar a cabo las determinaciones, se tomaron porciones de semillas que fueron desprovistas o no del tegumento -según el caso- y/o separadas en sus partes constitutivas: tegumento ovular, gametofito y embrión. Luego se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron en un molinillo de laboratorio. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado, sobre semillas enteras y sus distintas partes constitutivas. Las determinaciones de azúcares se realizaron además sobre semillas brotadas.

Contenido de almidón: Se tomaron 10 gramos de muestra congelada y triturada como se describió anteriormente. Se efectuó la hidrólisis del tejido de reserva (gametofito) con

HCl 10% a reflujó y se determinó el contenido de glucosa resultante por HPLC (como se describe en la Sección “Azúcares”).

Azúcares: Se tomó 1 gramo de muestra congelada y triturada como se describió anteriormente. Se extrajeron los azúcares con 5 ml de alcohol etílico 96°. Sobre alícuotas de los extractos obtenidos, se dosaron los azúcares presentes por HPLC. Se utilizó a tal efecto un cromatógrafo Waters equipado con un detector de índice de refracción. Se empleó una columna Accubond Amino 5 μ m y acetonitrilo:agua (75:25) como solvente de corrida. El caudal utilizado fue 2 ml min⁻¹. Tanto para la identificación como para la cuantificación de los azúcares presentes se emplearon soluciones patrón de fructosa, glucosa y sacarosa (Sigma®) en concentraciones de 2,0 mg / ml. Los resultados se expresaron en mg / 100 g de tejido fresco.

Capacidad antioxidante: Se tomó 1 gramo de muestra congelada y triturada como se describió anteriormente. Se extrajeron los compuestos antioxidantes con etanol 96°. Se determinó la cantidad de antioxidantes espectrofotométricamente (515 nm) utilizando el radical cromogénico DPPH• (2,2 difenil-1-picrilhidracilo) (Sigma®), según Brand-Williams et al. (1995). Los resultados se expresaron en mmoles de DPPH•/ 100 g de tejido fresco.

Fenoles totales: Se tomó 1 gramo de muestra congelada y triturada como se describió anteriormente y se determinó el contenido de fenoles por espectrofotometría (760 nm), empleando el reactivo Folin-Ciocalteu. Las concentraciones fueron expresadas como mg de catequina / 100g de tejido fresco.

Flavonoides totales: las mediciones se efectuaron sobre los tegumentos ovulares, por registrarse en los mismos el mayor nivel de fenoles totales. Se realizó la extracción de flavonoides totales con 20 ml de alcohol etílico a partir de 0,15 g de muestra. Se realizó una dilución (1:10) del extracto. Se determinaron flavonoides totales espectrofotométricamente (510 nm) empleando el método de Kim et al. (2003). Los resultados finales se expresaron como mg de catequina / 100g de tejido.

Análisis estadístico: los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Para la comparación de las medias se utilizó el test de Fisher, con un grado de significación $\alpha=0,05$ (DMS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de almidón: El componente mayoritario del tejido de reserva (gametofito) fue el almidón, que representó un 72,9% del mismo.

Azúcares: La Figura 1 muestra la proporción de azúcares simples presentes -tanto en semillas enteras como en sus partes constituyentes- que correspondieron a fructosa, glucosa y sacarosa. Cordenunsi et al. (2004) determinaron la presencia de los mismos azúcares.

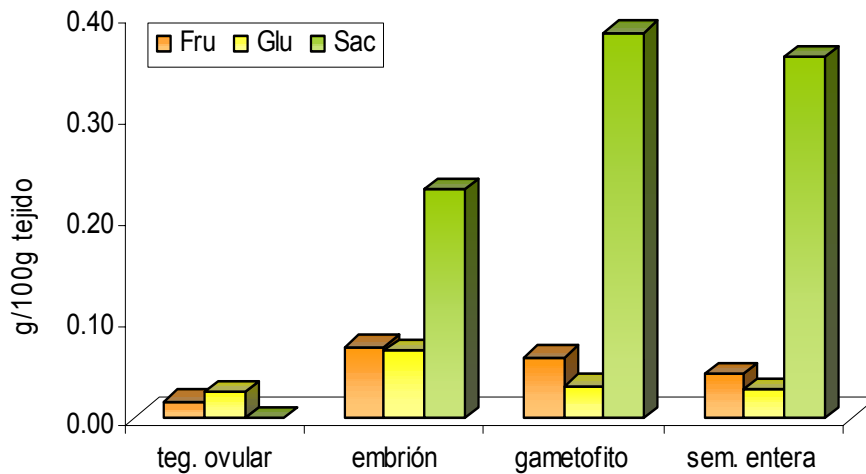


Figura 1: Contenido de azúcares en las distintas partes constituyentes de semillas de *Araucaria angustifolia*. (LSD=0,08).

Se observó que el azúcar predominante, tanto en el embrión como en el gametofito, fue sacarosa, en tanto que no se observaron niveles detectables del mismo en el tegumento ovular. Del total de azúcares presentes en semillas enteras, la proporción de cada uno de ellos fue la siguiente: 16,8% de fructosa, 10,5% de glucosa y 72,7% de sacarosa.

El brotado produjo disminuciones significativas ($p < 0,05$) en el nivel de sacarosa, que se redujo un 44,4% y 36,8% en las semillas enteras y en el gametofito, respectivamente (Figura 2). Los azúcares fructosa y glucosa, en cambio, no sufrieron variaciones significativas ($p > 0,05$).

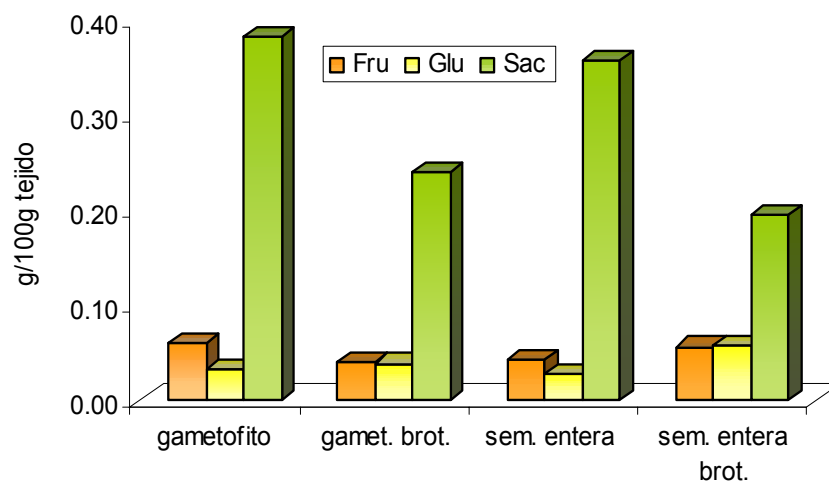


Figura 2: Contenido de azúcares en las distintas partes constituyentes de semillas de *Araucaria angustifolia* brotadas y sin brotar. (LSD=0,12).

Capacidad antioxidante: La mayor actividad antioxidante correspondió al tegumento ovular, que resultó muy superior ($p<0,05$) a la del gametofito y embrión en conjunto. La actividad antioxidante correspondiente al embrión fue 66 veces mayor a la del gametofito (Figura 3).

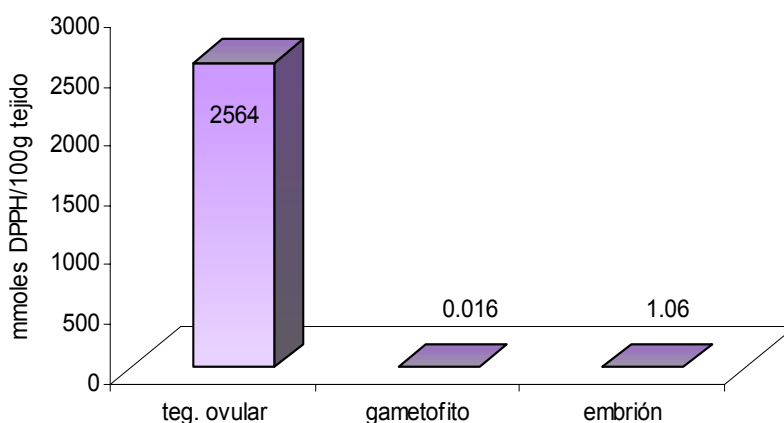


Figura 3: Capacidad antioxidante de las distintas partes constituyentes de semillas de *Araucaria angustifolia*. (LSD=128).

Fenoles totales: Los valores de fenoles totales hallados en las distintas partes constituyentes de las semillas mostraron correspondencia con las diferencias en actividad antioxidante (Figura 4). El tegumento ovular presentó el mayor contenido de fenoles ($p<0,05$), en concordancia con lo hallado por Cordenunsi et al. (2004). En nuestras experiencias, el nivel de fenoles totales registrado en el embrión fue 4 veces superior al hallado en el gametofito.

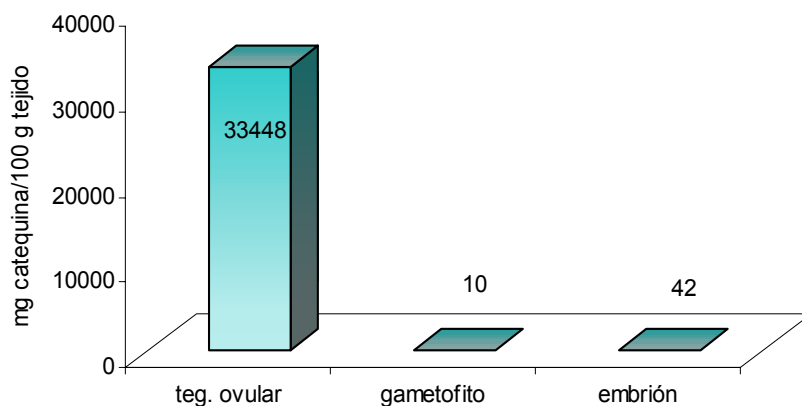


Figura 4: Contenido de fenoles totales de las distintas partes constituyentes de semillas de *Araucaria angustifolia*. (LSD=480).

Flavonoides totales: El contenido de flavonoides totales presentes en el tegumento ovular correspondió a 4641 (\pm 43) mg de catequina / 100 g de tejido y representó un 14% de los fenoles totales. Cordenunsi et al. (2004) señalaron que no detectaron flavonoides en las semillas de esta especie desprovistas de tegumentos, pero hallaron cantidades significativas del flavonol quercetina en las cubiertas seminales.

CONCLUSIONES

- De los azúcares libres, sacarosa fue el que se halló en mayor proporción, especialmente en el gametofito.
- Por efecto de la brotación, se observó un mayor consumo de sacarosa con respecto a los azúcares restantes.
- El tegumento ovular presentó una alta capacidad antioxidante que podría vincularse a los elevados contenidos de fenoles y flavonoides totales presentes en el mismo.

BIBLIOGRAFIA

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28: 25-30.
- Cordenunsi, B. R., Wenzel de Menezes, E., Genovese, M. I., Colli, C., Gonçalves de Souza, A., Lajolo, F. M. 2004.** Chemical composition and glycemic index of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. *J. Agric. Food. Chem.* 52: 3412-3416.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. & Kromhout, D. 1993.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Kim, D-O., Jeong, S. W., Lee, C. Y. 2003.** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-326.
- Miller, N. J. & Rice-Evans, C. A. 1997.** The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* 60 (3): 331-337.

CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN PROVENIENTE DE PIÑONES DE DOS ESPECIES DE ARAUCARIA

LUPANO, Cecilia E¹., CONFORTI, Paula A².

¹ Investigador de CONICET; ² Becaria de CONICET.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CIDCA – Facultad de Cs. Exactas (UNLP) 47 y 116 (1900) La Plata, Bs. As. TE/Fax: (221)4254853- (221)4809741. E-mail: cel@dalton.quimica.unlp.edu.ar.

RESUMEN

En Argentina existen fundamentalmente dos especies de araucaria: *Araucaria araucana*, en la provincia del Neuquén, y *Araucaria angustifolia* en la zona de Misiones. Ambas especies producen piñones comestibles, compuestos principalmente por almidón.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los almidones de ambas especies. Se realizaron observaciones microscópicas de cortes de piñones con microscopio óptico y microscopio electrónico ambiental de barrido. Se extrajo el almidón, y se determinó el porcentaje de amilosa, la temperatura de gelatinización por calorimetría diferencial de barrido, y el patrón de difracción de rayos X.

La morfología de los gránulos de almidón fue semejante en ambas especies, siendo el tamaño ligeramente inferior en la *A. araucana*. Se observó un pico de gelatinización del almidón a 69°C y 65°C, para *A. angustifolia* y *A. araucana*, respectivamente. Los patrones de difracción de rayos X fueron semejantes, presentando 3 picos a 2 θ : 15, 17 y 22.

Palabras claves: araucaria, almidón, piñones

ABSTRACT

In Argentine there exist mainly two araucaria species: the *Araucaria araucana*, in the province of Neuquén, and the *Araucaria angustifolia*, in the Misiones region. Both species produce eatable pine nuts, composed mainly by starch.

The objective of this work was to characterise the starch of both species.

The araucaria pine nuts were observed by light microscopy and atmosphere scanning electron microscopy. Starch was extracted, and the amylose content, the temperature of starch gelatinization measured by differential scanning calorimetry, and the X-ray diffraction pattern were determined.

The morphology of the starch granules was similar in both species, being starch granules of *A. araucana* a little smaller than the corresponding to *A. Angustifolia*. A peak of starch gelatinization at 69°C and 65°C in *A. angustifolia* and *A. araucana*, respectively, was observed.

The X-ray diffraction patterns of both araucaria starchs were similar, observing three peaks at diffraction angles 2 θ : 15, 17 and 22.

INTRODUCCIÓN:

El objetivo de este trabajo fue analizar el almidón proveniente de piñones de dos especies de *Araucarias*. En la Argentina existen fundamentalmente dos especies de araucaria: la *Araucaria araucana* o “Pehuén”, en la provincia del Neuquén, y la *Araucaria angustifolia* o “Pino Paraná”, en la zona de Misiones. Ambas especies producen piñones comestibles.

El Pehuén es un árbol dioico (con individuos femeninos y masculinos), siempre verde, de hasta 30 m de alto con una copa de forma aparasolada. Posee ramas largas cilíndricas cubiertas de hojas escamosas y punzantes reunidas en espiral. Los árboles femeninos forman conos globosos de 20 cm llamados en mapuche “ngellihue” o “gúillin” que producen cerca de 200 semillas. Las semillas son grandes, de unos 5 cm, castaño claras. Crece en suelos volcánicos encontrándose principalmente en el Parque Nacional Lanín del lado argentino de la cordillera y desde Ñuble hasta el volcán Villarica, del lado chileno, a más de 800 m de altura. Fructifica a partir de marzo y abril. Las semillas fueron utilizadas como alimento por los tehuelches y gununakene y son consideradas el pan de los mapuches¹. Al igual que el Alerce es "Monumento Nacional", está protegido y está prohibida su tala².

Por su parte, el Pino Paraná, pino de Misiones o árbol candelabro, es nativo del sur de Brasil y norte de Argentina. Es un árbol dioico de gran talla que puede alcanzar 35 m de altura, con porte en candelabro. Las ramas se sitúan en la parte superior del tronco. Las hojas se disponen en manojos al final de las ramas. La corteza se exfolia en delgadas escamas horizontales. Presenta conos gruesos, de hasta 15 cm de longitud, con escamas acabadas en una punta recurvada, y semillas alargadas, de 3-6 cm de longitud¹.

Los indios paranaenses, colectores de alimentos, tenían al piñón de la *Araucaria angustifolia* como fruto por excelencia y actuaban como propagadores de sus plantaciones.

Los piñones están compuestos principalmente por almidón, que representa alrededor del 88% en base seca.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Observación directa al microscopio:

Se realizaron cortes de piñones de ambas especies y se observaron con luz blanca y luz polarizada, con un aumento de 400x.

Observación con microscopio electrónico ambiental de barrido:

Se observaron cortes de piñón de *A. araucana* con un microscopio electrónico de barrido ambiental ElectroScan 2010 (Environmental Scanning Electron Microscope-ESEM). Este tipo de microscopio se diferencia de los convencionales de barrido (SEM) en que la cámara de observación de la muestra puede trabajar a presiones de 0 a 20 Torr.

Dentro de la cámara hay vapor de agua y condiciones que permiten variaciones de presión, temperatura y humedad para observación de muestras no conductivas sin preparación previa, especialmente las de tipo biológico.

Extracción del almidón:

Para la extracción de almidón⁴ se utilizaron piñones pelados, sin el embrión, guardados a -20°C . Se cubrieron con solución de bisulfito de sodio al 0,16% y se llevaron a estufa a 50°C durante 20 hs. Al cabo de ese tiempo, se las trituró, dejando decantar durante 2 hs. Se descartó el sobrenadante y al sedimento se le agregaron 6 volúmenes de solución de NaOH 0,2%. Se dejó en estufa a 25°C otras 20 hs.

Se descartó nuevamente el sobrenadante, y se lavó repetidas veces hasta que el sobrenadante no mostrara coloración rosada con gotas de fenolftaleína. Finalmente se filtró por succión y se llevó a secar a estufa a 45°C . Se pesó y se calcularon los rendimientos.

Determinación del contenido de amilosa:

Para determinar el contenido de amilosa de los almidones se utilizó una técnica colorimétrica con yodo-yoduro de potasio determinando la absorbancia a 620 nm, realizando una curva de calibración con estándar de amilosa⁵.

La determinación se realizó por triplicado.

Calorimetría Diferencial de Barrido:

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Rheometric Scientific. Se realizaron tres corridas para cada almidón.

Las muestras se pesaron en cápsulas herméticas, agregándoles agua destilada de modo que el peso de agua duplicara al de la muestra, de manera de tener agua en exceso. Como referencia se utilizó una cápsula doble con aire. La velocidad de calentamiento fue de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Rango de calentamiento: 10 a 100°C .

Difracción de Rayos X:

Equipo utilizado: Phillip 1740. Tubo de Cu. Condiciones de barrido: 1° por minuto. Portamuestra plano. Las muestras de almidón se colocaron finamente molidas.

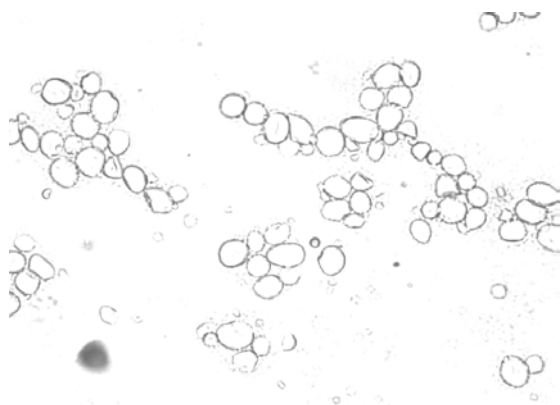
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación de gránulos de almidón al microscopio:

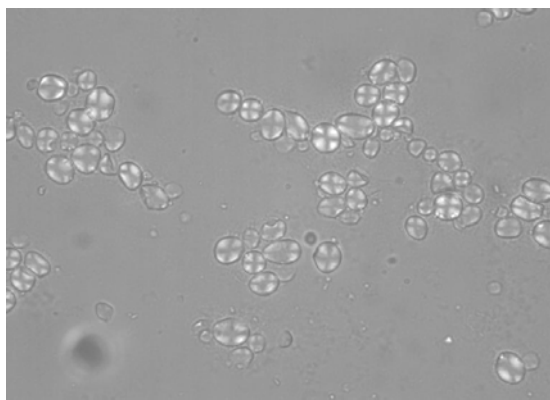
La morfología de los gránulos de almidón de ambas especies fue semejante, aunque el tamaño fue ligeramente inferior para *A. araucana* (Figura 1).

A. angustifolia

a)

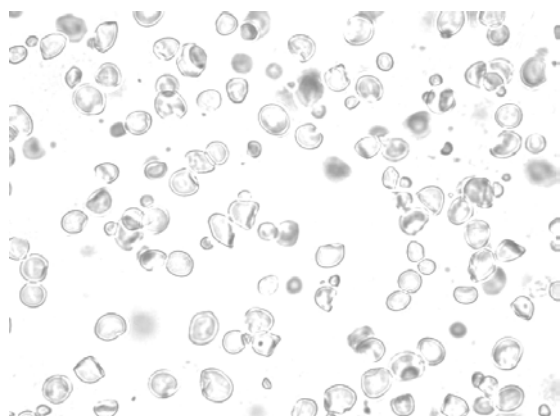


b)

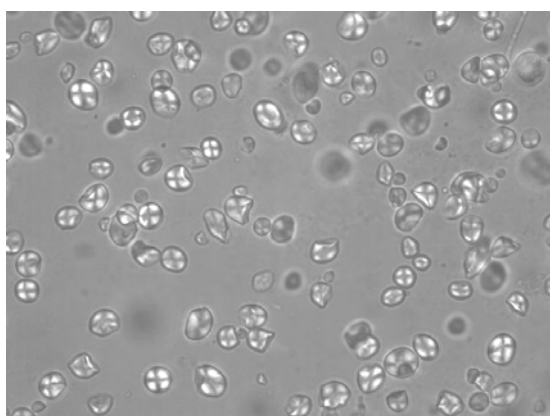


A. araucana

a)



b)



20 μ m

Figura 1 Micrografía de gránulos de almidón de piñones.. a) Con luz blanca; b) Con luz polarizada. Aumento 400x

Con el microscopio electrónico se pudieron observar claramente las células de *A. araucana* llenas de gránulos de almidón de tamaños variables entre 7 y 20 μm (Figura 2).

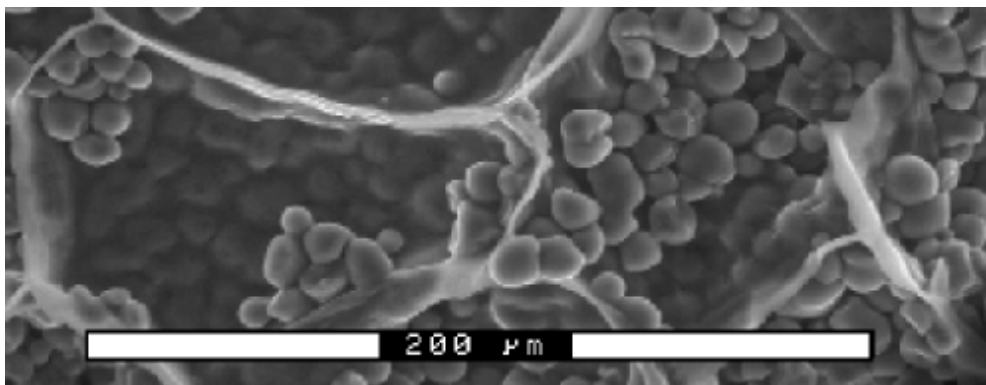


Figura 2. Micrografía electrónica de un corte de piñón de *A. araucana*.

Extracción de almidón:

El rendimiento de almidón a partir de piñones en base seca fue de 70,2% para *A. angustifolia* y 62,5 % para *A. araucana*.

Estos resultados indican que alrededor de dos tercios de los piñones está compuesto por almidón.

Determinación del contenido de amilosa:

El porcentaje de amilosa de ambos almidones se muestra en la Tabla 1. Los resultados se analizaron estadísticamente, concluyendo que existen diferencias significativas ($P < 0,01$), siendo mayor el contenido de amilosa para el almidón proveniente de *A. araucana*.

Tabla 1. Contenido de amilosa de los almidones extraídos a partir de piñones

almidón	Promedio (%)	Desviación estándar	N	Coefficiente de variación. (%)
<i>A. angustifolia</i>	9,78	0,65	3	6,66
<i>A. araucana</i>	12,81	1,32	3	10,27

Calorimetría Diferencial de Barrido:

Las corridas de calorimetría diferencial de barrido mostraron en ambos casos un pico de gelatinización del almidón a una temperatura de alrededor de 69 °C para *A. angustifolia* y de 65 °C para *A. araucana* (Tabla 2).

Tabla 2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de almidón de araucaria.

T₀ : temperatura inicial del pico. T_P : temperatura de pico. T_F : temperatura final del pico.

		T ₀ (°C)	T _P (°C)	T _F (°C)	ΔT (°C)
A. araucana	promedio	64,62	69,67	79,07	14,45
	Desviación estándar	0,09	0,19	0,55	0,55
	Coeficiente de variación %	0,13	0,27	0,70	3,83
A. angustifolia	promedio	60,77	65,80	78,53	17,76
	Desviación estándar	0,16	0,25	3,63	3,49
	Coeficiente de variación %	0,27	0,38	4,62	19,66

Se encontraron diferencias significativas en T₀ y T_p.

Difracción de Rayos X:

Los patrones de difracción de rayos X fueron semejantes, presentando 3 picos a ángulos de difracción 2θ de 15, 17 y 22.

CONCLUSIONES:

El almidón proveniente de las dos especies de Araucarias estudiadas es muy similar, encontrando diferencias entre ambos sólo en el contenido de amilosa y en la temperatura de gelatinización del almidón.

BIBLIOGRAFÍA:

Plantas nativas comestibles de la Patagonia andina argentino-chilena. Parte I . Eduardo H. Rapoport; Ana. Ladio; Eduardo H. Sanz. Ediciones de IMAGINARIA S.C. de Bariloche-2003. Pág.14.

² <http://www.asekond.in.cl/en2.htm>

³ <http://www.arbolesornamentales.com/Araucariaangustifolia.htm>

⁴ “Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches”. Kawaljit Singh Sandhu, Narpinder Singh, Maninder Kaur. *Journal of Food Engineering* **64** (2004) 119-127.

⁵ “A Rapid Colorimetric Procedure for Estimating the Amylose Content of Starches and Flours”. P.C Williams, F.D. Kuzina and I. Hlynka. *Cereal Chemistry* (1970) **47**, 411-420.

MATERIAS PRIMAS NO CONVENCIONALES: DESARROLLO DE PULPA DE HIGO DE TUNA (*Opuntia ficus indica*)

VIDALES, Susana L., MAZIERES, Jimena O. y CARREL, Giselle L.

Departamento de tecnología – Universidad Nacional de Luján – C.C. 221 Luján, Buenos Aires, Argentina. TE: 02323-423979, FAX: 02323-425795. svidales@unlu.edu.ar

RESUMEN

El higo de tuna es el fruto del nopal, cultivo no tradicional adaptado a zonas áridas donde otras especies frutihortícolas no prosperan. El objetivo del presente trabajo fue obtener pulpa de higo de tuna estable sensorialmente y con una vida útil significativa para su utilización fuera de la temporada de cosecha. Se aplicó la tecnología de obstáculos: disminución del pH, tratamiento térmico controlado, disminución de actividad acuosa y utilización de aditivos. La pulpa sin procesar fue de color verde amarillento, sin semillas y con aromas y sabor característicos; pH = 6,1 y 16° Brix. Los diferentes ensayos determinaron las siguientes características: pH = 3, tratamiento térmico a 90° C durante 5', actividad acuosa de 0,95 por agregado de jarabe de glucosa, adición de 60:40 de ácidos sórbico y benzoico. La vida útil resultó en 90 días sin refrigeración determinando recuentos de aerobios mesófilos, aerobios ácido tolerantes y hongos y levaduras.

Palabras claves: tuna, chumbera, pulpa, exótica, jugos, obstáculos.

ABSTRACT

The prickly pear is a fruit from the nopal, non traditional growing adapted to dry zones where other growings do not prosper. The objective of these studies was to obtain a sensory stable prickly pear pulp and with a shelf life larger to be consume after harvest period. The obstacle technology was used: pH decrease, control thermal treatment, water activity decrease and additives aggregate. The unprocessed pulp was yellow green, without seeds and with typical odors and flavours; pH = 6.1 and 16° Brix. The different studies determined the following characteristics: pH = 3, thermal treatment of 90° C for 5 minutes, decrease of water activity to 0.95 with glucose syrup, adding 60:40 of sorbic and benzoic acids. The shelf life was 90 days stored at refrigeration temperatures, evaluating counts of mesophylic aerobic, acid aerobics and yeasts and moulds.

Key words: prickly, chumbera, pulp, exotic, juice, obstacle.

INTRODUCCION

La fruta de descarte de las plantas de empaque debe encontrar una vía de procesamiento viable para evitar pérdidas económicas. La elaboración de pulpa de higo de tuna como producto intermedio para la industria alimenticia permite la utilización de esta fruta. Esta pulpa sería adecuada para la elaboración de derivados como jugos, dulces, mermeladas, helados y yogures.

Cuando se aplican tratamientos convencionales a este tipo de pulpas pueden resultar muy agresivos. Es el caso de la esterilización que puede llegar a generar un producto con color, aroma y sabor no característicos.

Un método que se está utilizando ampliamente en la industria de la conservación de frutas y hortalizas es la tecnología de obstáculos. Se basa en la aplicación de distintos factores de estrés tanto para el desarrollo microbiano como para el deterioro fisicoquímico. Entre ellos se encuentran: variación de pH, tratamiento térmico suave, disminución de la actividad acuosa, agregado de conservantes y aditivos (Cives, 2002).

Dadas las características que presentan las pulpas de frutos del tipo a analizar, se define el recuento de microorganismos como límite de la vida útil del producto.

Según las exigencias del CAA, artículo 1006, las concentraciones máximas de los conservantes en las bebidas analcohólicas son para ácido sórbico, 1000 ppm; ácido benzoico, 1000 ppm y mezcla de ambos, 1000 ppm en total. Por lo tanto una pulpa formulada puede utilizarse para jugos u otras bebidas de características similares, ya que la concentración mínima fijada por el CAA para el contenido de pulpa en estos productos es 10%.

El principal objetivo fue obtener pulpa de higo de tuna que, además de representar un producto sensorial y bromatológicamente aceptable, tenga una vida útil mayor que la fruta fresca, para permitir su utilización después de la temporada de cosecha como así también aumentar el valor agregado del producto.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima:

Se utilizó el fruto de la planta *Opuntia ficus indica* (higo de tuna) en grado de madurez óptimo (pH = 6,10; sólidos solubles = 16° Brix). Para la obtención de la pulpa se procesó el producto mecánicamente sin aplicación de calor y luego se tamizó.

Se estudió el comportamiento de la pulpa de higo de tuna a distintos valores de pH: 1 (Muestra A1), 3 (B3), 6 (C6), 7 (D7), 8 (E8), 9 (F9), 12 (G12) y 13 (H13) ajustándose las

muestras por adición de soluciones de ácido cítrico al 50% y de hidróxido de sodio al 50%. Se midió el pH, con homogeneización continua al agregado, utilizando un peachímetro con electrodo de vidrio apto para sólidos.

Las observaciones de la variación de color de las muestras se realizaron sobre fondo gris, con ángulo recto de observación y a 30 cm de los frascos, utilizando luz artificial (tubo fluorescente).

Para evaluar la estabilidad del color se almacenaron a temperatura ambiente y sin abrigo de la luz y se observaron los tubos diariamente hasta detectar cambios visuales evidentes. Paralelamente se corrieron 3 tubos control.

Una vez definido el pH de trabajo (Muestra B3) se evaluaron tiempos y temperaturas de pasteurización que no dañaran las características sensoriales de la pulpa. Las combinaciones de los parámetros tiempo-temperatura fueron las siguientes:

- Temperatura: 78° C. Tiempo: 5 minutos (Muestra B3T1).
- Temperatura: 78° C. Tiempo: 50 minutos (Muestra B3T2).
- Temperatura: 90° C. Tiempo: 5 minutos (Muestra B3T3).

Una vez definido el tratamiento térmico, se disminuyó la actividad acuosa al valor de 0,95 utilizando sacarosa y jarabe de glucosa, por separado y en combinación. Las cantidades de azúcares a agregar se calcularon en base a la ecuación de Ross (1975). Se generaron las siguientes muestras con proporciones variables de los azúcares (Tabla 4): B3T3I, B3T3II, B3T3III y B3T3IV.

Para evitar el pardeamiento no enzimático, los azúcares se agregan al final del tratamiento térmico y luego de la disolución completa se enfrió rápidamente.

Agregado de aditivos: A todas las muestras ensayadas se agregó ácido ascórbico en una concentración de 1000 ppm antes del calentamiento y del ajuste de pH.

Vida útil: A partir de los ensayos descritos anteriormente y definida las características de la pulpa se realizaron dos ensayos de vida útil agregando diferentes concentraciones de ácido sórbico y ácido benzoico.

- Desarrollo 1: cantidades iguales de ácido sórbico (sorbato de potasio) y ácido benzoico (benzoato de sodio), hasta alcanzar el límite de la mezcla.
- Desarrollo 2: 60% de ácido sórbico (sorbato de potasio) y 40% de ácido benzoico (benzoato de sodio), hasta alcanzar el límite de la mezcla.

Junto con estos dos desarrollos se corrió una muestra control de pulpa pasteurizada pero sin el agregado de aditivos. Se prepararon muestras en cantidades suficientes como para disponer de 2 muestras durante 3 meses con frecuencia mínima de análisis de 1 vez por semana. La pulpa una vez envasada se almacenó a temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$),

condiciones a las que va a estar expuesta durante su almacenamiento y comercialización. Se realizaron los recuentos de microorganismos aerobios ácido tolerantes (AMAT) y recuento de hongos y levaduras. Se utilizaron las técnicas de análisis recomendadas en el CAA.

RESULTADOS Y DISCUSION

El rendimiento para la obtención de la pulpa a partir del fruto fresco fue del 63%.

Los resultados obtenidos durante el ensayo de selección del pH adecuado para la conservación de la pulpa pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1: Variación de color de las pulpas ensayadas a diferentes pH al inicio y a los 4 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Ensayo	pH	Color inicial	Color después de 4 días
A1	1	Amarillo	Amarillo
B3	3	Verde amarillento	Amarillo
C6	6	Verde claro (original)	Amarillo
D7	7	Verde claro (original)	Amarillo
E8	8	Verde mas claro	Pardo
F9	9	Verde claro	Pardo
G12	12	Pardo	Verde
H13	13	Pardo más oscuro	Mantiene el color

El color inicial mas semejante al de los producto convencionales de higo de tuna es el que se obtiene a pH 3. La variación de los correspondientes a los otros valores se puede explicar considerando que el principal componente que influye en el color es el pigmento clorofila. Las clorofilas se pueden alterar químicamente de muchas formas, pero en el procesado de los alimentos la alteración más común es la feofitinización (Fennema, 1985). En base a estos ensayos y al tener en cuenta la necesidad de contar con pH ácidos para la estabilidad microbiológica del producto, se toma como pH de aplicación para la pulpa a desarrollar este valor. A esta concentración de protones existe un equilibrio entre feofitinas y clorofilas que dan lugar al color deseado. El color amarillo estable es el que corresponde a los productos derivados de la fruta y es aceptado por el consumidor habitual de estos productos.

Respecto del tratamiento térmico, los datos de la influencia de la temperatura y el tiempo sobre el color pueden observarse en la Tabla 2.

Tabla 2: Variación de color por aplicación de tratamiento térmico.

Muestra	T° / Tiempo (°C/min.)	Color
B3T1	78° / 5'	Amarillo
B3T2	78° / 50'	Marrón
B3T3	90° / 5'	Amarillo

La combinación temperatura-tiempo que se considera más favorable es 90 °C durante 5 minutos. Si bien con este tratamiento se obtiene el mismo color que en la primera experiencia, se opta por el de mayor temperatura debido a que aumenta el poder bactericida, alargando así la vida útil del producto. El procesado por los métodos de temperatura alta-tiempo corto (HTST) tiene la ventaja general que ocasionan la destrucción microbiana necesaria, con una menor destrucción de las características organolépticas y nutricionales que la que ocurre durante el procesado térmico convencional, como es la esterilización. A los efectos de observar el efecto de la temperatura sobre los microorganismos, se desarrollaron controles de hongos y levaduras (HyL) y recuento de aerobios mesófilos (AM) en pulpa control (A) pasteurizada y pulpa (B) sin pasteurizar. Los resultados se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3: Efecto del tratamiento de pasteurización sobre la muestra de pulpa sin conservante pasteurizada (A) y la muestra de pulpa sin conservantes sin pasteurizar (B)

	Pulpa A	Pulpa B
H y L	< 100 UFC / g	3.75 x 10³
AM	30 UFC/ g	9.5 x 10⁴

Para la actividad acuosa (0,95), los resultados respecto de color y sabor final de acuerdo a las distintas combinaciones de sacarosa y glucosa, se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 4: Variación de color y sabor por disminución de la actividad acuosa utilizando glucosa y/o sacarosa

Desarrollo	Sacarosa (%)	Glucosa (%)	Color final	Sabor final
B3T3I	100	0	Marrón opaco	excesivamente dulce
B3T3II	50	50	Ámbar oscuro	Muy dulce
B3T3III	25	75	Verde oscuro	Dulce
B3T3IV	0	100	Amarillo brillante	Dulce, sabor a fruta

Se observa la influencia de los azúcares en la reacción de Maillard y la caramelización de la sacarosa. En el desarrollo B3T3I en donde sólo se utilizó sacarosa, azúcar no reductor, debido al pH ácido esta se hidroliza parcialmente dando glucosa y fructosa, ambas azúcares reductores, lo cual incrementa los productos de la reacción de pardeamiento, y con esto el color oscuro de la pulpa final. La caramelización de la sacarosa define más aún el color final. Al disminuir la cantidad de sacarosa en los desarrollos posteriores, el color resulta más claro, hasta llegar al límite de 100% de glucosa, en donde el color permanece acorde a lo buscado (Fennema, 1985). El sabor dulce disminuye con el reemplazo de la sacarosa por el jarabe de glucosa, esto se puede explicar por los valores del poder edulcorante de cada uno de los mismos. En esta pulpa no se detecta el sabor característico del higo de tuna, debido al extremado sabor dulce. En el desarrollo B3T3IV se logran las características organolépticas adecuadas. Además a los aspectos anteriores se adiciona la practicidad tecnológica del agregado de jarabe de glucosa, junto a su fácil solubilización, ya que por el contrario, la sacarosa requiere un calentamiento posterior para su completa disolución. Por los aspectos evaluados anteriormente, se decidió la utilización del 100% de jarabe de glucosa para disminuir la actividad acuosa a 0,95. **Los resultados obtenidos en la evaluación de la vida útil se pueden observar en las Figuras 1, 2 y 3.**

En la Figura 1, se observa la evolución de la pulpa pasteurizada sin conservantes. Para el caso de hongos y levaduras un decrecimiento del recuento hasta los 20 días, a partir del cual comienzan a crecer, excediendo el límite máximo según CAA de 1000 UFC / g, a los 42 días. En cuanto al recuento de AMAT, el crecimiento comienza a surgir a los 8 días de control, lo cual se explica por el proceso térmico realizado en la pulpa, evolucionando luego de la misma forma que los hongos y levaduras.

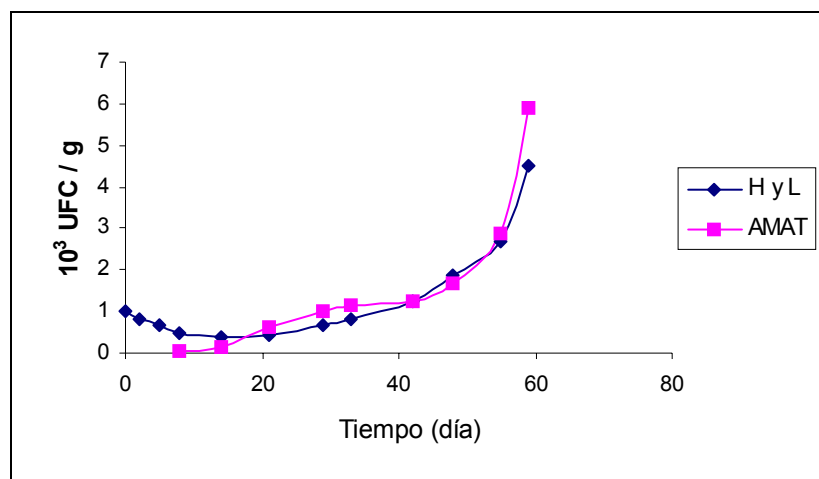


Figura 1: Evolución de Hongos y Levaduras y AMAT en pulpa sin conservante pasteurizada

En la Figura 2 correspondiente al desarrollo 1, se observa un decrecimiento del recuento de hongos y levaduras durante los primeros 33 días, donde el recuento permanece ausente durante los 9 días siguientes. En el día 48 resurge el crecimiento en forma menos pronunciada que para el caso de la pulpa sin conservantes. El recuento aumenta rápidamente y a los 63 días sobrepasa el límite fijado. Los AMAT permanecen ausentes hasta el día 59, donde evolucionan con valores menores a los de hongos y levaduras.

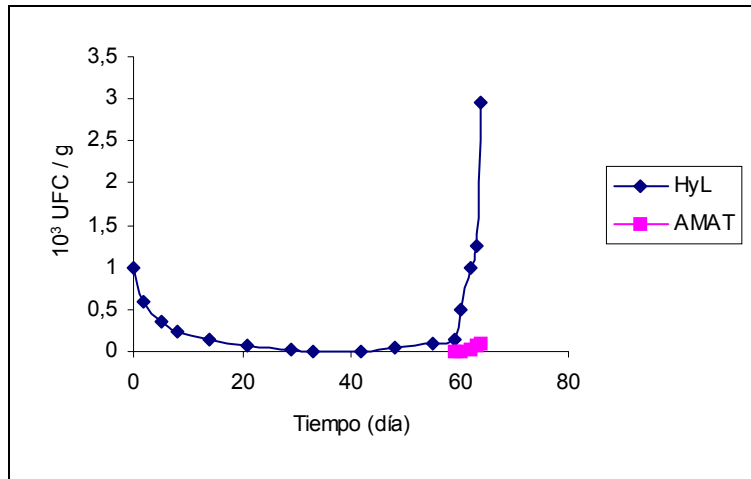


Figura 2: Evolución de Hongos y Levaduras y AMAT en pulpa desarrollo 1

En la Figura 3 correspondiente al desarrollo 2, se observa un decrecimiento del recuento de hongos y levaduras con mayor pendiente que para el desarrollo 1. Se observan ausencia de recuento hasta el día 85 de control, a partir de donde crece con igual pendiente que para el desarrollo 1. El límite de recuento se sobrepasa a los 96 días. El crecimiento de AMAT se hace evidente antes del resurgimiento de los hongos y levaduras (68 días), con una pendiente mayor que el desarrollo 1.

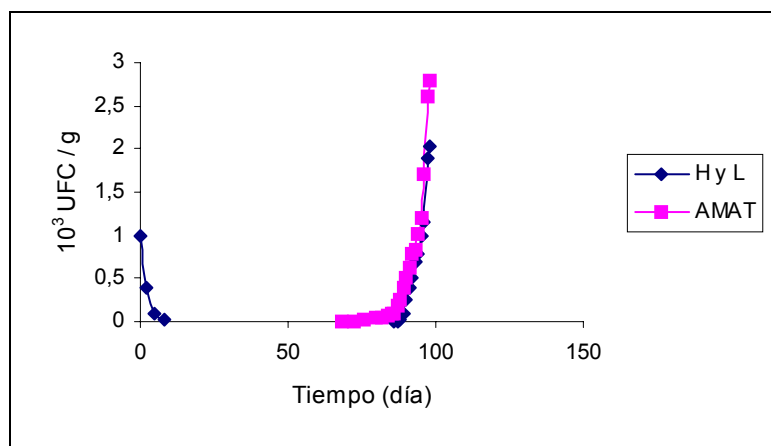


Figura 3: Evolución de Hongos y Levaduras y AMAT en pulpa desarrollo 2

Relacionando las figuras de cada tipo de pulpa se pudo observar el efecto antimicrobiano de los conservantes que se pone en evidencia al comparar la pulpa sin conservantes con las pulpas con conservantes (desarrollos 1 y 2). En éstas se puede observar un mayor decrecimiento inicial del recuento de hongos y levaduras debido a la acción sinérgica de los conservantes, llegando en algunos puntos a ser nulo. Esta situación no se logra en la pulpa sin conservantes, donde si bien se produce un decrecimiento, éste es producido por el estrés térmico que provoca el proceso de pasteurización, sin llegar a valores nulos. En las pulpas con conservantes existe una diferencia entre los días que permanece ausente el recuento, siendo la pulpa con conservantes (desarrollo 2) la que presenta un período mayor. En el último período de control para las tres pulpas se observa un tramo de crecimiento con una pendiente pequeña, pasando luego a un crecimiento exponencial. Con respecto a los AMAT, en las tres pulpas analizadas comienza en cero variando entre sí el momento en que aparecen en el producto. Las pulpas con conservantes presentan un período mayor de ausencia en el recuento que la pulpa sin conservantes.

CONCLUSIONES

La diferencia de días en la vida útil de las pulpas de los desarrollos 1 y 2, ambas con conservantes, se debe a una mejor relación de concentración de los conservantes que favorece la sinergia entre ellos. Resulta de esta forma que la proporción de conservantes más indicada es la utilizada en la pulpa con conservantes (desarrollo 2), 60% de ácido sórbico y 40% de ácido benzoico, donde la vida útil es de 90 días.

En el caso de que la pulpa se utilice para la elaboración de helados, deberá evitarse el agregado del sorbato de potasio, ya que el mismo no se encuentra contemplado en la lista positiva de aditivos del CAA. Por ello, se recomienda refrigerar la pulpa sin conservantes a 7° C para aumentar las barreras tecnológicas de conservación, si se desea obtener una mayor vida útil (29 días), ya que los límites de hongos y levaduras para este tipo de producto es el mismo que para bebidas analcohólicas (CAA).

BIBLIOGRAFIA

- Cives, H. 2002.** Descripción de Procesos Industriales. II Curso de Tecnología de Citrus. Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos. Código Alimentario Argentino. Edición actualizada.
- Fennema, O. 1985.** Food Chemistry. Ed. Marcel Dekker.
- Ross, K. D. 1975.** Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Tech. 29:26-30.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Luján, CIDETA, por facilitar las instalaciones de la Planta Piloto y a la familia Ruiz Perez (Quilino, Córdoba, Argentina) por todo el apoyo recibido.

EVOLUCIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES EN GUINDAS DESHIDRATADAS BAJO DISTINTAS CONDICIONES.

OCHOA, Mónica¹; DE MICHELIS, Antonio², LOZANO, Jorge E.³ y AGULLÓ, Enrique⁴

¹ Asentamiento Universitario Villa Regina, UNComahue 25 de Mayo y Reconquista (8336) Villa Regina, Río Negro, FAX: 02941 463200, email: mochoa@auvr.com.ar

² INTA AER El Bolsón- CONICET, Ap. 108 (8430) El Bolsón, Río Negro

³ PLAPIQUI - UNS – CONICET, Camino La Carrindanga Km7 (8000) Bahía Blanca

⁴Departamento de Química, UNS, Avenida Alem 1253 (8000) Bahía Blanca

RESUMEN

Se evaluaron los cambios por efecto de la deshidratación en el contenido total de antocianinas de guindas de la variedad Montmorency, en función de la temperatura y velocidad de aire de secado. Las antocianinas totales (AT) se determinaron por el método del pH diferencial. El perfil de antocianinas se obtuvo por HPLC y el porcentaje de color polimérico (%CP) por el método de Somers- Wrolstad. Los resultados indican que las antocianinas o bien no se modifican, o aumentan su concentración en la primer parte del secado a 70°C, hasta una humedad relativa de 0,5%, para luego degradarse. Este efecto es más pronunciado a menor temperatura. También se notó un menor deterioro a las velocidades de secado más altas. El %CP se comporta en concordancia con las AT, a iguales condiciones de secado. El perfil de antocianina muestra cambios importantes durante la deshidratación, atribuible a procesos de co-pigmentación por las altas temperaturas y bajos pH.

ABSTRACT

Pigment composition of air dehydrated cherries (cv. Montmorency) at different temperatures and air velocity were analyzed. PH differential and Somer- Wrolstad methods were used to determine total anthocyanin content (AT) and % polymeric color (%CP) quantification, respectively. Anthocyanin profile was obtained with a HPLC method. Total anthocyanin concentration increased during drying up to 0.5% relative humidity; decreasing then progressively with time of drying. This trend was more pronounced at lower temperatures and drying air velocities. Same behavior was found for %PC. Anthocyanin profiles changed during cherry dehydration, phenomena attributable to co-pigmentation at process temperature and pH.

Palabras clave: Secado, guindas, antocianinas.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas en la producción de frutos deshidratados es el cambio que se observa en el color de los mismos. El color de un producto alimenticio ocupa un lugar preferente entre los factores que definen su calidad hasta el punto que puede ser rechazado o aceptado si la impresión visual que produce no coincide con el estándar aceptado como bueno. Las guindas son pequeños frutos rojos que tienen gran difusión en la zona andino-patagónica y su principal aplicación comercial es la fabricación de licores, dulces, conservas y su conservación en alcohol para uso en repostería. La deshidratación de esta fruta tiene por finalidad obtener un producto que tenga características de aceptabilidad necesarias y que esté disponible todo el año.

El color rojo característico de estos frutos se debe a la presencia mayoritaria de pigmentos antociánicos (Mazza y Miniati, 1993). Los principales factores que gobiernan la degradación de las antocianinas son el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno. Factores que generalmente tienen menor importancia son la presencia de enzimas degradativas, ácido ascórbico, dióxido de azufre, iones metálicos y azúcares. Además, el fenómeno de copigmentación puede afectar a la velocidad de degradación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en las antocianinas totales de guindas de la variedad Montmorency deshidratadas a diferentes temperaturas y velocidades de aire en un secadero convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron guindas de la variedad Montmorency cosechadas en la región de El Bolsón y conservadas en cámara a 4°C. Su tamaño oscila entre los 13 y los 17 milímetros. El contenido de humedad se determinó en estufa de vacío a 60°C y 750 mmHg hasta peso constante. Las cenizas por el método AOAC 940-26.(1993) a 525 °C; los sólidos solubles totales por refractometría (refractómetro tipo ABBE, Atago, Japón) según el método AOAC 932-12 (1993); el pH con un Analizador de Iones marca ORION, modelo EA 940 y electrodo combinado; la acidez por titulación con solución 0,1 N de NaOH hasta pH= 8,1 AOAC 942-15 (1993) y el porcentaje de semillas por extracción, limpieza y secado hasta peso constante en estufa de aire a 102°C. Los resultados obtenidos de la caracterización de las guindas se muestran en la **Tabla 1**.

Determinación de antocianinas.

Las antocianinas se determinaron por el método del pH diferencial (Wrolstad, 1976). La preparación de la muestra se realizó según Abers y Wrolstad (1979). La determinación de

antocianinas totales se realizó espectrofotométricamente a 510 nm utilizando la absorptividad molar del Cianidin-3-glucósido: 29600. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible marca Metrolab. Sobre fruta fresca y puntos seleccionados de una curva de secado se realizó también la determinación del perfil de antocianinas por HPLC, utilizando el método N° 71 del IFU Analyses, Internacional Federation of Fruti Juice Producers, (1998). Se utilizó una columna C-18 Supelco (Supelco Inc. PN, U.S.A.) y un cromatógrafo HPLC Shimadzu LC 10 equipado con un detector UV-Vis. con arreglo de fotodiodo. La concentración de antocianinas fue expresada como mg de pelarginidín-3-glucósido usando una absorptividad molar de 22400.

Tabla 1: Caracterización de guinda fresca y deshidratada.

Propiedad	GUINDA	
	Fresca	Deshidratada
Humedad	74.29%	15.6%
Semillas ^(a)	7.8 %	---
Antocianinas totales ^(b)	19.5 mg/100g	14.1 mg/100g (b)
pH	3.42	---
Acidez ^(c)	1.63 %	---
Sólidos Solubles	19.6 °Bx	---

(a) Expresado como g semilla seca / 100 g fruta entera (b) Expresado como Cianidin -3- glucósido, (c) Expresado como Ac. Cítrico Anhidro.

Preparación y secado de las frutas.

Un grupo de frutas se escaldaron en microondas Sharp R-210B a potencia máxima durante 2 minutos, se enfriaron sumergiéndolas en agua helada, se secaron con papel absorbente y luego se verificó por actividad fenolasa (método Traverso- Rueda & Singeton, 1973). El secado en un secadero piloto colocando frutos seleccionados en monocapa en la bandeja de secado y deshidratando a temperaturas (40°, 55° y 70°C) y velocidad de aire (0,1 a 3 m/s) controladas hasta pérdida de peso constante. Las experiencias se hicieron por duplicado.

Se realizaron curvas de secado en estufa de laboratorio de circulación forzada, colocando los distintos frutos en monocapa en cestos de alambre de 10 x10 cm y deshidratando a temperaturas controladas hasta pérdida de peso constante. Las experiencias se hicieron por cuadruplicado. En ambos casos se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo las que fueron almacenadas a -18°C hasta el momento de su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Fig. 1a** se observa la evolución del contenido total de antocianinas en función de la humedad relativa del fruto a tres temperaturas de secado y a una velocidad de aire constante de 3 m/seg. Como se observa, en la primera parte del secado, hasta 0,5 de X/X_0 , las antocianinas no se modifican, o aumentan su concentración a la temperatura mas alta, para luego en la última parte del secado comenzar a degradarse. Aquí puede observarse que el pigmento es mas afectado a la menor temperatura de secado, lo que indica una mayor influencia del tiempo que dura la operación. Con respecto al “aumento” de antocianinas que se observa al comienzo de la deshidratación a la temperatura mas alta, se ha encontrado (Mazza y Miniati 1993) que por acción de la temperatura y a pH relativamente bajos pueden condensarse las antocianinas consigo mismas, o con otros compuestos flavonoides, en un proceso denominado copigmentación.

Este efecto se encuentra aún en etapa de estudio, pero se ha avanzado en la obtención de perfiles de antocianinas de las frutas en distintas condiciones de secado, para observar que ocurre con las antocianinas mayoritarias. En estos ensayos preliminares ya se ha observado que el perfil cambia con la deshidratación, ya que desaparece uno de los picos mayoritarios del cromatograma inicial y en el siguiente punto de la curva, donde se observa el aumento de Ac, otro de los picos mayoritarios se refuerza.

En la siguiente figura (**Fig. 1b**) se puede observar la evolución de antocianinas pero en función de dos velocidades de aire de secado. Tal como ya se detalló para pigmentos y color superficial, la degradación de antocianinas también es menor a medida que aumenta la velocidad de secado, ya que esta reacción está fuertemente influenciada por el tiempo de residencia en el secadero.

Para las mismas condiciones de trabajo señaladas en el punto anterior, se evaluó también el porcentaje de color polimérico (%CP), índice de la transformación de antocianinas en polímeros que no se decoloran en presencia de sulfitos. Finalmente, en la **Fig. 1c** se observa la evolución del %CP en función de las temperaturas a distintas humedades del fruto. Puede notarse que sólo se observa un aumento importante de %CP a 40 °C, en concordancia con la disminución de antocianinas monoméricas que se ve en el gráfico anterior para la misma temperatura. Por último, las **Figs. 2 a y b** comparan dos cromatogramas correspondientes a guindas frescas y deshidratadas en el punto de mayor contenido antocianinas. Los mismos muestran cambios importantes en el perfil durante la deshidratación.

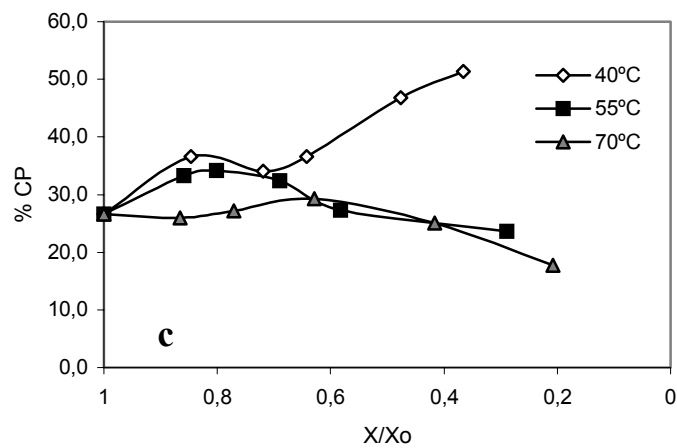
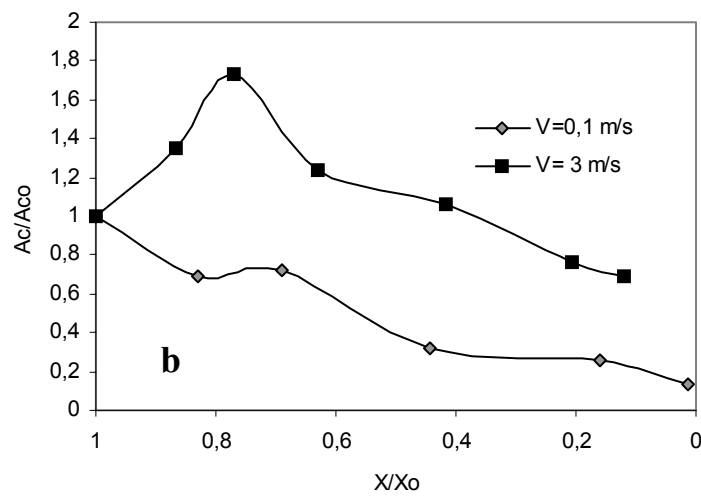
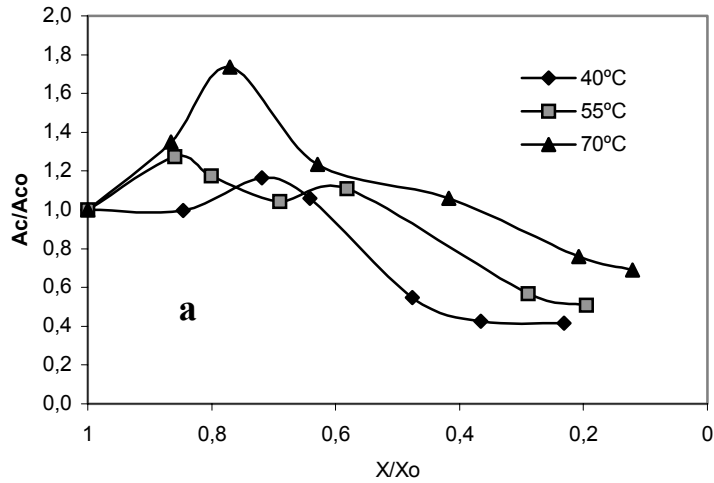


Figura 1: (a) Evolución del contenido total de antocianinas vs. humedad relativa del fruto a tres temperaturas. (b) Evolución de Antocianinas vs. humedad relativa del fruto a dos velocidades de aire y temperatura constante. (c) Evolución del % de Color Polimérico en función de las temperaturas de secado a velocidad de aire constante.

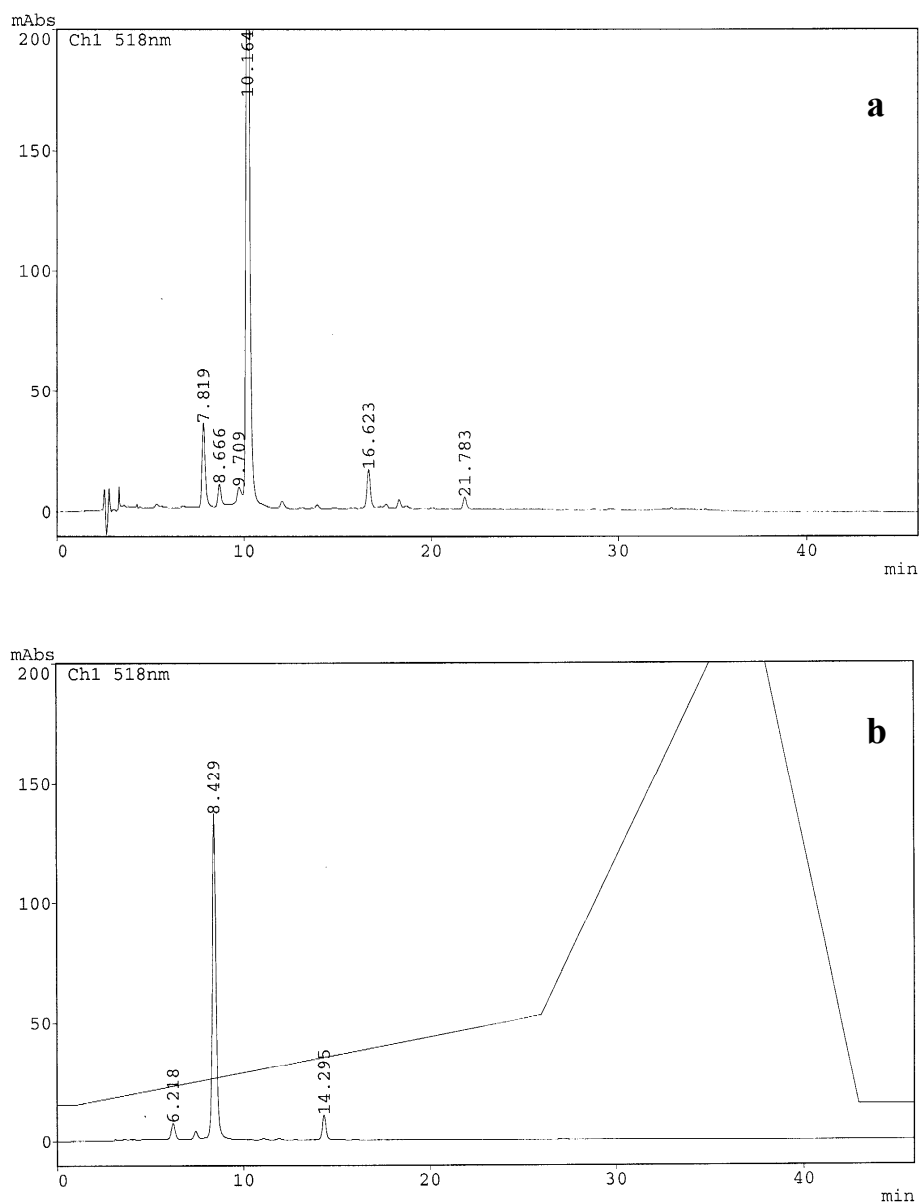


Figura 2: Cromatograma típico del perfil de antocianinas para (a) guinda fresca y (b) guinda deshidratada ($X/X_0 = 0,8-0,7$)

CONCLUSIONES

Se puede concluir que a fin de evitar la degradación de las antocianinas y su transformación a polímeros pardos, la condición de secado a 70°C y a la velocidad de 3 m/seg de aire serían las más adecuadas. Esto indica que se deben aumentar la temperatura y aire de secado lo más posible, para reducir el tiempo de residencia del producto. El máximo de temperatura estará dado en general por la manifestación de cambios atribuibles a reacciones de pardeamiento tipo Maillard y/o caramelización. Por otra parte, las modificaciones en el perfil de antocianinas podrían deberse a un proceso de copigmentación atribuible a las relativamente altas temperaturas y el bajo pH de las muestras, condiciones imperantes en el proceso estudiado.

BIBLIOGRAFIA

Abers, J.E. and Wroslad, R.E. (1979) Causative factors of color deterioration in strawberry preserves during processing and storage. *J. Food Sci.*, 44: 75 - 78

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) (1990) 15° Ed. 15ta

Mazza, G. and Miniati, E. (1993) Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. *CRC Press*, Boca Raton, 362 pp.

Traverso-Rueda S. and Singleton V.L. (1973). Catecholase Activity in Grape Juice and Its Implications in Winemaking *Am. J. Enol. Vitic.* 24: 103-109

Wroslad, R. E. 1976. Color and pigment analysis in fruit products. Oregon State University. *Agr. Expt. Sta. Bul.* 624

COMPORTAMIENTO DE PAPAS ANDINAS FRENTE A PROCESOS DE COCCIÓN

JIMENEZ, María E.; ROSSI, Analia M.; JUAREZ, Maria D.; SAMMAN, Norma C.

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas INSIBIO – Depto Bioquímica de la Nutrición – Fac. Bioquímica Química y Farmacia, UNT, Chacabuco 461, Tel:0381-4248921; nsamman@fbqf.unt.edu.ar

RESÚMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento de cinco variedades de papas andinas: *Runa*, *Imilla Colorada*, *Revolución*, *Collareja* y *Churqueña* frente a los procesos de fritura en profundidad y hervido. Se estudió la absorción de grasa durante la fritura y la modificación de las propiedades reológicas: fuerza de fractura, dureza y adhesividad en las papas hervidas.

Se observó una disminución de la fuerza de fractura y dureza al final de la cocción (20'). Los valores para *Imilla Colorada* y *Revolución* fueron significativamente menores respecto a *Spunta* (variedad de referencia). El aumento de la adhesividad de las papas andinas no fue significativo comparado con *Spunta*. Las papas estudiadas absorbieron entre 6,7 y 9,5 g aceite/100 g papas crudas (*Runa* y *Revolución* respectivamente), *Spunta* absorbió 7,4 g aceite/100 g papas crudas. En todos los casos la temperatura del aceite disminuyó de 196 a 168°C al agregar el alimento y aumentó hasta alcanzar 176-178 °C al final de la fritura, lo que minimiza el deterioro del aceite pero aumenta el tiempo de cocción.

Palabras claves: papas andinas, fritura, propiedades reológicas.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to study five varieties of andean potatoes: *Runa*, *Imilla Colorada*, *Revolución*, *Collareja* y *Churqueña* and their behavior of the potato while undergoing the processes of deep frying and boiling. The absorption of fat during frying was studied, and in the boiled potatoes, the modification of the rheological properties: fracture force, toughness and adhesiveness during boiling.

Both fracture force and toughness decreased following boiling (20'). Values for *Imilla Colorada* and *Revolución* were significantly lower than those for *Spunta* (reference variety).

The great adhesiveness for the andean potatoes was no significantly. The potato samples studied absorbed between 6.7 y 9.5 g oil/100 g raw potatoes (Runa and Revolución respectively); Spunta absorbed 7.4 g oil/100 g raw potatoes. In all cases oil temperature decreased from 196 to 168°C upon addition of the potatoes, and subsequently increased to 176-178°C, at the end of the frying process, what diminishes the deterioration of the oil but increases the time of cooking

INTRODUCCIÓN

La papa es uno de los cultivos básicos para la alimentación de las comunidades de la Puna Jujeña y los Altos Valles Andinos de Salta. Las variedades nativas o andinas se cultivan desde épocas precoloniales, utilizando técnicas agrícolas propias de esa región con pocas influencia de las técnicas modernas de agricultura. ([www.inta.gov.ar/...](http://www.inta.gov.ar/))

Las papas Andinas tienen una notoria calidad productiva, esto es libre de todo tipo de plaga y de fertilizantes o agroquímicos, tratándose en consecuencia de un producto alimenticio totalmente natural. Poseen valor por su papel fundamental en la alimentación de los pobladores andinos así como su potencial para el desarrollo de nuevos productos. Poseen características valiosas para su uso en el mejoramiento genético de la papa. Entre los parámetros que definen su calidad, se destacan el contenido de sólidos y proteínas en el producto fresco (Jiménez, Rossi, Sammán, 2004) y el comportamiento en la evaluación sensorial del producto procesado. El conocimiento de las características de calidad de las distintas variedades que aún se cultivan en los valles andinos, permitirá promover y ampliar su empleo en la gastronomía y crear nuevos mercados de consumo (Monti, M. C. y Clausen, A. M., 2003).

Las distintas variedades de papas difieren unas de otras en la textura de los tubérculos después de la cocción. Esta característica de la papa comestible, frecuentemente determina la dirección de su uso. Incluye su consistencia, así como su tendencia a la ruptura, harinosidad, sequedad y estructura (Howard, 1974).

La textura de los tubérculos cocidos es afectada, no solamente por los componentes químicos individuales, sino también por las interacciones entre ellos (Jarvis, Mackenzie & Ducan, 1992; Linehan & Hughes, 1969b), dependiendo esto de la variedad (Burton, 1989; Leung et al., 1983), de los factores de cultivo y almacenamiento (Keijbets & Vaal, 1974; van Marle, van Der Vuurst De Vries et al., 1997b) como así también de las interacciones que ocurren durante la cocción y la trituración (Burton, 1989; Taguchi, Schafer, & Breene, 1991).

El procesado del alimento siempre produce cambios. En los productos amiláceos, transforma al almidón en disponible para la digestión a través de la gelatinización, efecto clave deseado en los procesos de calentamiento. Sin embargo, la integridad de la membrana celular es afectada en el mismo rango de temperaturas y puede producir cambios en las propiedades texturales a través de la pérdida de turgencia. Cambios posteriores pueden ser iniciados por la pérdida de compartimentalización (Dejmek and Miyawaki, 2002).

La fritura en aceite caliente involucra tanto la transferencia de masa como de calor (Du Pont et al., 1992). El proceso de fritura reduce el contenido de humedad del alimento mientras que aumenta el contenido de aceite, el cual es tomado del medio de fritura (Gamble & Rice, 1988b). El color y flavor de las papas fritas son el resultado de reacciones de Maillard entre los azúcares y amino ácidos constituyentes (Roe et al., 1990; Roe & Faulks, 1991).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento de cinco variedades de papas andinas (*Solanum tuberosum ssp andigenun*): Runa, Imilla Colorada, Revolución, Collareja y Churqueña frente a los procesos de fritura en profundidad y de hervido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Papas Andinas: Se seleccionaron cinco variedades de papas andinas (*Solanum tuberosum spp andigenum*): Runa, Imilla Colorada, Revolución, Collareja y Churqueña adquiridas de la cooperativa CAUQUEVA, Jujuy; se empleó como referencia la variedad Spunta (*Solanum tuberosum*) provista por la Subestación Estación Experimental Agronómica Obispo Colombres Tafí del Valle.

Se determinaron los siguientes parámetros:

Humedad: usando la técnica oficial de AOAC método 950.46.B (1995).

Materia Grasa: según la técnica de Soxhlet (AOAC, 1995).

Fritura en profundidad: Se utilizó aceite vegetal parcialmente hidrogenad (®Superfry).

Tanto las papas andinas como la variedad Spunta, se cortaron en bastón (1,2 x 1,2 x 3,0 cm).

Procedimiento de fritura : Se utilizó una freidora doméstica con vaso de aluminio de 2,5 L de capacidad. El tiempo de fritura fue de 5 min/ 300 g de alimento con una temperatura inicial de 196 ± 2 °C. Relación Aceite/Alimento: 833,33 ml / 100 g.

Rendimiento en peso: Durante el proceso de fritura los alimentos pierden agua y absorben materia grasa del medio de fritura. El rendimiento ponderal se expresa como:

RP = Peso del alimento cocido [g] / Peso del alimento crudo [g]

Absorción de grasa: La absorción de grasa (G) se calculó usando la siguiente fórmula (Bognár and Piekarski, 2000):

$AG = \% \text{ grasa del alimento cocido} \times RP - \% \text{ grasa del alimento crudo}$

$AGf = \frac{g \text{ de grasa absorbida}}{g \text{ alimento crudo}}$

Cocción por hervido: Se seleccionaron papas de tamaños similares y se cocinaron enteras, con cáscaras a temperatura de ebullición durante 5, 10, 15 y 20 min. Luego se llevaron a temperatura ambiente con agua fría. La relación alimento/agua estuvo en el rango 90–210 g/l.

Propiedades Reológicas: Las papas hervidas se cortaron en rodajas de 1 cm de espesor. Se midieron Fuerza de Fractura, Dureza y Adhesividad. Las propiedades reológicas se evaluaron en el QTS 25 Texture Analyser CNS Farmell perteneciente a la Fac. de Ingeniería, UNSa. Los valores obtenidos se analizaron estadísticamente con el test de Tukey ($p < 0.05$) con el programa Statistix 1.0

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestran los resultados de humedad de las distintas variedades de papas crudas y fritas. Se observa que el proceso de fritura produce una pérdida del contenido de agua, lo cual es una característica de este proceso de cocción. La pérdida de humedad varió entre 20.80 y 27.40 % para las variedades andinas y fue de 18.63 % para Spunta.

Tabla 1 – Contenido de humedad de papas crudas y fritas

Variedad	Humedad(%)		Pérdida de Humedad(%)
	Papa Cruda	Papa Frita	
Spunta	80,57 ± 2,10	64,75 ± 1,58	19,63
Runa	71,79 ± 1,32	52,12 ± 1,50	27,4
Imilla Colorada	73,15 ± 0,57	55,33 ± 1,87	24,36
Revolución	78,90 ± 2,10	62,49 ± 2,43	20,8
Collareja	77,20 ± 0,45	57,74 ± 1,59	25,21
Churqueña	72,96 ± 1,65	57,04 ± 5,92	21,82

La tabla 2 muestra el contenido de grasa de las papas crudas y fritas. Se observa que éste aumentó desde 0.20-0.41 % inicial hasta un 11.39-16.02 % en las papas fritas. Para la variedad Spunta el aumento producido fue desde 0.27 % a 13.58%.

La absorción de grasa fue de 6.86 a 9.46 g de aceite/100 g de alimento crudo para las variedades estudiadas. Revolución y Runa fueron las que presentaron los valores mínimos y máximos respectivamente. Spunta absorbió 7.35 g de aceite/100g de alimento

crudo. Estos valores son similares a los informados por Bognar (1998) quien encontró que para papas en hojuelas, croquetas y tortillas fritas en profundidad, la absorción fue de 4.5 a 10 g de aceite /100 g de alimento crudo.

Tabla 2 – Contenido graso de papas crudas y fritas

Variedad	Lípidos (%)		AG (g/100g alim crudo)
	Papa Cruda	Papa Frita	
Spunta	0,27 ± 0,15	13,58 ± 1,47	7,35
Runa	0,40 ± 0,05	11,39 ± 1,06	6,86
I .Colorada	0,26 ± 0,11	13,26 ± 2,79	7,96
Revolución	0,4 ± 0,02	16,02 ± 3,24	9,46
Collareja	0,41 ± 0,06	15,89 ± 4,05	9,25
Churqueña	0,20 ± 0,02	14,42 ± 1,78	9,01

La figura1 muestra la variación de la temperatura del aceite en función del tiempo de fritura. Se puede observar que una vez colocado el alimento en la freidora, la temperatura desciende rápidamente desde 196°C hasta 168°C, para luego aumentar hasta 176-178°C , temperatuita que se mantiene hasta el final de la fritura, que se completó a los 5 minutos. Esta disminución minimiza el deterioro del aceite pero aumenta el tiempo de cocción.

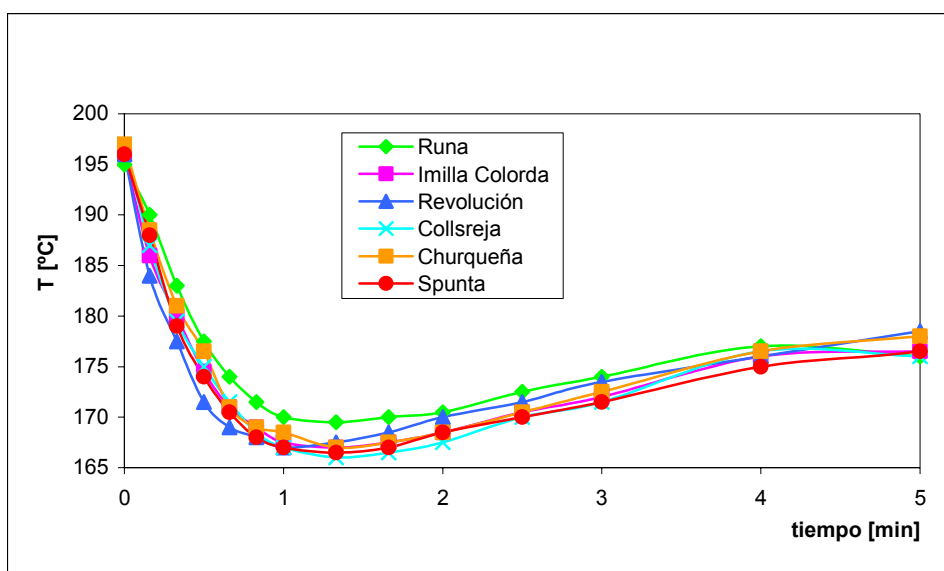


Figura 1- Variación de la temperatura del medio de cocción en función del tiempo de fritura.

Las figuras 2 Y 3 muestran la evolución de la fuerza de fractura y dureza de las papas en función del tiempo de hervido.

Las curvas de progreso de la cocción, muestran que si bien al inicio y al final no hay diferencias significativas entre las papas andinas y la variedad Spunta, sí se observan

diferencias entre las papas andinas y la referencia Spunta respecto de la fuerza de fractura a los 5, 10 y 15 minutos. Comportamiento similar se observa para la dureza. Respecto a la adhesividad, los resultados muestran que no existen diferencia significativas entre las variedades andinas estudiadas crudas ni hervidas y tampoco cuando se comparan con la de referencia.

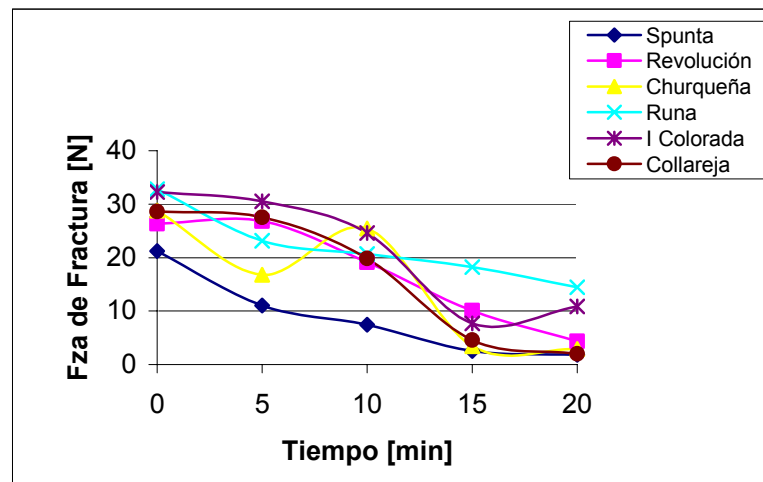


Figura 2 – Fuerza de fractura en papas hervidas en función del tiempo de cocción

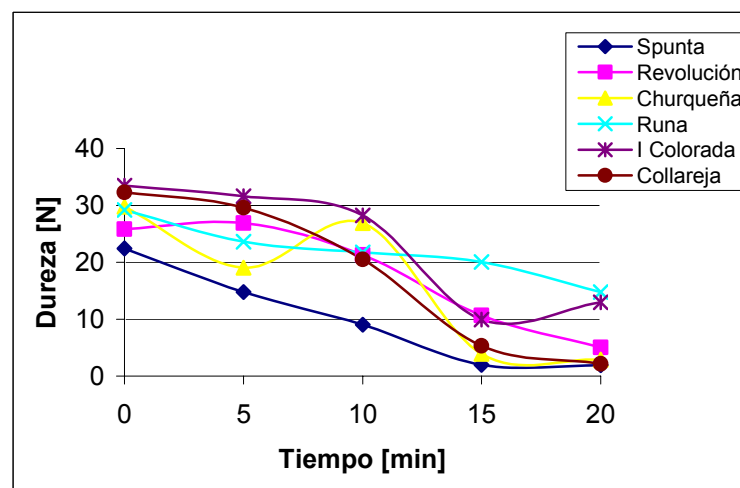


Figura 3 – Dureza de papas hervidas en función del tiempo de cocción

CONCLUSIONES

Las papas andinas presentan mayor contenido de sólidos totales iniciales, pierden mayor cantidad de agua y absorben mas aceite durante la fritura. Sin embargo no difieren significativamente en el contenido porcentual de aceite final.

El comportamiento reológico de las variedades andinas hervidas es similar al de la Spunta al término de los 20 min de cocción. Esto indica que las variedades estudiadas pueden ser empleadas en los procesos de hervido y fritura sin pérdidas de sus propiedades texturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Bognár, A. (1998)**. Comparative study of frying to other cooking techniques influence on the nutritive value. *Grasas y Aceites*, 49, 3-4: 250-260.
- Burton, W. G. (1989)**. *The potato* (3rd ed.). New York: Longman Scientific and Technical.
- Dejmek, P. and Miyawaki, O. (2002)**. Relationship between the electrical and rheological properties of potato tuber tissue after various forms of processing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(6), 1218-1223.
- Du Pont, M. S., Kirby, A. R & Smith, A. C. (1992)**. Instrumental and sensory tests of texture of cooked frozen French fries. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27, 285-295.
- Gamble, M. H. & Rice, P. (1988b)**. The effect of slice thickness on potato crisps yield and composition. *J. Food Eng.*, 8, 31-46.
- Howard, H. W. (1974)**. Factors influencing the quality of ware potatoes. I. The genotype. *Potato Research*, 17, 490 – 511
- Jarvis, M. C., Mackenzie, E., & Duncan, H. J.. (1992)**. The textural analysis of cooked potato. 2. Swelling pressure of starch during gelatinisation. *Potato Research*, 35, 93-102.
- Keibjests, M. J. H. & Vaal, J. F. A., (1974)**. Chemical composition of the potato tuber influences intercellular cohesion upon cooking. *Proceedings of the IV International Congress of Food Sciences and Technology*, 1, 56-67.
- Leung, H. K., Barron, F. H., & Davis, D. C. (1983)**. Textural and rheological properties of cooked potatoes. *Journal of Food Science*, 48, 1470-1474.
- Linehan, D. J., & Hughes, J. C. (1969b)**. Texture of cooked potato II. Relationships between intercellular adhesion and chemical composition of the tuber. *Journal of Science and Food Agriculture*, 20 (February), 113-119.
- Monti, M. C. y Clausen, A. M. 2003**. “Calidad Culinaria en Variedades Andinas de Papa y su Potencial Para el Desarrollo de Nuevos Productos”. IV Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, 10 al 14 de noviembre, Mar del Plata, Argentina.
- Roe, M. A., Faulks, R. M. & Belsten, J. L. (1990)**. Role of reducing sugars and amino acids in fry colour of chips from potatoes grown under different nitrogen regimes. *J. Sci. Food Agric.*, 52, 207-214.

- Roe, M. A., Faulks, R. M. (1991).** Color development in a model system during frying: role of individual amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, 56, 1711-1713.
- Taguchi, M., Schafer, H. W., & Breene, W. M. (1991).** Influence of cultivar and prewarming on texture relation of thermally processed potatoes. *Potato Research*, 34, 29-39.
- van Marle, J. T., van Der Vuurst De Vries, R., Wilkinson, E. C., & Yuksel, D. (1997b).** Sensory evaluation of the texture of steam – cooked table potatoes. *Potato Research*, 40, 79-90.
- www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/hortic/papa/mej/papas_andinas.htm

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DEL DESHIDRATADO EN EL COLOR SUPERFICIAL DE CEREZA

OHACO Elizabeth⁽¹⁾; PIRONE Beatriz N⁽¹⁾; KESSELER Alicia G⁽¹⁾; DE MICHELIS Antonio⁽²⁾

(1) Asentamiento Universitario Villa Regina, Universidad Nacional del Comahue, 25 de Mayo y Reconquista (8336) Villa Regina – Río Negro- Te.l: 02941-463200 quimica@auvr.com.ar

(2) INTA AER El Bolsón – CONICET, Ap. 108 (8430) El Bolsón- Río Negro, FAX (02944 – 492422), intaeb@elbolson.com

RESUMEN

El color rojo brillante de la cereza es uno de los atributos de calidad más importantes pero el más susceptible al cambio durante el proceso de secado. Este trabajo evalúa la influencia de las condiciones de secado en el color superficial de cerezas deshidratadas a diferentes temperaturas y velocidades de aire. Para tal propósito se trabajó con frutos de cereza frescas y seleccionada que fueron deshidratadas en un secadero piloto y en estufa de aire forzado en diferentes condiciones de trabajo. Se midió el color superficial utilizando el sistema de coordenadas "L", "a", "b" y se calculó valor numérico ΔE que permite encontrar la ubicación espacial que objetivamente se acerca a la valoración subjetiva del color. Se concluyó que, tanto la temperatura como la velocidad del aire en los rangos estudiados, no son parámetros optimizables porque el deterioro visual del fruto hacia colores amarronados es muy similar en todos los casos.

ABSTRACT

The brilliant red color of the sweet cherry is one of the most important attributes of quality but the most susceptible to change during the drying process. This work evaluates the influence of the drying conditions in the superficial color of sweet cherries dehydrated at different temperatures and velocity of air. For such a purpose are worked with fresh and selected sweet cherry fruits. They were dehydrated in a pilot drying equipment and in stove of air forced under different work conditions. The superficial color was measured using the system of coordinated "L", "a", "b" and numeric value ΔE was calculated that allows to find the space location that objectively comes closer to the subjective valuation of the color. It is concludes that, as much the temperature as the velocity of the air in the studied ranges, there aren't optimizing parameters because the visual deterioration of the fruit toward browned colors is very similar in all the cases.

INTRODUCCIÓN

El cerezo tiene gran importancia por su excelente comercialización ya que es el primer fruto de hueso que entra en el mercado debido a que presenta escasa necesidad de calor para su desarrollo. Este fruto es una drupa de color rojo brillante, globosas o con figura de corazón. El carozo es globoso, casi liso. Asimismo es el único fruto de carozo no climatérico, por lo que sí se recolecta con antelación, no madura fuera del árbol, por ello es necesario cosecharlo en su madurez plena. Es marcadamente estacionario lo que hace necesario la conservación del mismo por diferentes tecnologías, algunas todavía no desarrolladas tales como la deshidratación.

Este método consiste en la aplicación de calor bajo condiciones controladas para eliminar, por evaporación, gran parte del agua presente en el alimento. Es un proceso combinado de transferencia simultánea de calor y materia entre el medio externo de calentamiento y el material a deshidratar. Este tratamiento para conservación, como cualquier otro, produce cambios respecto del producto fresco que, en el caso de la cereza, se pone de manifiesto en su color que es uno de los atributos de calidad más importantes pero el más susceptible. Por lo tanto es importante conocer como afectan los parámetros del proceso al color superficial del fruto a fin de optimizar, si es posible, las condiciones operacionales. En este trabajo, se estudia la evolución del color superficial de la cereza mediante un método objetivo, en función de las condiciones operativas controlables en los procesos de deshidratación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con frutos de cereza en variedad Napolitana cosechados en la zona de El Bolsón – Río Negro (cosechas 2001, 2002 y 2003), conservados a 4°C hasta el momento de su utilización.

CARACTERIZACIÓN DE LOS FRUTOS: Los frutos frescos y deshidratados hasta aproximadamente 14% de humedad residual en base húmeda fueron caracterizados empleando las siguientes técnicas:

- Humedad: Método de la estufa de vacío. La muestra se coloca en una estufa de vacío a una temperatura de 60 °C y con un vacío de 750 mmHg hasta pesada constante.
- Cenizas: AOAC 940-26.(Ed. 15^{va})
- Porcentaje de Semillas: AOAC 949-08.(Ed. 15^{va})

- Sólidos Solubles Refractométricos: AOAC 932-12 (Ed. 15^{va}). Se utilizó un refractómetro ABBE, marca ATAGO tipo 1.
- PH: AOAC 981-12 (Ed. 15^{va})
- Acidez total: AOAC 942-15.(Ed. 15^{va}) Estas últimas determinaciones se realizaron utilizando un Analizador de Iones marca ORION, modelo EA 940 y electrodo combinado de pH ORION N° cat.: 91-04.
- Pectinas: Método del m-Hidroxidifenilo (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973)
- Antocianinas: Método del pH diferencial (Wrolstad, modificado. según Abers y Wrolstad, 1979) En ambos métodos colorimétricos se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible marca Metrolab 1700.
- Proteínas: Determinación de N total en alimentos. Método de Kjeldahl (ORION Guide to Food and Beverage Analysis, 1984). La medida del amoníaco destilado se realizó con un electrodo sensible al gas amoníaco, modelo 95-12 marca ORION y analizador de iones ORION Modelo EA 940
- Grasas: Método de Soxhlet. Se utilizó éter de petróleo 30-60°C

DESHIDRATACIÓN: La fruta fresca fue seleccionada y deshidratada en las siguientes condiciones:

- A temperatura constante (70°C) (a) en estufa de circulación de aire forzado a velocidad de aire: 0,1 m/s y (b) en secadero piloto a dos velocidades de aire: 4 y 1,5 m/s.
- A velocidad de aire controlada en secadero piloto a temperaturas entre 40 y 70°C.

Se realizaron curvas de secado colocando monocapas de los frutos en compartimientos formados sobre una misma bandeja, la cual permitía el paso de la corriente de aire caliente. Se reguló, según las condiciones, la temperatura y velocidad de aire. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo y fueron almacenadas en un freezer a - 20 °C en recipientes herméticos hasta el momento de su análisis y se llevaron a temperatura ambiente en sus contenedores como paso previo a la determinación del color superficial.

COLOR TRIESTÍMULO HUNTER (color superficial): Tanto en la fruta fresca como en cada punto de la curva de deshidratación se midieron los parámetros L, a y b en un equipo Hunter modelo D25 L-2, donde "L" representa la luminosidad, variando entre 0 y 100 para el negro y blanco respectivamente, "a" la variación cromática entre el rojo (+) y el verde (-) y "b" la variación entre el amarillo (+) y el azul (-). El Instrumento fue estandarizado con una placa cerámica blanca (L= 95,55; a= -0,10 y b=+2,69). La diferencia de color ΔE fue calculada a partir de los parámetros a, b y L usando la ecuación de Hunter – Scotfield (Hunter, 1975)

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2)}$$

donde $\Delta a = a - a_0$; $\Delta b = b - b_0$ y $\Delta L = L - L_0$. Los subíndices “ 0 ” indican color inicial.

Se realizaron 2 lecturas por fruto en la zona ecuatorial. Los resultados son promedio de veinte determinaciones por cada punto de la curva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para la caracterización de los frutos frescos y deshidratados de cereza se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados obtenidos para la caracterización de los de cereza

FRUTOS	FRESCOS	DESHIDRATADOS
Humedad	75.60 %	13.9 %
Semillas	4.4 % (a)	
pH	4.10	
Acidez	0.47 % (b)	
Sólidos Solubles	24.5 °Bx	
Pectinas	0.47 % (c)	
Proteínas		3.35 %
Grasas		0.06 %
Antocianinas totales	3.8 mg/100g (d)	
Color espectrofotométrico	96.56 A/100g (e) 24.90 A/100g (f)	15.41 (e) 32.45 (f)
Hunter L	31.28	23.83
Hunter a	14.65	9.33
Hunter b	2.35	6.45

(a) Expresado como g semilla seca / 100 g fruta entera; (b) Expresado como Ac. Cítrico Anhidro

(c) Expresado como Ac. Galacturónico; (d) Expresado como Cianidin -3- glucósido

(e) Expresado como unidades de Absorbancia a 530 nm; (f) Expresado como unidades de Absorbancia a 420 nm (%)

Como se puede ver, en las cerezas deshidratadas se observa un marcado cambio del color superficial de la fruta ya que disminuyen los parámetros Hunter L y a, aumenta el parámetro b y el color soluble (espectrofotométrico a 530 nm) disminuye. En este trabajo se siguió la evolución del color superficial que es un método de control que puede usarse durante el mismo proceso de secado y con obtención de resultados rápidos.

En la Figura 1 se muestra la variación del parámetro ΔE durante el secado, en el secadero y en la estufa, cuando se varía la velocidad de aire manteniendo una temperatura constante de 70 °C. En la misma, se puede observar que las respuestas finales son parecidas entre un método y otro de secado a pesar del tiempo que se insume. En el secadero para alcanzar una humedad residual del 14% se necesitó 12

horas, independientemente de la velocidad del aire, mientras que para, aproximadamente la misma humedad, se requirió 23 horas en la estufa.

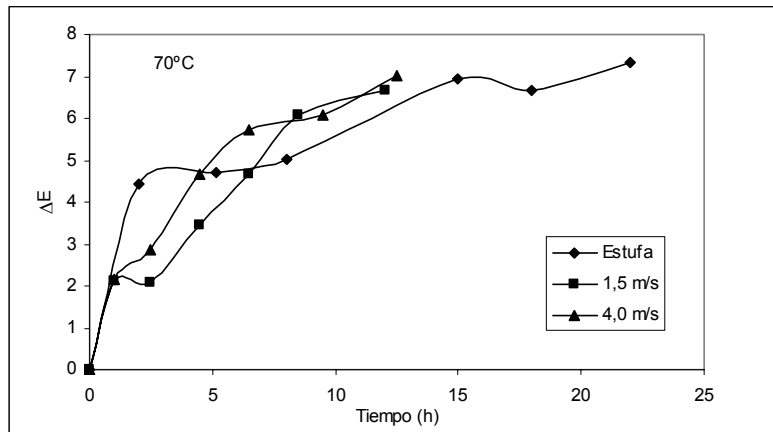


Figura 1: Cambios en el ΔE de los frutos de cereza en función del tiempo de secado de la muestra, en distintas condiciones de secado.

Asimismo, el valor del parámetro Hunter **a** final es prácticamente el mismo a igual contenido de humedad residual de los frutos en cualquiera de los dos métodos (estufa y equipo de secado) a temperatura constante de 70 °C y diferentes velocidades de aire, como se puede observar en la Figura 2.

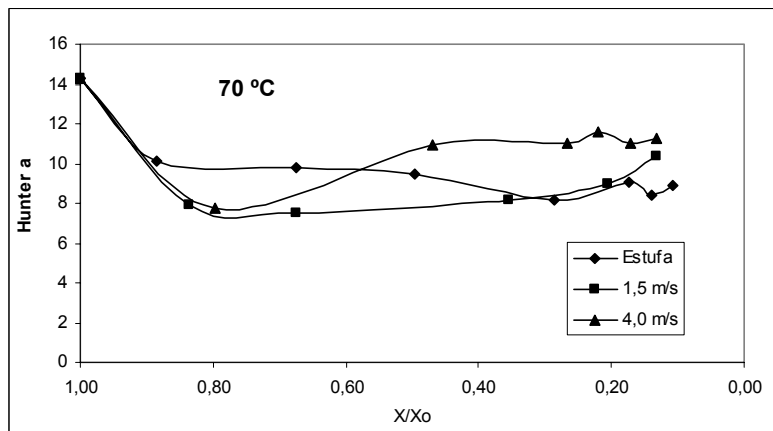


Figura 2: Cambios en el Hunter **a** de los frutos de cereza en función de humedad adimensional de la muestra a distintas velocidades de aire

Además de la experiencia de 70 °C en el secadero piloto se hicieron otras a 40 y 55 °C. En ellas se observa una disminución rápida del parámetro Hunter **a** al comienzo de la deshidratación (Figura 3) hasta aproximadamente un 50 % del inicial a las temperaturas de 55 y 70°C para permanecer luego prácticamente constante mientras que a 40°C la disminución del parámetro **a** es mucho más lenta en el tiempo. Sin embargo, este parámetro disminuye en función de la humedad del fruto y alcanza valores semejantes a las otras temperaturas estudiadas pero en tiempos muchos más extensos. Es decir que si

bien, cuando se evalúa el parámetro **a** en función del tiempo existen diferencias significativas entre las distintas temperaturas, en realidad no vale la pena establecer una cinética de degradación, ya que los valores para el contenido de humedad final, necesario para que la fruta deshidratada sea estable, es prácticamente el mismo.

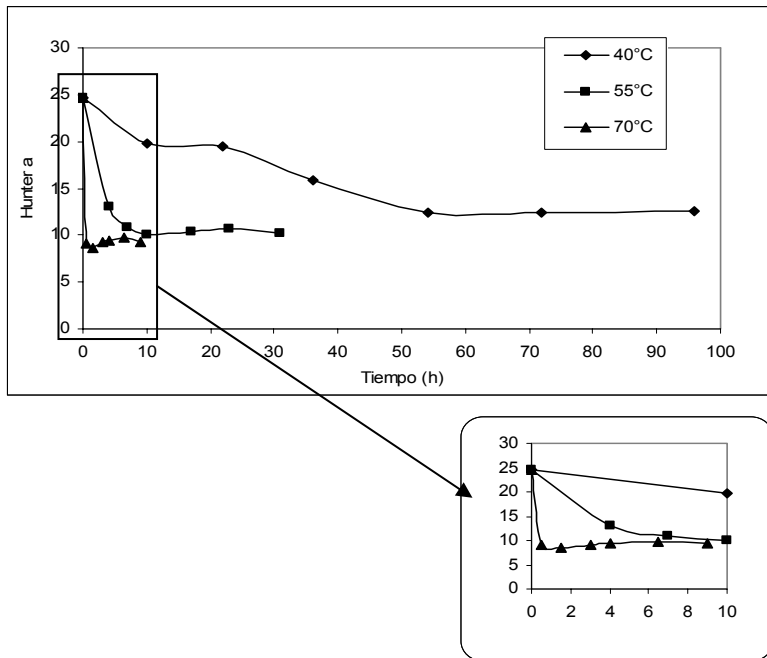


Figura 3: Cambios en el Hunter a de los frutos de cereza en función del tiempo de secado de la muestra, en el secadero

La tendencia en la variación del parámetro ΔE en función de la humedad adimensional a distintas temperaturas, como se puede ver en la Figura 4, es muy similar a la evolución del parámetro **a**, es decir las curvas se diferencian hasta valores de humedad adimensional de la muestra de aproximadamente 0,6. A humedades menores los valores no presentan diferencias significativas, llegando a ΔE semejantes para la humedad final de las muestras.

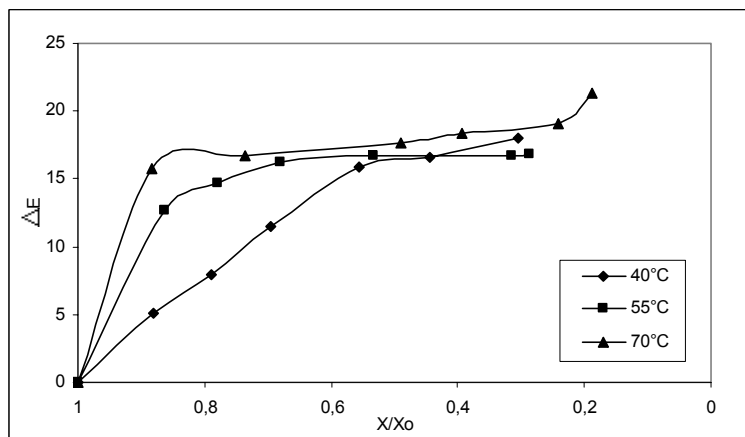


Figura 4: Cambios en el ΔE de los frutos de cereza en función de la humedad adimensional, a distintas temperatura en el secadero

CONCLUSIONES

El valor calculado ΔE , que permite evaluar el deterioro del color producido por el proceso de secado de cerezas, se ve poco influenciado por la relación tiempo-temperatura del proceso. En cuanto al efecto de la velocidad de aire, se observa que tanto el parámetro ΔE como el Hunter **a** muestran valores semejantes al final del secado.

Se puede concluir que, tanto la temperatura como la velocidad del aire en los rangos estudiados, no son parámetros optimizables en este proceso ya que los valores finales obtenidos para el color superficial de las cerezas son prácticamente los mismos.

Por ello se comenzó a evaluar la posibilidad de establecer mejores condiciones de secado estudiando la posibilidad de intentar pre tratamientos de la fruta antes de su deshidratación a fin de mejorar su color final.

BIBLIOGRAFÍA

Abers, J.E. and Wroslad, R.E. (1979) Causative factors of color deterioration in strawberry preserves during processing and storage. *J. of Food Science*, 44: 75 - 78

AOAC (Association of Oficial Analytical Chemist) (1990) Edic. 15^{va}. Disponible en: www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/cereza.htm

Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. (1973) New meted for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* (54): 484 – 489

Hunter, R. S. (1975) Scales for measurement of color differences; J. Wiley (Ed), "Measurement of Appearance". New York: Interscience, pp 133.

Lozano, R. D. (1978) E l color y su medición – Ed América Lee.

Ochoa, M. ; Kessler, A. ; Vullioud, M. y Lozano, J. (1999) Physical and Chemical Characteristics of Raspberry Pulp: Storage Effect on Composition and Color. *Lebens – Wissen. Und Technologie*, (32):149-153

Ohaco, E. ; Pirone, B. ; Ochoa, M. ; Kessler, A. ; De Michelis, A. (2001) Pigments Evolution during Air Dehydration of Sweet Cherries. *Proceeding of ENPROMER 2001 Vol III*, 1435-1440.

Orion Guide to Food and Beverage Analysis (1984)

Pirone, B. ; Ochoa, M. ; Kessler, A. ; De Michelis, A. (1999) Evolución de los Pigmentos durante la deshidratación de Guindas. VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Santa Fe.

Wrolstad, R.E. (1976) Color and pigment analyses in fruit products. Bull. 624. Oregon Agric. Exp. Stn., Corvallis, OR

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Comahue - Asentamiento Villa Regina, y a la ANPCyT que colaboraron con la financiación de este trabajo. INTA AER EL Bolsón que aportaron personal, servicios, etc. CIATI, Villa Regina por facilitar la búsqueda bibliográfica y aportar servicios para hacer posible este trabajo.

DULCE DE LECHE ARGENTINO – SU CARACTERIZACIÓN

CASTAÑEDA, Roberto; MUSET, Graciela; CASTELLS, María L.; ARANIBAR, Germán F.; MURPHY, Marcela; RODRÍGUEZ, Gabriela; GIRAUDO, Cintia

INTI-Lácteos. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL - Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea. Av. General Paz 5445, casilla de correo 157 (1650) San Martín, Buenos Aires, Argentina. Telefax: 11-4754-4068, correo electrónico: lacteos@inti.gov.ar

RESUMEN

Con el fin de promover y difundir en el exterior el dulce de leche como producto autóctono de nuestro país, se elaboró un programa de trabajo entre la Fundación Exportar, la SAGPyA, el INTI y empresas elaboradoras del producto.

El objetivo del presente trabajo es presentar y analizar las características del Dulce de Leche Argentino variedad tradicional a través de las determinaciones cuantitativas de los siguientes parámetros: humedad, proteínas totales, materia grasa total, cenizas, hidratos de carbono, pH, colesterol, actividad acuosa (a_w), ácidos grasos saturados, color, índice de refracción ($^{\circ}$ Brix), parámetros reológicos y evaluación sensorial.

Los panelistas pudieron determinar diferencias significativas entre muestras en las propiedades de corte, dureza, picos, adherencia, untabilidad, gusto ácido y sabor a leche condensada. También se observó diferencia entre muestras en los contenidos de sodio y de azúcares reductores.

Esta metodología ha permitido conocer en profundidad las características del producto, obteniéndose de esta manera su “huella digital”.

Palabras Clave: Dulce de leche, Caracterización, Análisis Sensorial, Reología, Composición.

ABSTRACT

A work program was carried out among INTI, Fundación Exportar, SAGPyA, and “dulce de leche” manufacturing companies in order to promote and to spread outside the country, the product as an argentine typical dairy product.

The objective of the present work is to show and to analyze the dulce de leche characteristics through the following quantitative determinations: moisture, total proteins, total fat content, ash, pH, cholesterol, water activity (a_w), saturated fatty acids, color, refraction index($^{\circ}$ Brix), rheological parameters and sensory evaluation.

The judges who participated of the sensory evaluation sessions, were able to determine significant differences among samples in the cut, hardness, peaks, adhesiveness, spreadability, acid taste and condensed milk flavor properties. Differences in the reduced sugar and sodium contents were also observed.

This methodology allowed us to acquire a deep knowledge referring the product characteristic properties, obtaining by this way its "fingerprint".

INTRODUCCION

El dulce de leche es uno de los productos nacionales más reconocidos en el exterior, infaltable desde hace más de 100 años en la mesa de los argentinos; sabroso, tentador e irresistible. Tiene su origen, entre leyendas e historia, el 24 de Junio de 1829 en la estancia "La Caledonia", donde se firmó el "pacto de Cañuelas" entre Juan Manuel de Rosas y Juan Lavalle.

Como resultado de la expansión del comercio internacional, existe una demanda creciente del mercado para establecer estándares de identidad de productos que serán vendidos en lugares muy distantes al país de origen, y donde los elementos de identidad del producto no son conocidos o no son completamente entendidos.

Estos estándares incluyen información detallada sobre la composición química, bioquímica y en algunos casos mediciones físicas. Sin embargo, la definición de un producto es generalmente incompleta a menos que se incluya una caracterización sensorial que implique una descripción de su apariencia, textura, flavor, etc.

Por esta razón, se vuelve imprescindible ofrecer un producto característico y totalmente diferenciado de productos similares elaborados en otros países de Latinoamérica.

Con el fin de promover en el exterior y difundir como producto autóctono de nuestro país se elaboró un programa de trabajo entre la Fundación Exportar, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, el INTI y las empresas elaboradoras del producto, para su caracterización.

El objetivo del presente trabajo es presentar y analizar las características físico-químicas, reológicas y sensoriales del Dulce de Leche Argentino variedad tradicional elaborado por 8 empresas que se asociaron al programa.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó una breve **descripción del producto** y de su **proceso de elaboración**.

Las **características físico-químicas** del producto se estudiaron a través de las determinaciones cuantitativas de los siguientes parámetros: *actividad acuosa* (equipo

Durotherm Lufft colocado en estufa a $20,0 \pm 0,1$ °C ,3 horas y calibrado con solución sobresaturada de BaCl₂), *pH* (pHmetro Hanna instruments HI 9025), *índice de refracción* (refractómetro digital ATAGO, expresado como grados Brix), *humedad* (FIL-IDF, 1991), *cenizas* (Calcinación en mufla a 525 ± 25 °C), *proteínas totales* (ISO/IDF, 2001), *hidratos de carbono* (Calculado por diferencia a 100% del resto de los componentes), *azúcares reductores totales* (Analyses F.I.P.J. N° 4,1985), *materia grasa total* (FIL-IDF, 1987), *ácidos grasos saturados* (FIL-IDF, 1991 e IRAM 1982), *colesterol* (AOAC, 2000), *calcio* (digestión vía seca a 500-550 °C y cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica. Adaptación del procedimiento PE/LE – 5.4 – 0.2), *sodio* (digestión vía húmeda con ácido nítrico y cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica. Adaptación del procedimiento PE/LE – 5.4 – 0.2) y *color* (Espectrofotómetro de Reflectancia marca BYK The Color Machine. Las mediciones fueron realizadas para Observador de 10°, Iluminante D65. El error del equipo en L*,a*,b* es de ± 0.05 , Delta E de ± 0.1).

Las **características reológicas** se determinaron mediante un analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems). Se utilizó el método TPA –Textura Profile Analysis– (FIL-IDF, 1991; Pauletti y col, 1992) de dos ciclos de penetración con 15 seg de separación entre los mismos a una velocidad constante de 0,8mm/s, siendo la penetración de 20mm. Las muestras se analizaron por cuadruplicado a temperatura ambiente (20-24°C).

Para la determinación de las **características sensoriales** (Perfil de Textura y Flavor), se empleó la técnica “Análisis Descriptivo Cuantitativo” –QDA– (IRAM, 1996, 1997, 2001, 2004; Hough y col, 1992) utilizando una escala no estructurada de 10 cm con referencias ancladas en 1 cm (intensidad débil) y/o en 9 cm (intensidad fuerte). El panel fue integrado por 10 personas seleccionadas y entrenadas según Normas IRAM (1995) y (1996). Las muestras fueron presentadas, utilizándose un diseño de bloques incompletos (Anderson y col; 1974), a temperatura ambiente (20-24°C) en vasos de material plástico transparente de 70 cm³ rotuladas con números de tres dígitos elegidos al azar. Tanto para el análisis sensorial del flavor, como de la textura bucal y manual del dulce de leche, se utilizaron cucharitas de material plástico descartable (tipo de café, con concavidad).

El **análisis de resultados** se realizó mediante el Análisis de Varianza de un factor (ANOVA) utilizando un $\alpha = 0.05$, la Mínima Diferencia Significativa (Método de Tukey) y el Intervalo de Confianza (Considerando distribución t-Student)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se entiende por dulce de leche al producto obtenido por concentración y acción del calor a presión normal o reducida de la leche, o leche reconstituida y adicionado de sacarosa

(parcialmente sustituido o no por monosacáridos y /u otros disacáridos) con o sin adición.

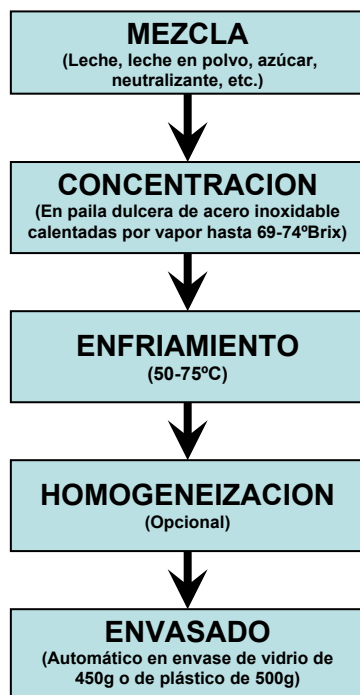


Figura 1. Proceso de elaboración

de otras sustancias alimenticias. El punto final del proceso de concentración se obtiene midiendo el índice de refracción (entre 69 y 74 °Brix). La alta concentración de solutos se traduce en una baja actividad acuosa (a_w 0,86), lo que constituye el principal factor de conservación del producto.

El dulce de leche adquiere su flavor y color característico debido principalmente a las reacciones de pardeamiento no-enzimático (Maillard) y caramelización y en menor medida a la oxidación

En la *figura 1* se detalla el proceso característico de elaboración del dulce de leche argentino a través de un flujograma.

Entre los parámetros fisicoquímicos analizados (*ver tabla 1*) se observa que la mayor variación entre muestras se encuentra en los contenidos de sodio (CV% 26,3) y azúcares reductores totales (CV%22,8), lo cual reflejaría diferencias en la formulación del producto, al estar dichos parámetros relacionados con el agregado de bicarbonato de sodio y de azúcares.

Si consideramos una porción de 45 g en un dulce de leche promedio, ésta aporta a una dieta de 2000 Cal, los siguientes porcentajes de la dosis diaria recomendada (*Food and*

Drug Administration, 1999): grasa total 4,4%, grasa saturada 8,1%, colesterol 4,2%, carbohidratos totales 8,4%, proteínas 5,4%, sodio 1,9% y calcio 10,4%.

En la *Tabla II* se presentan los valores e intervalos de confianza del Color en el sistema CIE L*a*b*, y en el sistema L*C*h. Se puede observar que las muestras presentan colores de distintas gamas, encontrándose la mayor fuente de variación en el valor de Intensidad luminosa L* (Clara-Oscura).

TABLA I. Parámetros Físico-químicos.

Muestra	a _w	pH	Índice de refracción (°Brix)	Humedad (%p/p)	Cenizas (%p/p)	Proteínas totales (%p/p)	Hidratos carbono (%p/p)	Azuc. red. tot (g/100g)	Materia grasa total (%p/p)	Ac. grasos saturados (g/100g)	Colesterol (mg/100g)	Calcio (%m/m)	Sodio (%m/m)
1	0,88	5,98	67,50	32,67 ^(*)	1,28	5,71	54,58	8,60	5,76 ^(*)	3,36	26,54	0,20	0,09
2	0,85	6,07	72,80	30,18 ^(*)	1,62	6,56	55,10	10,80	6,54	3,75	23,42	0,28	0,09
3	0,86	5,89	72,90	28,42	1,66	6,72	56,32	9,60	6,88	3,90	30,38	0,23	0,12
4	0,91	6,28	66,70	32,51 ^(*)	1,30	5,24	54,35	9,90	6,60	3,76	24,50	0,25	0,06
5	0,85	6,14	69,00	30,92 ^(*)	1,20	5,26	57,08	8,70	5,54 ^(*)	2,97	31,74	0,18	0,09
6	0,85	5,90	72,60	28,54	1,34	5,62	58,45	12,50	6,05	3,41	33,13	0,20	0,10
7	0,83	5,67	73,30	27,20	1,54	6,46	57,68	16,20	7,12	4,00	30,46	0,24	0,10
8	0,88	5,85	69,90	30,42 ^(*)	1,74	6,24	54,97	11,50	6,63	3,73	26,49	0,25	0,15
Promedio	0,86	5,97	70,59	30,11	1,46	5,98	56,07	10,98	6,39	3,61	28,33	0,23	0,10
CV _% ¹	3,0	3,2	3,8	6,5	14,0	9,9	2,8	22,8	8,6	9,4	12,6	14,7	26,3

^(*) Fuera de especificaciones según resolución MERCOSUR N° 137/96

TABLA II. Valores del color

Muestra	L*	a*	b*	C*	h
1	37,28	15,94	30,48	34,38	62,37
2	35,23	17	31,01	35,37	61,26
3	31,88	16,8	30,95	35,22	61,51
4	32,51	15,48	26,37	30,58	59,59
5	41,31	14,72	29,73	33,17	63,66
6	33,05	16,69	31,49	35,64	62,07
7	30,17	17,09	30,96	35,36	61,1
8	26,36	16,26	27,11	31,61	59,04
Promedio	33,5	16,2	29,8	33,9	61,3
CV _%	13,4	4,9	6,4	5,6	2,5
Intervalo de confianza 99,9%					
Límite Superior	24,8	14,7	26,0	30,2	58,5
Límite Inferior	42,2	17,8	33,5	37,6	64,2

En la *tabla III* se presentan los valores individuales de los parámetros reológicos, el intervalo de confianza y la mínima diferencia significativa entre muestras. La mayor variación entre las mismas se presenta en el módulo de deformabilidad (M_D), relacionado con la dureza del dulce de leche, y en el trabajo registrado durante la subida del sensor (W₂), relacionado con la adherencia del mismo.

TABLA III. Parámetros reológicos

Muestra	F _{1(g)}	W _{1 (g.s)}	MD (g/s)	F _{2 (-g)}	W _{2 (-g.s)}	F _{3 (g)}	W _{3 (g.s)}	F _{1/F₃}	W _{1/W₃}
1	72 ^{cd}	975 ^a	3,72 ^b	41 ^b	584 ^b	64 ^c	777 ^{cd}	1,118 ^c	1,26 ^{abc}
2	51 ^{ab}	612 ^a	2,33 ^{ab}	26 ^a	283 ^a	46 ^{ab}	508 ^{ab}	1,107 ^c	1,21 ^a
3	118 ^e	1817 ^b	8,71 ^d	56 ^c	843 ^c	109 ^d	1310 ^e	1,084 ^{abc}	1,39 ^c
4	134 ^e	2240 ^c	12,54 ^e	60 ^c	989 ^{cd}	124 ^e	1601 ^f	1,084 ^{abc}	1,40 ^c
5	41 ^a	569 ^a	2,06 ^a	17 ^a	237 ^a	38 ^a	468 ^a	1,055 ^{ab}	1,22 ^{ab}
6	86 ^d	1288 ^d	5,46 ^c	41 ^b	620 ^b	79 ^f	933 ^d	1,090 ^{bc}	1,37 ^b
7	131 ^e	2002 ^{bc}	9,25 ^d	70 ^d	1065 ^d	117 ^{de}	1417 ^e	1,118 ^c	1,41 ^c
8	63b ^c	738 ^a	2,81 ^{ab}	24 ^a	240 ^a	60 ^{bc}	644 ^{bc}	1,043 ^a	1,14 ^a
Promedio	87	1280	5,90	42	608	80	957	1,087	1,299
CV%	40,2	49,8	62,7	42,9	53,1	40,0	43,7	2,9	8,9
MDS	17	275	1,60	9	135	14	167	0,044	0.15
Intervalo de confianza 99,5%									
Lím. Inferior	36	372	0,50	16	147	34	362	1,043	1,136
Lím.Superior	137	2189	11,2	68	1068	125	1552	1,131	1,463

Test de Tukey - Los promedios para un mismo parámetro que se presentan con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05).

MDS: Mínima Diferencia Significativa (indica la mínima diferencia para que las muestras se consideren distintas)

F_{1 (g)} : Fuerza máxima registrada durante la penetración en el 1º ciclo; F_{2 (-g)}: Fuerza máxima registrada en la subida del sensor;; F_{3 (g)}: Fuerza máxima registrada durante la penetración en el 2º ciclo; W_{1 (g.s)}: Trabajo registrado durante la penetración en el 1º ciclo; W_{2 (-g.s)}: Trabajo registrado en la subida del sensor; W_{3 (g.s)}: Trabajo registrado durante la penetración en el 2º ciclo;; M_{D (g/s)}: Modulo de penetración; F_{1/F₃}: Relación entre la fuerza en el 1º ciclo y la fuerza en el 2º ciclo de penetración (Pauletti 1992); W_{1/W₃}: Cohesividad (H. Friedman, 1962)

En el *gráfico 1* se presentan las curvas experimentales fuerza-tiempo donde se observan con claridad los diferentes comportamientos reológicos.

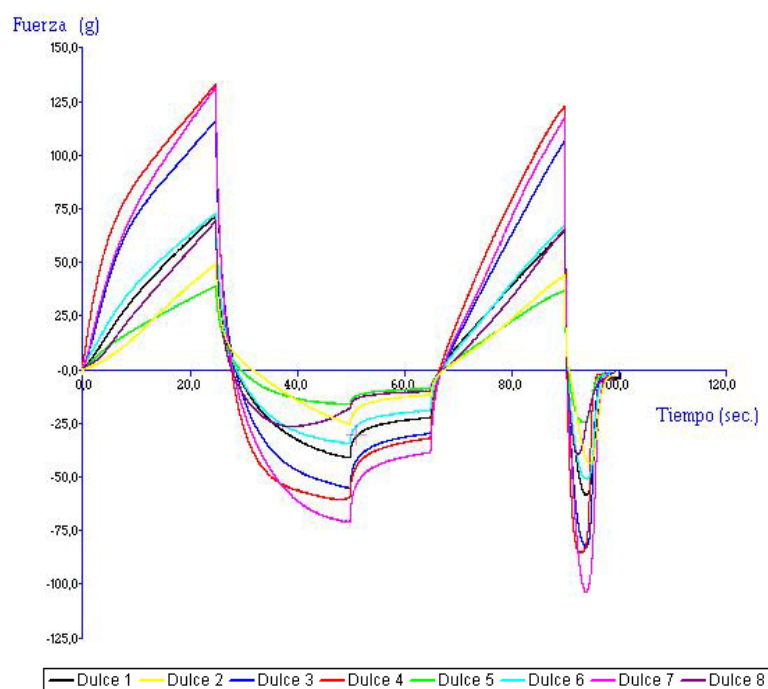


Gráfico 1. Curvas fuerza – tiempo

En las *tablas IV y V* se presentan los perfiles de textura y flavor obtenidos a través del Análisis sensorial. Los panelistas pudieron determinar diferencias significativas entre muestras en las propiedades de corte, dureza, picos, adherencia, untabilidad, gusto ácido y sabor a leche condensada.

TABLA IV. Perfil de textura

Muestra	Corte	Dureza	Filante	Untabilidad	Picos	Cristales	Solubilidad	Adherencia	Humedad
1	5,8 ^b	5,2 ^{ab}	4,2	6,4 ^{ab}	5,7 ^{bc}	0	6,4	5,0 ^{ab}	5,6
2	6,3 ^{bc}	5,4 ^b	5,3	6,6 ^{ab}	4,7 ^{ab}	0	6,4	5,1 ^{ab}	5,6
3	7,4 ^c	6,8 ^{bc}	5,2	6,1 ^{ab}	7,0 ^c	7(**)	5,8	4,6 ^a	4,6
4	7,4 ^c	6,4 ^{bc}	4,4	7,3 ^b	7,4 ^c	0	6,2	5,0 ^{ab}	5,7
5	4,3 ^a	3,8 ^a	5,3	7,1 ^{ab}	3,7 ^a	0	6,8	4,0 ^a	6,4
6	7,1 ^{bc}	6,4 ^{bc}	5,5	6,5 ^{ab}	5,9 ^{bc}	0	6,3	5,3 ^{ab}	5,1
7	7,4 ^c	7,3 ^c	5,7	5,4 ^a	6,7 ^c	0	5,7	6,8 ^b	5
8	6,9 ^{bc}	6,3 ^{bc}	5,2	6,5 ^{ab}	6,7 ^c	0	6,3	5,5 ^{ab}	5
Promedio	6,6	5,9	5,1	6,5	6	0	6,2	5,2	5,4
CV _%	16,7	19,0	10,2	8,9	20,5	0,0	5,5	15,6	10,2
MDS	1.5	1.4	N/S	1.8	1.8	N/S	N/S	2	N/S
Intervalo de confianza 99,8%									
Límite Superior	4,7	4	4,2	5,5	3,9	0	5,7	3,9	4,4
Límite Inferior	8,4	7,8	6	7,5	8,1	0	6,8	8,1	6,3

(**)Valor eliminado del cálculo del promedio dado que se considera una propiedad no característica del dulce de leche. Test de Tukey - Los promedios para un mismo parámetro que se presentan con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05). MDS: Mínima Diferencia Significativa (indica la mínima diferencia para que las muestras se consideren distintas)

Corte: Se mide al tomar una porción de dulce con una cucharita y evaluar la forma del dulce que queda en la cucharita y la depresión dejada al retirar la misma.

Dureza: Se evalúa como la fuerza necesaria para sumergir en forma completa en el dulce de leche la cara convexa de una cucharita.

Filante: El termino filante está relacionado con la capacidad de liga y formación de hilos que tiene un dulce. Se evalúa introduciendo media cucharita en el dulce de leche y al levantarla se mide el grado de formación del hilo.

Untabilidad: Facilidad requerida para untar el dulce con la cara convexa de una cucharita sobre un plato.

Picos: Tiempo que el pico mantiene su forma. Se evalúa colocando la concavidad de la cucharita sobre la superficie del dulce, pegarla a la misma y levantar la cucharita y evaluar la formación de picos

Cristales: Se evalúa al manipular el contenido de una cucharita de dulce entre la lengua y el paladar.

Solubilidad: Tiempo que tarda la muestra en disolverse en la boca. Se evalúa al colocar una cucharadita del dulce en la boca y masticarla de 2 a 4 veces apreciando la rapidez de disolución en la saliva ya sea de una parte o de la totalidad del producto.

Adherencia/pegajosidad bucal: Trabajo que es necesario realizar con la lengua para despegar el producto pegado en el paladar y en los dientes.

Impresión de humedad: Percepción del grado de humedad en la muestra.

TABLA V Perfil de flavor

Muestra	Int. Sabor	Dulce	Salado	Ácido	Amargo	Caramelo	Vainilla	Leche condensada	Regusto	Persistencia
1	6,1	6,3	0,9	1,0 ^{ab}	0,6	3,2	1,9	4,2 ^b	1,5	6,5
2	6,3	6,2	0,7	0,6 ^a	0,5	3,9	2,3	2,3 ^a	1,4	6,7
3	6,3	6,6	1,0	1,0 ^{ab}	0,9	3,4	2,0	2,5 ^a	2,5	6,9
4	6,3	6,7	0,7	0,6 ^a	0,7	2,7	2,4	4,0 ^{ab}	2,0	6,5
5	6,5	6,9	0,7	0,6 ^a	0,5	3,3	2,3	5,3 ^d	0,8	6,5
6	6,5	5,9	0,9	0,7 ^{ad}	0,8	4,8	2,4	3,6 ^{ad}	2,2	6,6
7	6,4	6,0	1,4	1,9 ^d	0,7	3,5	1,9	1,8 ^a	0,5	5,8
8	6,6	5,8	1,2	1,2 ^{ad}	0,5	4,4	2,2	1,6 ^a	1,9	6,5
Promedio	6,4	6,3	0,9	1,0	0,7	3,6	2,2	3,2	1,6	6,5
CV%	2,5	6,4	25,6	46,0	24,3	18,6	9,6	40,3	43,1	4,6
MDS	N/S	N/S	N/S	1,3	N/S	N/S	N/S	2,6	N/S	N/S
Intervalo de confianza 99,8%										
Límite Inferior	6,1	5,6	0,5	0,2	0,4	2,5	1,8	1,0	0,4	6,0
Límite Superior	6,6	7,0	1,3	1,7	0,9	4,8	2,5	5,3	2,8	7,0

Test de Tukey - Los promedios para un mismo parámetro que se presentan con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05). MDS: Mínima Diferencia Significativa (indica la mínima diferencia para que las muestras se consideren distintas)

Intensidad del sabor: Intensidad del sabor de la muestra; **Dulce:** Intensidad del sabor dulce de la muestra; **Salado:** Intensidad del sabor salado de la muestra; **Ácido:** Intensidad del sabor ácido de la muestra; **Amargo:** Intensidad del sabor amargo de la muestra; **Caramelo:** Intensidad del gusto caramelo de la muestra; **Vainilla:** Intensidad del gusto vainilla de la muestra; **Leche condensada:** Intensidad del gusto a leche condensada de la muestra; **Regusto:** Es la sensación olfato- gustativa que aparece después de la eliminación del producto y que difiere de las sensaciones percibidas cuando este estaba en la boca.; **Persistencia:** Es la permanencia de la sensación similar o próxima a la percibida cuando el producto estaba en la boca y cuya duración puede medirse.

El *gráfico 2* presenta el intervalo de confianza para el Perfil Sensorial del Dulce de Leche Argentino variedad tradicional.

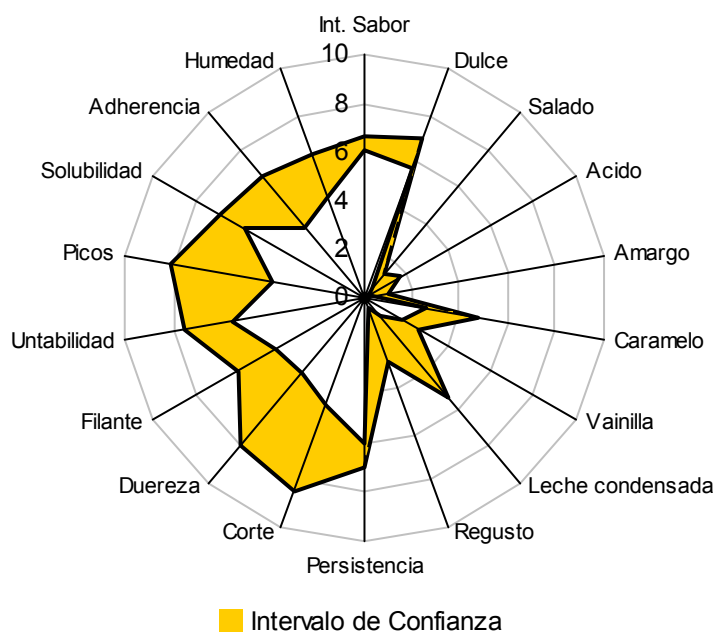


GRAFICO 2. Intervalo de confianza del 99,8% para el Perfil Sensorial del Dulce de Leche Argentino variedad tradicional.

CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permite contar con un conjunto de herramientas que son hoy en día utilizadas internacionalmente para caracterizar y/o tipificar distintos productos, en nuestro caso al Dulce de Leche Argentino variedad tradicional.

Esta metodología ha permitido conocer en profundidad las propiedades características del producto, obteniéndose de esta manera su “huella digital”.

Su utilidad es conocer los atributos de este producto típicamente argentino y poder diferenciarlo de otros dulces de leche elaborados en otras partes del mundo.

BIBLIOGRAFIA

Analyses F.I.P.J. (1985) N°4

AOAC (2000) Cholesterol multicomponent foods. Gas chromatographic method. Official Method Of Analysis (976.26).

AOAC (2000) Sterols in Mocaroni products. Official Method Of Analysis (954.03)

Anderson, V.; McLean, (1974), Design of experiments: a realistic approach. Dekker, New York. US.

FIL-IDF (1987). Determination of fat content Standard 013C.

FIL-IDF (1991). Rheological and Fracture properties of cheese. *Bulletin* N°268, ch 1-3 y 5.

FIL-IDF (1991) Determination of the total solids content. Standard 015B.

FIL-IDF (1991) *Bulletin* N°265

Food and Drug Administration (1999), A Food Labeling Guide. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Hough, G.; Bratchell, N.; MacDougall, D. (1992) Sensory Profiling of Dulce de Leche. A Dairy Based Confectionary Product, *Journal of Sensory Studies*, vol. 7, pp 157-178.

IRAM (1982) Método rápido de preparación de esteres metílicos de ácidos grasos para su análisis por cromatografía en fase gaseosa. Norma IRAM 5650 Parte II

IRAM (1995) Análisis Sensorial – Vocabulario. Norma IRAM 20001.

IRAM (1995) Análisis Sensorial - Directivas generales para la metodología. Norma IRAM 20002.

IRAM (1996) Análisis Sensorial – Metodología de investigación de la sensibilidad del gusto Norma IRAM 20004.

IRAM (1996) Análisis Sensorial – Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Norma IRAM 20005-1.

IRAM (1996) Análisis Sensorial- Iniciación y entrenamiento de los evaluadores en la detección y reconocimiento de olores. Norma IRAM 20006.

IRAM (1996) Ensayo de Categorización de Dulce de Leche. Norma IRAM 14067-5.

IRAM (1997) Análisis Sensorial - Métodos para determinar el perfil de flavor. Norma IRAM 20012.

IRAM (2001) Análisis Sensorial - Perfil de textura. Norma IRAM 20013.

IRAM (2004) Análisis Sensorial - Guía general para establecer un perfil sensorial. Esquema 1 Norma IRAM 20019.

ISO/IDF (2001). Determination of nitrogen content. Block-digestion method - Standard 020-2/ISO 8968-2

Pauletti, M.; Calvo, C.; Izquierdo, L.; Costell, E. (1992) Color y Textura de Dulce de Leche. Selección de Métodos Instrumentales para el Control de Calidad. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 32 (3), pp 291-305.

PRODUCTOS FRUTÍCOLAS DIFERENCIADOS EN GRAL. PUEYRREDON (SU APORTE A LA ECONOMÍA LOCAL EN LA ÚLTIMA DÉCADA)

SANCHEZ, R. Magdalena*; GARCÍA, Mónica C.*

Departamento de Geografía, Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3250. 7600 Mar del Plata. Argentina. TE: (0223) 4752426 int 407 FAX (Facultad): (0223) 4752277 E-mail: rmsanche@mdp.edu.ar; mcgarcia@mdp.edu.ar

RESUMEN

El área agrícola intensiva de Gral. Pueyrredon se caracteriza por la producción hortícola; aunque desde hace dos décadas, se desarrolla una progresiva actividad frutícola. Algunas experiencias previas estuvieron orientadas a la producción de kiwis, manzanas, peras o duraznos, que no prosperaron a largo plazo; no obstante, a partir de los años '90, se insistió con producciones no tradicionales (*PNT*), a través de las frutas finas (berries y cherries), kiwis y champiñones. Se pretende analizar varias producciones no tradicionales en la última década en Gral. Pueyrredon y su contribución a la economía local con la búsqueda de nuevos nichos de mercado. Los pasos metodológicos incluyeron, la recopilación de fuentes bibliográficas disponibles sobre el tema, el procesamiento de datos estadísticos de distintas fuentes y el relevamiento de campo mediante encuestas y entrevistas a los actores involucrados en la producción e industrialización frutícola, analizando cuanti-cualitativamente sus resultados, para cumplir con los objetivos planteados.

Palabras claves: producciones no tradicionales – economía local – nichos de mercado – contraestación

ABSTRACT

The intensive agricultural area of Gral. Pueyrredon is characterized by the horticultural production; although for two decades, a progressive activity fruticola is developed. Some previous experiences were guided to the production of kiwis, apples, pears or peaches that didn't prosper long term; nevertheless, starting from the years' 90, it was insisted with non traditional productions (*PNT*), through the fine fruits (berries and cherries), kiwis and mushrooms. It is sought to analyze several non traditional productions in the last decade in Gral. Pueyrredon and their contribution to the local economy with the search of new market niches. The methodological steps included, the summary of available bibliographical sources on the topic, the prosecution of statistical data of different sources

and the field report by means of surveys and interviews to the actors involved in the production and the industrialization frutícola, analyzing their results cuanti-cualitatively, to fulfill the outlined objectives.

Key words: *non traditional productions- local economy- market niches - against station*

INTRODUCCIÓN

La producción hortícola marplatense tiene a sus espaldas una larga trayectoria de más de cinco décadas, sustentada en las favorables aptitudes agroecológicas de su entorno, que la posiciona entre las zonas productoras más importantes del país. A escasos diez kilómetros al oeste del casco urbano de la ciudad de Mar del Plata, se concentra considerable número de establecimientos frutihortícola, cuya producción abastece la ciudad, otras áreas de la provincia de Buenos Aires y del resto del país, ampliando su distribución hacia el exterior según la demanda de esos mercados.

Desde principios de la década del '90, se han incorporado a la estructura social hortícola tradicional, nuevos agentes que han orientado su producción hacia cultivos no

tradicionales o “diferenciados” según Von Bernard y Obschatko (2003: 2), es decir productos no commodities, que no se negocian en grandes mercados internacionales y con un valor unitario generalmente mayor que el de los productos exportables tradicionales. Entre los cultivos no tradicionales (*PNT*) desarrollados en cinturón frutihortícola de Mar del Plata, se ha centrado el análisis en las frutas finas.

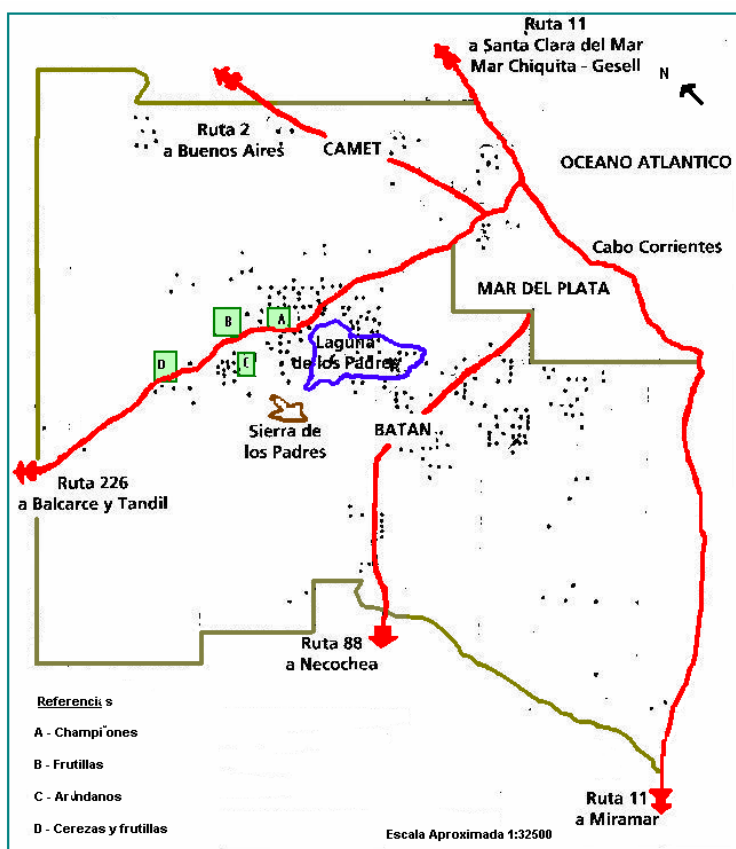


Fig. 1: Localización de área productoras de cultivos no tradicionales en Gral. Pueyrredon. Fuente: Sanchez (2005)

Este nombre identifica a las frutas de reducido tamaño, sabores acidulados, rápida perecibilidad y que generalmente reciben el nombre genérico de *berries* (frambuesas, frutillas, moras, arándanos) y *cherries* (cerezas y guindas), incluyéndose también entre estas producciones no tradicionales a los kiwis.

La orientación y/o conversión de algunos establecimientos hortícolas en productores de cultivos no tradicionales respondió en la mayoría de los casos, a la búsqueda de alternativas productivas rentables en un espacio reducido en hectáreas, en un área accesible por la presencia de rutas nacionales o provinciales (fig. 1) que acercan la producción a los grandes centros urbanos o a las posibilidades de exportación a través de las estaciones aéreas o portuarias, teniendo en cuenta su perecibilidad. Otra importante variable analizada por los productores, se relaciona con la ubicación latitudinal, que se traduce por una parte, en excelentes condiciones agroecológicas, especialmente de suelos y clima, para el desarrollo de este tipo de cultivos y por otra, la ventaja de su producción en contraestación con la de los países del hemisferio norte, grandes demandantes de estos productos, que incrementa las posibilidades de hallar nuevos nichos de comercialización.

Se pretende con esta comunicación:

- ✓ Analizar varias de las producciones no tradicionales en la última década en Gral. Pueyrredon y su contribución a la economía local con la búsqueda de nuevos nichos de mercado.
- ✓ Indagar los motivos que estimulan al incremento productivo de los cultivos seleccionados y las perspectivas generadas a partir de transformación de la materia prima, para la formación de microempresas frutícolas en el área de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los pasos metodológicos, enmarcados desde una perspectiva geográfica, incluyeron la recopilación de fuentes bibliográficas y periodísticas disponibles sobre los productos frutihortícolas no tradicionales, que permitió confirmar que son pocos los trabajos que han centrados sus investigaciones en este tema, al menos en el área de estudio. Paralelamente, se han analizado y procesado datos estadísticos provenientes de diversas fuentes, tales como censos frutihortícolas provinciales, datos aportados por la Secretaría de Estadísticas de la Municipalidad del Partido de General Pueyrredon y registros provenientes de otras instituciones, localizadas por medio de Internet. En una segunda etapa, se complementó la recopilación antes planteada con relevamiento de campo, mediante encuestas y/o entrevistas a los actores involucrados en la producción y la

industrialización frutícola, a los efectos de verificar las modalidades de producción frutícola no tradicional en el área local y determinar las ventajas y/o desventajas percibidas por sus productores, para la comercialización de sus productos.

Para ello, se utilizaron distintas técnicas e instrumentos de medición, entre ellas, las de entrevista y encuestas ya mencionadas, en sus diversas modalidades - estructurada o no estructurada; con categorías abiertas o cerradas, mediante una previa y cuidadosa selección de la muestra, la que se completó con un análisis cuanti-cualitativo de los resultados obtenidos. Estos constituyeron la base para la confección de cuadros estadísticos y gráficos representativos para la mejor presentación de los resultados de esta investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos de frutas finas no tienen una antigüedad mayor de dos décadas en la mayor parte de las regiones del país, a excepción de Cuyo, donde se produce cerezas desde hace mucho tiempo y según Von Bernard y Obschatko (op.cit; 8-19), por ese motivo "*no existen estadísticas oficiales*" sobre ellos, porque ["...se trata de productos muy dinámicos en los últimos dos o tres años"]. Las frutas finas de interés comercial se denominan *berries*: frutillas (strawberry), frambuesas (raspberry), arándanos (blueberry), grosellas o (blackberry) y *cherries*: guinda y cerezas. Estos cultivos en producción en el sudeste de la Provincia de Buenos Aires, tienen muy alto valor comercial y le confieren a este espacio una nueva dinámica territorial, con una importante difusión en los últimos años, que consolidan el cinturón frutihortícola marplatense como de gran potencial para este tipo de producciones. La mayor concentración de productores frutícolas no tradicionales en el Partido de General Pueyrredon, se localizan en cercanías de Sierra de los Padres.

La fig. 2 permite apreciar la evolución de la superficie hortícola sembrada en el municipio de Gral. Pueyrredon y la cultivada con producciones no tradicionales, desde la década del '90 a la actualidad. Se advierte que esa superficie cultivada total estuvo afectada a fluctuaciones que la incrementaron o disminuyeron en un 20-25% en ese lapso; no obstante, a pesar de las oscilaciones señaladas, las producciones no tradicionales locales manifestaron un constante crecimiento en el mismo período.

Esta situación permite abastecer a la creciente demanda, no sólo de la población marplatense en permanente incremento, sino también de otros centros urbanos regionales y la creciente demanda nacional e internacional, según el tipo de producto requerido.

PERIODO	TOTAL AREA (hectáreas)	CULTIVOS NO TRADICIONALES SELECCIONADOS				
		CEREZAS	FRUTILLAS	FRAMBUESAS	ARANDANOS	KIWIS
1992/93	7140,0	s/d	17,1	24,7	s/d	s/d
1993/94	9141,9	s/d	26,2	27,0	1,0	s/d
1996/97	9500,9	s/d	33,8	35,2	10,0	s/d
2003	7140,7	20,0	83,2	s/d	15,0	18,0

Fig. 2 Superficie cultivada (según cultivos seleccionados, en hectáreas, período 1992-2003)
Fuente: Sanchez (op. cit.)

La consolidación de la producción de *frutillas* le ha permitido a Mar del Plata encaramarse en el tercer lugar entre las áreas productoras del país, después de Coronda y la provincia de Tucumán. Si bien presenta condiciones climáticas más templadas que las áreas mencionadas, el clima de Mar del Plata asegura a los berries la cantidad de horas de frío necesarias para que dichas frutas adquieran un bouquet apropiado, que se complementan con la introducción de diversas técnicas productivas, que permiten más de una cosecha anual. Según datos del censo frutihortícola de la campaña 1993/94, el porcentaje de pérdidas de producción no llega al 5,8 %. Puede verificarse también en la fig. 2, que este cultivo sólo representaba el 0,2% del total de la superficie cultivada del cinturón frutihortícola marplatense a principios de los '90; llegando al 1,1 % de la superficie total cultivada en la campaña 2001, con tendencia a incrementarse. Este obedece a varios factores, entre los que destacan: la incorporación de tierras al cultivo de frutillas, al continuo perfeccionamiento de las técnicas empleadas en los cultivos y a una mejor gestión por parte de los productores de frutillas, demostrado en los rendimientos promedios, que pasaron de 23,8 ton/ha al aire libre en la campaña censal 1998/99, a 34,1 ton/ha según datos aportados por el censo hortícola realizado en el año 2001, es decir un 50% más, aún cuando el porcentaje de pérdidas se incrementa en estos últimos. La falta de estadísticas actualizadas sobre la comercialización de frutillas, pero a través de entrevistas se ha podido corroborar, que hubo un importante incremento en la producción en fresco, que abastece el mercado interno, existiendo un excedente que se exporta congelada. Según el censo hortícola 1993/94, se comercializaba un 66,8% a través de consignatarios locales, un 1,3% se vendía directamente a distintos comercios; un 29,8% pasaba por otras formas de comercialización y sólo un 2,1%, correspondía a otros tipos de venta.

El cultivo de *frambuesas* se apoya también en adecuadas condiciones agroecológicas,

que al Partido de General Pueyrredon, en una de las dos zonas productivas de la provincia de Buenos Aires, juntamente con Balcarce, Azul y Tandil. No obstante, presenta un 15% de pérdidas en la producción según datos del censo frutihortícola de la campaña 1993/94, principalmente debidas a enfermedades parasitarias y no parasitarias que atacan a los cultivos, disminuyendo sus rendimientos y a los frutos post cosecha, que baja su nivel comercial. Según el censo frutihortícola 1993/94 se comercializó un volumen total de 63,5tn de frambuesas, distribuidos un 9,6% a través de consignatarios locales y un 46% orientado hacia la industrialización de dulces y helados preferentemente, constituyendo el cultivo de mayor valor agregado en el área. Se consigna también en el mismo censo que, un 3,2 % se exporta y un 3,2 % se envía a otros mercados no especificados.

Las *cerezas* es un cherry que no puede ser almacenada a mediano plazo (un año) bajo ningún tipo de tecnología, lo que favorece el consumo en fresco del producto, brindando la posibilidad de ser comercializada principalmente en contraestación en otras latitudes. No obstante, existe también la posibilidad de abastecer el mercado interno orientado a dulces, repostería y helados. Si bien existen en el país unas 2.280 has en producción, en el área de estudio la experiencia es reciente, sólo se cultivan unas 20 has en Gral. Pueyrredon, según datos aportados por la Cooperativa de Horticultores, principalmente en las cercanías del límite con el partido de Balcarce.

El *arándano*, conforma uno de los cultivos de más reciente introducción en el área marplatense (las primeras plantaciones se realizaron en 1996 y las restantes en los dos últimos años), a partir de vástagos proveniente del hemisferio norte. A nivel local se cultivan aproximadamente 30 hectáreas con un rendimiento total que ronda los 12.000 kg, aunque todavía no se puede estandarizar la pérdida. Todo lo que se produce, se exporta (menos el descarte y lo que no clasifica como calidad A1, es decir que al menos el 95% de la producción local, se despacha en fresco y en packaging por avión a mercados europeos desde Ezeiza (Buenos Aires) y el 5% restante en supermercados capitalinos. Se exporta a Estados Unidos, Japón y Canadá, entre otros y para conseguir volumen exportable, los actuales productores se han asociado para mejorar cantidad y calidad para satisfacer o ampliar los actuales y/o futuros mercados. El valor nutricional del arándano es bajo, pero su condición de libre de grasas, sodio y colesterol y rico en fibras y vitamina C, fundamenta su importancia para la dieta actual. Además, la consistencia del fruto y su cutícula cerosa, le confieren una mayor durabilidad post cosecha que otros berries. Está incorporado a la dieta habitual de canadienses, estadounidenses y algunos europeos, quienes la consumen como fruta fresca, deshidratada o congelada, en comidas dulces o

saladas y en aplicaciones industriales tan diversas como productos farmacéuticos, colorantes, pastelería, jugos concentrados, purés, mermeladas, salsas, helados, yogures, golosinas y conservas, entre otros. El principal atractivo de esta alternativa productiva para el área, es su rentabilidad por su oferta en contraestación hacia el hemisferio norte. Desde 1994, está habilitado el ingreso de arándano fresco argentino a los mercados estadounidenses.

Por último, aunque la implantación del *kiwi* en el área tiene ya más de una década de antigüedad, ha pasado por varios altibajos y sólo recientemente ha consolidado su producción, en respuesta a las acciones asociativas de sus productores, motivo por el cual se lo ha declarado cultivo de interés municipal. Este cultivo es oriundo de China, refinado en Nueva Zelanda y por la similitud agroecológica del área marplatense con éstas, el cultivo se prospera en estas latitudes. En el sudeste bonaerense existen unas 50 hectáreas dedicadas a esta producción, de las cuales 18-20 se localizan en Parque Hermoso, hacia el sudoeste de la ciudad de Mar del Plata. Su desarrollo requiere de un importante capital inicial para realizar la plantación del fruto, entre el quinto y el séptimo alcanza su plenitud y como la vida útil es de cuarenta años, permite amortizar la inversión realizada inicialmente, obteniendo una rentabilidad del cien por ciento. Las tareas subsiguientes, -producción, cosecha y almacenamiento- no son significativamente onerosos y el almacenaje se puede extender hasta ocho meses en cámara, facilitando la negociación de venta. En el área de Mar del Plata existe una vasta experiencia de producción y cosecha, asociado con el rinde anual de 20-35 mil kilos por hectárea, con un valor de venta de alrededor de 0,70 centavos de dólar por kilo, obteniendo aproximadamente unos 14 mil dólares por hectárea. El alto costo de los kiwis en Nueva Zelanda, Italia y Chile le permite a la Argentina captar esos mercados externos, posicionando a la producción local, en una atractiva producción alternativa a las tradicionales que se realizan en la zona. Ejemplo de ello lo constituye la primera exportación de kiwis, en mayo de 2004, con destino a Holanda y otros países europeos, entre ellos, Italia, quienes adquieren estas frutas por su excelente calidad y sabor, que compensa su tamaño menor.

Si bien subsisten ciertas restricciones a las ventas de producciones del sector primario al exterior, las exportaciones de productos finos desde Argentina hacia diferentes países y continentes, se encuentran en creciente expansión. Los productores locales dedicados a las producciones no tradicionales y específicamente a las frutas finas, son optimistas con las estadísticas y con los emprendimientos realizados, ya que en general fueron inversiones previas a la devaluación del peso, beneficiándose con la actual paridad

U\$S1=\$3.- Esta diferencia cambiaria favorece al productor, abocado a producciones en las cuales su inversión inicial se cotiza en dólares (como el arándano y los kiwis), pero las exportaciones también se realizan en dólares, por lo que su tasa de retorno es altamente positiva.

No obstante, si la materia prima se procesara y se ubicara en otros nichos de mercados externos como dulces, salsas, licores, etcétera, resultaría mucho más atractivo para los productores locales, porque se incrementaría el valor agregado y la demanda de insumos necesarios en ese procesamiento, además de un mayor requerimiento de mano de obra local. De este modo, la mayor articulación de un proceso productivo establecería un factor de impulso al desarrollo de la economía local.

CONCLUSIONES

Los cultivos frutícolas no tradicionales analizados precedentemente capitalizan las ventajas espaciales, locacionales y/o competitivas del municipio y constituyen una cada vez más firme fuente de ingresos para los productores locales, por las posibilidades comerciales de los productos frutícolas no convencionales en mercados selectos locales, nacionales e internacionales. La producción local se viabiliza por varios canales de venta; uno en fresco y de alcance regional, que abastece en general la costa atlántica, una segunda opción, vinculada con la venta de frutas congeladas (frutillas, entre otras) a la industria de dulces y helados entre otras, a la que se agrega la alternativa de comercialización hacia mercados internacionales en el hemisferio norte en contraestación (en el caso de arándanos, frutillas y kiwis).

De manera incipiente pero sostenida, han comenzado a gestarse y posicionarse microempresas procesadoras de frutas por iniciativa de productores familiares y otros de carácter empresarial, en el espacio marplatense. Aún debe trabajarse de forma mancomunada a través de asociaciones con el objetivo de obtener *cantidad, calidad y precios* accesibles de los artículos procesados, factores imprescindibles a la hora de ganar y mantener mercados en el tiempo, obligando a los empresarios a gestionar de manera minuciosa su producción, para un mejor desarrollo y control de su empresa.

Merecen destacarse las acciones de apoyo y asesoramiento del municipio para surgimiento y consolidación de microempresas dedicadas a la producción frutícola no tradicional, a los efectos de lograr una *marca local o de origen*. Aunque el acceso a créditos flexibles es limitado todavía en el sistema financiero argentino, puede destacarse el asesoramiento y conformación de grupos de trabajo desde distintas dependencias municipales, que se amplifica en el caso de la oficina de Export-Ar, estableciendo los

nexos necesarios con diferentes áreas del mundo, a los efectos de captar nuevos mercados en función de las demandas de productos diferenciados. -

BIBLIOGRAFÍA

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 1993/94: *Censo hortícola campaña*, Buenos Aires

La Capital. 2003. El resurgimiento del kiwi: la zona cuenta con excelentes condiciones para la producción. En: Diario La Capital. Sección Campo Nuevo. Pág 3, 13 de marzo, Mar del Plata

La Capital. 2004. "Proponen Hacer en Mar del Plata la Fiesta Nacional del Kiwi". En: *Diario La Capital* Sección Campo Nuevo. Pág. 3, 17 de julio, Mar del Plata.

Municipalidad de Gral. Pueyrredon. 1962-2001. Departamento de Estadísticas y Cooperativa Horticultores de Gral. Pueyrredon: *Estadísticas generales y de censos y encuestas hortícolas años*. Mar del Plata.

Sanchez, R. Magdalena (2005): *Recientes desafíos frutihortícolas en Gral. Pueyrredon (hacia prácticas productivas no tradicionales en la última década)*. Tesis de Licenciatura, dpto. de Geografía, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata.

SENASA (2004) Disponible en: www.sensasa.gov.ar

Von Bernard, Tamara y Obschatko, Edith S. (2003) "*Frutas Finas*". (Documento A-8), Estudio 1, EG 33, Componente A, Préstamo BID 925/OC-AR. Pre II: Coordinación del Estudio Oficina de la CEPAL-ONU en Bs. As., a solicitud de la Secretaría de Política Económica, Ministerio de Economía de la Nación. Argentina.

AGRADECIMIENTOS

- A los diferentes productores de cultivos no tradicionales, que colaboraron en las entrevistas.
- Al Secretario de la Producción, Municipalidad de Gral. Pueyrredon, por su disposición y asesoramiento

Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005

TRABAJOS DEL X CONGRESO CYTAL

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías

“Apertura a nuevos procesos, productos e ideas: camino al futuro”

Realizado en Mar del Plata, Argentina del 18 al 20 de mayo de 2005



ASOCIACION ARGENTINA de TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

Filial Mar del Plata
aatamdq@gmail.com

AATA Central
Alsina 943. 4to Piso, oficina 406 (1088) Buenos Aires
TE/FAX: 54 11 4334 0155

Asociación afiliada a



ITF- Institute of Food Technologists



IUFoST- Institutional Union of Food Science and Technologists



ALACCTA- Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



IAEF- International Association for Engineering and Food

ISBN: 987-22165- 1- 7.

Editado: Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina.
1er Edición. Volumen 1. Marzo de 2006.

TOMO II

Tomo 2:

Calidad sensorial

Composición y química de los alimentos. Propiedades
fisicoquímicas.

INDICE

CALIDAD SENSORIAL

-INTERACCIÓN AROMA - ALBÚMINA DE HUEVO. IMPACTO DE LA PROTEÍNA EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL AROMA.....	409
-CARACTERÍSTICAS SENSORIALES Y QUÍMICAS DEL VINO CHARDONNAY ARGENTINO VINCULADAS A LA VENDIMIA Y REGIÓN GEOGRÁFICA.....	415
-ESTABILIDAD DE AROMAS ENCAPSULADOS : RELACION ENTRE CAMBIOS FÍSICOS/ESTRUCTURALES Y LA RETENCIÓN DEL AROMA EVALUADA SENSORIALMENTE.....	424
-INCIDENCIA DE LA ALIMENTACIÓN DEL GANADO VACUNO SOBRE EL PERFIL SENSORIAL DE QUESO REGGIANITO ARGENTINO.....	432
-EFECTO DEL ASPARTAMO SOBRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE SISTEMAS MODELO ACUOSOS.....	439
-APLICACIÓN DE UN PROGRAMA DE COMPUTACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CURVAS INTENSIDAD-TIEMPO (I-T) MÚLTIPLES.....	447
-CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE TAMALES Y DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE SENSORIAL PARA ESTABLECER LA VIDA ÚTIL.....	454
-ANÁLISIS SENSORIAL Y ACEPTABILIDAD DE UN PATE DE OVEJA.....	462
-EL AMARANTO EN SU MESA.....	469

COMPOSICIÓN Y QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.

-INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN Y LA PROTEÓLISIS EN LA CAPACIDAD DE FUSIÓN DEL QUESO CREMOSO ARGENTINO.....	476
-INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACIÓN EN LA PROTEÓLISIS DE QUESO MOZZARELLA.	484
-INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE ELABORACIÓN Y MADURACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE PLASMINA EN QUESOS ARGENTINOS.....	492
-PROPIEDADES REOLÓGICAS DE MASA DE EMPANADAS LIBRES DE GLUTEN.....	500
-ESTUDIO DE LA PROTEÓLISIS DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS FYNBO MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MULTIVARIADO.....	508
-CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE HARINA DE ARROZ DE VARIETADES CULTIVADAS EN URUGUAY.....	516
-TRANSICIÓN VÍTREA Y FENÓMENO DE COLAPSO EN SISTEMA CARBOHIDRATOS-AGUA DETECTADOS CON TÉCNICAS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PULSADA.....	522
-COMPARACIÓN DE PARÁMETROS REOLÓGICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE RETROEXTRUSIÓN Y VISCOSIMETRÍA ROTACIONAL.....	530
-CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE PULPAS DE Prunas pérsica MENDOZA Y DESARROLLO DEL MODELO DE PREDICTIVO.....	538
-COMPOSICIÓN ACÍDICA Y CONTENIDO DE CERAS EN ACEITES DE OLIVA VARIETALES ARGENTINOS.....	545

-CARACTERÍSTICAS SORCIONALES DEL POLEN RECOLECTADO POR ABEJAS	553
-ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DEL COLOR, EXTRACTO ACUSO Y HUMEDAD DURANTE EL PROCESAMIENTO PRIMARIO DE LA YERBA MATE.....	560
-CARACTERIZACIÓN DE POROTO PHASEOLUS VULGARIS DE DESCARTE.....	566
-CONTRIBUCION AL ATLAS MUNDIAL DE SELENIO: RESULTADOS PRELIMINARES DE SELENIO EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA EN ARGENTINA.....	573
-EMULSIONES O/W PREPARADAS CON AISLADO DE SOJA Y CASEINATO DE SODIO. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA SOBRE LA ESTABILIDAD FRENTE AL ALMACENAMIENTO CONGELADO.....	581
-ESTABILIDAD FRENTE A LA CONGELACIÓN DE EMULSIONES O/W PREPARADAS CON AISLADOS DE SOJA. EFECTO DE LA ADICION DE CRIOPROTECTORES.....	589
-ESTABILIDAD DE EMULSIONES AGUA EN ACEITE (W/O) Y DOBLES (W/O/W) PREPARADAS CON SPANS.....	596
-REACCION DE MAILLARD: EFECTO COMBINADO DE AZÚCARES DE DISTINTA REACTIVIDAD....	604
-INFLUENCIA DE LOS AZUCARES PRESENTES EN LECHE DE BAJO CONTENIDO EN LACTOSA EN LA VELOCIDAD DE REACCION DE MAILLARD.....	611
-ESTUDIO DE LA REHIDRATACIÓN DE ALLIÁCEAS DESHIDRATADAS.....	619
-INFLUENCIA DEL SOLVENTE SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE ROMERO (Rosmarinus officinalis L.).....	626
-PARÁMETROS SORCIONALES PARA MANÍ EN VAINA.....	632
-CINÉTICA DE SECADO DE MANÍ. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA DEL AIRE, Y DE LA HUMEDAD INICIAL DEL GRANO EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIFUSIVIDAD EFECTIVA.	639
-ENERGÍA DE REPULSIÓN ELECTROSTÁTICA ENTRE PARTÍCULAS DE JUGO CLOUDY A DISTINTAS CONCENTRACIONES.....	647
-PROPIEDADES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS DE ARROZ (Var. NUTRIAR F.C.A. Y F.).....	653
-INFLUENCIA DE PROTEÍNA DE SOJA HIDROLIZADA Y SIN HIDROLIZAR EN GELES DE κ -CARRAGENANO.....	662
-EFECTO DE LA PRESENCIA DE AZUCARES SOBRE LA ESTABILIDAD DE CLARA DE HUEVO DESHIDRATADA Y SUS PROPIEDADES DE ESPUMADO.....	669
-CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO EN LA INTERFASE AIRE – AGUA: ADSORCIÓN Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS PELÍCULAS.....	677
-EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SENSORIALES EN PANES ENRIQUECIDOS NUTRICIONALMENTE.....	686
-RELACION ENTRE EL DESARROLLO DE ESCALDADURAS Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS EN PIEL DE BERENJENAS.....	695
-TRANSICIONES TERMICAS Y MOVILIDAD MOLECULAR EN SISTEMAS CONGELADOS DE SACAROSA Y FRUCTOSA CON AGREGADO DE HIDROCOLOIDES ESTABILIZANTES.....	704
-ESTUDIO COMPARATIVO DE CALIDAD INICIAL DE VEGETALES OBTENIDOS POR TÉCNICAS DE CULTIVO ORGÁNICAS Y CONVENCIONALES.....	712

-EFECTO DEL USO DE PELÍCULAS COMESTIBLES Y PLÁSTICAS SOBRE LA CALIDAD COMERCIAL Y NUTRICIONAL DE REPOLLITOS DE BRUSELAS (<i>Brassica oleracea</i> L., var gemmifera DC) REFRIGERADOS.....	721
-INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ESCALDADO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD DE REPOLLITOS DE BRUSELAS (<i>Brassica oleracea</i> L., var. gemmifera DC).....	728
-EFECTO DE POLIAMINAS SOBRE LA EVOLUCIÓN DE PIMIENTOS.....	735
-EFECTO DEL TRATAMIENTO ÁCIDO SOBRE ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD ESPUMANTE DE PROTEÍNAS DE SOJA Y AMARANTO.....	742
-INFLUENCIA DEL TIPO DE ENDOSPERMO DE MAIZ SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE PRODUCTOS EXPANDIDOS A BASE DE MAÍZ-SOJA.....	751
-PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE POLIÉSTERES DE SACAROSA.....	759
-EFECTO DEL TIPO DE POLISACÁRIDO EN LA INTERACCIÓN CON LAS PROTEÍNAS DEL PESCADO BARRILETE DETERMINADO POR MICROCALORIMETRÍA.....	767
-ESTUDIO POR DIAFILTRACIÓN DE LAS PROPIEDADES COLOIDALES DE UN JUGO TURBIO (CLOUDY) DE MANZANA.....	777
-CALIDAD DE CARNE DE POLLO EN FUNCIÓN DE LA DIETA Y EL PROCESAMIENTO.....	784
-PROPIEDADES REOLÓGICAS DE DISPERSIONES DE HARINAS OBTENIDAS POR EXTRUSIÓN DE MEZCLAS MAÍZ-SOJA.....	791

INTERACCIÓN AROMA - ALBÚMINA DE HUEVO. IMPACTO DE LA PROTEÍNA EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL AROMA

¹GORDILLO, Julieta, ¹BRUNO , Diego, ¹BLUGUERMAN, Fernando, ¹GOLDNER, María C., ^{1,2}ZAMORA, María C., ¹CHIRIFE, Jorge.

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, Cap. Gral. Ramón Freire 183, C1426AVC, Buenos Aires Argentina. Tel/fax: (011) 4552-2711/21.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas czamora@uca.edu.ar

RESUMEN

Se estudió sensorialmente la reducción de la concentración de volátiles orgánicos (aldehídos o cetonas) en fase gaseosa por la presencia de proteínas en la fase acuosa. Se utilizaron soluciones de citral (0.5ul/100ml), cinamaldehído (0.3ul/100ml) y diacetilo (3ul/100ml), en presencia o ausencia de 2.5% de albúmina de huevo. Trece evaluadores entrenados cuantificaron la intensidad del aroma en el espacio de cabeza, previamente equilibrado con la fase acuosa, sobre una escala no estructurada de 100 mm.

En todos los casos el panel detectó que la albúmina de huevo producía una disminución significativa en la intensidad de la percepción olfatoria del volátil orgánico (citral, cinamaldehído o diacetilo), atribuyendo este resultado a una interacción del volátil en la fase acuosa con sitios activos de la proteína. La interacción volátil - albúmina de huevo en fase acuosa se tradujo en una reducción de la intensidad aromática entre un 50 y un 70%.

Palabras Claves: Interacción aroma-proteína - percepción sensorial – albúmina huevo – aldehído

ABSTRACT

The reduction of the organic volatiles (aldehydes or ketones) concentration in the gaseous phase due to the presence of proteins in the aqueous phase, was subjected to sensory evaluation. Citral (0.5ul/100ml), cinnamaldehyde (0.3ul/100ml) and diacetylene (3ul/100ml) solutions were evaluated in the presence or absence of 2.5% egg albumin. Thirteen trained evaluators quantified on a non structured 100 mm scale, the aroma intensity in the headspace, which had been previously equilibrated with the aqueous phase.

In all the cases the panel detected that the egg albumin produced a significant reduction in the intensity of the olfactory perception of the organic volatile (citral, cinnamaldehyde, diacetylene), assigning this result to binding of the volatile to active sites of the protein, in the

aqueous phase. The interaction volatile - egg albumin in aqueous phase translated in a reduction of the aromatic intensity between 50 and 70%.

INTRODUCCIÓN

Un importante número de compuestos volátiles pueden ser identificados en un alimento, pero no todos contribuyen de igual manera al flavor percibido por el consumidor. Por ejemplo, se ha demostrado a través de métodos analíticos físico/químicos que muchas moléculas (particularmente proteínas) pueden ligar volátiles orgánicos en fase acuosa reduciendo su concentración de equilibrio en la fase gaseosa, modificando por lo tanto, el perfil aromático (Lubbers y col.,1998). Van Osnabrugge (1989) indicó que la interacción de aldehídos con proteínas modificaba el perfil del flavor atribuyéndolo a la variación de ciertas notas asociadas con aldehídos.

El objetivo de este estudio fue verificar si la interacción aroma – albúmina de huevo en fase acuosa modificaba la percepción sensorial de esos volátiles en la fase gaseosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres aromas (Fig. 1): citral (cis + trans; Fluka), cinnamaldehído (98%; Fluka) y 2,3 - Butanodiona (diacetilo, 99%; Fluka); y albúmina de huevo (Grado Alimenticio) como proteína.

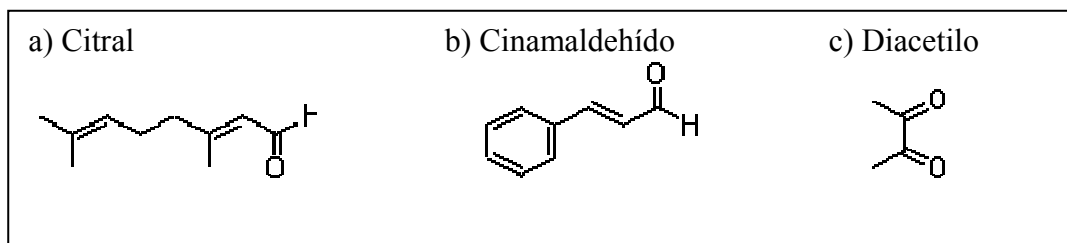


Fig. 1 – Estructura molecular de los compuestos aromáticos utilizados

El panel estuvo integrado por 13 evaluadores (tres hombres y 10 mujeres de 22 ± 2 años de edad) alumnos de la cátedra de Análisis de la Calidad Sensorial de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UCA.

Los evaluadores recibieron un entrenamiento en cuantificación de aromas durante dos sesiones de una hora, realizando la curva de calibración del citral midiendo por duplicado, sobre una escala gráfica no estructurada de 100 mm, la intensidad aromática de tres concentraciones de citral (0.2, 0.5, 1.0 ul/100ml) respecto de una referencia (1.6 ul/100ml) a la que se le asignaba el máximo valor en la escala (100). Las muestras (20 ml) se

colocaron en frascos plásticos con una capacidad de 66 ml y se las dejó tapadas a temperatura ambiente (22 a 25° C) para que se equilibraran la fase acuosa y la fase gaseosa, aproximadamente unas cuatro horas antes de la evaluación sensorial.

En la tercer sesión, además de las concentraciones correspondientes a la curva de calibración, se agregaron dos muestras (por triplicado): citral + proteína (0.5 ul/100 ml + 2.5%) y proteína sola (2.5% en solución acuosa) con la consigna de que evaluaran sólo la intensidad de aroma a citral, en caso de que la proteína agregara algún olor.

En la cuarta sesión midieron la intensidad de aroma a canela, empleando dos concentraciones de cinamaldehído (0.3 y 0.03ul/100ml), cinamaldehído + proteína (0.3ul/100ml + 2.5%) y proteína sola (2.5% en solución acuosa), respecto de una referencia (0.3ul/100 ml) a la que se le asignaba el valor máximo de la escala (100). La referencia tenía la misma concentración que una de las muestras incógnitas para corroborar las mediciones del panel, realizando las estimaciones por triplicado.

En la última sesión midieron la intensidad de aroma a manteca, empleando dos concentraciones de diacetilo (0.75 y 3.0ul/100ml), diacetilo + proteína (3.0ul/100ml + 2.5%) y proteína (2.5%) respecto de una referencia (3.0ul/100 ml), siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Análisis de datos

Para determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un factor y el test de Tukey. El estudio de los evaluadores se llevó a cabo a través de un ANOVA, aplicando un modelo mixto, donde la concentración y las replicaciones se tomaron como valores fijos, y los evaluadores como aleatorios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 2 se presenta la curva de calibración de citral, que fue el método desarrollado para entrenar a los evaluadores en la discriminación de aromas. Como se puede observar existe una relación lineal entre la concentración y la percepción olfatoria del aroma a citral, siendo el coeficiente de correlación $R^2 = 0.926$. El análisis de varianza de las cinco muestras evaluadas (citral 0.2, 0.5 y 1.0 ul/100ml; citral 0.5ul/100ml + 2.5% proteína; 2.5% proteína) determinó que todas las muestras se percibían diferentes ($F_{4,64} = 215.52$; $p < 0.001$).

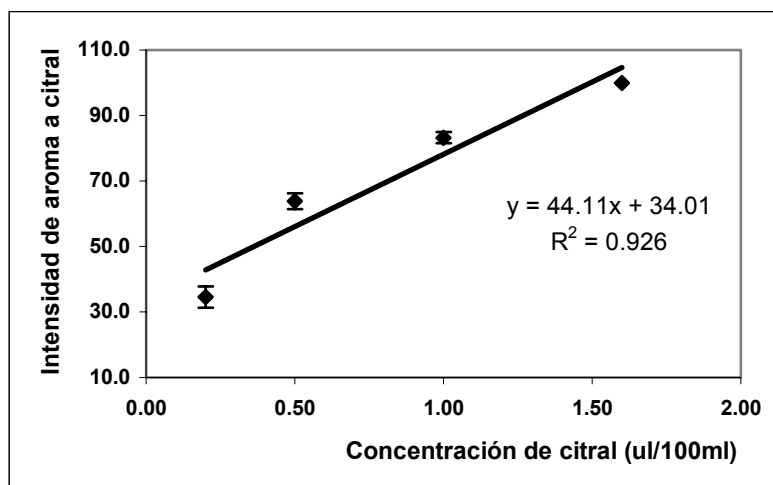


Fig. 2 - Curva de calibración de citral (entrenamiento)

La Fig.3 muestra la intensidad aromática en fase gaseosa (percibida por los evaluadores) para el citral (0.5ul/100ml), citral +proteína (0.5ul/100ml + 2.5%) y proteína sola (2.5%). La presencia de proteína en la fase acuosa redujo la intensidad aromática en la fase gaseosa en un 63%. Si bien la consigna del panel era sólo medir aroma a citral, la albúmina de huevo posee olor y por lo tanto fue imposible asignarle un valor cero en el aroma base.

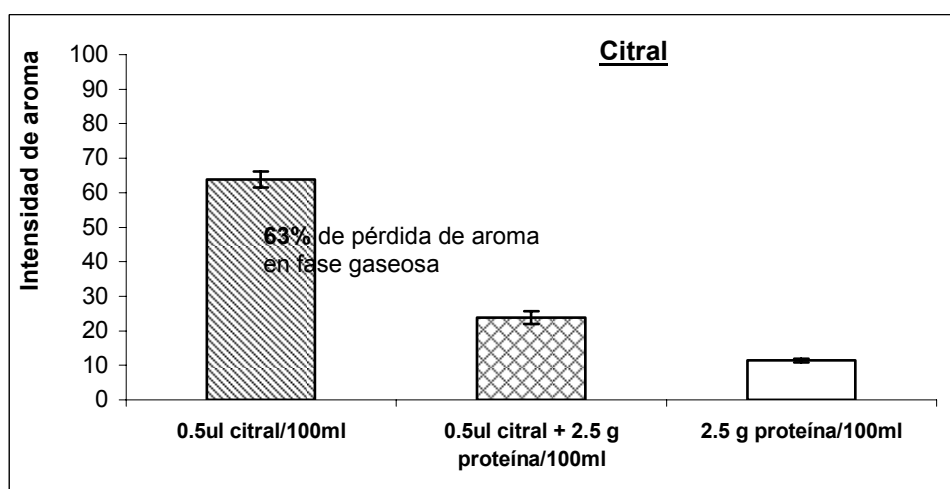


Fig. 3. Intensidad de aroma a citral en fase gaseosa.

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis de varianza de los datos de las cuatro muestras de cinamadehído, observándose una interacción altamente significativa ($p < 0.001$) para concentración*evaluador. Esto demuestra que aún cuando los evaluadores estén entrenados en la percepción aromática, el cambio de sustancia lleva aparejado un nuevo aprendizaje.

Tabla 1. Análisis de varianza de los resultados de Cinamaldehído

	CINAMALDEHÍDO		
	<i>gl</i>	<i>Valor de F</i>	<i>Valor de p</i>
Replicación	2	1.755	0.194
Concentración	3	39.699	0.000***
Evaluador	12	0.979	0.492
Replicación*Concentración	6	0.142	0.990
Replicación*Evaluador	24	0.181	1.000
Concentración*Evaluador	36	6.307	0.000***

En la Fig. 4 se presentan las estimaciones de cinamaldehído (0.3ul/100ml), cinamaldehído + proteína (0.3ul/100ml + 2.5%) y proteína sola (2.5%), alcanzándose en este caso una reducción del 71% en la intensidad aromática en la fase gaseosa.

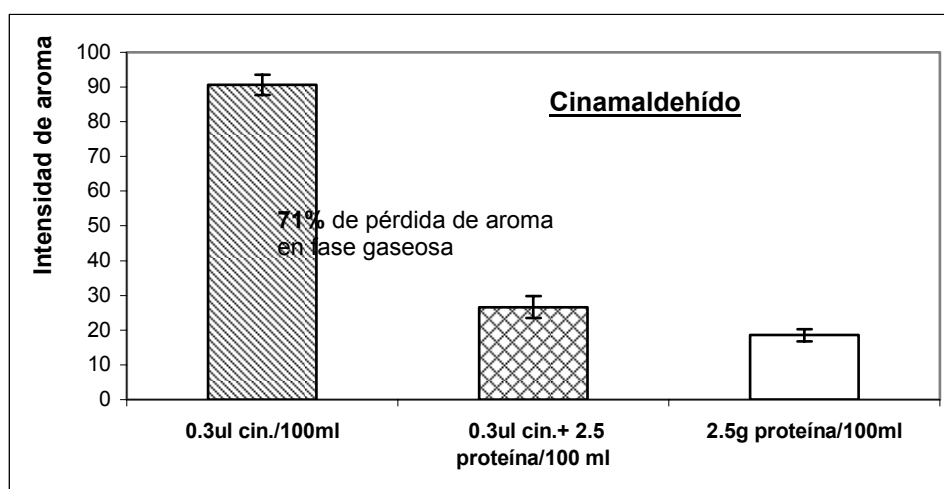


Fig. 4. Intensidad de aroma a cinamaldehído en fase gaseosa.

En la Tabla 2 se muestra el análisis de varianza correspondiente al estudio del diacetilo, advirtiéndose en este caso una interacción significativa ($p < 0.001$) replicación*evaluador. La reducción de diacetilo en fase gaseosa resultó en un 58% (Fig. 5).

CONCLUSIONES

En todos los casos el panel detectó que la albúmina de huevo producía una disminución significativa en la percepción de la intensidad olfatoria del volátil orgánico (citral, cinamaldehído o diacetilo), atribuyendo este resultado a una interacción del volátil en la fase acuosa con sitios activos de la proteína. Esta interacción se tradujo en una reducción

de la intensidad aromática entre un 58 y un 71%, correspondiendo la máxima reducción al cinamaldehído.

Tabla 2. Análisis de varianza de los resultados de diacetilo

	DIACETILO		
	<i>gl</i>	<i>Valor de F</i>	<i>Valor de p</i>
Replicación	2	0.728	0.493
Concentración	3	28.265	0.000***
Evaluador	12	1.126	0.381
Replicación*Concentración	6	0.996	0.435
Replicación*Evaluador	24	2.909	0.000***
Concentración*Evaluador	36	1.436	0.097

BIBLIOGRAFÍA

Lubbers, S., Landy, P. & Voilley, A. (1998). Retention and rease of aroma compounds in foods containing proteins. *Food Technology* 52 (5), 68-74, 208-214.

Van Osnabrugge, W. (1989). How to flavor baked goods and snaks effectively. *Food Technology* 43 (1), 74-82.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los alumnos de la Cátedra de Análisis de la Calidad Sensorial de la Facultad de Ciencias Agrarias (UCA) por su participación como evaluadores en el desarrollo del presente trabajo.

Este estudio fue financiado por el proyecto PICT 2000 N° 8820 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Foncyt) de la Secretaría de Ciencia y Técnica.

CARACTERÍSTICAS SENSORIALES Y QUÍMICAS DEL VINO CHARDONNAY ARGENTINO VINCULADAS A LA VENDIMIA Y REGIÓN GEOGRÁFICA.

^{1,2}GOLDNER María C.; ^{1,2}GALMARINI Mara V.; ^{1,3}ZAMORA María C. y ⁴PANDOLFI Cristina

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA). ²Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) ⁴Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), Mendoza, Argentina
Cap. Gral. R. Freire 183 C1426AVC, Bs. As., - Argentina – tel/fax: (011) 4552-2711/21
mglmarini@gmail.com

RESUMEN

Se estudiaron las características sensoriales y químicas del vino Chardonnay de tres regiones de la provincia de Mendoza (Maipú, Valle de Uco y Luján de Cuyo), analizando tres vendimias (tres vinos/ año, en total 27 muestras). Un panel de nueve evaluadores, entrenado en análisis sensorial de vino Chardonnay, realizó pruebas discriminativas y perfiles descriptivos cuantitativos. Mediante análisis químicos se determinó: alcohol, pH, acidez, azúcares reductores y extracto seco. El análisis de varianza de los datos químicos no mostró diferencias significativas entre las regiones ni entre las vendimias en ninguna de las variables. Los tests discriminativos revelaron diferencias significativas entre las muestras de una misma región y vendimia. Los vinos fueron caracterizados por 16 atributos, de los cuales siete presentaron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las vendimias, no mostrando diferencias entre regiones. Analizando las vendimias en cada una de las regiones, Valle de Uco mostró la menor variabilidad.

Palabras claves: Vino Chardonnay, análisis sensorial, región geográfica, vendimia

ABSTRACT

Chemical and sensory characteristics of Chardonnay wine from three different regions of Mendoza province (Maipú, Valle de Uco, Luján de Cuyo) were studied analyzing three vintages (three wines/year, a total of 27 samples). Discriminative tests and descriptive quantitative profiles were done by a panel of nine judges trained in Chardonnay sensory analysis. Chemical analysis was used to determine: alcohol, pH, acidity, reducing sugars and dry extract. The variance analysis of the chemical data did not show any significant differences among the regions nor among the vintages in any of the given variables. Discriminative tests revealed significant differences between samples of a same region and vintage. Wines were characterized by 16 attributes, from which seven showed

significant differences ($p < 0.01$) between vintages, but did not reveal differences between the regions. Analyzing vintages in each region the smallest variability was found in Valle de Uco.

INTRODUCCIÓN

La localización del viñedo se ha convertido en sinónimo de calidad, sin embargo el uso de la ubicación geográfica como medio para clasificar vinos ha generado un gran debate e investigaciones. Muchos estudios sostienen el concepto que el sitio del viñedo es un factor determinante en la composición del vino y en el desarrollo del aroma y del flavor. La diferenciación regional sobre la base de la composición química fue demostrada por Tapias y col. (1986), Silversten y col. (1999) y Di Stefano y Corino (1986) entre varias regiones de España, Francia e Italia, respectivamente. Desde el punto de vista del aroma y del flavor, Guinard y Cliff (1987) observaron diferencias entre vinos Pinot noir en regiones de California, y más recientemente Douglas y col. (2001) entre vinos Riesling de la península del Niágara. En un trabajo previo (Zamora y col., 2003) comparamos las características regionales entre vinos Chardonnay de San Juan, Mendoza (Luján de Cuyo, Maipú, Valle de Uco, San Rafael) y Salta observando que las áreas que más se diferenciaban eran San Juan y San Rafael a través de los atributos acidez, dulzor, color y frutal; en contraste con las regiones más cercanas (Luján de Cuyo, Maipú y Valle de Uco) que presentaron gran similitud.

El objetivo del presente trabajo fue relacionar las características sensoriales y químicas del vino Chardonnay con las regiones de Luján de Cuyo, Maipú y Valle de Uco en el curso de tres vendimias (2001, 2002 y 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de vino

Se estudiaron veintisiete muestras comerciales de vino blanco variedad Chardonnay (vendimia 2001, 2002 y 2003) de tres regiones vitivinícolas argentinas de la provincia de Mendoza (Luján de Cuyo, Maipú, Valle de Uco).

La descripción de las muestras: origen, tipo de fermentación y datos de los análisis químicos fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) de Mendoza (Tabla 1). Los métodos usados para analizar la composición química del vino están descritos en Amerine y Ough (1980).

Procedimiento

El trabajo experimental se llevó a cabo a lo largo de dos años, evaluando durante el primer año las vendimias 2001 y 2002 en forma conjunta, por lo tanto, los vinos 2001 tenían un año más de añejamiento en botella; la vendimia 2003 se analizó en el transcurso del 2004. En cada año los análisis se llevaron a cabo en dos etapas: pruebas discriminativas (test del triángulo) y pruebas descriptivas; tomando la primera etapa como parte del entrenamiento de la segunda.

Primera etapa: Test del triángulo expandido con elección forzada (IRAM 20008); se realizó por duplicado, comparando las muestras de cada región y entre regiones (este último sólo para los vinos 2003), en cada vendimia, y describiendo las características de la muestra diferente en base al color, aroma, gusto y/o sabor. Las muestras fueron presentadas en vasos plásticos a 12-13°C de temperatura y codificadas por números de tres dígitos al azar, utilizando agua mineral para el enjuague. Participaron 14 evaluadores del staff de la Facultad de Ciencias Agrarias (9 mujeres y 5 hombres, de 23 a 55 años) seleccionados en base a su interés y disponibilidad de tiempo. Recibieron, al comienzo de cada año, 4 horas de entrenamiento en identificación de gustos y aromas del vino Chardonnay utilizando estándares.

Segunda etapa: Perfil Descriptivo Cuantitativo (Stone and Sidel, 1993, ASTM, 1992). Se utilizó, en el primer año un diseño de bloques incompleto, y para el segundo un diseño de bloques completo, evaluando nueve vinos por sesión. Los atributos del perfil se seleccionaron en base a la frecuencia de mención en el test del triángulo expandido, cuantificándose por duplicado sobre escalas no estructuradas de 10 cm.

Se seleccionaron nueve de los 14 evaluadores del panel en base a su capacidad de discriminación, recibiendo un nuevo entrenamiento de 4 horas en estimación de magnitudes y manejo de escalas gráficas.

Las muestras fueron presentadas en copas de vino tipo tulipa a 12-13°C de temperatura y codificadas por números de tres dígitos al azar. Se les proveyó agua mineral a temperatura ambiente y galletas de agua para el enjuague oral al comienzo del ensayo y entre los vinos.

Análisis de datos

Para determinar el mínimo número de respuestas correctas necesario para concluir que existen diferencias perceptibles ($\alpha = 0.05$) basadas en el test del triángulo, se utilizó la tabla de la norma IRAM 20008. Sobre los vinos discriminados se evaluó la frecuencia de

mención de los atributos, seleccionándose los de mayor frecuencia para el perfil descriptivo. El Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos químicos y del perfil descriptivo se realizó para determinar los atributos que se diferenciaban significativamente entre regiones y vendimias, usando el comando General Linear Model del SPSS v. 11.5. Para comparar los datos sensoriales de los experimentos de ambos años, se promediaron los datos de todos los panelistas y se normalizaron. La variabilidad de cada descriptor se estudió aplicando un modelo factorial donde región y vendimia fueron factores fijos. También se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando la matriz de covarianza y el mínimo eigenvalor igual a 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza de la composición química de los vinos que se detallan en la Tabla 1 no mostró diferencias significativas entre las regiones ni entre las vendimias en ninguna de las variables evaluadas.

A través de los tests discriminativos se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las muestras de una misma región y vendimia. En la **Región de Maipú** de la vendimia 2001 se distinguió el vino 2 (Tabla 1) del 1 y del 3 por la acidez sensorial; en la vendimia 2003, la muestra 9 fue distinta por los atributos tostado y manteca. En la **Región Valle de Uco** sólo se observaron diferencias en la vendimia 2003, siendo la muestra 16 diferente por los atributos tostado, manteca y madera. En la **Región Luján de Cuyo** en la vendimia 2001 el vino 20 fue más oscuro, en la 2002 se distinguió la muestra 22 por los atributos dulzor y frutal mientras que en la vendimia 2003 los tres vinos fueron distintos caracterizándose el 25 por el atributo frutal, el 26 por manteca y el 27 por tostado, madera y miel.

Del análisis de las vendimias dentro de cada región surgió que Valle de Uco fue la de menor variabilidad, dado que sólo se observaron diferencias en una muestra de la vendimia 2003 a través de atributos que responden a la elaboración.

La comparación entre regiones de la vendimia 2003 mostró que la muestra 18 de Valle de Uco fue la que exhibió mayor similitud entre los vinos, diferenciándose de una muestra de la misma región (16) y de otra de Luján de Cuyo (27), ambas con la particularidad de presentar alta frecuencia de mención en los atributos madera y tostado, propios del almacenamiento en barrica. Esta similitud se asoció a que esa muestra (18) representaba más acabadamente las características varietales del vino Chardonnay.

A través del perfil descriptivo los vinos fueron caracterizados por 16 atributos siendo siete los que presentaron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las vendimias (manzana,

cítrico, banana, tostado, vainilla, floral y amargo), no presentando diferencias entre regiones (Tabla 2).

Tabla 1. Origen, composición química y características de elaboración de los vinos seleccionados

Muestra	Región	Vendimia	Alcohol (20/20 % v/v)	Ext. Seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Acidez tot. Ac. Tartár. (g/l)	pH	Ferment. Malolác.	B X
1	Maipú	2001	12.7	21.42	2.40	5.02	3.70	x	
2	Maipú	2001	13.5	19.87	1.80	6.52	3.39	X	
3	Maipú	2001	13.5	20.02	1.87	4.61	3.50		
4	Maipú	2002	13.2	19.50	3.47	4.84	3.00	X	
5	Maipú	2002	14.1	20.50	2.06	6.45	3.40	X	
6	Maipú	2002	12.6	22.70	4.20	5.85	3.75		
7	Maipú	2003	13.5	19.20	2.00	5.60	3.44		
8	Maipú	2003	12.8	21.50	4.00	5.50	3.39		
9	Maipú	2003	13.0	22.03	4.84	6.07	3.28		
10	Valle de Uco	2001	13.3	21.20	3.84	5.04	3.70		
11	Valle de Uco	2001	13.4	22.84	2.34	6.38	3.42	X	
12	Valle de Uco	2001	13.5	19.70	3.95	5.5	3.80		
13	Valle de Uco	2002	13.0	21.90	1.40	6.00	3.50		
14	Valle de Uco	2002	13.0	18.00	3.10	5.84	3.80		
15	Valle de Uco	2002	13.9	19.26	5.46	4.70	3.40		
16	Valle de Uco	2003	13.2	21.47	5.56	5.21	3.61	X	
17	Valle de Uco	2003	13.3	17.23	2.10	5.20	3.35	X X	
18	Valle de Uco	2003	14.0	17.49	2.15	5.05	3.41		
19	Luján de Cuyo	2001	13.3	21.3	4.60	5.25	3.65	X X	
20	Luján de Cuyo	2001	13.0	20.42	4.50	5.35	3.63	X X	
21	Luján de Cuyo	2001	11.0	32.10	10.50	5.25	2.57		
22	Luján de Cuyo	2002	13.4	22.10	5.00	5.02	3.70	X X	
23	Luján de Cuyo	2002	13.0	19.32	3.95	5.04	3.70	X X	
24	Luján de Cuyo	2002	14.0	24.80	6.53	5.4	3.62	X	
25	Luján de Cuyo	2003	11.9	17.60	1.80	5.60	3.28		
26	Luján de Cuyo	2003	13.6	19.00	1.80	5.60	3.43	X X	
27	Luján de Cuyo	2003	13.4	20.47	5.50	5.70	3.20	X	

En la Fig.1 se muestra el análisis de componentes principales de los atributos de los 27 vinos examinados por vendimia, caracterizando a cada una por los constituyentes de mayor peso sobre el componente1 (C1). La vendimia 2001 (Fig.1.a; C1=64.84%) tiene como atributos más importantes floral, cítrico y ananá; la 2002 (Fig.1.b; C1= 38.27%) tiene como atributos principales floral y cítrico y la 2003 (Fig.1.c; C1= 35.87%) manzana.

Cabe destacar que en cada una de las vendimias los atributos correspondientes a la fermentación maloláctica y almacenamiento en barrica fueron de gran peso, pero siempre se ubicaron en forma opuesta a los descriptores propios de la cepa y del grado de maduración de la uva. En concordancia con las afirmaciones de Schlosser y col. (2005), el vino Chardonnay es conocido como "la uva del enólogo" porque está sujeto a un amplio

rango de tratamientos enológicos, tales como fermentación maloláctica y almacenamiento en barricas. Estos tratamientos modifican el perfil sensorial del vino enmascarando las características propias de la cepa y la región de origen.

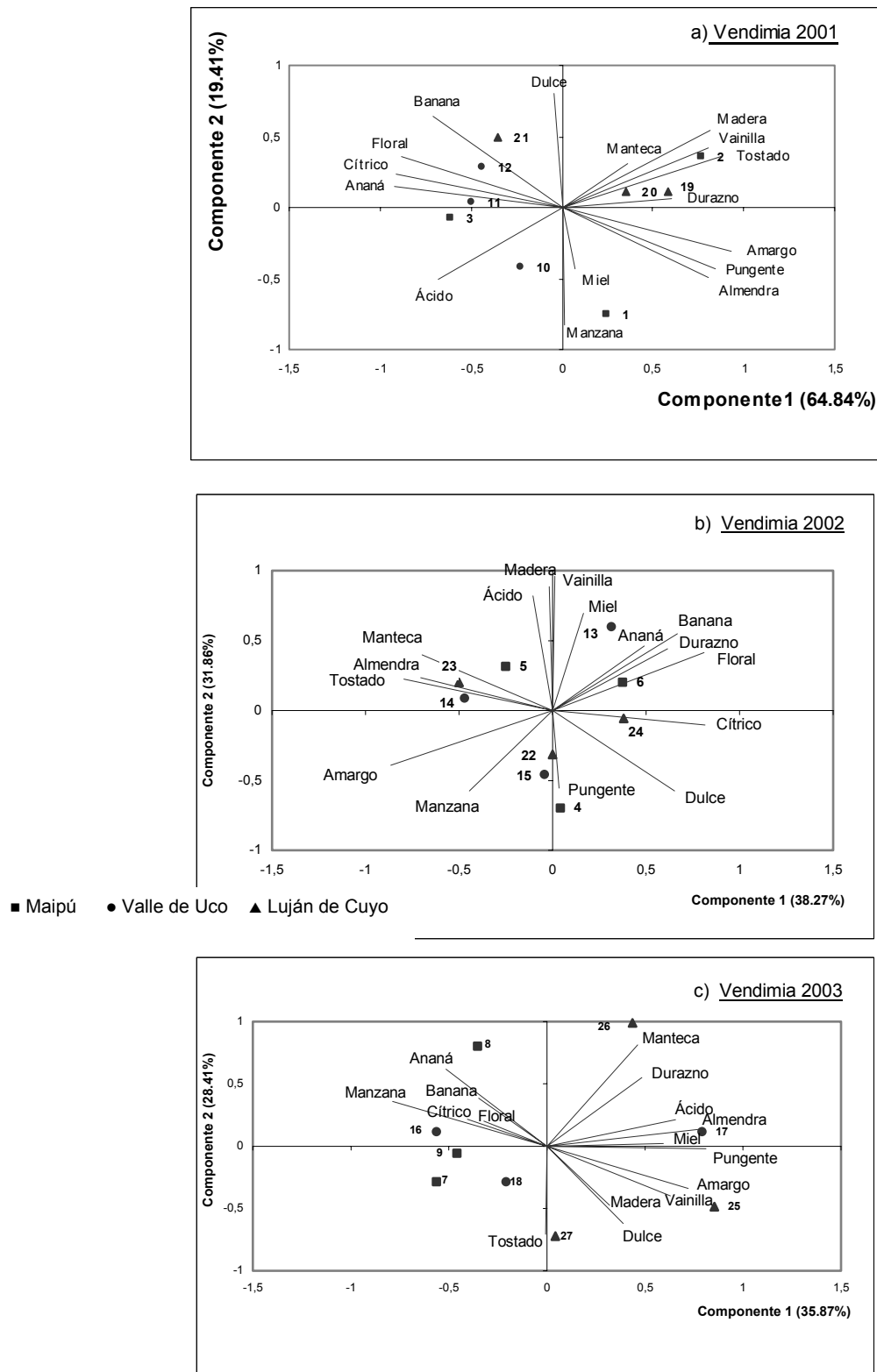


Fig. 1. Perfil descriptivo del vino Chardonnay analizado por vendimia: a) 2001, b)2002, c) 2003 de distintas vendimias, por lo tanto habría una mayor uniformidad de las prácticas enológicas entre las bodegas de esta región.

Tabla 2. Análisis de varianza de los descriptores según región y vendimia

Atributos	Región		Vendimia	
	Valor de	Valor de	Valor de	Valor de
	F	P	F	P
Manzana	1.046	0.368	30.277	0.000
Cítrico	0.120	0.887	28.475	0.000
Banana	0.038	0.963	30.601	0.000
Ananá	0.340	0.715	5.550	0.027
Durazno	0.717	0.499	5.915	0.023
Miel	0.349	0.709	0.283	0.600
Tostado	1.795	0.189	11.707	0.002
Vainilla	0.824	0.451	9.658	0.005
Madera	1.634	0.217	0.626	0.437
Almendra	0.600	0.557	1.978	0.173
Manteca	0.283	0.756	7.618	0.011
Floral	0.097	0.908	21.126	0.000
Amargo	1.426	0.261	8.190	0.009
Acido	0.128	0.881	2.202	0.151
Dulce	0.135	0.875	0.243	0.627
Pungencia	0.381	0.687	0.001	0.970

Los análisis químicos (alcohol, pH, acidez, azúcares reductores y extracto seco) no permitieron registrar diferencias significativas entre los vinos Chardonnay de las vendimias 2001, 2002 y 2003 como tampoco entre las regiones de Maipú, Valle de Uco y Luján de Cuyo. El análisis de los atributos sensoriales estudiados por este panel permitió caracterizar las vendimias examinadas; sin embargo no pudieron encontrarse descriptores distintivos de las regiones analizadas. Cabe comentar que la región de Valle de Uco presentó la menor variabilidad en las características sensoriales de los vinos provenientes. Se concluye que el vino Chardonnay producido en las regiones de Maipú, Valle de Uco y Luján de Cuyo (Vendimia 2001, 2002, 2003) no presenta ni en su composición química básica (alcohol, pH, acidez, azúcares reductores y extracto seco) ni en los atributos sensoriales examinados por este panel, particularidades que lo acredite como perteneciente a una determinada región.

CONCLUSIONES

Los análisis químicos (alcohol, pH, acidez, azúcares reductores y extracto seco) no permitieron registrar diferencias significativas entre los vinos Chardonnay de las vendimias 2001, 2002 y 2003 como tampoco entre las regiones de Maipú, Valle de Uco y Luján de Cuyo. El análisis de los atributos sensoriales estudiados por este panel permitió

caracterizar las vendimias examinadas; sin embargo no pudieron encontrarse descriptores distintivos de las regiones analizadas. Cabe comentar que la región de Valle de Uco presentó la menor variabilidad en las características sensoriales de los vinos provenientes de distintas vendimias, por lo tanto habría una mayor uniformidad de las prácticas enológicas entre las bodegas de esta región.

Se concluye que el vino Chardonnay producido en las regiones de Maipú, Valle de Uco y Luján de Cuyo (Vendimia 2001, 2002, 2003) no presenta ni en su composición química básica (alcohol, pH, acidez, azúcares reductores y extracto seco) ni en los atributos sensoriales examinados por este panel, particularidades que lo acredite como perteneciente a una determinada región.

BIBLIOGRAFÍA

American Society for Testing and Materials, ASTM. (1992). Committee E-18.

Descriptive analysis testing. *MNL 13*. Philadelphia, Pa.

Amerine, M. A. and Ough, C. S. (1980). Methods for analysis of musts and wines. John Wiley and Sons, New York.

Di Stefano, R. & Corino, L. (1986). Caratteristiche chimiche ed aromatiche di vini secchi prodotti con Moscatto Bianco e Giallo di Chambave e con Moscatto Bianco di Canelli. *Rivista Viticoltura and Enology* 3-11

Douglas, D., Cliff, M. A. & Reynolds, A. G. (2001). Canadian terroir: characterization of Riesling wine from the Niagara Peninsula. *Food Research International* 34, 559-563.

Guinard, J. X. & Cliff, M. 1987. Descriptive analysis of Pinot noir wine from Carneros, Napa, and Sonoma. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 211-215.

Schlosser, J., Reynolds, A.G., King, M. & Cliff, M. (2005). Canadian terroir: sensory characterization of Chardonnay in the Niagara Peninsula. *Food Research International* 38, 11-18.

Silversten, H. K., Holen, B., Nicolaysen, G. & Risvik, E. (1999). Classification of French red wines according to their geographical origin by the use of multivariate analysis. *Journal of Science and Food Agriculture* 79, 107-115.

Stone, H. and Sidel, J. L. (1993). *Sensory Evaluation Practices*. 2da Edición, Academic Press, San Diego, California.

Tapias, R. M., Larrechi, M. S., Guasch, J., Rubio, J. & Rius, F. X. (1986). Enological parameters and pattern recognition methods in the geographic differentiation of Spanish Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 195-203.

Zamora, M. C., Goldner, M. C. & Pandolfi, C. (2003). Características diferenciales del vino Chardonnay argentino atribuidas a la región geográfica. *IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología Chile 2003*, Resumen N° 34, p. 21. Noviembre 24 -28, Santiago, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los miembros del panel por su participación en el desarrollo del presente trabajo. Asimismo, se destaca la colaboración del Instituto Nacional de Vitivinicultura con el aporte de los análisis químicos de los vinos. Este estudio fue financiado por el proyecto PICT 2000 N° 8820 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la Secretaría de Ciencia y Técnica.

ESTABILIDAD DE AROMAS ENCAPSULADOS : RELACION ENTRE CAMBIOS FISICOS/ESTRUCTURALES Y LA RETENCION DEL AROMA EVALUADA SENSORIALMENTE.

¹BUSSO CASATI Carolina I., ¹BUZZO Bernadette, ^{1,2}ZAMORA María C, ¹CHIRIFE Jorge

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina (UCA). ²CONICET
Cap.Gral. Ramón Freire 183 C146AVC, Bs. As. - Argentina – tel /fax:4552-2711/2721
carolinabusso@fibertel.com.ar

RESUMEN

Aromas de naranja y frutilla encapsulados (secado spray) en diferentes matrices amorfas se almacenaron a distintas humedades relativas por espacio de 20 días a temperatura ambiente. Se registraron los cambios físicos que ocurrieron (apelmazamiento, caking, colapso) y paralelamente un panel sensorial evaluó la intensidad del aroma.

Los cambios físicos fueron función de la humedad relativa y del tipo de matriz; aunque también se observó una influencia por la presencia *per se* del aroma encapsulado.

Aunque los cambios físicos estructurales se correlacionaron cualitativamente con el fenómeno de la transición vítrea, su relación con la retención del aroma no fue tan directa; si bien la mayoría de las matrices almacenadas a 75 % HR colapsaron totalmente, la variación en la intensidad del aroma no fue la misma.

La presencia de sacarosa en algunas de las matrices amorfas tuvo una profunda influencia en la aparición de cambios físicos y en la intensidad del aroma percibido por el panel sensorial; este comportamiento es atribuible al bajo valor de temperatura de transición vítrea de la sacarosa.

ABSTRACT

Encapsulated flavors (orange and strawberry) spray dried in different matrices (maltodextrine- starch- sucrose) were stored at different relative humidities during twenty days (room temperature). Physical changes (stickiness; caking; collapse) were recorded; at the same time a trained sensory panel evaluated aroma intensity in the different samples.

Physical changes were correlated with relative humidity and type of matrix; however an effect of the encapsulated aroma “*per se*” was also suggested by results obtained.

Although physical changes were in accordance with predicted glass transition temperatures, the relationship with aroma intensity was not always apparent. Though most

of the matrices stored at 75% HR suffered total collapse , the intensity in aroma variation was not the same.

The presence of sucrose in some of the amorphous matrices had a dramatic influence on both, the occurrence of physical changes and aroma loss; this being attributed to the low value of the glass transition temperature of sucrose.

Palabras Claves: aromas encapsulados – transición vítrea – colapso – caking

INTRODUCCION

El secado spray es el principal proceso empleado para producir aromas de alimentos encapsulados (“secos”) para uso en la industria alimenticia; durante el secado spray, las moléculas del material usado como soporte (generalmente hidratos de carbono) forman una estructura que mantiene atrapadas en microrregiones a las moléculas constituyentes del aroma.

El secado spray de componentes de alimentos (polisacáridos, proteínas, azúcares) conduce generalmente a la formación de estructuras que presentan propiedades térmicas y mecánicas típicas de los materiales amorfos, los cuales existen en un estado de equilibrio metaestable. Cuando un material amorfo se somete a temperaturas mayores que una temperatura crítica, llamada temperatura de transición vítrea (T_g) se produce un aumento muy importante de la movilidad molecular; al ocurrir esta transición el material pasa de un estado inicialmente rígido (vítreo) a un estado más parecido al líquido (gomoso).

El objetivo de este proyecto fue estudiar los cambios físicos (apelmazamiento, “caking”; colapso) experimentados por diversas matrices encapsulantes de aromas de naranja y frutilla, almacenadas a diferentes humedades relativas. Un panel sensorial entrenado determinó paralelamente los cambios en la intensidad del aroma, buscando correlacionarlos con las modificaciones físicas observadas.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron aromas encapsulados de frutilla y naranja provistos por una empresa del ramo; estos productos se obtuvieron por secado spray de los aromas dispersos en diferentes soportes.

La composición porcentual (base seca) de los diferentes sistemas (matrices amorfas) fue la siguiente:

Componente	Aroma				
	<i>Frutilla</i>	Naranja			
		N1	N2	N3	N5
Maltodextrina	84.9	78.4	72	40	64.4
Almidón modificado	5	5.4	-	3.6	6.9
Aroma	9.8	15.8	19.9	13	17.7
Goma arábica	-	-	8	-	-
Sacarosa	-	-	-	40.6	10.3

Almacenamiento a diferentes humedades relativas

Se utilizaron recipientes de vidrio sin tapa donde se colocaron 3 g de muestra por recipiente la cual se distribuyó uniformemente. Las muestras se almacenaron a cuatro humedades relativas : 32%; 44%; 58% y 75% ,utilizando para ello soluciones salinas saturadas estándar. El almacenaje se hizo a temp. ambiente (osciló entre 22-25°C), por un lapso de 20 días.

Paralelamente de cada sistema se conservó una muestra patrón (herméticamente cerrada en un recipiente) almacenada -18°C ; esta muestra representaba el “control” en evaluaciones sensoriales de muestras evaluadas en diferentes condiciones.

Cumplido el tiempo de almacenamiento, las muestras fueron fotografiadas digitalmente y luego se taparon, sellaron y conservaron a -18°C hasta el momento de su evaluación sensorial.

Evaluación Sensorial

Se realizó la prueba del triángulo extendido (IRAM 20008), comparando cada muestra con el patrón y en las muestras donde se encontraban diferencias significativas respecto del patrón se evaluó la intensidad aromática sobre una escala no estructurada de 10 cm.

El panel estaba integrado por 14 evaluadores (3 hombres y 11 mujeres; edad promedio: 22 años), entrenados (6 horas) en reconocimiento y cuantificación de aromas. Los asesores evaluaron cada una de las muestras en una sesión (media hora) llevando a cabo 4 triángulos por duplicado, obteniéndose un total de 28 respuestas por cada muestra. A continuación realizaban la estimación de la intensidad de aroma sobre la escala, de las muestras que se percibían diferentes del patrón.

Las muestras fueron diluidas al 0.5%, colocando 20 ml (1/3 del volumen total del frasco) en envases plásticos transparentes, dejando que se equilibren las fases acuosa y gaseosa 4 horas antes de su evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Cuando un polvo higroscópico, tal como los aromas encapsulados por spray, se almacena a humedades relativas crecientes, se suelen observar los fenómenos de apelmazamiento, caking y finalmente colapso. Estos cambios están asociados con la disminución de la temperatura de transición vítrea causada por el aumento de humedad (Ross 1992). El apelmazamiento describe una aglomeración de las partículas que dificulta su “deslizamiento” (flujo), mientras que el “caking” representa un estado de agregación superior con la formación de estructuras compactas, y finalmente el “colapso” es una pérdida de porosidad y concomitante reducción del volumen del sistema. Todos estos fenómenos, a un dado valor de $(T - T_g)$, son dependientes del tiempo.

En la Fig. 1-a- (Frutilla /MD-Alm) se observa que a 75%HR el sistema ha colapsado; en cambio una matriz similar (Naranja /MD –Alm) pero donde el aroma encapsulado es naranja (Fig.1-b) no evidencia un colapso similar. Esto parece indicar que la presencia del aroma encapsulado “*per se*” influye en el colapso de la estructura. Igualmente la matriz con maltodextrina y goma arábica (Fig.1-c) no manifiesta colapso.

Cuando la matriz del aroma encapsulado contiene sacarosa en su formulación el comportamiento es diferente tal como se observa en la Fig.1-d y 1-e.; la presencia de este azúcar promueve la aparición de colapso y la liberación del aceite esencial de naranja lo cual se observa visualmente por el cambio de color del sistema. Esto se puede atribuir a la baja T_g de la sacarosa (Ross 1993).

a) FRUTILLA (MD- Alm)



muestra control (izq.) – RH 58% (arriba izq) – RH 75% (arriba dcha) RH 32% (abajo izq) – RH 44% (abajo dcha)

b) NARANJA N1 (MD-Alm)



muestra control (izq.) – RH 58% (arriba izq) – RH 75% (arriba dcha)
RH 32% (abajo izq) – RH 44% (abajo dcha)

c) NARANJA N2 (MD-Gom.Ar)



muestra control (izq.) – RH 58% (arriba izq) – RH 75% (arriba dcha)
RH 32% (abajo izq) – RH 44% (abajo dcha)

d) NARANJA N3 (MD-Alm-Sac)



muestra control (izq.) – RH 58% (arriba izq) – RH 75% (arriba dcha)
RH 32% (abajo izq) – RH 44% (abajo dcha)

e) NARANJA N5 (MD-Alm-Sac)



**muestra control (izq.) – RH 58% (arriba izq) – RH 75% (arriba dcha)
RH 32% (abajo izq) – RH 44% (abajo dcha)**

Fig. 1. Comparación del aspecto físico de las matrices luego de 20 días de almacenaje a diferentes humedades relativas

La Tabla 1 resume los cambios fisicoquímicos (apelmazamiento, caking, colapso) observados en las cinco muestras frutilla (F) y naranja (N1;N2;N3;N5), así mismo los cambios sensoriales (percepción olfatoria) evaluados. En la muestra de Frutilla (MD-Alm), el panel detectó una pérdida significativa en la intensidad de aroma en la muestra almacenada a 75%HR (colapso total); en cambio en las muestras naranja N1 (MD-Alm) y N2 (MD-Gom.ar) el panel no detectó cambios significativos en la intensidad de aroma en las muestras almacenadas a 75%HR, a pesar que en una de ellas (N2) el caking de la muestra era evidente. En las muestras N3 y N5 que incluían diferentes % de sacarosa en su formulación el panel detectó pérdida significativa en la intensidad de aroma y esto estaba asociado con una observación visual del colapso de las estructuras.

CONCLUSIONES

Podemos concluir: a) aunque algunas muestras estaban en estado “gomoso” -evidenciado por la observación de apelmazamiento o caking - no se detectó pérdida significativa en la intensidad del aroma encapsulado; lo cual si ocurría cuando se observaba un colapso total de la estructura

b) el comportamiento físico de la matriz no parece depender exclusivamente de la composición del soporte sino del tipo y cantidad del flavor encapsulado.

c) la inclusión de un constituyente de bajo T_g (sacarosa) es altamente perjudicial a los efectos de la estabilidad física del sistema encapsulado.

BIBLIOGRAFÍA

Roos, Y., 1995. "Phase Transitions in Foods", Academic Press, N. York.

Roser, B. 1991. Trehalose: A new approach to premium dried foods. Trends in Food Science & Technology, 3 : 166-169.

Levine, H. and Slade, L., 1986. A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. Carbohydrate Polymers, 6 : 213-244.

To, E.C. and J.M. Flink. Collapse : a structural transition in freeze-dried carbohydrates. III Prerequisite of recrystallization. J. Food Technology, 13 : 586-594

Roos, Y. and Karel, M. 1991. Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. Biotechnology Progress, 7 : 49.

Tsouroufilis, S. Flink, J.M., and Karel, M. 1976. Loss of structure in freeze-dried carbohydrate solutions : effect of temperature, moisture content and composition. J. Sci. Food Agriculture, 27 : 509-519

Risch, S.J. and Reineccius, G. 1988. Spray-dried orange oil- Effect of emulsion size on flavor retention and shelf stability. ACS Symposium Series, 360 : 67-77

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los miembros del panel por su participación en el desarrollo del presente trabajo, como así también a los alumnos de 5° año de la carrera de Lic. en Tecnología de los Alimentos (UCA) que colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 1: Resultados sensoriales y cambios fisicoquímicos observados en las muestras almacenadas a diferentes humedades relativas

H.R % (almacenamiento: 20 días)	SISTEMA					
	FRUTILLA		NARANJA N1		NARANJA N2	
	Maltodextrina	84.9%	Maltodextrina	78.4%	Maltodextrina	72%
	Almidón modificado	5%	Almidón modificado	5.4%	Goma arábica	8%
	Aroma frutilla	9.8%	Aroma naranja	15.8%	Aroma naranja	19.9%
	Descripción física	Resultado sensorial	Descripción física	Resultado sensorial	Descripción física	Resultado sensorial
32	f.l	n.s	f.l	n.s	f.l	n.s
44	f.l	n.s	f.l	n.s	f.l	n.s
58	ligero apelmazamiento	n.s	f.l	n.s	ligero apelmazamiento	n.s
75	colapso total	Diferencias significativas (p<0.05) Pérdida de aroma -28%-	Ligero apelmazamiento	n.s	caking	n.s

Referencias: f.l: fluye libremente; n.s: no significativo

H.R % (almacenamiento: 20 días)	SISTEMA			
	NARANJA N3		NARANJA N5	
	Maltodextrina	40%	Maltodextrina	64.4%
	Almidón modificado	3.6%	Almidón modificado	6.9%
	Sacarosa	40.6%	Sacarosa	10.3%
	Aroma naranja	13%	Aroma naranja	17.7%
	Descripción física	Resultado sensorial	Descripción física	Resultado sensorial
32	f.l	n.s	f.l	n.s
44	caking apreciable	n.s	f.l	n.s
58	colapso total liberación del color amarillo	n.s	apelmazamiento	n.s
75	colapso total liberación del color amarillo	Diferencias significativas (p<0.01) Pérdida de aroma -52.5%-	caking-colapso total liberación del color naranja	Diferencias significativas (p<0.05) Pérdida de aroma -29.1%-

Referencias: f.l: fluye libremente; n.s: no significativo

INCIDENCIA DE LA ALIMENTACION DEL GANADO VACUNO SOBRE EL PERFIL SENSORIAL DE QUESO REGGIANITO ARGENTINO

SABBAG¹, N.; ETCHEVERS², F.; LOPEZ, G².; GERARD², R.; GIECO², A.; GERVASONI², L.; DELLA GIUSTINA², Z.; COSTA¹, S.; CANDIOTI³, M.

¹ Instituto de Tecnología de Alimentos –FIQ-UNL.-Paraje El Pozo – 3000-Santa Fe.(Argentina)
Email: nsabbag@fiqus.unl.edu.ar ² Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER.-Paraná-(Argentina) ³ Cátedra de Lactología Industrial-FIQ-UNL.-Santa Fe-(Argentina)

RESUMEN

Diferentes alternativas de formulados se utilizan en nuestro país para alimentar ganado vacuno. Los mismos generalmente están compuestos por pasturas, balanceado y ensilado de maíz, con o sin agregado de residuo de citrus o bacterias lácticas. En tal sentido, la información acerca de la influencia de la alimentación sobre la calidad de la leche y sus derivados es limitada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características sensoriales de queso reggianito argentino elaborado con partidas de leche de vacas alimentadas con formulados diferentes.

Un panel de siete jueces entrenados evaluó aroma, color, aspecto de la masa del queso, flavor genuino y textura (corte granular, fracturabilidad, sensación al paladar).

Los perfiles obtenidos muestra que no hay influencia de la alimentación sobre el aspecto de la masa y textura. En cambio, hay diferencias significativas en aroma, color y flavor genuino.

Los resultados de este trabajo constituyen un aporte a la revalorización de los residuos de las plantas procesadoras de cítricos, contribuyendo a mantener la calidad del medio ambiente.

Palabras claves: alimentación vacuna-queso duro-análisis sensorial.

ABSTRACT

Different alternatives of formulations are used in our country to feeding cattle. They are generally composed by pasture, balanced feed and corn ensilage, with or without addition of citrus waste or lactic bacteria. On this way, the information about influence of feeding on quality of milk and derivatives is limited.

The objective of this work was to evaluate the sensorial characteristics of Reggianito Argentino cheese made with lots of milk from cows fed with different formulations.

A panel of seven trained judges evaluated odor, color, aspect of cheese mass, genuine flavor and texture (grainy, fracturability, palatal sensation).

The sample profiles show there are no influence of feeding on aspect of mass and texture.

On the other hand, there are significative differences in odor, color and genuine flavor.

Results of this work contribute to revaluing of residues from citric juice industry, and to maintain the quality of environmental.

Key words: cattle feeding-hard cheese-sensorial analysis.

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios se han realizado en Italia sobre la microflora que se desarrolla durante la elaboración y conservación del silaje (1, 6), y su influencia en la calidad de quesos de pasta dura (2, 8). En Francia se han obtenido preparados comerciales de bacterias, que se adicionan a los forrajes, en el momento del ensilado, con el propósito de lograr mejores características de los mismos.

En nuestro país los estudios se orientan a ensayos comparativos de diferentes especies forrajeras ensiladas (7) y calidad nutritiva según el momento de corte (3, 11), pero no se registran en el país antecedentes de trabajos de investigación relacionados con la influencia del consumo de forrajes ensilados sobre la calidad de la leche cruda, y su implicancia en la elaboración y maduración de los quesos fabricados con dicha leche. Dado que en Argentina es habitual el uso de ensilados de maíz pasado del estado óptimo de corte, por razones climáticas y operativas, se plantea el agregado de bacterias lácticas o residuo de citrus para acelerar y mejorar el proceso de fermentación de los mismos.

En la cuenca lechera de Entre Ríos esto se presenta como un desafío interesante puesto que permitiría la revalorización de este desecho, reduciendo los consabidos problemas de disposición final y contaminación ambiental resultante de su proceso de putrefacción.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles cambios en las características sensoriales de quesos tipo reggianito, elaborados con leche proveniente de vacas en cuya alimentación se incluyó ensilado de maíz pasado de su estado óptimo de corte, con agregado de bacterias lácticas o residuos cítricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de queso: en dos períodos consecutivos de lactancia (identificados 1 y 2) se elaboraron muestras de queso reggianito argentino. En el cuadro siguiente se

presentan las distintas formulaciones utilizadas en ambos períodos y la identificación correspondiente para cada muestra de queso.

Muestra de queso	Período	Pastura (% MS)	Balanceado (% MS)	Ensilado de maíz pasado (% MS)		
				c/Citrus Natural	c/Bact.	Lácticas
M1	1	0	40	60		
M2	1	0	40		60	
M3	1	0	40			60
M4	2	30	10	60		
M5	2	30	10		60	
M6	2	30	10			60

Evaluación sensorial: al finalizar el período de maduración, un panel integrado por siete jueces entrenados evaluó las muestras presentadas, identificadas con números aleatorios. Se aplicó Análisis Descriptivo Cuantitativo utilizando escalas de 10 cm no estructuradas, ancladas en los extremos.

Los atributos evaluados fueron: Aroma (1 = suave – 9 = intenso); Color (1 = tenue – 9 = muy intenso); Aspecto de la masa y Corte granular (1 = malo – 9 = muy bueno); Fracturabilidad (1 = mucha – 9 = poca o nada); Sensación al paladar (1 = áspero, arenoso o pastoso – 9 = no áspero, no arenoso o no pastoso); Flavor genuino (1 = extremadamente suave – 9 = muy intenso). (4, 5,

Evaluación de los resultados: se aplicó Análisis de Varianza (One way - ANOVA). Para ello se utilizó el soporte estadístico Statgraphic Plus 3. Para la confección del perfil sensorial se utilizó el soporte Excell. (10, 13)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los valores promedio obtenidos para cada uno de los atributos evaluados en cada muestra, se confeccionaron los respectivos perfiles (Figura 1). En ellos se aprecia que las muestras presentaron características de textura semejantes (corte granular, fracturabilidad y sensación al paladar); el valor obtenido para cada uno de los descriptores fue bueno, superando 7 en todos los casos.

En general, las muestras elaboradas con leche proveniente de vacas en cuya alimentación se incluyó ensilado de maíz pasado del estado óptimo, con residuo de citrus o con bacterias lácticas, tuvieron aroma y flavor genuino más intenso que aquellas en las que se incluyó ensilado natural de maíz pasado.

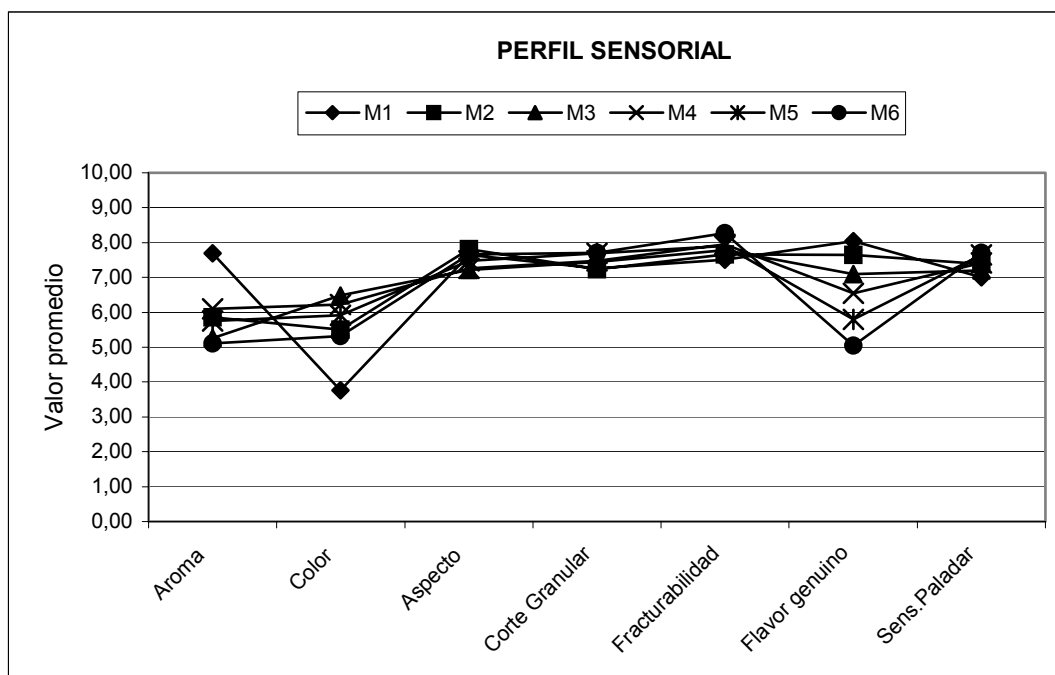


Figura 1. Perfil Sensorial de las muestras analizadas en los dos períodos.

El Análisis de Variancia permitió comprobar que, para los descriptores de textura, las diferencias entre las muestras no fueron significativas; en cambio si hubo varias diferencias significativas en aroma, color y flavor genuino.

La Tabla 1 muestra los resultados del ANOVA para estos tres atributos. Las muestras M1 y M4 obtuvieron el valor más alto en aroma; presentando la M1 diferencias significativas con el resto, al nivel $\alpha \leq 0,05$. Por otra parte, las muestras M2 y M5 no difieren entre sí, en este atributo, ni tampoco de las muestras M3 y M6 respectivamente. En cuanto al flavor genuino, fue más intenso para las muestras M1, M2 y M3, lo que podría ser atribuido a la utilización de mayor porcentaje de balanceado en la dieta de los distintos planteles de vacunos en esta etapa del trabajo. Además, el flavor genuino de las muestras M1 y M4 difiere significativamente del de las muestras M3 y M6, respectivamente, no así de las muestras M2 y M5.

Respecto del color, se encontraron marcadas diferencias entre las muestras M1, M2 y M3. Además, también hubo diferencias significativas entre las muestras M4 y M6.

CONCLUSIONES

*La utilización en la alimentación de ganado vacuno, de ensilado de maíz pasado del estado óptimo con residuo de citrus o con bacterias lácticas, no afecta las características texturales del queso reggianito elaborado con la leche producida bajo estas condiciones.

*Esta alimentación, en cambio, puede intensificar el aroma y el flavor genuino, sin que se modifique la aceptabilidad del producto, según los resultados obtenidos en un trabajo preliminar realizado por el mismo grupo. (12)

*El aprovechamiento de los desechos de las plantas elaboradoras de jugos de cítricos contribuye a su revalorización, reduciendo al mismo tiempo su aporte a la contaminación ambiental.

Tabla 1. Resultados del ANOVA para aroma, color y flavor genuino de las muestras evaluadas.

Atributos	Identificación de las Muestras	Valor medio	F
Aroma	M1	7.69 ^c	8.85
	M2	5.86 ^{ab}	
	M3	5.26 ^{ab}	
	M4	6.10 ^b	
	M5	5.75 ^{ab}	
	M6	5.11 ^a	
Color	M1	3.76 ^a	13.92
	M2	5.51 ^{bc}	
	M3	6.48 ^d	
	M4	6.22 ^{cd}	
	M5	5.91 ^{bcd}	
	M6	5.32 ^b	
Flavor genuino	M1	8.05 ^e	15.52
	M2	7.65 ^{de}	
	M3	7.10 ^{cd}	
	M4	6.54 ^{bc}	
	M5	5.79 ^{ab}	
	M6	5.04 ^a	

^{abcde} Letras distintas indica diferencias significativas al nivel $\alpha \leq 0,05$.

AGRADECIMIENTOS

Al panel de evaluación sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe).

BIBLIOGRAFÍA

BIANCHI SALVADORI.B., (1987) “Batteri lattici selezionati nell, insilato di mais: ripercussioni sullo stato sanitario e funzionale della manmella e sulla qualità del latte” - Centro sperimentale del latte - Milano. Italia.

CAMASCHELLA,P., ROTTIGNI,C., TORCHIO,E.y GIROLETTI,A. (1987) “Caratteristiche chimiche e microbiologiche dell `insilato preparato, con particolare riferimento agli sporigeni anaerobi”. Centro sperimentale del latte - Milano. Italia.

COMERON,E., ROMERO,L.A., BRUNO,O.y DIAZ,C. (1996) “Utilización de forrajes conservados en los sistemas lecheros” EEA Rafaela del INTA - Argentina.

COSTELL, E. y DURAN, L. (1981). El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. I. Introducción. II. Planteamiento y planificación: Selección de pruebas. III. Planificación, selección de jueces y diseño estadístico. Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos 21, 1-10, 149-166 and 454-470.

COSTELL, E. y DURAN, L. (1982). El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. IV. Realización y análisis de datos. Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos 21, 1-21.

DEGANO,L. (1987) “Preparazioni e somministrazione alle bovine dell `insilato di maíz trinciato aggiunto di batteri lattici selezionati” Istituto sperimentale lattiero caseario - Lodi. Italia.

DIAZ,M.G., VICENTIN,J., DI NUCCI,E. y PAVETTI,D. (1996). Trabajo final de graduación “Características fermentativas y de calidad de silaje de diferentes cultivares de maíz” UNER. Facultad de Ciencias Agropecuarias, pág 12. Argentina.

LODI,R. y TODESCO,R. (1987) “Qualità microbiologica e fisico-chimica del latte prodotto” Centro per lo Studio Tecnologico, Bromatologico e Microbiologico del Latte C.N.R. - Milano - Italia.

MAYNARD, A.; AMERINE, M.A.; PANGBORN, R. M. y ROESSLER, E. B. (1965). Principles of Sensory Evaluation of Foods. New York and London: Academic Press.

O'MAHONY, M. (1985). Sensory Evaluation of Food. Statistical Methods and Procedures. New York and Basel: Marcel Dekker Inc.

ROMERO,L.A., BRUNO,O.A., CAMERON,E.E., GAGGIOTTI,M.C. (1996) “Silaje de sorgo granífero - Efecto del momento de corte” - EEA Rafaela del INTA. Argentina.

SABBAG, N.; ETCHEVERS, F.; LOPEZ, G.; GERARD, R.; GIECO, A.; GERVASONI, L.; DELLA GIUSTINA, Z.;; CANDIOTI, M. y COSTA, S. (2003) Características organolépticas de queso reggianito elaborado con leche de vacas alimentadas con diferentes forrajes ensilados. Resúmenes de presentaciones IV Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, pag. 192. Valparaíso - Chile

STONE, H.; SIDEL, J.L..1993. Sensory Evaluation Practices. San Diego, California: Academic Press, Inc.

EFECTO DEL ASPARTAMO SOBRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE SISTEMAS MODELO ACUOSOS

GLIEMMO, María F.^{1,3}; TAMASI, Olga²; PASCUAL, Malena²; CAMPOS, Carmen A.^{1,4}; GERSCHENSON, Lía N.^{1,4}; CALVIÑO, Amalia M.^{2,4}

¹Departamento de Industrias, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Ciudad Universitaria (1428), Argentina. Tel/Fax: 4576-3366. CE: carmen@di.fcen.uba.ar ²Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA y IQUIMEFA-CONICET Junín 956, (1113), Argentina. Tel: (05411)-4964-8280 Fax: 4508-3645. CE: acalviño@ffyb.uba.ar. ³ Becaria de la Universidad de Buenos Aires. ⁴Miembro de la Carrera del Investigador Científico, CONICET

RESUMEN

Se estudió el efecto de la presencia de aspartamo (0,05-0,50%*m/m*) sobre a) la estimación de la intensidad total, el dulzor y la acidez de soluciones acuosas ácidas conteniendo sorbato de potasio, glucosa y/o xilitol y, b) el deterioro del color durante el almacenamiento de las soluciones a 35°C.

El incremento de la concentración de aspartamo produjo aumento del dulzor, disminución de la acidez, y aceleró el desarrollo de pardeamiento no enzimático de los sistemas. El elevado contenido de edulcorantes saturó la evaluación del dulzor y perturbó la determinación de la acidez. Es de destacar que, la presencia de xilitol disminuyó la formación de pigmentos pardos.

Los resultados obtenidos destacan la importancia de seleccionar el tipo y la concentración de edulcorantes a emplear al formular productos de bajo tenor glucídico.

Palabras clave: aspartamo, xilitol, dulzor, acidez, pardeamiento no enzimático.

ABSTRACT

The effect of aspartame presence (0,05-0,50%*w/w*) on a) the estimation of total intensity, sweetness and sourness of acidic aqueous solutions containing potassium sorbate, glucose and/or xylitol and, b) color changes during storage at 35°C was studied.

The increase in aspartame level produced an increment of sweetness, a decrease of sourness, and accelerated the non-enzymatic browning development. The high content of sweeteners saturated sweetness evaluation, and perturbed sourness determination. It must be highlighted that xylitol presence diminished brown pigments formation.

The results obtained remark the importance of a right selection of type and concentration of sweeteners to be used in low glucidic content product formulation to assure the sensorial acceptability of them.

INTRODUCCIÓN

El uso de aspartamo (APM) y de otros edulcorantes se ha incrementado en las últimas décadas debido al mayor consumo de alimentos reducidos en azúcares. El xilitol tiene la capacidad de proveer el cuerpo y la textura que ofrecen los azúcares, actúa como edulcorante y depresor de la actividad de agua (a_w). Por otra parte, presenta efectos benéficos sobre la salud, al reducir la placa bacteriana. Además, inhibe el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, una levadura deteriorativa de alimentos tales como jugos y mermeladas (Gliemmo y col., 2004).

Desde el punto de vista de los atributos sensoriales, la presencia de aditivos reemplazantes del azúcar, junto con otros componentes del alimento, dan lugar a una percepción heterogénea, en la cual, la intensidad total del gusto puede descomponerse en diferentes cualidades (Schifferstein, 1995).

Por otra parte, el ácido sórbico y su sal de potasio (KS), utilizados como antimicrobianos en gran cantidad de alimentos, pueden oxidarse en solución acuosa formando compuestos carbonílicos, los cuales promoverían el desarrollo de pigmentos pardos. Además, el pardeamiento podría verse incrementado por la presencia de APM debido a la reactividad del mismo frente a compuestos carbonílicos. Estos comportamientos podrían estar afectados por factores como, la presencia de otros aditivos, las condiciones de almacenamiento, el pH, la a_w , entre otros (Gliemmo y col., 2001; Stamp y, Labuza, 1983).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la presencia de APM (0,05-0,50% m/m) sobre a) las propiedades sensoriales de soluciones acuosas ácidas (pH 3,0) conteniendo KS como preservador y glucosa y/o xilitol como edulcorantes y depresores de la a_w . Estos sistemas modelan la composición de jugos de bajo tenor glucídico y, b) el deterioro del color durante el almacenamiento a 35°C de dichos sistemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de los sistemas

La composición de los sistemas se detalla en la Tabla 1. Los mismos contienen 0,13% m/m de KS. Xilitol y glucosa se utilizaron como edulcorantes y depresores de la a_w . El pH

se ajustó a 3,0 por agregado de ácido cítrico. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Estimación de la intensidad total, del dulzor y de la acidez

Un panel de 20 evaluadores, entrenados en el uso de la técnica de estimación de la magnitud, cuantificó la intensidad total percibida de cada uno de los sistemas, a 25°C, y la descompuso en las componentes dulzor y acidez.

Tabla 1. Composición (% m/m) de los sistemas modelo acuosos.

	Aspartamo	Glucosa	Xilitol	Aw
A	-	-	-	1
B	0,05	-	-	1
C	0,50	-	-	1
D	-	-	11,00	0,985
E	0,05	-	11,00	0,985
F	0,50	-	11,00	0,985
G	-	10,00	-	0,985
H	0,05	10,00	-	0,985
I	0,50	10,00	-	0,985
J	-	10,00	11,00	0,971
K	0,05	10,00	11,00	0,971
L	0,50	10,00	11,00	0,971

Los panelistas realizaron cada estimación por duplicado, en dos sesiones separadas. Todos los estímulos se presentaron una vez por sesión, en orden balanceado. Los sujetos debían sorber sin tragar un volumen total de 5 ml de muestra, enjuagándose con abundante agua destilada, a 25°C, entre muestras. La duración de cada estímulo fue de 3 s y, los intervalos entre los mismos estuvieron en el rango de 20 - 30 s, dependiendo del sujeto.

Para hacer las determinaciones, los sujetos emplearon el método de estimación de la magnitud sin módulos de referencia.

Se realizó un ANOVA de tres factores para conocer el efecto del nivel de APM y del tipo de humectante, considerados factores fijos, y de los sujetos (factor aleatorio) sobre la respuesta.

Determinación del desarrollo de pardeamiento no enzimático

Se almacenaron a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), por duplicado, alícuotas de los sistemas en frascos de vidrio oscuro y, a distintos tiempos se determinó el desarrollo del pardeamiento no enzimático de los sistemas a través de la medición de los valores triestímulo CIE (X, Y, Z) para el iluminante C, 10° de observación, en un colorímetro (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón). A partir de dichos valores, se obtiene el Índice de Pardeamiento (IP) mediante la siguiente expresión (Buera y col., 1985):

$$IP = \frac{100(x - 0,31)}{0,172}$$

donde:

x: coordenada cromática definida por

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}$$

0,31: coordenada cromática del iluminante C, y

0,172: diferencia entre la coordenada cromática del color puro espectral y la coordenada cromática del iluminante C.

Las constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento fueron estimadas por regresión lineal de los datos. Las diferencias significativas se evaluaron a través de un análisis de covarianza (ANCOVA) para la igualdad de las pendientes ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación de la intensidad total, del dulzor y de la acidez

El nivel de APM tuvo un efecto significativo sobre las magnitudes de la intensidad total, del dulzor y de la acidez ($p < 0,001$).

En la Figura 1(a) se muestra la intensidad total de los sistemas. En ausencia de APM, el descenso de la a_w produjo una disminución de la intensidad total (sistemas A vs. D, G y J, respectivamente). Por otra parte, la adición de APM, produjo un aumento de la intensidad total. A un nivel del 0,50% m/m de APM, no se observaron diferencias significativas en la intensidad total (sistemas C, F, I y L).

Los resultados de la estimación del dulzor pueden observarse en la Figura 1(b). En general, la adición de APM se correlacionó con un aumento del dulzor. Es de destacar que, en presencia de glucosa y xilitol, un sistema con 0,05% m/m de APM, fue igualmente dulce que el mismo sistema con una concentración de edulcorante diez veces mayor (sistemas K y L). Además, en los sistemas de a_w reducida conteniendo 0,50% m/m de APM, el dulzor fue independiente del tipo de humectante (sistemas F, I y L). Estos resultados revelan que el elevado contenido de edulcorantes saturaría los receptores no permitiendo a los evaluadores diferenciar su dulzor.

Los resultados de la estimación de la acidez se presentan en la Figura 1(c). El agregado de 0,05% m/m de APM tuvo un efecto reductor de la acidez del sistema sin humectante (sistema A vs. B) y, de los sistemas que contenían xilitol o glucosa o ambos humectantes (sistemas D vs. E, G vs. H y J vs. K, respectivamente). No se observó un efecto reductor de la acidez en los sistemas de a_w reducida, cuando el nivel de APM se incrementó de 0,05 a 0,50% m/m (sistemas E vs. F, H vs. I y K vs. L).

En particular, cuando el contenido de APM fue de 0,50% m/m, la acidez de los sistemas con a_w reducida fue independiente del humectante utilizado (sistemas F vs. I y F vs. L, respectivamente). Esto puede interpretarse debido al elevado contenido de edulcorantes que perturbaría la evaluación de la acidez por parte de los panelistas.

El descenso de la a_w también produjo un efecto reductor de la acidez de los sistemas, ya sea en ausencia o en presencia de APM.

Pardeamiento no enzimático

Para todos los sistemas estudiados, el desarrollo de pardeamiento no enzimático se incrementó linealmente con el tiempo, indicando una cinética de reacción de orden cero. En la Figura 2 se muestran las constantes de velocidad obtenidas.

La presencia de APM aceleró la formación de pigmentos pardos y, este comportamiento, fue proporcional al incremento de la concentración del edulcorante.

Para un nivel de 0,05% m/m de APM, el sistema sin humectante (sistema B) fue el que mostró la mayor velocidad de pardeamiento, seguido luego, por el sistema que contiene 10% m/m de glucosa (sistema H). Sin embargo, cuando el nivel de APM es de 0,50% m/m, ambos sistemas presentaron similares velocidades de pardeamiento (sistemas C e I). El mismo comportamiento se observó en ausencia de APM.

Es de destacar que el agregado de xilitol, independientemente de la presencia de glucosa, disminuyó significativamente el desarrollo de pigmentos pardos para ambos niveles de APM (sistemas B vs. E, C vs. F, H vs. K e I vs. L). La misma tendencia se observó en ausencia de APM (sistemas A vs. D y G vs. J).

En ausencia de APM, la formación de pigmentos pardos se produce por la polimerización de los compuestos carbonílicos provenientes de la oxidación del sorbato (Campos y col., 1997)

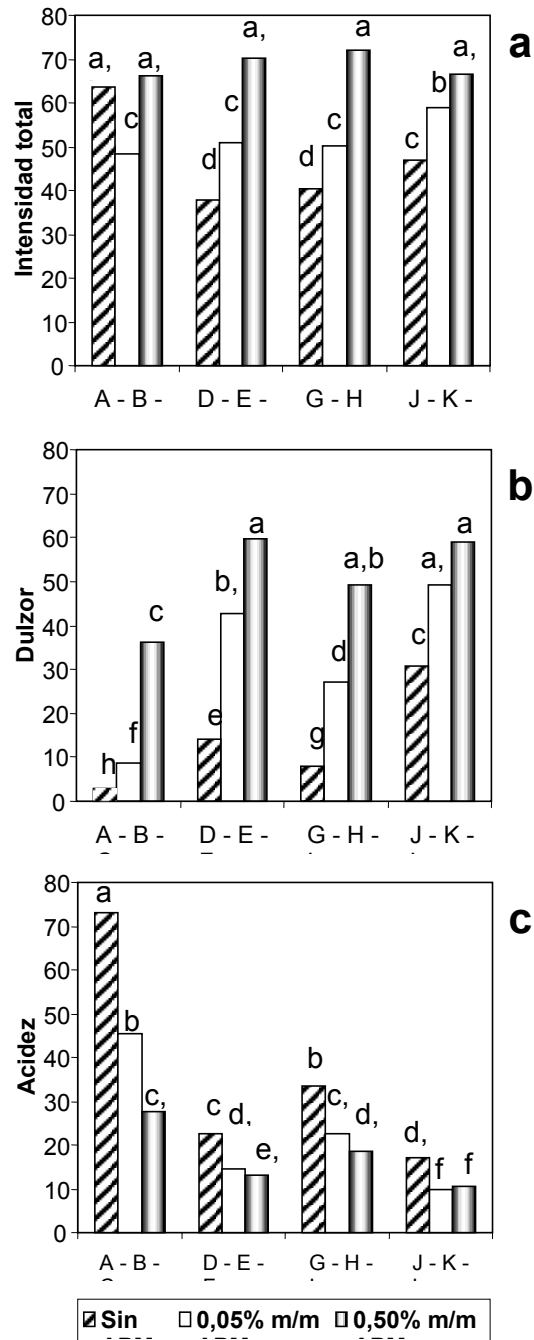


Figura 1. Intensidad total, dulzor y acidez en función del nivel de aspartamo (APM). Las barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,001$).

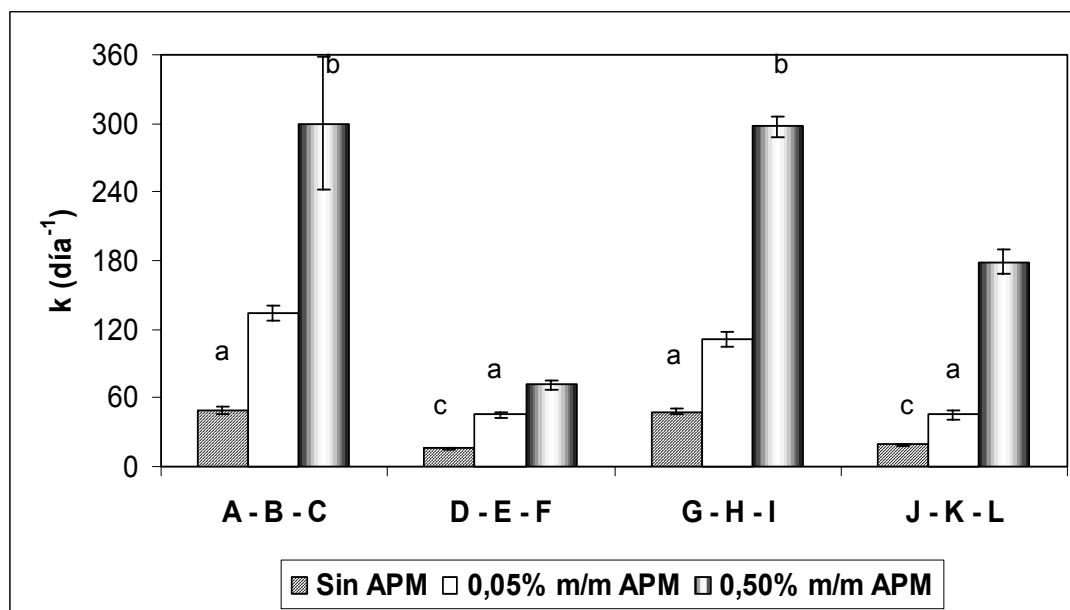


Figura 2. Constantes de velocidad del pardeamiento no enzimático en función de la concentración de aspartamo (APM). Las barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos destacan la importancia de seleccionar adecuadamente el tipo y la concentración de edulcorantes a emplear en la formulación de productos de bajo tenor glucídico.

BIBLIOGRAFÍA

Buera, M.P., Petriella, C. and Lozano, R.D. 1985. Definition of colour in the non-enzymatic browning. *Die Farbe*, 33; 316-326.

Campos, C.A., Alzamora S.M. y Gerschenson L.N. 1997. Sorbate destruction and non-enzymatic browning in model aqueous systems. *Food Sci and Tech Int*, 3, 405-411.

Schifferstein, H.N.J. 1995. Perception of taste mixtures. En R.L. Doty (Ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation* (pp. 689-713), Nueva York, Marcel Dekker, Inc.

Gliemmo, M.F., Campos, C.A. and Gerschenson, L.N. 2001. Interaction between potassium sorbate and aspartame in aqueous model sugar systems. *J Food Sci* 66, 3: 428-431.

Gliemmo, M.F., Campos, C.A. and Gerschenson, L.N. 2004. Effect of sweet humectants on stability and antimicrobial action of sorbates. *J Food Sci* 69, 2: 39-44.

Stamp, J.A., Labuza TP. 1983. Kinetics of the maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperatures. *J Food Sci* 48(2):543- 547.

AGRADECIMIENTOS

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

APLICACIÓN DE UN PROGRAMA DE COMPUTACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CURVAS INTENSIDAD-TIEMPO (I-T) MÚLTIPLES

¹COSSALTER, Rodolfo, ²TAMASI, Olga, ¹GARRIDO, Delia y ²CALVIÑO, Amalia.

¹Cátedra de Matemática, ²Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA, CONICET, Junín 956, (1113), Buenos Aires.. Tel: (05411)-4964-8280 Fax: (05411)-4508-3645. E-mail: acalvino@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Los registros I-T establecen las variaciones de la intensidad de una propiedad sensorial en función del tiempo. Para averiguar la respuesta sensorial dinámica a múltiples exposiciones a un producto se desarrolló un programa de computación (TIM.exe) que determina cuatro curvas I-T múltiples (curvas ITM).

Señales sonoras indican cuando comenzar a probar la muestra, eliminar el contenido bucal (tiempo de degustación: 5 segundos) y probar la siguiente muestra (pausa entre estímulos: 30 segundos). Mientras se desliza el 'mouse' una barra iluminada en la pantalla del monitor indica la intensidad. TIM.exe captura los datos transformándolos al rango de intensidades [0-100] y los almacena en un archivo ASCII que permite analizarlos posteriormente por cualquier otro programa tipo Excel[®] o GraphPad Prism[®]. La velocidad de muestreo y el tiempo al que suenan las señales se fijan previamente, según las propiedades que resulten de interés evaluar en el alimento. Se analizan curvas ITM de dulzor de dextrosa en solución alcohólica obtenidas aplicando TIM.exe.

Palabras Clave: curvas intensidad-tiempo múltiples- recolección computarizada de datos- propiedades sensoriales

ABSTRACT

Time-intensity (TI) evaluations establish the variations of intensity over time. To increase the dynamical information a software was developed, (TIM.exe), which may be used to obtain four successive registrations (curves TIM).

Sound signals prompted to begin the tasting process, to spit the mouth contents (tasting time: 5 seconds) and tasting the following sample (setting 30 seconds between successive stimuli). As the assessor drives the mouse, an illuminated bar on the computer screen follows its movement. TIM.exe captures the data transforming it linearly into the intensity range [0-100]. Then, it saves it in an ASCII file readable by any other software as Excel[®] or GraphPad Prism[®]. The rate of sampling and the time at which the computer prompts

the judge to spit are fixed previously according to the attributes of the food requiring TI evaluation. Data are analyzed from sweetness ITM curves of dextrose in alcoholic solution obtained by TIM.exe

Key Words: time-intensity curves- computerize data collection- multiple recordings- sensory attributes

INTRODUCCIÓN

La percepción del aroma, flavor, gusto y astringencia de los alimentos es dinámica (Pionnier y col., 2004; Drobna y col., 2004; Calviño y col., 2004). En otras palabras, estas propiedades sensoriales sufren cambios de intensidad con el transcurso del tiempo. Este comportamiento dinámico de la respuesta sensorial permite registrar, continuamente, las variaciones de intensidad percibida con el tiempo (curvas I -T).

Para el registro de curvas I -T se utiliza, en la actualidad, procedimientos completamente computarizados, que reemplazaron, paulatinamente en las últimas dos décadas, a los primitivos sistemas electromecánicos de recolección de datos (Birch y Munton, 1981).

El procedimiento básico para obtener curvas I-T administra a evaluadores previamente entrenados (Peyvieux y Dijksterhuis, 2001) la muestra del producto, y, a partir del instante en que lo prueba registra simultáneamente la intensidad percibida y el tiempo transcurrido. El tiempo es registrado por la computadora y el evaluador marca la intensidad que percibe sobre un instrumento interconectado con ella, que generalmente es un mouse. Este sistema facilita la recolección y el análisis de curvas I-T (ASTM, 1998; Garrido y col., 1999, Bolini-Cardello, 2004).

Tradicionalmente, las curvas IT comprenden una única exposición al estímulo en estudio. Una variante de esta metodología permite evaluar, continuamente, cómo cambia cada propiedad sensorial durante múltiples ingestas. Las curvas IT múltiples (curvas ITM) han permitido precisar los cambios temporales en la percepción de amargo y astringente (Guinard y col., 1986; Courregelongue y col., 1999).

En el presente trabajo se analiza a) el equipamiento para registrar adecuadamente las curvas ITM, la escala de medición empleada y el programa de registro TIM.exe, b) la información obtenida a partir de curvas ITM de dulzor.

MATERIALES Y MÉTODO

1. EQUIPAMIENTO

Se emplea un equipo cuyos mínimos requerimientos son: una computadora personal con procesador 80286 o superior, 640 Kbytes de memoria RAM, monitor gráfico y un mouse.

Con TIM.exe, la velocidad de muestreo de los datos se configura previamente. El programa probado con curvas experimentales de dulzor recoge 10 datos por segundo, midiendo los valores del tiempo en centésimas de segundo. El diseño permite realizar cuatro registros sucesivos. Se estableció un tiempo de degustación de 5 segundos y 30 segundos entre estímulos sucesivos.

2. ESCALA DE MEDICIÓN

En el presente protocolo se trabajó con una escala de intensidades de 0 a 100, con cinco marcas correspondientes a los valores: 0, 25, 50, 75 y 100. Como entrenamiento del panel se realizaron pruebas triangulares que aseguraron la discriminación entre ambos niveles de dulzor.

3. CARACTERÍSTICAS DEL PROGRAMA TIM.EXE

TIM.exe se diseñó en lenguaje Turbo Pascal y su diagrama de flujo se indica en la Figura 1. La interfase gráfica de TIM.exe es una barra iluminada en el monitor, contenida en un rectángulo de 20 pixeles de alto y más de 600 de ancho. La posición del extremo derecho de la barra es variable y solidaria con los movimientos del evaluador sobre el mouse.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se fijaron ingestas a los 0, 30, 60 y 90 segs., y suenan breves pitidos a los 5, 35, 65 y 95 segs. respectivamente para indicarle al evaluador que expulse el contenido bucal. Al completar cada registro ITM el evaluador se enjuaga con agua destilada. Completaron la tarea 9 jueces entrenados que evaluaron por duplicado soluciones al 4,2 y 8,4% P/V de dextrosa en alcohol al 8% V/V.

5. INFORMACIÓN QUE SE OBTIENE CON LAS CURVAS I-T MÚLTIPLES

En la Figura 2 se detallan diversos conjuntos de parámetros extractados de las curvas ITM. Estos parámetros que se agregan a los ya conocidos para curvas IT simples permiten establecer los cambios de intensidad secuenciales y la cinética de la propiedad sensorial en estudio de forma más completa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de curvas múltiples implica que cada evaluador sorba alícuotas del mismo estímulo ignorando si el estímulo es similar o no al precedente para obviar sesgos por interpretaciones o expectativas del evaluador. Las curvas ITM de dulzor tuvieron una duración total variable entre 110 y 170 segs dependiendo del evaluador.

La Figura 3 muestra registros ITM individuales confirmando, que al igual que en las curvas IT simples cada panelista registra una secuencia de curvas distintiva, cuyo trazado puede equipararse a su firma (Peyvieux y Dijksterhuis, 2001).

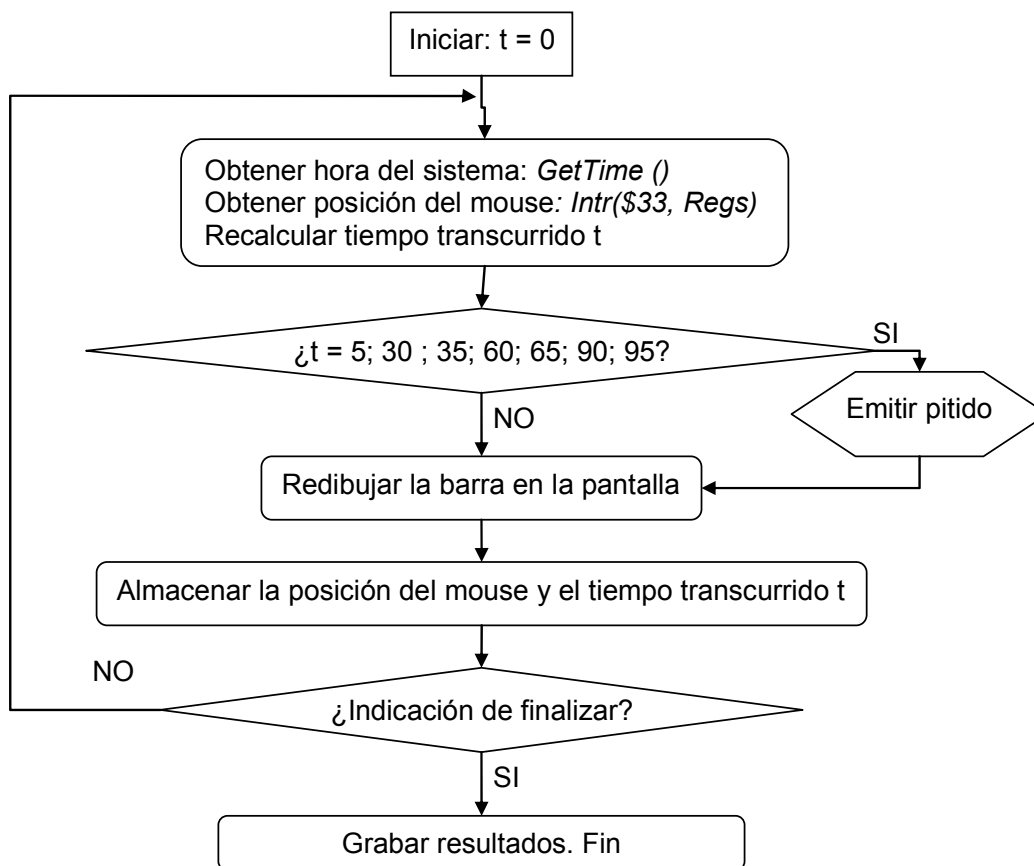


Fig 1 . Diagrama de flujo correspondiente al programa TIM.exe

Imax: es la máxima intensidad que alcanza cada curva.

Imin: es la mínima intensidad que alcanza cada curva antes del siguiente sorbo.

Tmax: es el tiempo al que se alcanza la intensidad máxima de cada curva.

Velocidad de aparición (A): es la velocidad de crecimiento de la propiedad en estudio.

Se calcula como $[(Imax_{n+1} - Imin_n)/(Tmax_{n+1} - Tmin_n)]$.

Velocidad de desaparición (B): es la velocidad de extinción de la propiedad en estudio.

Se calcula como $[(Imin_{n+1} - Imax_n)/(Tmin_{n+1} - Tmax_n)]$.

Incremento de intensidad en cada sorbo (C): es el rango de Intensidad desde el valle de una curva hasta el pico máximo de la siguiente. Se calcula como $(Imin_n - Imax_{n+1})$.

Variación de intensidad máxima entre sorbos (D) es la variación de Imax entre curvas sucesivas. Se calcula como la $(Imax_{n+1} - Imax_n)$.

Otros parámetros susceptibles de medirse son:

I110", I120", etc. consiste en registrar la intensidad a 110 ó 120 segundos.

Area debajo de cada curva: es la que queda comprendida entre el valle de una curva hasta el valle de la siguiente.

Tmax corregido: es el tiempo en que se alcanza el máximo luego de cada sorbo. Se calcula como la diferencia entre cada Tmax y 0, 30, 60 o 90 segundos dependiendo de la curva que se trate.

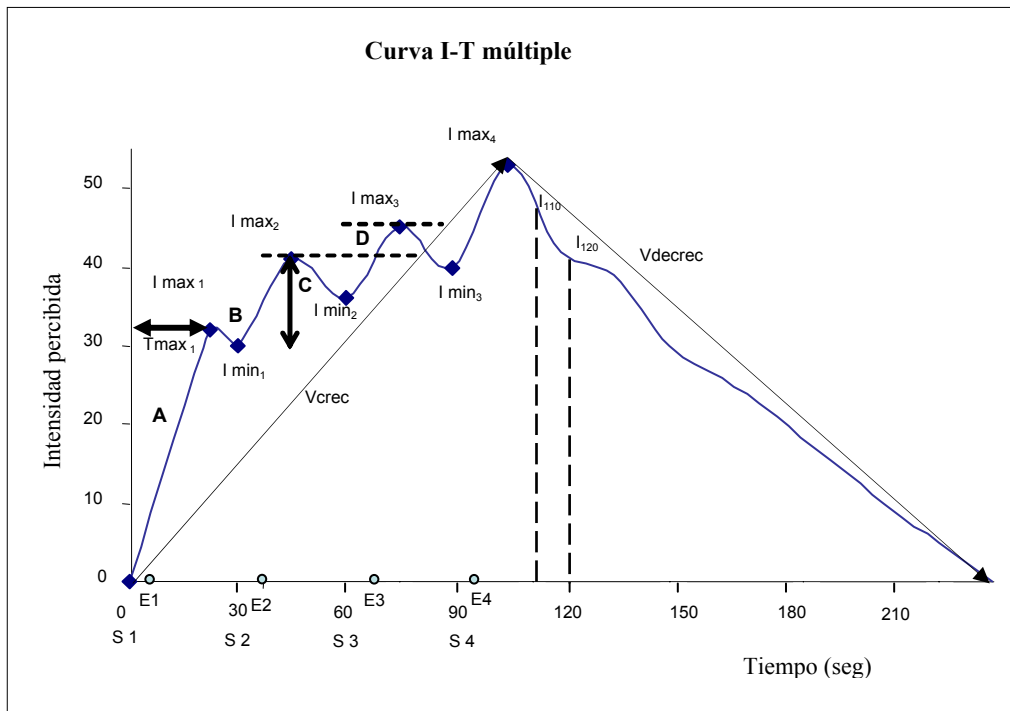


Fig. 2 Se muestra un trazado típico de curvas I-T múltiples indicando con S los momentos de sorber el estímulo y con E los momentos de eliminarlo. En el gráfico se presentan diversos parámetros

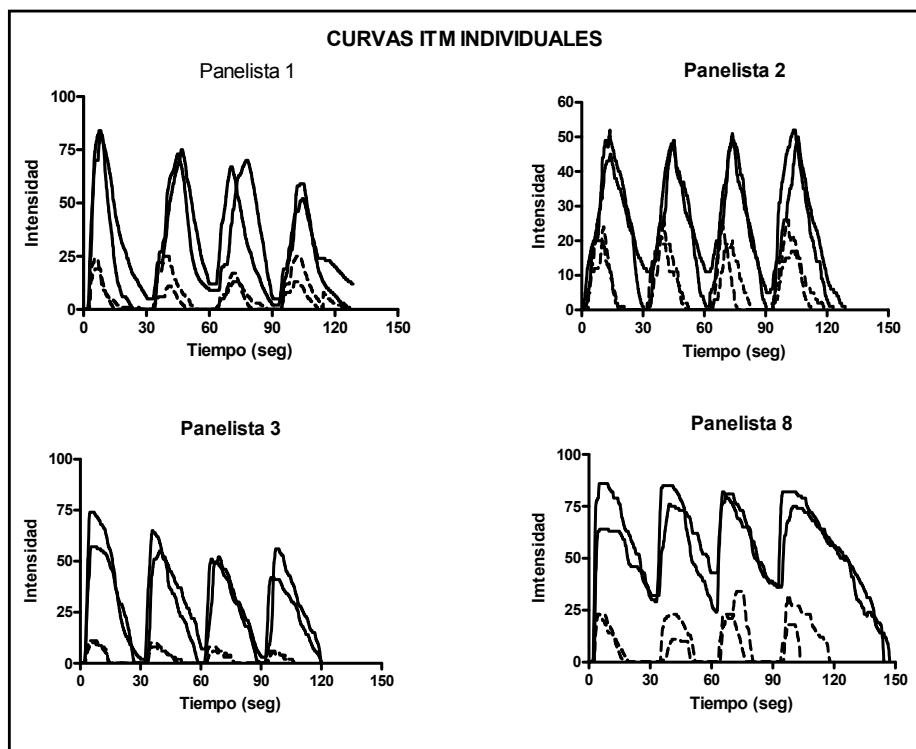


Fig. 3. Curvas ITM individuales obtenidas por evaluación de dextrosa al 4,2 (-----) y 8,4% P/V de dextrosa en alcohol al 8% V/V (—).

En la Tabla I se presentan los valores promedio de los parámetros obtenidos de las curvas ITM de dulzor indicando aquellos que varían entre curvas sucesivas. Se observa que tanto la intensidad máxima de dulzor como la velocidad de crecimiento (aparición) es mayor en el primer sorbo que en los subsecuentes, sin alcanzar a comprobarse el fenómeno de adaptación ya que no se observaron diferencias significativas ni en la intensidad ni en la cinética de dulzor del segundo al cuarto sorbo.

Tabla I Parámetros extraídos de las cuatro curvas it múltiples

PARAMETRO	Dextrosa 8,4 % P/V*			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
I_{max}	66,44 ^a ±7,93	61,06 ^b ±9,29	62,67 ^b ±8,06	59,11 ^b ±9,81
Incr I/sorbo		45,9±10,03	45,1±7,23	40,5±7,47
Dif I_{max}	-5,39±4,30	1,61±5,08	-3,56±3,72	
I_{min}	15,17±5,74	17,61±7,10	18,61±7,90	
Area	1167±169	1160±195	1198±249	1290±360
T_m corregido	8,18 ^a ±1,75	10,05 ^b ±2,28	8,75 ^{a,b} ±1,85	9,56 ^{a,b} ±2,18
V_{aparición}	13,66 ^a ±3,36	5,91 ^b ±1,86	6,56 ^b ±1,73	5,18 ^b ±1,73
V_{desaparición}	-2,35±0,45	-2,22±0,54	-2,18±0,40	-2,05±0,37
	Dextrosa 4,2 % P/V*			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
I_{max}	52,56 ^a ±12,66	47,44 ^b ±13,57	43,06 ^b ±12,86	40,44 ^b ±13,79
Incr I/sorbo		37,2±10,66	33,0±10,69	32,3±11,02
Dif I_{max}	-5,11±3,87	-4,39±3,68	-2,61±2,41	
I_{min}	10,22±6,37	10,06±5,15	8,17±5,79	
Area	834±244	825±270	728±268	784±417
T_m corregido	8,04±1,58	9,42±1,67	9,08±1,69	8,32±1,94
V_{aparición}	11,29 ^a ±4,17	3,79 ^b ±1,39	4,57 ^b ±2,09	4,35 ^b ±2,37
V_{desaparición}	-2,23±0,54	-1,94±0,58	-1,89±0,55	-1,73±0,52

*Se indican los valores promedio \pm 2 error estándar. Los valores promedio con distinta letra indican diferencia significativa, en cada nivel, ($p < 0,05$). Test LSD

CONCLUSIONES

Con este programa se describe la respuesta sensorial en forma más cercana a la realidad, simulando una situación de ingesta. Al utilizar esta metodología es posible evaluar si hay adaptación por disminución de la intensidad máxima (I_{max}) del primero al cuarto sorbo del mismo producto ($I_{max_4} < \dots < I_{max_1}$) o sensibilización a estímulos sucesivos ($I_{max_1} < \dots < I_{max_4}$). También es factible averiguar que tendencias adoptan las velocidades de aparición y desaparición de la sensación al estimular sucesivamente con el mismo producto o conocer el efecto de estímulos sucesivos de un producto sobre la cinética de la sensación ante otro producto.

BIBLIOGRAFÍA

ASTM (1998) Standard guide for time-intensity evaluation of sensory attributes. E1909. American Society for testing and Materials, 14 págs.

Birch G.G. y Munton, S.L . (1981). Use of the “SMURF” in taste analysis, *Chemical Senses*: 6, 45-52.

Bolini-Cardello, H.M.A., Silva, M.A.A.P. da, Damasio, M.H., Lobao, F. (2004). Time-intensity data collect system software. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia y Tecnologia de Alimentos*, 37, 54-60.

Calviño, A.M., Gonzalez Fraga, S., Garrido, D. (2004). Effects of sampling methodology on temporal perception of bitterness in Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J. Sensory Studies*, 19(3), 193-210.

Courregelongue, S., Schlich P. y Noble, A. C. (1999). Using repeated ingestion to determine the effect of sweetness, viscosity and oiliness on temporal perception of soymilk astringency. *Food. Qual. Preference*, 10, 273-279.

Drovna, Z., Wismer, W.V. y Goonewardene, L.A. (2004). Selection of an astringency reference standard for the sensory evaluation of black tea. *J. Sensory Studies*, 19, 119-132.

Garrido, D., Cossalter, R. y Calviño, A.M. (1999). Metodología computarizada para el registro tiempo-intensidad de atributos sensoriales de alimentos. *Revista Internacional. Información Tecnológica*, 10, 15-20.

Guinard, J. X., Pangborn, R. M. y Lewis, M. (1986). Effect of repeated ingestion on temporal perception of bitterness in beer. *A. S. B. C. Journal*, 44, 28-32.

Peyvieux C. y Dijksterhuis G.. (2001). Training a sensory panel for TI: a case study, *Food Quality and Preference*, 12, 19-28.

Pionnier, E., Nicklaus, S., Chabanet, C., Mioche, L., Taylor, A.J., Quere, J.L. y Salles, C. (2004). Flavor perception of a model cheese: relationships with oral and physicochemical parameters. *Food Qual. Pref.*, 15, 843-852.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con fondos del Proyecto B039 de la Programación UBACYT 2004-2007.

CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE TAMALES Y DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE SENSORIAL PARA ESTABLECER LA VIDA ÚTIL

GENEROSO, Silvina M.¹; RODRÍGUEZ, Silvia del C.¹; YEANNES, María I.²

1) ICyTA-FayA-UNSE. 2) CONICET, UNMDP.

Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria. Av. Belgrano (S) 1912. (4200) Santiago del Estero. E-mail: silviadepece@hotmail.com

RESUMEN

El tamal es un alimento, constituido por harina de maíz, carne, zapallo y condimentos.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar sensorialmente al tamal y determinar el punto de corte sensorial (PCS), para establecer la vida útil (VU) del mismo. Para tal fin se usaron tamales conservados a -5 y 5 °C. Para caracterizarlo sensorialmente se usó el Análisis Descriptivo Cuantitativo. La estimación de la VU se realizó por correlación de resultados de aceptabilidad (35 consumidores), paneles entrenados y determinaciones de índice peróxido.

Se obtuvieron 15 descriptores. La VU estimada, con el PCS determinado, resultó ser de 1 y 3 días a 5 y -5 °C respectivamente, sin embargo la VU estimada por aceptación o rechazo fue de 4 y 8 días. La VU en base al PCS señaló el primer momento en que los tamales difieren de aquel del tiempo cero, pero siguen siendo aceptables.

Palabras clave: Tamales, vida, útil, caracterización sensorial

ABSTRACT

The tamale is a food constituted for corn flour, meat, pumpkin and condiments.

The objective of this work was characterize sensorially the tamale and determine the sensorial cut point (PCS), to set the VU of it. Tamales stored to -5 and 5°C were used. In order to characterize it sensorially the Quantitative Descriptive Analysis was used. The estimation of the VU was made by correlation of acceptability results (35 consumers), trained panels and determinations of peroxide index.

Fifteen 15 descriptors were obtained. The estimated VU with the determined PCS, were 1 and 3 days to 5 and 5°C respectively, but the estimated VU for acceptance or refuse were of 4 and 8 days. The VU in bases to PCS marked the first moment in which the tamales differ in the zero time, but it follow being acceptable.

INTRODUCCION

El tamal es un alimento tradicional del norte de Argentina, también habitual en distintos países de Latinoamérica; se elabora en forma artesanal a partir de harina de maíz, anco o zapallo y carne como principales ingredientes y se envuelve en hojas secas de la mazorca de maíz (chala).

Es un producto multicomponente, perecedero debido a su alto contenido acuoso y su elevada actividad de agua (a_w), por lo que es un medio apto para el desarrollo de microorganismos y sus características sensoriales varían en un tiempo limitado (Maldonado y col., 1999).

La determinación de la VU es de suma importancia para establecer las posibilidades de comercialización de los productos alimenticios. Daun (1993), define la vida útil como el período máximo de tiempo durante el cual los alimentos retienen sus atributos de calidad predeterminados.

Según Taoukis y Labuza (2000) hace falta una medida de pérdida de calidad, un valor de corte de la pérdida de la misma, el orden de la reacción para predecir el tiempo para llegar al punto de corte y medidas experimentales de esta pérdida a por lo menos dos temperaturas.

La evaluación de la calidad puede llevarse a cabo por distintos métodos, sin embargo dado que el consumidor es el último juez de la calidad, la mayoría de los métodos químicos o instrumentales deben correlacionarse con la evaluación sensorial, constituyendo esta última una parte importante de todo estudio de VU de un alimento.

El Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA), desarrollado por Stone y col. (1974), proporciona una descripción detallada de las características sensoriales en forma cuali y cuantitativa (Damasio y Costell, 1991) permitiendo efectuar estudios de almacenamiento.

Sin embargo en los estudios de vida útil no es menos importante el estudio de la aceptabilidad del producto mediante consumidores, las razones de su uso se basan en cuanto puede variar un producto sin que afecte la aceptabilidad por parte del consumidor. Este concepto se torna aún más importante cuando se trata de alimentos tradicionales o bien alimentos de los que el consumidor tiene un juicio o una concepción preformada.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar sensorialmente al tamal y determinar mediante correlación entre evaluadores y consumidores el punto de corte sensorial (PCS) con el propósito de establecer la vida útil de este alimento.

MATERIALES Y METODOS

A fin de determinar la vida útil del tamal resultó necesario conocer las características y los atributos sensoriales. La caracterización sensorial, se realizó en tamales elaborados en la provincia de Santiago del Estero.

Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA)

Debido a que el tamal es un alimento multicomponente formado por chala, masa y relleno, se evaluó el producto íntegro y cada una de sus partes. Las etapas de trabajo fueron: 1) reclutamiento, selección y entrenamiento de evaluadores, Norma 20005-1 (IRAM, 1996), 2) búsqueda de descriptores para redactar un glosario de términos apropiados, 3) medición de intensidad de atributos en la planilla redactada y acordada en sesiones previas, la intensidad se midió sobre escalas no estructuradas de 10 cm ancladas en los extremos. Las pruebas definitivas de medición de intensidad de atributos, se efectuaron utilizando tamales obtenidos de un mismo lote de elaboración.

Las pruebas, se llevaron a cabo en la Planta Piloto de Alimentos de la FAyA, el local fue acondicionado, según Norma 20003 (IRAM, 1995). La temperatura del producto fue de 67 ± 1 °C (temperatura de consumo) mantenidos en recipientes de telgopor con tapa. Se usó como neutralizante, agua gasificada a 5 °C. Se seleccionaron ocho jueces. Para el desarrollo de descriptores, durante 6 sesiones y con la ayuda del líder de panel y una planilla orientativa, Norma 20001 (IRAM, 1995), los evaluadores verbalizaron sus impresiones respecto de los diferentes tamales presentados.

Para la medición de intensidad de atributos, se realizaron 4 sesiones. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza: muestra y evaluadores. Fueron comprobados los presupuestos del análisis paramétrico.

Para determinar el PCS, las muestras conservadas a -5 ° y 5 °C fueron sometidas al juicio de evaluadores y consumidores. Se seleccionaron 35 consumidores en base a encuestas previas conformando un grupo de adultos de entre 25 y 50 años con 50% de hombres y 50 % de mujeres, consumidores habituales del producto, los que manifestaron el nivel de agrado en una escala estructurada de 9 puntos y respondieron a la pregunta "¿lo consumirían?".

En tanto, los evaluadores merituaron el atributo de 0 a 10, según se incrementa el sabor rancio en los tamales.

El muestreo fue escalonado y todas las muestras se juzgaron el mismo día. Diariamente se determinó el índice de peróxido de los tamales en estudio, según Norma 5-551 (IRAM, 1983), expresándose los resultados en meq O₂/ Kg de grasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la caracterización sensorial del tamal por QDA se obtuvo una lista de 25 descriptores. Se eligieron los directamente relacionados con el propósito del estudio (influencia del almacenamiento en la calidad sensorial), se eliminaron los de significado similar y los usados con frecuencia inferior al 40% (Lion, 1987; Damasio y Costell, 1991), quedando seleccionados 15.

Los descriptores fueron representados en un gráfico polar (Figura 1). Los descriptores sabor y olor típico ostentan un valor absoluto mayor que otros, lo que indicaría la importancia de la evaluación sensorial de este producto ya que no es posible cuantificar por otra metodología analítica estas variables.

Se puede inferir la importancia que los evaluadores otorgan a los atributos aspecto y apariencia dado que los describen con 6 descriptores (40%), sobre el total.

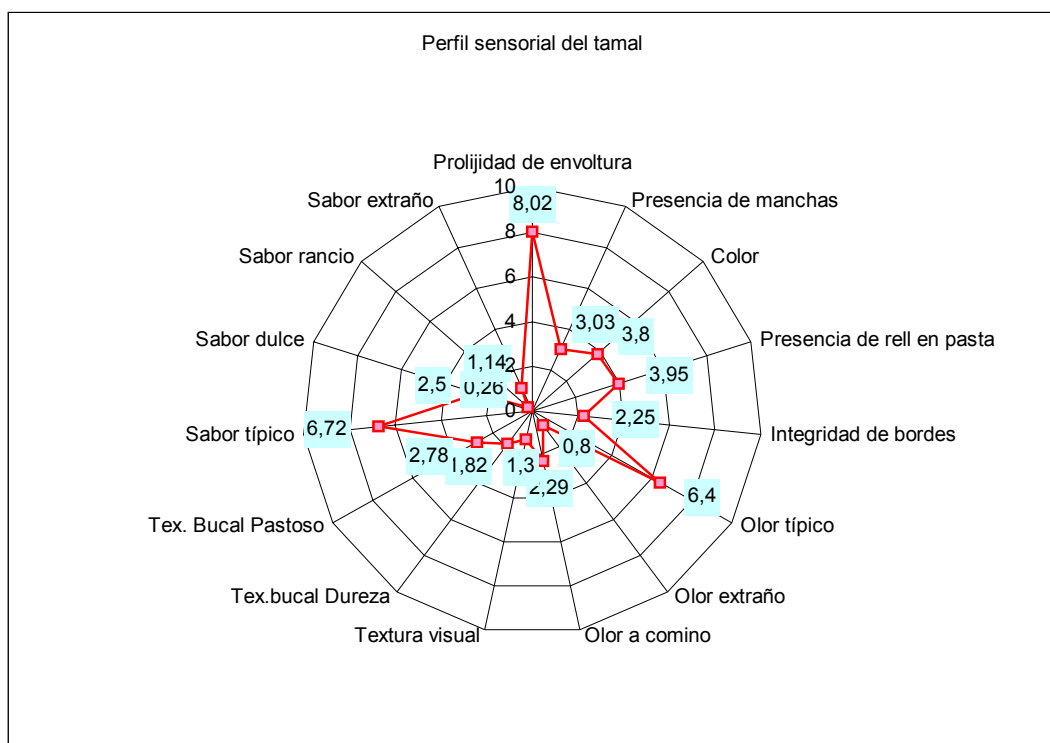


Figura 1. Gráfica polar del perfil sensorial del tamal

Determinación de punto de corte

De acuerdo a lo sugerido por Hough (2003) a fin de determinar el PCS, punto de percepción máxima aceptable, se realizó una correlación entre datos obtenidos a partir de ensayos con consumidores (Y) y evaluadores (X), obteniéndose las siguientes correlaciones: $y = -2,2151x + 9,3144$ ($R^2 = 0,9069$) y $y = -4,0022x + 9,8413$ ($R^2 = 0,9597$) para -5 y 5 °C (Figura 2).

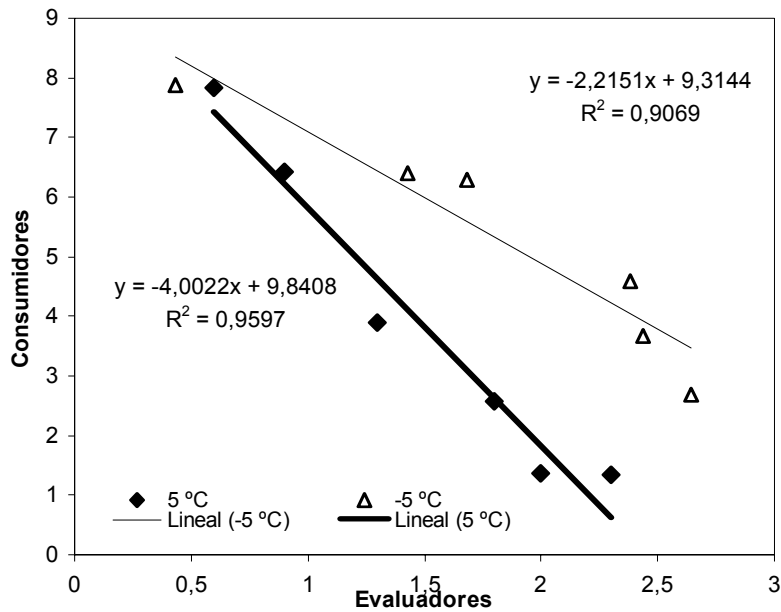


Figura 2. Correlación de valores de aceptabilidad (consumidores) vs. puntaje otorgado por un panel de evaluadores a una misma serie de tamales conservados a -5 °C.

Para determinar el PCS en ambos casos, se calculó la mínima diferencia significativa para consumidores, valor que se restó al promedio del expresado por los consumidores en tiempo cero, con este resultado (y_a) y las ecuaciones anteriores se encontraron los valores al que los evaluadores los perciben diferentes al tiempo cero (x_e). Se graficó medida de sabor rancio (evaluadores) en función del tiempo (Figuras 3 y 4), obteniéndose el PCS al ingresar a los gráficos con el valor x_e en el eje Y. En la tabla 1 se muestra el PCS definido en base a esta correlación.

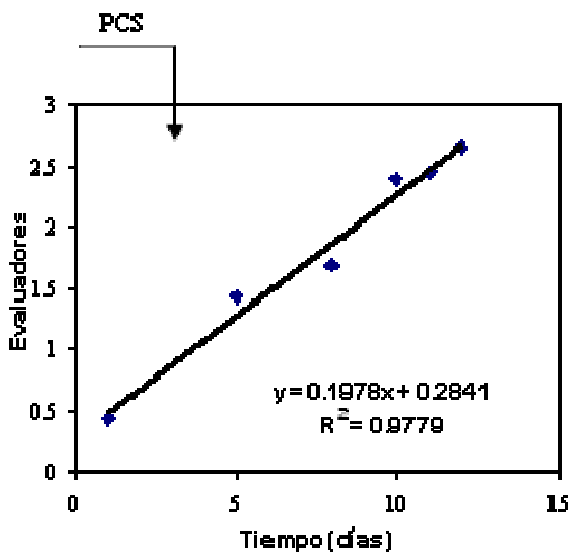


Figura 3: Percepción sensorial de evaluadores respecto de tamales almacenados a -5 °C en función del tiempo

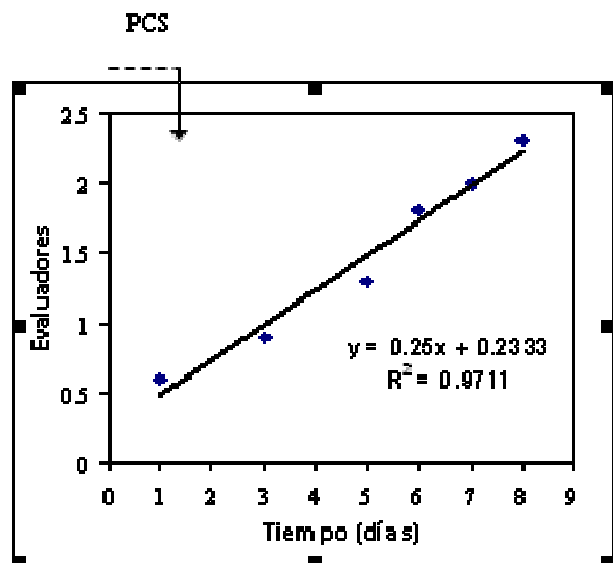


Figura 4: Percepción sensorial de evaluadores respecto de tamales almacenados a 5 °C en función del tiempo 458 de almacenamiento.

Tabla 1: Vida útil sensorial determinada en base al PCS a las temperaturas de almacenamiento 5 °C y – 5 °C.

Temp. de ensayo	DMS	Evaluadores	Vu sensorial
-5 °C	0,6228	0,928	3,25 días
5 °C	0,4997	0,623	1,55 días

DMS: diferencia mínima significativa

Se realizó también una correlación entre el punto de corte y los resultados de Índice peróxido (IP) (Tabla 2). Con lo que se puede inferir que la aceptabilidad es independiente del valor de IP determinado químicamente ya que tanto con 3.01 y /o con 1.57 igualmente son aceptados.

Los tamales son diferentes a tiempo 0 luego de almacenados 1 día a 5°C o luego de ser conservados 3 días a – 5°C. Sin embargo son aceptados hasta el día 4 u 8 lo que estaría indicando que el consumidor juzga en forma integra al producto y no se remite únicamente al sabor.

Según la tabla estadística para pruebas de preferencia (Pedrero y Pangbord, 1989), el número mínimo para establecer significancia para 35 consumidores es de 28 juicios afirmativos ($p > 0,001$) lo que se verifica hasta el día 8 de almacenamiento para – 5 °C y 4 para 5 °C (Tabla 3 y 4).

Tabla 2: Resultados de Índice de peroxido determinado en tamales almacenados a 5 y a – 5 °C

Tiempo (días)	IP -5 °C	Tiempo (días)	IP 5 °C
0	1.36	0	1.36
3.25	1.55	1.55	1.75
8	1.57	4	3.01

Tabla 3. Respuestas de aceptación y valores promedios de agrado expresados por los consumidores respecto de tamales almacenados a -5°C .

Días	N. de agrado	Aceptabilidad Si consumirían	N° de cons.
1	7,80	34	35
5	6,40	32	35
8	6,28	32	35
10	4,60	18	35
11	3,68	10	35
12	2,68	0	35

Tabla 4. Aceptación y promedio de agrado manifestado por los consumidores respecto de tamales almacenados durante 8 días a 5°C .

Días	N. de agrado	Aceptabilidad Si consumirían	N° de cons.
1	7,82	28	36
2	7,86	28	36
3	6,41	26	36
4	7,02	30	36
5	3,88	0	36
6	2,57	6	36
7	1,37	0	36
8	1,34	0	36

CONCLUSIONES

En cuanto a los resultados de vida útil, no hay coincidencia entre el punto de corte y el rechazo medido por los mismos consumidores. El punto de corte señala el primer momento en que disminuye la aceptabilidad con respecto a los tamales frescos. Sin embargo los consumidores los siguen considerando aceptables.

BIBLIOGRAFÍA

- Damasio, M. y Costell, E. 1991.** Análisis sensorial descriptivo: Generación de descriptores y selección de catadores. Rev. Agroquímica. Technol. Aliment. 31/2: 165-178.
- Daun H. 1993.** 'Introduction', in Charalambous G, *Shelf-life studies of foods. The meaning of shelf-life 187 and beverages Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B V, ix-x.
- Generoso, S. 2005.** Caracterización y evaluación de un alimento multicomponente. Determinación del tiempo de vida útil en diferentes condiciones de conservación. Tesis doctoral. Posgrado en Red de Universidades. UNSE.
- Hough, G. 2003.** Conferencia: Vida útil sensorial, aspectos prácticos de su determinación. Simposium Iberoamericano de análisis sensorial Sensiber 2003. 19 al 21 de Marzo. Montevideo, Uruguay. Organizado, Sección Evaluación Sensorial, Facultad de Química. Auspiciado por CYTED.
- IRAM, 1983.** Grasas animales y vegetales. Método de determinación del índice peróxido. Norma 5-551
- IRAM. 1995.** Análisis Sensorial. Guía para la instalación de locales de ensayo. Norma 20003.18 pág.

IRAM. 1995. Análisis Sensorial. Vocabulario. Norma 20001.

IRAM. 1996. Equivalente a ISO 8586-1: 1993, Análisis Sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte 1- Evaluadores seleccionados. Norma 20005-1

Maldonado , A.; Generoso, S.; Macias, S.; Rosas, D. y Rodríguez, S. 1999. Elaboración artesanal de tamales. Propuestas de optimización para prolongar su vida útil. VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 13 al 15 de Mayo. Rafaela. Santa Fé. Argentina. Libro de resúmenes. Pag: 146.

Pedrero, D. y Pangborn, R. 1989. *Evaluación Sensorial De Los Alimentos. Métodos Analíticos.* Primera Edición. Editorial Alambra Mexicana. México D.F. Pag. 250.

Taoukis, P.; Labuza, T. 2000. Resumen: Integración Conceptual. En Química de los Alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

ANALISIS SENSORIAL Y ACEPTABILIDAD DE UN PATE DE OVEJA

MARTÍNEZ, Sandra L.; GENEROSO Silvina M.; PAZ María; GARCÍA Luis, CORIA, Gabriela

Planta Piloto de Procesamiento de Alimentos. ICyTA. FAYA. UNSE. Av. Belgrano (s) 1912. (4200) Santiago del Estero. Argentina sandram@unse.edu.ar

RESUMEN

El auge de la actividad ovina justifica desarrollar productos derivados. El hígado es fuente de hierro hemínico, por lo que diseñar un paté resulta apropiado y por tratarse de un nuevo alimento, se impone el análisis sensorial.

El objetivo fue desarrollar patés con distintos tenores grasos elaborados con hígado de oveja y determinar el nivel de agrado, para seleccionar la formula de mayor preferencia.

Se elaboraron teniendo en cuenta BPM. Se ensayaron tres formulaciones diferentes en contenido graso, el nivel de agrado se determinó mediante test Hedónico con escala estructurada, escogiéndose 35 personas entre 20 y 50 años de ambos sexos. Se correlacionaron los resultados de aceptabilidad con los de pruebas triangulares.

Se prefirieron las formulaciones con 30 y 40 % de grasa, las mismas presentaron una aceptabilidad media del 4,1 y de 4,2 respectivamente. Posteriormente se sometieron a pruebas triangulares, mediante evaluadores entrenados, determinándose que no hay diferencias significativas. Se concluye que los productos con 30 y 40 % de contenido graso son aceptables.

Palabras Claves: Pate, ovejas, evaluación sensorial, paneles entrenados.

ABSTRACT

The peak of the ovine activity justifies the development of derived products. The liver is an heminic iron source, so the development of a paté is appropriated. Because it's a new food, the sensorial analysis is imposed.

The objective was to develop different fatty tenors patés with sheep liver and to determine the level of pleasure to select the formula of more preference.

They were elaborated three different formulations keeping in mind BPM.

The level of pleasure was determined with an structured scale hedonic test and 35 people between 20 and 50 years of both sexes were chosen. The acceptability results were correlated with those of triangular tests.

The 30 and 40% formulations were preferred which presented a half acceptability of 4,1 and 4,2 respectively. The triangular tests, with trained judges, determined that there were not significant differences so, the products with 30 and 40% of fatty content were acceptable.

INTRODUCCIÓN

El paté de oveja es un alimento no tradicional en la región norte de Argentina. En el país se consume paté vacuno el que se expende en latas, en tanto que el de especies exóticas, en general, se importa. Los patés poseen en su composición como elementos mayoritarios hígado, carne y tocino condimentados con diferentes especias. Nuestro Código Alimentario Argentino (CAA) define al paté en su Art. 416 - (Res 3678, 10.12.79) "Se entiende por Pasta de hígado (Paté de foie), a la conserva elaborada con pasta de hígado, grasa, carne vacuna, pudiendo contener leche, huevos y almidón", no estando definido aún el paté de oveja.

Es importante mencionar que este alimento no contiene TACC, según la definición del CAA (Art.1382), "alimento libre de gluten" por lo que es apto para ser consumido por enfermos celíacos, además es rico en hierro hemínico y proteínas lo que refuerza su calidad nutritiva.

Una aproximación a la calidad total debe abarcar todos los aspectos de un alimento desde su concepción, desarrollo y producción, hasta el consumo. La calidad de un alimento se puede definir como la aceptación de sus características por los consumidores, (Cardello; 1995). Actualmente, la evaluación sensorial es una parte importante a estudiar durante el desarrollo de nuevos productos.

La evaluación de la calidad puede llevarse a cabo por distintos métodos, sin embargo dado que el consumidor es el último juez de la calidad, la mayoría de los métodos químicos o instrumentales deben ser correlacionados con la evaluación sensorial. En cuanto a los ensayos de aceptabilidad, las razones de su uso se basan en analizar cuanto puede variar un producto sin que afecte la aceptabilidad.

Conocer el comportamiento del consumidor representa un reto para toda empresa que vaya a desarrollar un nuevo producto. La evaluación sensorial provee información sobre la relación producto-consumidor (Pedrero; 2003). Sin embargo resultan no menos importantes las pruebas discriminativas, mediante paneles entrenados, particularmente útiles para detectar diferencias globales provocadas por cambios en la formulación (Meilgaard y col,1988; O'Mahony, 1995).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar patés con distintos tenores grasos elaborados con hígado de oveja y determinar el nivel de agrado para seleccionar la formula de mayor preferencia.

MATERIALES Y METODOS

Se empleó hígado de ovejas, de la provincia de Santiago del Estero, para la producción de los patés que fueron elaborados en la Planta Piloto de Procesamiento de Alimentos de la UNSE, observando BPM. Se elaboraron a base de: carne, cebolla, grasa y condimentos. El diagrama de elaboración del producto, se muestra en la Figura 1.

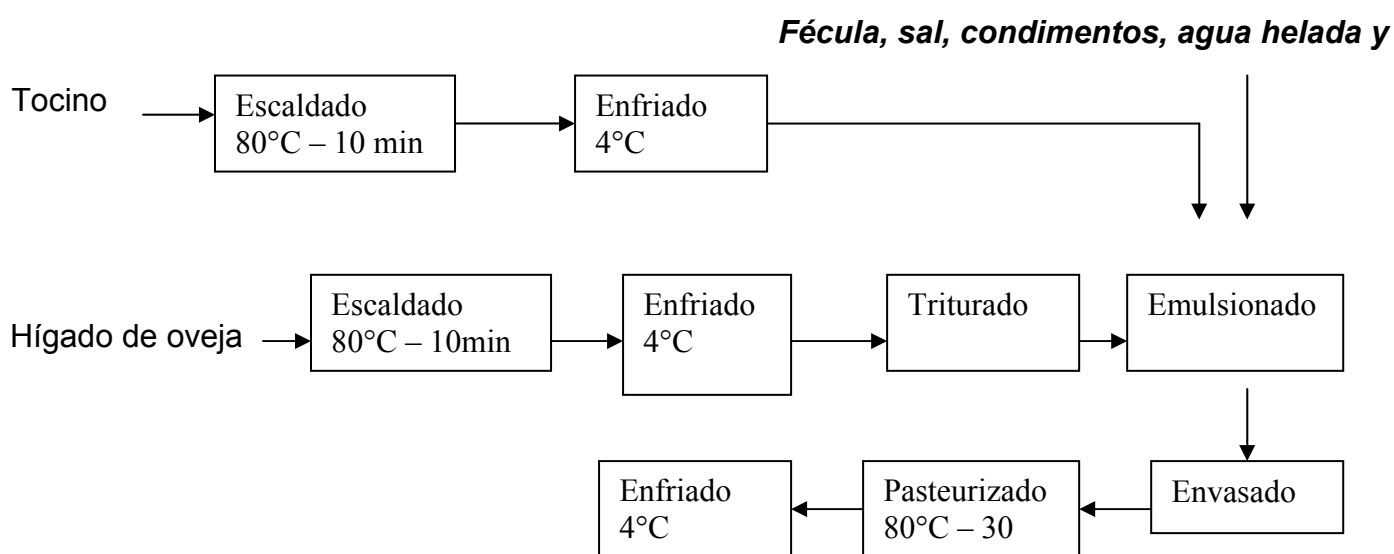


Figura 1. - Diagrama de elaboración de paté.

A fin de caracterizar al alimento se llevaron a cabo los siguientes estudios:

A cada una de las tres formulaciones de patees desarrolladas, las que se diferenciaban por el contenido en tocino se les determinó:

1- Evaluación físico-química, para caracterizar al alimento

Color: con colorímetro Minolta; pH: mediante un potenciómetro Orion SA 520, normas AOAC (1990) Sec. 981.12. Contenido de agua: normas AOAC (1990). Sec. 984.25. Cenizas. AOAC (1993). Sec. 945.46. Los resultados obtenidos en estos dos últimos casos se expresaron como g/ 100g de paté. Cloruros: método de Mohr, expresándose los resultados en mg/100g de producto.

2- Evaluación microbiológica, para testar el tratamiento térmico al que se sometió el producto. Los patees se homogeneizaron asépticamente y se realizaron determinaciones para evaluar la presencia de los siguientes microorganismos: recuento de aerobios

totales, recuento de anaerobios totales, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*), según la metodología propuesta por ICMSF(1986).

3- Evaluación sensorial, por tratarse de un alimento nuevo.

La preparación de las muestras, se llevó a cabo en un área independiente a la de la prueba, para evitar que los jueces sean influenciados por características irrelevantes. Las pruebas se realizaron en el comedor de la Planta piloto de la FAyA, en condiciones similares a las de consumo habitual.

Las tres formulaciones ensayadas se presentaron de manera idéntica y a una temperatura uniforme de 20 ± 1 °C (temperatura normal de consumo). Todas las muestras se presentaron codificadas con números de tres cifras. La degustación se realizó, untando el producto en galletitas de agua con la recomendación de circunscribirse a evaluar solamente al paté. En todos los casos se usó como neutralizante, agua a 5 °C.

3.1- Aceptabilidad Sensorial

Se midió la aceptabilidad de los patees en estudio, determinando el número de aceptaciones o rechazos de un panel de consumidores potenciales, seleccionados en base a encuestas previas. Para la selección se consideró: edad (entre 20 y 50 años) y sexo (idéntica cantidad de hombres y mujeres). Para realizar la prueba se utilizó una planilla con escala hedónica estructurada de 5 puntos.

3.2- Pruebas discriminativas

Se llevaron a cabo mediante un panel de evaluadores reclutados, seleccionados y entrenados conforme con la Norma 20005-1 (IRAM, 1996). Se realizaron pruebas de triángulo con 15 evaluadores. Las muestras fueron preparadas de tal modo de suministrar las seis combinaciones posibles, igual número de veces y se indicó, mirar, oler, tocar y degustar el producto, Norma 20002 (IRAM, 1995). Esta prueba se realizó para determinar si existían diferencias entre los patees preparados con un 30 % y un 40 % de tocino. Las muestras se sirvieron aleatoriamente por duplicado.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados de la prueba triangular se efectuó comparando el número de identificaciones correctas con el número el número mínimo de juicio correctos necesarios para establecer significancia al 95 % de probabilidad (Pedrero y Pangborn, 1989), mediante el uso de tablas estadísticas, conforme a la Norma 15129 (IRAM, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de pH como así también el contenido de humedad (Tabla 1), revelan la necesidad de someter a este alimento a métodos de preservación por calor. Por lo tanto

luego del exhausting logrado con el envasado en caliente, los frascos de vidrio se taparon y pasteurizaron, este procedimiento evitó el daño a la emulsión, por calentamiento drástico.

Tabla 1: Caracterización Físico química de los Patés

Parámetros	Pate con 40 % de grasa	Pate con 30 % de grasa	Pate con 20 % de grasa
pH	5,83	5,90	6,04
Contenido de agua(g / 100 g)	44,21	53,12	51,64
Cenizas (g/ 100g)	3,36	3,27	3,25
Cloruros (g / 100g)	0,90	0,89	0,80

Observaciones de la textura visual y pruebas microbiológicas posteriores, confirman la efectividad de la metodología seleccionada ya que los recuentos efectuados en ningún caso superaron los estándares aconsejados por la legislación, observándose que la pasteurización no afectó la textura de la emulsión; sin embargo fue necesario la posterior conservación por frío, para mantener la flora banal en los rangos admitidos, dado que se trata de una semiconserva alimenticia.

El producto alimenticio desarrollado fue caracterizado tanto por su contenido en cenizas y porcentaje de cloruros (Tabla1), como así también por su color (Tabla 2).

El color es uno de los atributos más importantes de la calidad sensorial de un alimento y pesa en diverso grado al evaluar la calidad global. Se determinaron los parámetros de color: L, a y b. Posteriormente y como el color superficial se caracteriza por tres atributos: luminosidad (L), tinte o color (HUE) y saturación o intensidad (Chroma), se calcularon estos últimos valores. En las experiencias realizadas se encontraron los valores que se detallan en la tabla 2.

Si bien el chroma de la muestra con un 20 % de contenido graso, presenta el mayor valor, no se detectaron cambios de color significativos entre las muestras restantes y por prueba de triángulo tampoco los evaluadores encontraron diferencias entre estas.

Por lo mencionado anteriormente se realizó análisis sensorial a los tres pates elaborados mostrándose en la Tabla 3 los valores obtenidos al someter a las muestras al juicio de consumidores seleccionados a tal fin.

. La muestra conteniendo un 20 % de materia grasa fue significativamente diferente en cuanto al nivel de agrado manifestado por los consumidores, en comparación con las de 30 y 40 % de contenido graso (las que resultaron de mayor agrado), razón por la cual las pruebas triangulares se realizaron sobre estas dos últimas formulaciones. Los resultados

vertidos por los consumidores sometidos al test de student, indican que no hubo diferencias significativas entre las muestras formuladas con un 30 y 40 % de materia grasa, lo que es concordante con los resultados de las pruebas de triangulo efectuadas por un panel entrenado, donde tampoco se evidencio diferencia entre las muestras estudiadas.

Tabla 2: Promedio de los parámetros del color y desviación estándar

Muestra	L	DS	a	DS	b	DS	Chroma	DS	HUE	DS
40 %	59.88	0.87	2.30	0.21	9.73	0.49	10.00	0.52	76.71	0.87
30 %	56.85	0.90	2.31	0.05	8.77	0.23	75.22	0.22	9.07	0.66
20 %	60.53	0.35	2.15	0.08	11.14	0.16	79.04	0.17	11.34	0.32

Tabla 3: Nivel de agrado de las formulaciones de Paté ensayadas

Formulaciones Ensayadas		
Muestra 40%	Muestra 30%	Muestra 20%
4,20	4,07	3,57

CONCLUSIONES

Los pates al 30 y 40 % tiene una buena aceptación entre los consumidores.

Los evaluadores no evidencian diferencias entre estas dos formulaciones.

En este alimento el tenor graso superior al 30 % no afecta los atributos sensoriales del producto.

En base a lo expuesto, sería factible elaborar pateé a partir de hígado de ovejas, con un contenido de 30 % de materia grasa, ya que es un alimento igualmente apetecible pero más saludable que el formulado con un mayor contenido graso.

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. 1990. Oficial methods of analysis. Association of Oficial Analytical Chemists, 15 t ed. Washington, D.C.

A.O.A.C. 1993. Oficial methods of analysis. Association of Oficial Analytical Chemists, 16 t ed. Washington, D.C.

Código Alimentario Argentino.2003.De La Canal y Asociados.

ICMSF. 1986. *Microorganismos de los alimentos 1.* Técnicas de análisis microbiológicos. Vol 1. Editorial Acribia. segunda Edición.

IRAM. 1995. Equivalente a ISO 6658: 1985, Análisis Sensorial. Directivas generales para la metodología. Norma 20002.

IRAM. 1996. Equivalente a ISO 8586-1: 1993, Análisis Sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte 1- Evaluadores seleccionados. Norma 20005-1.

Meilgaard, M.; Civille, G.; Carr, B.1988. *Sensory Evaluation Techniques*, CRC Press, Florida. USA.

O'Mahony, M. 1995. Who told you the triangle test was simple?. Food quality and preference6.227-238.

Pedrero, D. y Pangborn, R. 1989. *Evaluación Sensorial De Los Alimentos. Métodos Analíticos.* Primera Edición. Editorial Alambra Mexicana. México D.F. Pag. 250.

Pedrero, D. 2003. Ponencia La segmentación afectiva del consumidor. III Simposium Iberoamericano de análisis sensorial Sensiber 2003. 19 al 21 de Marzo. Montevideo, Uruguay. Organizado, Sección Evaluación Sensorial, Facultad de Química. Auspiciado por CYTED.

EL AMARANTO EN SU MESA

MARTÍN DE TROIANI, ROSA T.¹, REINAUDI, NILDA B.¹ Y TASSONE, MIRTA²

¹Facultad de Agronomía UNLPam. Ruta 35 km 335 La Pampa. TE 02954-433092/93. E-Mail mdetroiani@agro.unlpam.edu.ar ²Ministerio de Bienestar Social. Pcia. de La Pampa.

RESUMEN

El elevado valor nutricional del grano de amaranto (*Amaranthus ssp.*) y el uso en numerosas comidas de los distintos pueblos americanos, motivó la inquietud de promover su incorporación a la dieta de la población Pampeana. Por tal motivo se propuso conocer el grado de aceptación por parte de individuos adultos de la población de Santa Rosa, La Pampa, de ocho preparaciones culinarias que incluían entre otros, harina y pop (semilla explotada por la temperatura) del grano de amaranto. Se dieron a degustar a un total de 171 individuos, los que respondieron sobre caracteres sensoriales de color, olor, sabor y textura, marcando las consignas de “me gusta mucho”, “me gusta”, “ni me gusta ni me disgusta” y “me disgusta”, luego de degustar cada preparación. Se pudo apreciar un alto grado de aceptabilidad de las preparaciones realizadas. El porcentual de la suma “me gusta mucho” y “me gusta”, para todos los caracteres sensoriales y para cada una de las preparaciones fue de 86,45 %, 93,97 %, 92,59 %, 69,23 %, 84,61 %, 82,85 %, 93,25 % y 49,40 %. Se registraron variados comentarios alentadores referentes a las preparaciones y a la actividad realizada.

Palabras claves: amaranto, caracteres sensoriales, degustación, preparaciones culinarias.

ABSTRACT

The high nutritional value of amaranth (*Amaranthus spp.*) grain and its widespread use in foods of different American people were the reason for promoting its introduction into the diet of the pampean population. Therefore the goal of the present study was to know about the degree of acceptance in adult individuals of Santa Rosa, La Pampa. Eight meals prepared with among other ingredients amaranth flour and “pop” (high temperature extruded grain) were served to a total of 171 individuals. After testing each meals or food preparation the candidates responded on sensorial much, I like it, I don't like nor dislike it, it dislike it. The test food was found to be highly accepted. The percentage of the first two

categories for all sensorial characters and for each preparation were 86.45 %, 93.97 %, 92.59 %, 69.23%, 84.61 %, 82.85 %, 93.25 % and 49.40 %. Many favorable comments on the preparations and the activity registered.

Key words: amaranth, sensorial characters, tasting, culinary preparations.

INTRODUCCIÓN

El potencial nutritivo del grano de amaranto fue reconocido por culturas americanas como la Azteca, Inca y Maya. Era consumido por estas civilizaciones americanas juntamente con maíz y poroto. Sin embargo, por estar ligado a rituales religiosos fue prohibido por el español al conquistar América (Becerra R., 2000, Kigel, J. 1994)

En las últimas décadas, ha resurgido como “viejo-nuevo” cultivo debido a los atributos que posee como: alto contenido de proteína (17,9 %), altos niveles del aminoácido esencial lisina (6,4 % de la proteína), contenidos de 1,5 a 3 veces más de lípidos que otros granos, desarrollo en condiciones adversas de altas temperaturas y suelos salinos, utiliza para la fijación del nitrógeno la llamada vía del C₄, es un cultivo de múltiples usos, para la alimentación humana (granífero y hortícola), posee potenciales usos industriales en cosmetología y en la fabricación de plásticos biodegradables (Kulakow P.A., Hauptll H., 1994).

Las semillas de los amarantos son pequeñas de 1 a 2 mm de largo y 0,2 a 1,1 mg de peso. Los gránulos de almidón son pequeños, de 1 a 3 micrones de diámetro, por lo que resulta de 2,4 a 5 veces más rápido de digerir que el almidón de maíz. El salvado es rico en fibra, proteínas, vitaminas y minerales (calcio, magnesio, hierro). La harina de la semilla de amaranto (producto de la molienda integral) no resulta panificable por sí sola ya que carece de gluten (gliadina y glutenina). Esta particularidad la convierte en un alimento apto para la población celíaca. El grano entero cocido puede usarse en forma similar al arroz, también en forma explotada (pop), para la preparación de confituras y para agregarse a los desayunos, helados y otros (Schnetzler, K. y Breene, W. 1994).

El contenido proteico del trigo se incrementa cuando es combinado con la semilla de amaranto y se logra un mejor equilibrio de aminoácidos esenciales (Delgadillo, P. y otros. 1991).

Las distintas especies del género *Amaranthus*, productoras de grano, se adaptan con facilidad a una amplia zona de Argentina en especial a la zona semiárida (Covas G., a y b 1994)

Los productos provenientes de las harinas, juntamente con los cárnicos y sus derivados, constituyen los principales integrantes de la dieta de la mayoría de la población de la

Provincia de la Pampa, como resultado de las costumbres de raigambre familiar, provenientes del inmigrante europeo. Como consecuencia es apreciable la incidencia de enfermedades como colesterolemia, obesidad y celiaquía (P.P.A.N. 1999)

Con la finalidad de diversificar el consumo de alimentos de la población pampeana nos propusimos difundir y promover el uso del grano de amaranto. A tal fin en una primera instancia, se planteó como objetivo conocer la aceptación por parte de la población de Santa Rosa, La Pampa, de distintas preparaciones culinarias realizadas con el “pop” y la harina integral del grano de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron ocho preparaciones culinarias, de origen mejicano y peruano cuya constitución incluían harina de amaranto y semilla explotada. Las mismas fueron reformuladas adecuándolas a las costumbres y paladar de la población Argentina.

La harina integral de amaranto se obtuvo de la semilla cosechada en el año 2.000 en la Facultad de Agronomía UNLPam. La misma se lavó convenientemente y se molió con molinillo familiar “júpiter Mahlsystem” de origen Alemán. El explotado del grano (pop, pororó, rosetas), se logró por medio de la exposición del mismo sobre plancha de acero caliente (120° C – 140° C) por 3 a 4 segundos.

Se realizaron las preparaciones seleccionadas en dos oportunidades, las que se colocaron en bandejas con los respectivos nombres identificatorios (foto 1 y 2) y se ofrecieron a individuos adultos de ambos sexos, en dos lugares públicos de la Ciudad de Santa Rosa (recepción de la Municipalidad y de la Universidad). Al mismo tiempo se entregaron encuestas, las que fueron respondidas por un total de 171 individuos en el momento de la degustación. En base a los aportes calóricos de los ingredientes y considerando las porciones obtenidas, se calcularon las calorías por unidades en cada preparación. Se hizo un análisis descriptivo a partir de las respuestas de las encuestas.



Foto 1 y 2 Preparaciones ofrecidas en la degustación

En la tabla 1 se muestran los ingredientes de las preparaciones realizadas y las calorías por porción. Cada una, puede aromatizarse con vainilla a gusto.

En la tabla 2 se muestra el modelo de encuesta respondidas por los degustadores.

Tabla 2. Modelo de encuesta

ENCUESTA SOBRE DEGUSTACIÓN DE PREPARACIONES CON AMARANTO				
Marque con una cruz el criterio sobre color, olor, sabor y textura que Usted considere más adecuado, después de haber degustado la preparación.				
Nombre de la preparación: _____				
	Color	olor	sabor	textura
Me disgusta	_____	_____	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____	_____
Me gusta	_____	_____	_____	_____
Me gusta mucho	_____	_____	_____	_____
Sugerencias: (escriba sus sugerencias y apreciaciones sobre esta actividad)				
Muchas gracias por su opinión				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

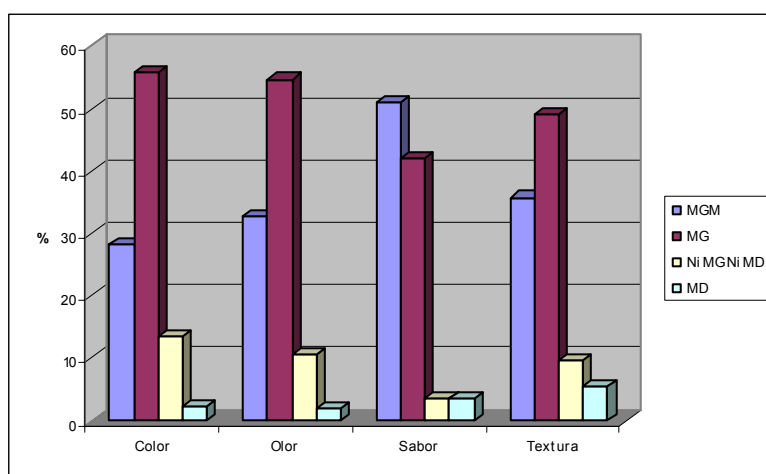
Las calorías por unidades de las preparaciones, oscilaron entre 15,12 y 144,08 (Tabla 1).

Similar a lo hallado por Troiani , R. M. de y otros.1998, para la verdura de amaranto, se puede apreciar en la figura 1, que los porcentajes de las respuestas obtenidas para el total de las preparaciones, fueron mayoritariamente para las apreciaciones de “me gusta” y “me gusta mucho”, para color, olor sabor y textura. Analizando las respuestas de “me gusta mucho” más “me gusta” para la totalidad de las preparaciones en cada uno de los caracteres sensoriales, ellas fueron de 84,12 % para color, 87,33 % para olor, 92,98 % para sabor y 84,84 % para textura.

En el caso de sabor (posiblemente uno de los más definitorios) predomina “me gusta mucho”. La respuesta “ni me gusta ni me disgusta” no superan el 14 %, siendo el porcentaje más alto para color mientras que la respuesta “me disgusta” no supera el 5,50 %, siendo en este caso, el valor más alto para textura.

Tabla 1 Cantidades de los ingredientes de cada una de las preparaciones realizadas y calorías por unidades.

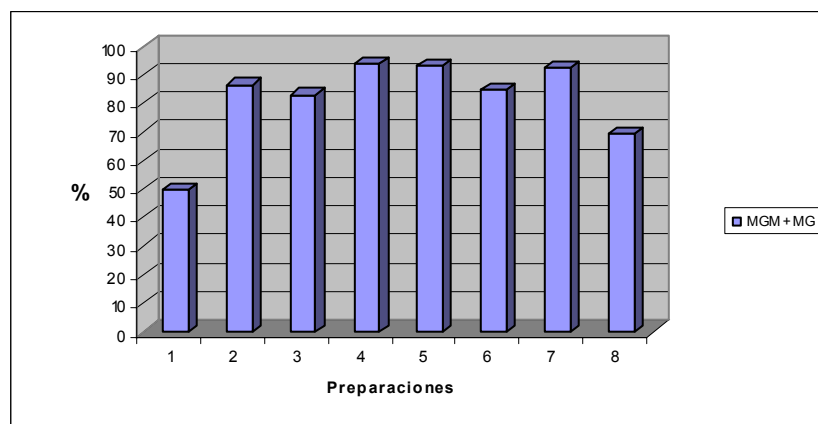
Nombre	Harina de amaranto (g)	Harina de trigo (g)	Maizena (g)	Azúcar (g)	Huevos	Roseta de amaranto (g)	Leche (ml)	Polvo de hornear	otros	Cal/u (unidades)
1) Galletitas de rosetas			50	225	2	150		1 cucharadita	110 g fécula de maíz	28,48 (80)
2) Galletitas de amaranto	315	150	100	150	2					71,05 (60)
3) Suspiros de amaranto				250	5 claras	100				28,88 (50)
4) Bocaditos	125		50	75	1					15,12 (80)
5) Budín inglés con amaranto	315		100	75	2		112	1 cucharadita	37,5g fécula de maíz, 75ml jugo de naranja, 150g de pasas de uva y 50g nueces.	144,08 (25)
6) Panqueque con amaranto	80	80			1		400		45 ml de aceite, 2 cucharadas de miel	63,30 (20)
7) Quequitos	50	200	50	75	1		240			60,36 (30)
8) Chipás con amaranto	50		20		2			1 cucharadita	125g harina de mandioca, 120g de queso rallado	46,20 (30)



MGM: me gusta mucho. MG: me gusta. Ni MG Ni MD: ni me gusta ni me disgusta. MD: me disgusta.

Gráfico 1: Porcentaje de las respuestas obtenidas para los caracteres sensoriales de la totalidad de las preparaciones.

Analizando las respuestas obtenidas por preparaciones (Figura 2), la suma de “me gusta mucho” más “me gusta”, supera ampliamente el 50 % del total de las respuestas, para todas ellas. Las preparaciones 4, 5 y 7 (bocaditos, budín inglés con amaranto y quequitos), superan el 90 % de las mismas. Las preparaciones 2, 3 y 6 (galletas de amaranto, suspiras de amaranto y panqueques) superan el 80%, la 8 (chipas con amaranto) supera el 65 %. La primera preparación (galletas de amaranto), obtuvo un 49,47%. En esta última, a “ni me gusta ni me disgusta” le correspondió un 44 % y el resto a “me disgusta”. En este caso tanto textura como color, contribuyeron a aumentar estos dos caracteres sensoriales (Figura 1). Se registraron comentarios como: “Es importante que difundan alimentos nuevos”, “Deberían publicarse recetas en los matutinos”, “Esta actividad me parece excelente”.



MGM: me gusta mucho. MG: me gusta.

Gráfico 2: Porcentaje de las respuestas obtenidas para cada una de las preparaciones correspondientes a la suma de “me gusta mucho” y “me gusta”.

CONCLUSIONES

Se pudo apreciar un alto grado de aceptabilidad de las preparaciones realizadas. Posiblemente el aumento en las respuestas “ni me gusta ni me disgusta” y “me disgusta” para color y textura (predominantes en la preparación 1) se deban a la indiferencia en la apreciación del color y a la consistencia que origina el “pop” junto a los demás ingredientes para la textura.

BIBLIOGRAFÍA

BECERRA R., 2000. El amaranto; nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. Published in internet, available in http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/amaranto.html. [18 March 2003].

COVAS G., 1994a. Perspectiva del cultivo de los amarantos en la República Argentina. EEA, INTA Anguil. Santa Rosa, La Pampa, Argentina, Publicación Miscelánea. No. 13, 10 pp.

COVAS G., 1994b. Fitomejoramiento de amarantos (*Amaranthus ssp*) para la región pampeana semiárida de la República Argentina. Mendeliana (suppl) 11(1), 68-70.

DELGADILLO, P., CORONEL, A. M. Y CALDERON, D. G. 1991. Obtención de galletas a partir de la mezcla de trigo y amaranto *A. hypochondriacus* L. Primer Congreso Internacional de Amaranto. Oaxtepec, Morelos. México. p. 119.

KIGEL J., 1994. Development and ecophysiology of amaranth. In: Amaranth biology, chemistry and technology (O. Paredez López, ed). Chapter 4. CRC Press Inc., 223 pp.

KULAKOW P.A., HAUPTLI H., 1994. Genetic characterization of grain amaranth. In: Amaranth Biology, Chemistry and Technology (O. Paredez López, ed). Chapter 2. CRC Press Inc., 223 pp.

P.P.A.N. Plan Provincial De Alimentación y Nutrición. 1999. Gobierno de la Provincia de La Pampa. 156 p.

SCHNETZLER, K. AND BREENE, W. 1994. Food uses and Amaranth Product Research: A Comprehensive Review. In: Amaranth Biology, Chemistry and Technology (O. Paredez López, ed). Chapter 9 CRC Press Inc., 223 pp.

TROIANI R.M. DE, SANCHEZ T., REINAUDI N., 1998. Una amarantácea con posibilidades de consumo y cultivo granífero y hortícola. Rev. Fac. Agron. (LUZ) Universidad del Zulia. Venezuela. 15, 30-37.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Agr. Teresa Sánchez y Lic. Laura A. de Ferramola.

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN Y LA PROTEÓLISIS EN LA CAPACIDAD DE FUSIÓN DEL QUESO CREMOSO ARGENTINO.

ALONSO, María J, CANDIOTI, Mario C, HYNES, Erica R

Instituto de Lactología Industrial, Facultad de Ingeniería Química –(UNL).
Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Facultad de Ingeniería Química –(UNL). Santiago del Estero 2829, Santa Fe. Tel:0342-4530302. E-mail: jalonso@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la composición química y la proteólisis en la capacidad de fusión del Queso Cremoso Argentino. Para ello se estudiaron muestras de queso del mercado local y se elaboraron quesos experimentales con distintas dosis de enzima coagulante. Se midió el incremento del área de las muestras de quesos calentadas en una estufa en condiciones estandarizadas. Se determinó también la composición de los quesos, la actividad residual de la enzima coagulante y se estudió la proteólisis. Los resultados indican que varios de los parámetros analizados influyen en la capacidad de fusión. La proteólisis no mostró un impacto significativo en la fusión, ya que las muestras más proteolizadas no se fundieron mejor. La humedad y el pH mostraron la mayor influencia en la aptitud a la fusión del queso.

Palabras Claves: Queso Cremoso Argentino – composición – actividad residual de enzima coagulante – proteólisis – maduración – fusión.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the influence of chemical composition and proteolysis on “Cremoso Argentino” cheese meltability. For that purpose, we studied cheese samples from the local market and we performed cheese-making experiences using different doses of coagulant. We assessed the increase of the area of cheese samples when they were heated in an oven in standardized conditions. We also determined cheese composition, residual activity of milk-clotting enzyme, and proteolysis. Results indicated that several variables influenced on cheese meltability. Proteolysis did not show a significant impact on the ability of the cheese to melt, since the most proteolyzed samples did not melt better. Moisture content and pH were the variables that influenced the most on cheese meltability.

INTRODUCCIÓN

El Queso Cremoso Argentino es el queso de mayor consumo en el país, con una producción cercana al 50% del total obtenido por la industria quesera nacional (Centro de la Industria Lechera, 2004). Es una variedad muy utilizada por la versatilidad de sus aplicaciones, que van desde su consumo como producto de mesa hasta su inclusión como ingrediente en diferentes alimentos procesados por medio de calor. Esta última aplicación hace que las características de fusión sean un factor primordial en la determinación de la calidad del queso Cremoso.

La capacidad de fundir puede definirse como la facilidad con que el queso fluye y se esparce por acción del calor. Desde el punto de vista fisicoquímico es un fenómeno muy complejo y sus características dependen de numerosos factores, cuya influencia aún no ha sido completamente dilucidada.

El contenido de materia grasa, la humedad y el pH se encuentran entre los factores de mayor influencia sobre la variación en la capacidad de fusión de los diferentes tipos de quesos. Sin embargo, la proteólisis, principal transformación que sufren los quesos blandos durante la etapa de maduración, también ha sido señalada como uno de los factores que determinan la aptitud del queso para fundir.

Los quesos blandos, con elevado contenido de humedad y que no sufren tratamiento térmico durante la elaboración, retienen en su masa una cantidad relativamente alta de enzima coagulante activa. Como las condiciones ambientales de este tipo de queso son favorables a la acción de dicha enzima, se ha demostrado que es el principal agente proteolítico durante la maduración (Hynes y col., 2001).

Si bien se han llevado a cabo varios estudios sobre la influencia de diferentes factores en la capacidad de fusión del Queso Cremoso Argentino, no se ha podido establecer aún la relación existente entre la actividad residual de enzima coagulante, el grado de maduración y la capacidad de fusión. En efecto, si bien se sabe que la hidrólisis de la caseína α_{s1} es de fundamental importancia en el desarrollo de la textura cremosa del producto, hasta el momento no se ha correlacionado cuantitativamente la actividad coagulante residual y la proteólisis de la caseína α_{s1} . Por otra parte, este fenómeno proteolítico tampoco ha sido confrontado con la capacidad de fusión del queso.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la influencia de la composición, la actividad residual de enzima coagulante y el grado de maduración sobre la capacidad de fusión del Queso Cremoso Argentino. Para ello se analizaron muestras de mercado de diferentes marcas comerciales y de quesos elaborados en nuestro laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de queso

- Quesos del Comercio: Se utilizaron muestras de queso Cremoso Argentino procedentes del mercado local, adquiridas en comercios de la ciudad. Se analizaron quesos de diez marcas comerciales, tratando de abarcar toda la oferta existente.

- Quesos Miniatura: Se llevaron a cabo elaboraciones de quesos modelo a escala miniatura, basados en la tecnología estándar de queso Cremoso. Se prepararon tres tipos de queso: testigo, con dosis estándar (T) de coagulante ($0,5 \text{ mL L}^{-1}$ de leche), con media dosis (1/2D) de coagulante ($0,25 \text{ mL L}^{-1}$ de leche), y con doble dosis (2D) de coagulante ($1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de leche).

- Quesos a Escala Piloto: Se elaboraron quesos con enzima coagulante inactivada (CI), y quesos testigos (Te). La inactivación de la enzima coagulante se realizó mediante un ciclo de pH (6,4-7,8-6,4) en una tina quesera especialmente diseñada (Meinardi y col., 1998).

Determinaciones analíticas Composición global. Se determinó humedad, materia grasa, proteínas totales y pH por métodos normalizados (FIL-IDF).

Estudio de la proteólisis. La hidrólisis de las caseínas se evaluó:

a) Cuantitativamente: Mediante la determinación del índice de maduración, definido como el porcentaje de nitrógeno soluble a pH 4.6 con respecto al total (Hynes y col., 2001).

b) Cualitativamente: Por electroforesis sobre gel mixto de poliacrilamida en presencia de urea (Hynes y col., 2001).

Determinación de la actividad residual de enzima coagulante. Se llevó a cabo por medio de un método de cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) que se basa en la cuantificación indirecta de la enzima (Hynes y col., 2004).

Medición de la capacidad de fusión de las muestras de queso. Se realizó mediante el método de Schreiber modificado (Muthukumarappan y col., 1999), sometiendo las muestras a un tratamiento térmico de 130°C por 15 min.

Análisis estadístico. Los valores medios de índice de maduración e incremento de área se compararon mediante el test de ANOVA. Asimismo se aplicaron métodos multivariantes para explorar la dependencia de la capacidad de fusión de una o más de las variables estudiadas (Hair y col., 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Quesos del Comercio: Las muestras analizadas mostraron una gran variabilidad en su composición global y grado de maduración (Tabla I), aunque todas cumplían con los

requerimientos que para este tipo de queso establece el Código Alimentario Argentino (De la Canal y Asociados, 1999).

Tabla I: Composición global, pH, grado de maduración y actividad residual de coagulante en quesos comerciales.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Humedad (%)	48,58	48,49	47,37	50,64	51,75	50,19	52,82	55,10	52,08	49,86
pH	5,75	5,45	5,70	5,40	5,27	5,35	5,40	5,43	5,45	5,45
Grasa (%)	24,9	26,8	24,4	22,8	24,6	23,1	23,3	21,1	20,8	21,5
Proteínas	20,03	18,76	21,88	19,90	17,74	23,67	17,99	17,67	19,14	20,22
Grado de maduración (%)	10,09	10,68	9,96	13,53	11,56	8,00	10,17	13,64	14,00	12,79
Coagulante residual ($\mu\text{l/kg}$ queso)	81,14	149,5	54,17	39,43	44,46	100,6	79,06	107,7	29,05	30,05

El estudio de la proteólisis por electroforesis (Figura 1a) confirmó los resultados de grado de maduración obtenidos y, aunque la capacidad de fusión varió de una marca comercial a otra (Figura 1b), no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$). La aplicación de métodos multivariantes no permitió correlacionar con un ajuste aceptable la capacidad de fusión con una o más de las variables estudiadas (resultados no informados). Ante estos resultados se planteó la hipótesis de que todos los quesos comerciales analizados habían superado un umbral mínimo de proteólisis, luego del cual esta variable mostraba escasa incidencia sobre la capacidad de fusión. Para comprobar dicha hipótesis, se elaboraron quesos experimentales a escala miniatura con distintas dosis de enzima coagulante (estándar, media y doble dosis).

Figura 1a

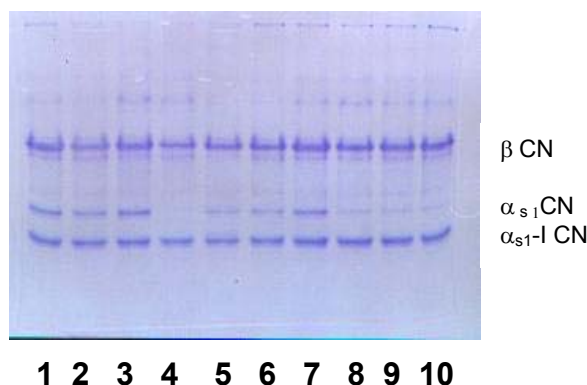


Figura 1b

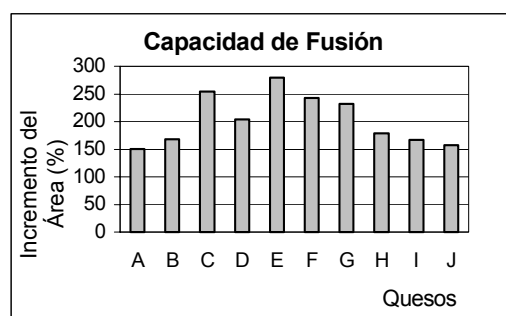


Figura 1 a: Electroforesis (Urea-PAGE) del residuo insoluble a pH 4,6 de muestras de quesos comerciales. Carriles 1 - 10: Muestras comerciales en orden alfabético A – J.. **b:** Incremento porcentual del área de los quesos comerciales luego de la fusión.

Quesos Miniatura:

En la Tabla II se muestran los valores obtenidos para los quesos miniatura. Si bien la actividad residual de enzima coagulante fue marcadamente distinta para los tres tipos de queso, los valores promedio de grado de maduración no resultaron significativamente diferentes ($p > 0,05$). Esta observación probablemente fue debida a que la media dosis de enzima coagulante fue suficiente para obtener un grado de proteólisis adecuado al final de la maduración (28 días).

Tabla II: Composición global, pH, grado de maduración y actividad residual de coagulante en quesos miniatura.

	T	1/2 D	2 D
Humedad (%)	56,19	54,88	56,20
pH	5,01	5,08	5,10
Grasa (%)	22,7	21,5	22,6
Proteínas	17,23	18,18	17,74
Grado de maduración (%)	14,27	13,3	14,85
Coagulante residual ($\mu\text{l}/\text{kg}$ queso)	490,46	239,45	717,42

Los perfiles electroforéticos indicaron que en todas las muestras se produjo la hidrólisis de la caseína α_{s1} para dar el péptido $\alpha_{s1}(f24-199)$, aunque en los quesos con menor dosis de coagulante, esta transformación fue menor (Figura 2a). El incremento del área de los quesos luego de la fusión no difirió (Figura 2b).

Figura 2a

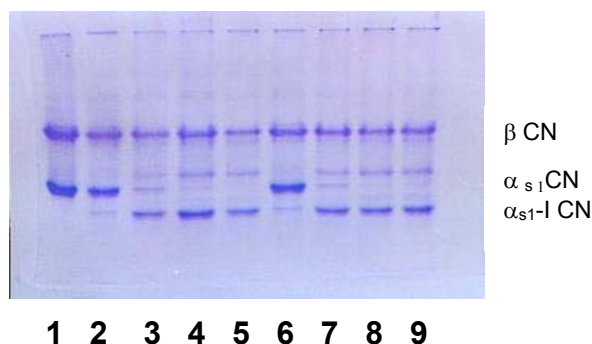


Figura 2b

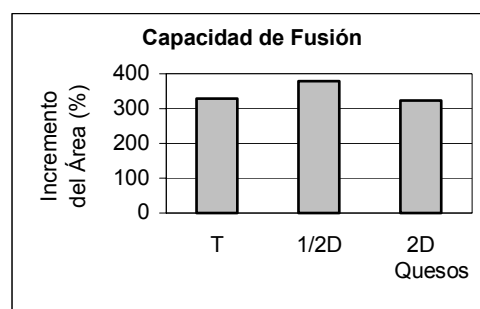


Figura 2. a: Electroforesis (Urea-PAGE) del residuo insoluble a pH 4,6 de muestras de quesos miniatura. Carriles: 1-Caseinato patrón – 2-Cuajada – 3-Queso media dosis (D/2) – 4-Queso Testigo (T) – 5-Queso doble dosis (2D) – 6-cuajada – 7-Queso D/2 – 8-Queso T – 9-Queso 2D. **b:** Incremento porcentual del área de los quesos miniatura luego de la fusión.

Los resultados obtenidos sugirieron que la proteólisis era un fenómeno concurrente con el aumento de la capacidad a la fusión durante la maduración de quesos, y no constituía el origen de dicho aumento. Para profundizar en el estudio de este fenómeno, se elaboraron quesos en los cuales se inactivó la enzima coagulante.

Quesos a Escala Piloto:

Se comprobó que, para los quesos elaborados con enzima coagulante inactivada, la actividad residual de dicha enzima fue despreciable (Tabla III).

Tabla III: Composición global, pH y actividad residual de coagulante en quesos obtenidos en planta piloto

	Te	CI
Humedad (%)	47,17	48,66
pH	5,5	5,1
Grasa (%)	24,40	23,90
Coagulante residual ($\mu\text{l}/\text{kg}$ queso)	197,3	11,29

En consecuencia, la proteólisis en estos productos fue muy reducida, a diferencia de lo que ocurrió en los quesos testigo que mostraron una marcada hidrólisis de la caseína α_{s1} (Figuras 3a y 3b).

Figura 3a

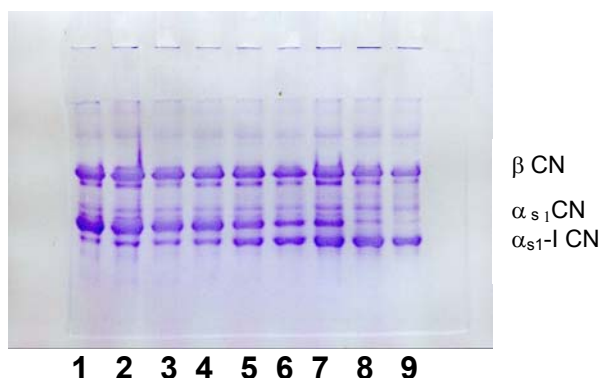


Figura 3b

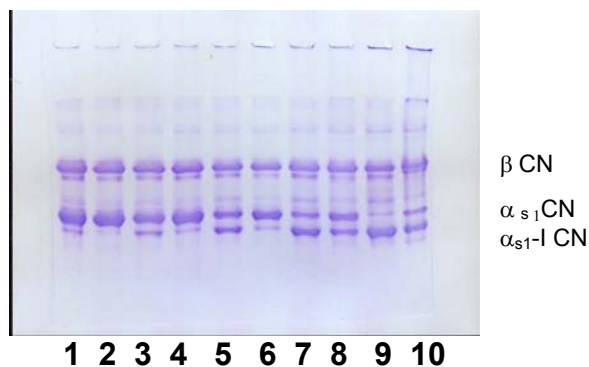


Figura 3: a: Electroforesis (Urea-PAGE) del residuo insoluble a pH 4,6 de muestras de quesos testigo a escala piloto. Calles: 1-1 día – 2-3 días – 3-5 días – 4-7 días – 5-14 días – 6-21 días – 7-30 días – 8-60 días – 9-75 días. b: Electroforesis (UREA-PAGE) del residuo insoluble a pH 4,6 de muestras de quesos Testigo (Te) y Coagulante Inactivado (CI) a escala piloto. Calles: 1-1 día Te – 2-1 día CI – 3-7 días Te – 4-7 días CI – 5-14 días Te – 6-14 días CI – 7-30 días Te – 8-30 días CI – 9-60 días Te – 10-60 días CI.

Sin embargo, se observó que la aptitud a la fusión hasta los 30 días de maduración fue similar para quesos testigos y experimentales (Figura 4a), a pesar de que a temperatura

ambiente estos últimos resultaban duros y quebradizos. Después de los 30 días de maduración, y coincidentemente con un descenso en el pH, se encontró una marcada disminución de la capacidad de fusión de los quesos con enzima coagulante inactivada (Figura 4b).

Figura 4a

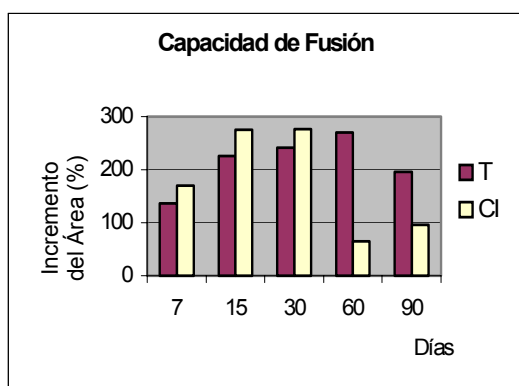


Figura 4b

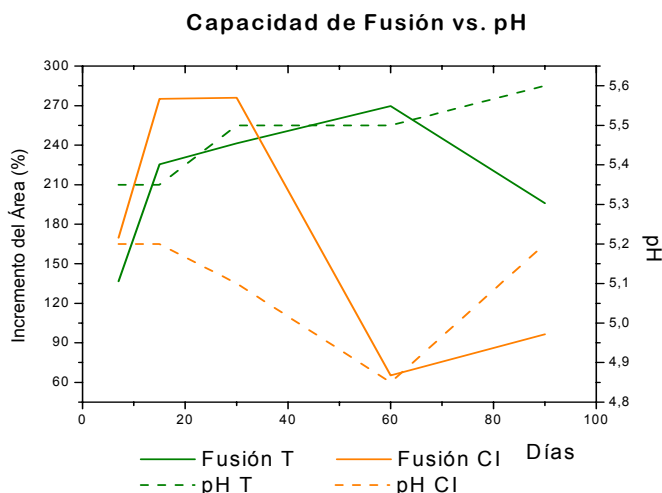


Figura 4 : a: Incremento porcentual del área de los quesos Te y CI obtenidos en planta piloto luego de la fusión. b: Capacidad de fusión y pH de los quesos Te y CI obtenidos en planta piloto en función del tiempo de maduración.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la composición global, especialmente la humedad, y el pH influyen en la capacidad de fusión del Queso Cremoso Argentino. Por el contrario, la actividad residual de enzima coagulante y, consecuentemente, el grado de proteólisis alcanzado, no mostraron un impacto significativo en esta propiedad del queso. El aumento en la capacidad de fusión que se registra a medida que transcurre la maduración estaría más ligado, entonces, a fenómenos fisicoquímicos como cambios de pH y mineralización de la micela, que a la ruptura de la red proteica.

BIBLIOGRAFÍA

Centro de la Industria Lechera (2004) <http://www.cil.org.ar/>

Código Alimentario Argentino (1999) De la Canal y Asociados. Capítulo 8, Alimentos Lácteos. Art 622: Queso Cremoso Argentino.

FIL- IDF 4:A (1985)

FIL- IDF 20:B (1993)

Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C. (1999) *Análisis Multivariante*, 5ª ed. Prentice Hall Iberia, Madrid.

Hynes, E.; Aparo, L.; Candiotti, M. (2004) Influence of residual milk-clotting enzyme on α_{s1} casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*. 87, 565-573.

Hynes E., Meinardi C.; Sabbag N.; Cattaneo T.; Candiotti M.; Zalazar C. (1999) Influence of milk-clotting enzyme concentration on the α_{s1} -casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science*. 84,1335–1340.

Meinardi, C., Hynes, E.; Garnero, D.; Zalazar, C. (1998) Methodology and equipment for making rennet-free cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 53, 149-151

Muthukumarappan, K.; Wang, Y.-C., Gunasekaran, S. (1999) Modified Schreiber Test for Evaluation of Mozzarella Cheese Meltability. *Journal of Dairy Science*. 82, 1068 – 1071.

INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACIÓN EN LA PROTEÓLISIS DE QUESO MOZZARELLA

COSTABEL, Luciana¹; PAULETTI, Miguel S.²; HYNES Erica R.³

¹ Suc. de Alfredo Williner S.A., Rafaela., ² Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Facultad de Ingeniería Química (UNL)., ³ Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Facultad de Ingeniería Química (UNL). Santiago del Estero 2829 – S3000AOM Santa Fe. TEL 03424530302 FAX 0342 4571162 Email: ehynes@figus.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la temperatura de hilado, el contenido de grasa y el tiempo de salado en la proteólisis de queso Mozzarella. Se realizaron experiencias en una industria láctea, aplicando distintos procedimientos para la elaboración de las Mozzarellas, que se maduraron al menos tres meses. El contenido de nitrógeno soluble no difirió significativamente entre las muestras obtenidas por distintos métodos, pero aumentó con el tiempo de maduración, lo que coincidió con un incremento en la degradación de la caseína α_{s1} , evidenciado por electroforesis. Esta transformación alcanzó niveles similares en todos los quesos de 135 días, independientemente del proceso de elaboración. El análisis multivariante de los perfiles peptídicos realizados por cromatografía también detectó agrupaciones de muestras por tiempo de maduración. La proteólisis comenzó más tempranamente en aquellas muestras obtenidas a menores temperaturas de hilado, lo que sugirió una influencia de la enzima coagulante residual.

Palabras clave: Queso Mozzarella / proteólisis / elaboración de quesos / maduración de quesos / análisis multivariante

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the influence of stretching temperature, fat matter content and time of brining on proteolysis of Mozzarella cheeses, which were ripened for at least three months. The amount of soluble nitrogen was not significantly different in cheeses obtained by diverse procedures, but it increased during ripening. This result was coincident with the breakdown of α_{s1} casein evidenced by electrophoresis, which reached similar extent in all samples after 135 days of ripening, regardless of the cheese-making process. Multivariate analysis of peptide profiles determined by liquid chromatography also detected sample grouping according to ripening

time. Proteolysis begun earlier in samples in which stretching step had been performed at lower temperatures, suggesting a contribution of residual milk-clotting enzyme to casein hydrolysis.

INTRODUCCIÓN

La composición química inicial y las transformaciones bioquímicas que ocurren durante la maduración del queso Mozzarella son determinantes para su calidad final, ya que influyen en las propiedades funcionales de esta variedad, ampliamente consumida en todo el mundo. El contenido de humedad y materia grasa, la evolución del pH durante la elaboración, así como la cantidad de azúcares reductores y de calcio, han sido señalados como factores que influyen en la textura y funcionalidad de la Mozzarella (Joshi et al., 2003; Sheenan y Guinee, 2004; Everett, et al., 2004). La proteólisis de las caseínas, que constituyen la matriz proteica donde se encuentran dispersas la grasa y la humedad, también ha sido relacionada con cambios en las propiedades de este tipo de queso (Feeney et al., 2002).

Teniendo en cuenta esta influencia de las variables tecnológicas en la calidad de la Mozzarella, resulta de enorme interés para los productores dilucidar la manera de combinar materia prima y tecnología para obtener un producto “a medida”. Sin embargo, aún no es posible controlar completamente las propiedades del producto final, ya que el impacto de algunas variables, individualmente o en conjunto, aún se ignora. La proteólisis durante la maduración del queso, por ejemplo, es un conjunto de reacciones bien conocido para varios tipos de queso, especialmente Cheddar, pero aún no ha sido completamente descrito en los quesos de pasta hilada (Feeney et al., 2002).

Existen diferentes puntos de vista acerca del impacto de la proteólisis en la textura y propiedades funcionales de la Mozzarella. Mientras algunos autores consideran que es necesaria para el ablandamiento del queso y el logro de propiedades funcionales adecuadas, otros han señalado a la proteólisis como un fenómeno de menor importancia frente a factores tecnológicos como la evolución del pH o la composición proximal del queso. Asimismo, es poco lo que se conoce sobre la contribución relativa de las diferentes enzimas proteolíticas presentes en el queso al proceso general de hidrólisis de las caseínas en la Mozzarella (Johnson y Law, 1999, Feeney et al., 2002).

El objetivo del presente trabajo fue investigar el impacto de diferentes procesos industriales de fabricación en la proteólisis de queso Mozzarella. Para ello se elaboraron Mozarellas en una planta industrial, según el procedimiento estándar y modificando la

temperatura de hilado, la concentración de grasa en la leche de procesado, y las horas de salado por inmersión en salmuera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y elaboración de quesos

Los quesos se elaboraron a escala industrial. Después de cada elaboración, se tomaron las muestras y el resto de cada lote fue madurado en cámara y luego comercializado. Consecuentemente, cada parámetro estudiado se modificó dentro de un rango relativamente ajustado, compatible con las posibilidades tecnológicas de la fábrica y los estándares de calidad razonables para el producto final. Las variables estudiadas fueron: contenido de grasa en la leche de elaboración de quesos, temperatura en la etapa de hilado, y tiempo de salado por inmersión en salmuera. Estas variables fueron seleccionadas por la industria para una primera caracterización del impacto del proceso en la calidad del producto, dejándose para estudios posteriores otros parámetros de manejo más dificultoso a escala industrial, como la curva de pH de la elaboración.

El diseño experimental se llevó a cabo usando un modelo de superficie de respuesta del tipo rotacional centrado, que proporcionó un plan de 17 elaboraciones que se llevaron a cabo en días consecutivos (Tabla 1). Para ello se aplicó el programa Statgraphics 3.0 (Manugistics, Inc. Rockville, MD, Estados Unidos). Los quesos fueron elaborados en la planta industrial de la empresa láctea Sucesores de Alfredo Williner S.A., utilizando tinajas específicas de 10.000 litros, como así también las instalaciones e infraestructura requeridas para el proceso. Para la elaboración de los quesos, se siguió la metodología utilizada actualmente por la empresa, con las modificaciones pertinentes para cumplir con el diseño experimental.

Composición global

El contenido de humedad, materia grasa y proteínas, así como el valor de pH, fueron determinados por métodos normalizados en los quesos de 3 días.

Estudio de la proteólisis

El índice de maduración, calculado como el porcentaje del nitrógeno (N) total que resulta soluble a pH 4,6, fue determinado mediante el método de Kjeldahl, y los resultados se compararon por ANOVA. La hidrólisis de las caseínas también fue estudiada mediante electroforesis de la fracción del queso insoluble a pH 4,6, realizando la separación sobre geles de poliacrilamida en presencia de urea (Urea-PAGE). Finalmente, se realizaron perfiles peptídicos de la fracción soluble en agua mediante cromatografía líquida en fase reversa. Los perfiles peptídicos se analizaron por métodos estadísticos multivariantes:

análisis por componentes principales y clusters no jerárquico. Para el tratamiento estadístico de los datos experimentales se utilizó la aplicación Statgraphics 3.0 (Hynes et al., 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El índice de maduración de las Mozzarellas obtenidas según los distintos procedimientos no mostró diferencias significativas. En cambio, para cada muestra, se verificaron diferencias significativas en el contenido de N soluble a pH 4,6 a lo largo del almacenamiento del producto. Estos resultados indicaron que el tiempo de maduración tuvo una influencia mayor en la proteólisis que las otras variables estudiadas. Los valores de índice de maduración correspondientes a los puntos centrales del diseño experimental (E1, E9 y E17) se presentan en la Figura 1. La proteólisis evolucionó de manera similar en las tres muestras, con un incremento moderado del nitrógeno soluble.

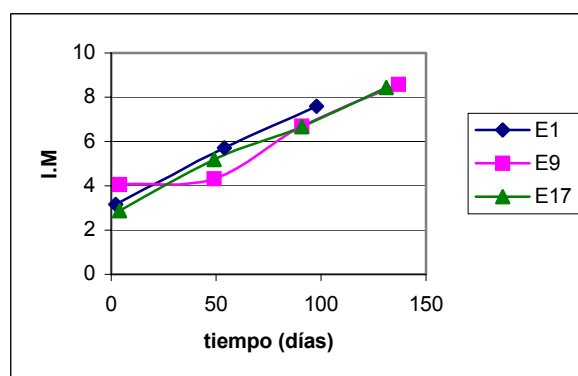


Figura 1 – Evolución del índice de maduración, expresado como % N soluble (NS) a pH 4,6 con respecto al N total, durante la maduración de las muestras de Mozzarella correspondientes a los puntos centrales del diseño (E1, E9 y E17).

En la Figura 2, se muestra la evolución del índice de maduración de varias muestras, obtenidas utilizando distintos procedimientos (ver Tabla 1). Las muestras en las cuales el contenido de grasa era mayor, mostraron un incremento de índice de maduración levemente mayor, aunque no se verificaron diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los llamados “puntos estrella” del diseño, a lo largo de toda la maduración (Figura 3 a, b y c).

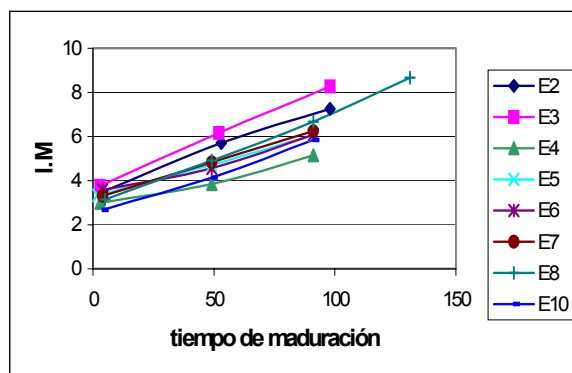


Figura 2 - Evolución del índice de maduración, expresado como % NS a pH 4,6 con respecto al N total, durante la maduración de las muestras de Mozzarella elaboradas mediante diferentes procedimientos (ver Tabla 1 por referencias).

Tabla 1 – Plan de elaboraciones de quesos según el diseño experimental. MG: cantidad de materia grasa en la leche de elaboración (%). T: temperatura de la etapa de hilado (°C). t: tiempo de salado por inmersión en salmuera (h).

				TH			
Experiencia	%MG	TH (°C)	t (h)	Experiencia	%MG	(°C)	t (h)
E1	2,9	83	18	E10	3,4	88	22
E2	2,4	78	14	E11	2,06	83	18
E3	3,4	78	14	E12	3,74	83	18
E4	2,4	88	14	E13	2,9	74,6	18
E5	3,4	88	14	E14	2,9	91,4	18
E6	2,4	78	22	E15	2,9	83	11,27
E7	3,4	78	22	E16	2,9	83	24,73
E8	2,4	88	22	E17	2,9	83	18
E9	2,9	83	18				

Por otra parte, la electroforesis evidenció que todas las Mozzarellas fueron muy similares al inicio de la maduración, cuando sólo se detectaban las bandas de caseínas α_{s1} , α_{s2} y β . Después de 49 días, se comprobó la hidrólisis de la caseína α_{s1} y la consecuente aparición del péptido $\alpha_{s1}(f24-199)$, un producto típico de la acción de la enzima coagulante residual en el sitio Phe23-Phe24 (Carles y Ribadeau-Dumas, 1985; McSweeney et al., 1993). La banda correspondiente $\alpha_{s1}(f24-199)$, era más intensa en quesos obtenidos con bajas temperaturas de hilado, y no resultaba visible en aquellas Mozzarellas hiladas a temperaturas más altas (Figura 4). A los 91 días de maduración, la banda correspondiente al péptido $\alpha_{s1}(f24-199)$, se detectó en todas las muestras, aunque resultaba levemente más intensa en aquellas tratadas a temperaturas menores (resultados no informados). En todas las muestras, además, se incrementó la intensidad

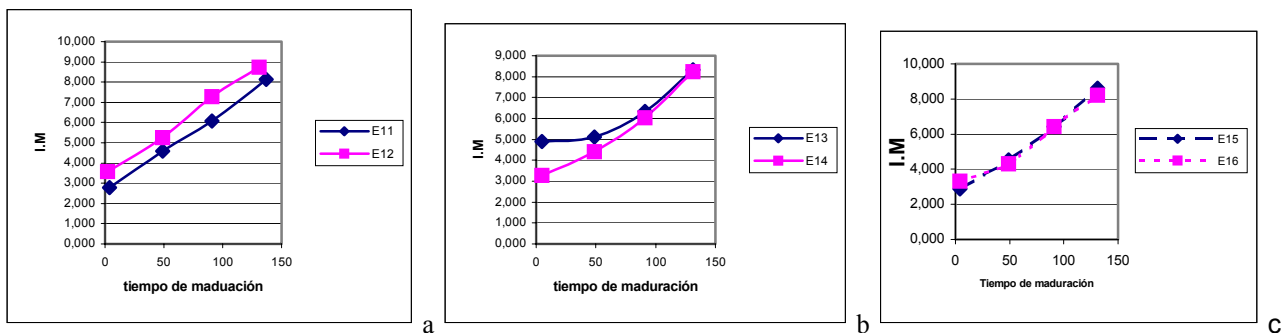


Figura 3 - Evolución del índice de maduración, expresado como % NS a pH 4,6 con respecto al N total, durante la maduración de las muestras de Mozzarella correspondientes a los puntos estrella del diseño experimental (E11, E12, E13, E14, E15 y E16, ver Tabla 1 por referencias).

de las bandas correspondientes a las caseínas γ al aumentar el tiempo de maduración. Esta transformación es consecuencia de la acción de la enzima nativa de la leche plasmina sobre la caseína β . Todas las Mozzarellas estudiadas luego de 135 días mostraban perfiles electroforéticos similares (resultados no informados).

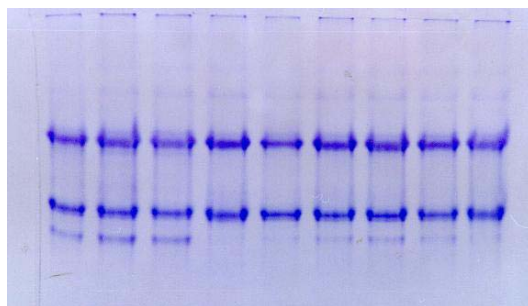


Figura 4 – Perfiles electroforéticos de muestras de queso Mozzarella obtenidos por distintos procedimientos industriales, a los 49 días de maduración (ver Tabla 1 por referencias).

Los cromatogramas de la fase soluble en agua obtenidos por HPLC, preprocesados por una metodología estadística específica (Piraino et al., 2004), fueron analizados por análisis de componentes principales (PC) utilizando la matriz de covarianza (Pripp et al., 2000). Se retuvieron los seis primeros PC, que explicaban el 93,48 % de la variación total original de los datos, utilizando el criterio de Eigenvalue mayor que 1 ($\lambda > 1$). Analizando visualmente los cromatogramas, fue posible observar que en general se produjo un incremento de la proteólisis a lo largo de la maduración, evidenciado ya sea por la aparición de nuevos picos, como por el aumento en el área y altura de los picos ya existentes en los perfiles de los quesos recién elaborados. Los péptidos hidrofóbicos situados al final los perfiles (tiempo de retención 45 a 85 min.), mostraron loadings negativos en el primer componente principal (datos no informados), que representó la mayor parte de la variación (51,5%). Por el contrario, aquellos péptidos que aparecían al principio de los perfiles, con tiempos de retención bajos, influyeron positivamente en PC1

(datos no informados). Valores mayores de PC1 podrían asimilarse, entonces, a una mayor proteólisis, mientras que lo contrario sería válido para PC2. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la concentración de un determinado péptido en el queso es consecuencia de un equilibrio entre su producción y degradación, y que a su vez un solo pico en el cromatograma puede incluir varios péptidos. De esta manera, mientras el área de algunos picos se incrementa durante la maduración, en otros casos otros aumenta al principio y luego disminuye.

Se realizó además un análisis de clusters no jerárquico (k-means). El análisis arrojó la mejor solución para un número de cinco clusters: los puntos centrales se agruparon juntos y las muestras de 135 días formaron un único conglomerado. Asimismo, esta estructura es coincidente con las agrupaciones que se detectaron visualmente en la representación gráfica de los componentes principales. Los métodos estadísticos multivariantes utilizados detectaron una estructura de los datos que permitía clasificar las muestras por tiempo de maduración, pero ningún indicio de agrupamiento de acuerdo al proceso de elaboración (Figura 5).

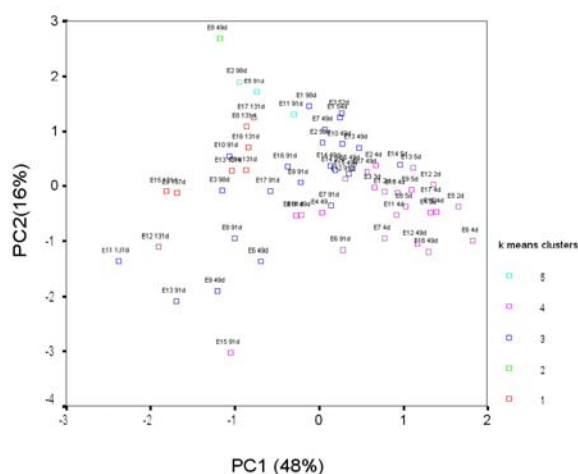


Figura 5 – Puntuaciones (*scores*) de las muestras en los componentes principales PC1 y PC2, y agrupamientos por clusters no jerárquicos. Muestras pertenecientes a distintos grupos se indican con colores distintos.

CONCLUSIONES

Las variables tecnológicas estudiadas no tuvieron un impacto significativo en la proteólisis durante la maduración de quesos Mozzarella. Si bien se detectaron algunos cambios en la hidrólisis de las caseínas atribuibles a la tecnología de la elaboración, estas modificaciones no fueron significativas. El tiempo de maduración, por el contrario, influyó significativamente en la proteólisis.

Es probable que las modificaciones del proceso estándar de fabricación de la Mozzarella, planteadas por el diseño experimental, hayan resultado insuficientes para promover cambios en la proteólisis. Por este motivo, sería de gran interés el estudio de las variables seleccionadas y de otros parámetros, en rangos más amplios. Sin embargo tal investigación no es compatible con la experimentación a escala industrial, por lo que deberían realizarse a escala laboratorio o piloto.

BIBLIOGRAFÍA

Carles C., Ribadeau Dumas B. (1985) Kinetic of the action of chymosin on a peptide bond of α_{s1} casein. Comparison of the behavior of this substrate with that of β and κ caseins. FEBS Letters. 185, 282-286.

Everett D., Rowney M., Hickey M., Roupas P. (2004) Salt induced changes in Mozzarella cheese and the impact upon free oil formation in ripening time. Lait. 84, 1-11.

Feeney E. P., Guinee T. P., Fox P.F. (2002) Effect of pH and Calcium content on proteolysis in Mozzarella cheese. J. Dairy Sci. 85,1646-1654.

Hynes E., Bergamini C.V., Suárez V., Zalazar C. A. (2003) Proteolysis on Reggianito Argentino Cheeses Manufactured with Natural Whey Cultures and Selected Strains of *Lactobacillus helveticus*. J. Dairy Sci. 86, 3831-3840.

Johnson M., Law B. A. (1999) The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. En "Technology of cheesemaking" Ed.: B. Law. Sheffield Academic Press, Sheffield, Inglaterra.

Joshi N. S., Muthukumarappan K, Dave R. I. (2003) Understanding the Role of Calcium in Functionality of Part Skim Mozzarella cheese. J. Dairy Sci. 86, 1918-1926.

McSweeney P. L. H., Olson N. F., Fox P. F., Healy A., Horup P. (1993) Proteolytic specificity of chymosin on α_{s1} -casein. J. Dairy Res. 60, 401-412.

Piraino, P., E. Parente, and P. L. H. McSweeney (2004) Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptide profiles from cheese extracts. J. Agric. Food Chem. (En prensa).

Pripp A. H., Stepaniak L., Sørhaug T. 2000. Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. Int. Dairy J.10, 249–253.

Sheenan J., Guinee T (2004) Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional. Int. Dairy J. 14, 161-172.

INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE ELABORACIÓN Y MADURACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE PLASMINA EN QUESOS ARGENTINOS

FERNANDEZ Verónica, CANDIOTI Mario, PEROTTI María C., BERNAL Susana M. y ZALAZAR Carlos A.

Instituto de Lactología Industrial, Facultad de Ing. Química, Univ. Nacional del Litoral.. Santiago del Estero 2829, 3000 Santa Fe, Argentina.Tel.: 0342-4530302. Fax: 0342-4571164. E-mail: azalazar@fiquis.unl.edu.ar

RESUMEN

La plasmina es la principal proteasa nativa de la leche, en la que están presentes además su precursor inactivo (plasminógeno), el activador del mismo y dos inhibidores. Los tratamientos térmicos pueden producir modificaciones en la actividad de la enzima debido al pasaje de plasminógeno a plasmina.

En este trabajo se determinaron la actividad de plasmina y de plasminógeno en tres tipos de quesos Argentinos comerciales y en quesos Reggianito experimentales, se estudió la acción sobre las caseínas y se relacionaron los resultados con la tecnología.

La actividad de plasmina y de plasminógeno se estudiaron por espectrofotometría y la acción sobre las caseínas se analizó por electroforesis.

Se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de quesos comerciales. Para los quesos experimentales, se observó un aumento en la actividad con el tiempo de maduración atribuido a la activación del plasminógeno. Se encontró una correlación positiva entre la actividad de plasmina y el índice de proteólisis de la caseína β .

Palabras clave: plasmina, quesos argentinos, maduración.

ABSTRACT

Plasmin is the main native milk proteinase. Besides the plasmin appear its inactive predecessor (plasminogen), a plasminogen activator and two inhibitors. The heat treatment produce modifications in the enzyme activity owing to the change from plasminogen to active plasmin. The objective of this study was to determine the activities of plasmin and plasminogen in three different types of commercial Argentinean cheeses and in experimental Reggianito cheeses. Moreover, the action on the caseins was studied and the results were associated with the technologies. The plasmin and plasminogen activities were studied by spectrophotometry and the degradation of caseins was analysed

by electrophoresis. Significant differences among types of commercial cheeses were found. The enzyme activity in experimental cheeses increased with time of ripening, owing to plasminogen activation. A positive correlation was found between the plasmin activity and the proteolysis index of β casein.

Keywords: plasmin, Argentinean cheeses, ripening.

INTRODUCCIÓN

La plasmina (E.C. 3.4.21.7) es una serina proteinasa que constituye la enzima nativa de mayor concentración en la leche, con pH y temperatura óptima de 7,5 y 37°C respectivamente. En la leche esta enzima es parte de un sistema complejo que está compuesto por la plasmina propiamente dicha, por su precursor inactivo llamado plasminógeno, un activador del plasminógeno, el inhibidor de la plasmina y el inhibidor del activador del plasminógeno. La concentración de plasminógeno presente en la leche es notablemente mayor a la de plasmina, variando la relación plasminógeno/plasmina de 50:1 a 2:1 (Grufferty y Fox, 1988).

En la leche fresca la plasmina, el plasminógeno y el activador del plasminógeno se encuentran asociados a la micela de caseína, mientras que los dos inhibidores se hallan en el suero. Se encontró que tanto el agregado de cloruro de sodio como la acidificación de la leche, reducen las interacciones entre la plasmina y el plasminógeno con las micelas de caseína (Gruferty y Fox, 1988). La plasmina posee una estabilidad al calor relativamente alta, habiéndose informado que se requiere una temperatura de 80°C durante 10 minutos para producir su inactivación total.

Los sustratos preferenciales de la plasmina son la β y la α_{s2} caseínas, originándose a partir de la proteólisis de la primera los fragmentos C-terminales γ_1 , γ_2 y γ_3 caseínas. (Rampilli y Raja, 1998).

La presencia de plasmina en la leche puede conducir a diversas alteraciones sobre determinados productos lácteos. En quesos, la plasmina es la responsable de la proteólisis primaria de las caseínas durante la maduración. La intensidad de este efecto depende de varios factores tecnológicos entre los que se pueden mencionar la temperatura de cocción de la cuajada, el pH alcanzado durante la elaboración, el lavado e hilado de la cuajada, etc. Estas variables condicionan en distinta manera la concentración de plasmina que se encuentra presente en la masa del queso y consecuentemente el grado de proteólisis de las caseínas, siendo un índice de su acción el aumento de la concentración de las γ caseínas.

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar la actividad de plasmina y de plasminógeno en distintos tipos de quesos argentinos, y asociar los resultados obtenidos con el tipo de tecnología utilizada durante la elaboración. Se procuró además establecer asociaciones entre los resultados de actividad de plasmina y el nivel de degradación de la β caseína.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras analizadas

Se emplearon quesos típicos argentinos adquiridos en el comercio de los tipos de pasta muy blanda, blanda, semidura y dura, y quesos Reggiano Argentino elaborados en la planta piloto del INLAIN de acuerdo a la tecnología convencional (Zalazar et al, 1999).

Los quesos comerciales se seleccionaron para determinar la influencia del proceso de cocción de la cuajada sobre la concentración de plasmina. Para ello se procesaron dos quesos de pasta muy blanda (MB₁ y MB₂), dos de pasta blanda (B₁ y B₂), seis de pasta semidura (SD₁ a SD₆) y cuatro de pasta dura (D₁ a D₄). En los Reggiano experimentales (D₅ a D₇), se investigó la influencia de las condiciones de elaboración y del tiempo de maduración sobre los niveles de plasmina, para cual se determinó la enzima en la cuajada y en el queso al final de la maduración (seis meses).

2.2. Valoración de la actividad de plasmina y de plasminógeno

Se procesaron 5 g de queso finamente divididos con 15 ml de solución buffer de citrato de sodio 0.5 M. Luego de agitarse en vórtex, la mezcla se centrifugó a 8.000 rpm -10 min y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 14.000 rpm - 5 min. para obtener un extracto claro. La enzima se analizó con la metodología colorimétrica de Rollema et al (1983). En la misma se produce la liberación de para-nitroanilina que se cuantifica por espectrofotometría a 390 nm, debido a la acción enzimática de la plasmina sobre el tripéptido cromogénico D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO USA). Para la determinación de plasminógeno se realizó la activación del mismo a plasmina con uroquinasa (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO USA). De esta forma se determinó la actividad total y por diferencia se evaluó la actividad de plasminógeno. El análisis se realizó por triplicado para los todos quesos analizados. Los valores de actividad de plasmina y de plasminógeno se expresaron en μg de plasmina g^{-1} de queso, empleando la curva de calibrado realizada con soluciones de plasmina (Sigma Chemical Co., MO USA) de distintas concentraciones preparadas en buffer Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4.

2.3. Otras determinaciones

A fin de correlacionar los valores de actividad obtenidos con otros parámetros, se determinó el pH de las muestras según método APHA (Bradley et al, 1992). También se analizó la acción proteolítica de la plasmina sobre las caseínas, especialmente la β , para lo cual se realizó el análisis electroforético (Urea-PAGE) del residuo caseínico insoluble a pH 4,6 según el método de Andrews (1983), utilizando como control caseinato de sodio. La cuantificación de las distintas bandas se realizó con un densitómetro Minidensit (SEAC, Italia) a una longitud de onda de 632 nm. Con los valores obtenidos se determinaron los porcentajes de caseína β y γ respecto de la caseína total, y se calculó el índice de proteolisis de la caseína β definido como $CN-\gamma / (CN-\gamma + CN-\beta) \times 100$.

2.4. Tratamiento estadístico

Se aplicó análisis de variancia (ANOVA) y la prueba de rango múltiple para detectar diferencias entre los quesos analizados. La comparación entre valores de plasmina y niveles de degradación de la β caseína se llevó a cabo mediante regresión lineal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los valores de pH obtenidos para las muestras y las medias de cada variedad. El valor promedio de pH para los quesos muy blandos fue significativamente menor ($p > 0,05$) que el de los otros quesos.

Tabla 1: Valores de pH obtenidos para los quesos comerciales analizados.

Quesos	Valores de pH	pH promedio
MB1	4,74	4,66+/-0,11
MB2	4,59	
B1	5,2	5,40+/-0,28
B2	5,6	
SD1	5,38	5,37+/-0,15
SD2	5,51	
SD3	5,60	
SD4	5,23	
SD5	5,26	
SD6	5,26	
D1	5,45	5,36+/-0,07
D2	5,29	
D3	5,34	
D4	5,34	

Los valores obtenidos en $\mu\text{g plasmina g}^{-1}$ de queso, para las distintas variedades incluyendo el promedio de los tres quesos Reggianito experimentales (D_5 a D_7) con 180 días de maduración, se presentan en la Figura 1.

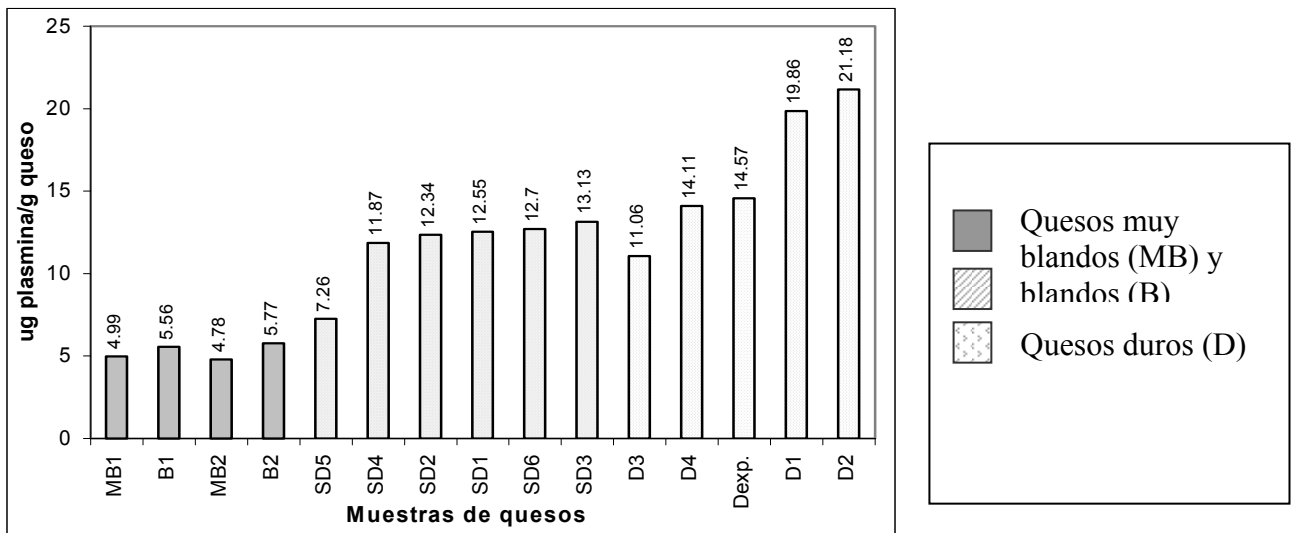


Figura 1: Actividad de plasmina ($\mu\text{g plasmina g}^{-1}$ queso) en quesos comerciales y en queso Reggianito experimental.

Quesos semiduros (SD)

Los valores promedio de actividad de plasmina y de plasminógeno, y la relación plasminógeno/plasmina para las 4 variedades estudiadas, se observan en la Figura 2.

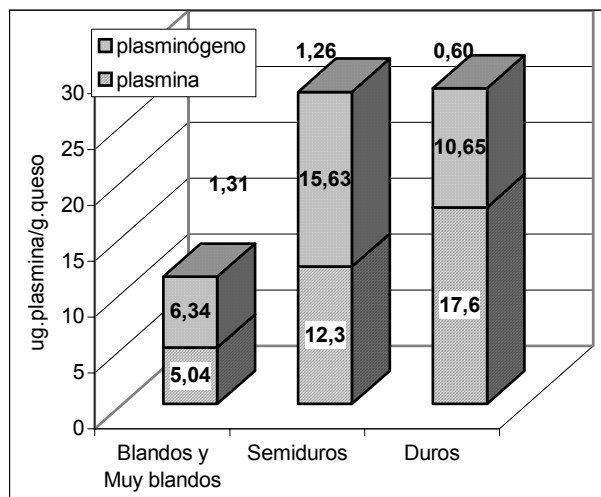


Figura 2: Valores promedio de actividad en quesos comerciales argentinos ($\mu\text{g plasmina/g queso}$). El valor sobre la barra indica relación Plasminógeno/Plasmina.

Para los quesos blandos (B_1 , B_2 , MB_1 y MB_2) se encontraron los valores más bajos en actividad. Esto podría justificarse por la similitud en los procesos de fabricación, ya que se trata de quesos de pasta blanda y ligeramente ácidos, cuya coagulación se produce por cuajo, a veces complementada por acidificación láctica y/o enzimas específicas, sin etapa de cocción y sin maduración o con un período muy corto. Estas condiciones conllevan, a una mayor pérdida de plasmina, por cuanto la etapa de acidificación de la cuajada que se produce en pocas horas (2-3 hs) simultáneamente con su desuerado, ocasiona que plasminógeno y plasmina se disocian de la micela de caseína y se eliminan con el suero, dado que estas uniones se debilitan por el pH ácido. Este efecto se vio acentuado en el caso especial de los quesos muy blandos, para los que se encontraron valores de plasmina y de pH significativamente más bajos ($p > 0,05$). En lo que respecta a la relación plasminógeno/plasmina (valor promedio de $1,31 \pm 0,39$), en los quesos blandos no se destruyen los inhibidores de los activadores de plasminógeno y por lo tanto predomina la forma inactiva de la enzima (plasminógeno).

Para los quesos semiduros (SD_1 a SD_6) se encontraron valores intermedios entre los quesos blandos y duros. Los valores superiores con respecto a los quesos blandos se debe a que la acidificación se produce luego del desuerado, y a que el tiempo de maduración es mayor. No se detectaron diferencias significativas entre los quesos SD_1 , SD_2 , SD_3 , SD_4 y SD_6 , sin embargo se encontraron diferencias ($p < 0,05$) entre éstos y el Provolone (SD_5), para el que se encontró un menor valor de actividad. Esto se debe a que durante la elaboración del Provolone Hilado se realiza un lavado de la masa a pH ácido (5,0 - 5,1) con lo que se produce la eliminación parcial de la plasmina debido a que a ese pH se debilita la asociación de la enzima con la micela. En lo que respecta a la relación plasminógeno/plasmina (valor promedio = $1,26 \pm 0,28$), la misma continúa siendo mayor que uno.

Finalmente, para los quesos duros tanto comerciales como los experimentales (D_1 a D_7), se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos lo que permitió definir tres niveles. El primero constituido por los quesos D_1 y D_2 para los que se obtuvieron los valores más altos; el segundo formado por D_4 , D_5 , D_6 y D_7 con valores intermedios y superiores a D_3 ubicado en el tercer nivel. Este comportamiento puede atribuirse a diferencias en la tecnología de elaboración o en el proceso de maduración, ya que se trata de muestras de distintos orígenes. Sin embargo, en todos los casos, los valores de actividad de plasmina encontrados en estos quesos fueron significativamente superiores a los obtenidos para los otros tipos. Esto se debe a que los mismos son sometidos a temperaturas de cocción muy elevadas (52-55 °C), produciéndose la inactivación por

desnaturalización térmica, de los inhibidores del sistema plasmina-plasminógeno. Por otro lado, los prolongados períodos de maduración facilitan la activación del plasminógeno y su conversión a plasmina. De esta manera, la relación plasminógeno/plasmina fue menor que uno (valor promedio = $0,60 \pm 0,12$), la que se diferenció de la hallada para los quesos blandos y semiduros. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros investigadores, quienes encontraron los valores más elevados de actividad para este tipo de queso.

En la Figura 3 se presentan los valores medios de actividad de plasmina para las cuajadas y los quesos Reggianito experimentales (D_5 , D_6 y D_7) con 180 días de maduración. Los resultados obtenidos confirman el proceso de activación del plasminógeno durante la maduración, ya que se encontró en la cuajada un valor promedio de relación plasminógeno/plasmina de $2,96 \pm 0,27$ (25% de la actividad total), mientras que a los seis meses de maduración la relación descendió a $0,69 \pm 0,1$ (59% respecto al total).

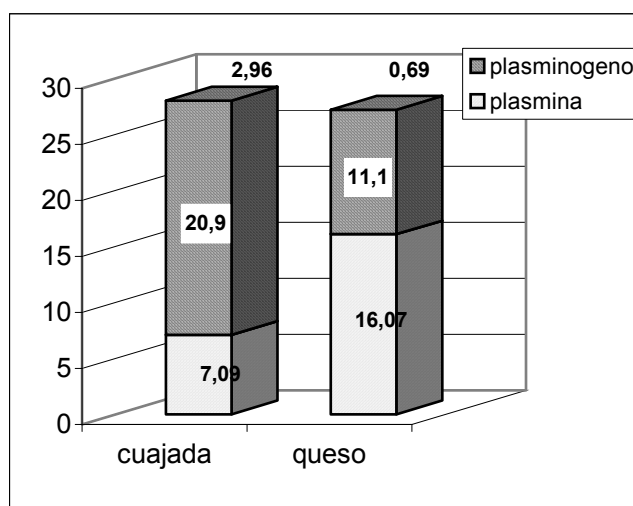


Figura 3: Valores de actividad de plasmina y plasminógeno en cuajada y queso Reggianito experimental (180 días) ($\mu\text{g plasmina g}^{-1}$ queso). Valor sobre la barra indica relación plasminógeno/plasmina.

El análisis electroforético se efectuó para algunas muestras representativas de las variedades estudiadas (B_1 , SD_1 , SD_5 , D_2 , D_3 y D_4). Se observó que a medida que aumenta la actividad de plasmina, aumentan el índice de proteólisis de la caseína β y el porcentaje de caseína γ , mientras que el porcentaje de caseína β disminuye. Estos datos se procesaron por medio de una regresión lineal simple. El coeficiente de correlación obtenido ($0,887$; $p < 0,01$) indicó una buena correlación, hecho que estaría comprobando

la preferencia de la plasmina por la caseína- β como sustrato.

CONCLUSIONES

Los valores obtenidos de actividad de plasmina se relacionaron satisfactoriamente con el proceso tecnológico empleado en los distintos tipos de quesos. Se observaron claramente las diferencias en la actividad de la enzima de acuerdo a la variedad de queso. Se verificó una activación del plasminógeno durante el proceso de maduración de quesos Reggianito Argentino, lo que se tradujo en una disminución de la relación plasminógeno/plasmina. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre la actividad de plasmina y el índice de proteólisis de la caseína β obtenido por el análisis densitométrico de los perfiles de electroforesis.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan los primeros datos existentes sobre la valoración de la plasmina en quesos típicos argentinos.

BIBLIOGRAFÍA

Andrews, A. T. (1983). "Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins". J. Dairy Res. 50, 45-54.

Bradley R.L., Arnold E., Barbano D.M., Semerad R.G., Smith D.E. and Vines B.K. (1993). Chemical and physical methods. In R. Marshall, *Standard methods for the examination of Dairy Products* (433-531). Washington D.C.: American Public Health Association.

Grufferty, M.B.; Fox, P.F. (1988). Review article. "Milk alkaline proteinase". J. Dairy Res. 55, 609-630.

Rampilli, M. y Raja, V. (1998). "Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio". Scienza e Técnica Lattiero Casearia, 49 (6), 341-350.

Rollema, H. S.; Visser S. y Poll, J. K. (1983). "Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk". Milchwissenschaft, 38, 214-217.

Zalazar, C.; Meinardi, C.; Reinheimer, J. (1994). "Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos". Diagrama (Ed.), Argentina.

PROPIEDADES REOLÓGICAS DE MASA DE EMPANADAS LIBRES DE GLUTEN

¹GARCÍA, María E., ^{1,2}ZARITZKY, Noemí E. y ¹CALIFANO, Alicia N.

¹ CIDCA. CONICET. Fac. Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 116. La Plata. ² Fac.de Ingeniería, UNLP. La Plata. e-mail: anc@quimica.unlp.edu.ar. TE/FAX: 0221-4254853/ 4249287.

RESUMEN

La masa de empanadas incluye normalmente harina de trigo que contiene gluten por lo cual no son aptas para individuos celíacos. El gluten confiere características elásticas a la masa, por lo que su reemplazo por almidón constituye un desafío para el tecnólogo, especialmente desde el punto de vista reológico. El presente estudio examina el comportamiento reológico de masa de empanadas libre de gluten, analizando los efectos de la adición de gomas, concentrado de proteínas de suero de leche, huevo deshidratado y agua, a almidones de maíz y mandioca. Las formulaciones incluyeron aceite de maíz y NaCl. Los estudios reológicos comprendieron análisis de textura y ensayos de viscoelasticidad. En el primer caso se utilizó un texturómetro TAXT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems,UK) en ensayos de punción y elongación. Para estudiar las propiedades viscoelásticas de las masas formuladas se empleó un reómetro de esfuerzo controlado RS6000 (Haake,Alemania) utilizando experimentos dinámicos oscilatorios para determinar los módulos de almacenamiento y pérdida. Las formulaciones conteniendo altos porcentajes de gomas y bajos contenidos de agua tuvieron un comportamiento adecuado para la producción industrial de masas a base de almidón destinadas a individuos celíacos.

Palabras clave: masa, celíacos, hidrocoloides, textura, reología.

ABSTRACT

Dough for “empanadas”, a traditional meal in Latin America, includes wheat flour that contains gluten; they are home-made or industrially prepared and sold refrigerated. When people with celiac disease eat foods containing gluten, their immune system responds by damaging the small intestine walls. Then people affected by celiac disease cannot eat this type of meals. Gluten is responsible for the elastic characteristics of the dough, thus the replacement of gluten by starch results in a major challenge to the cereal technologist mainly from the rheological point of view. The present study was designed to examine the

effects of the addition of gums, whey protein concentrate, dry egg, and water, to corn and cassava starch on the rheological properties of “empanadas” dough. Rheological studies involved texture analysis and viscoelastic measurements. A TAXT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems,UK) was used to determine the maximum tensile strength on stretching and the maximum force need to puncture a thin (2mm) dough disk. A Controlled-Stress Rheometer RS6000 (Haake,Germany) was used for studying the viscoelastic properties of the formulated doughs by dynamic oscillatory experiments using a serrated plate-and-plate geometry. Storage and loss moduli, complex viscosity, and loss tangent were determined within the linear viscoelastic range. Formulations containing higher percentages of gums and lower water content led to an appropriate behavior for industrial production of these doughs suitable for celiac persons.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca consiste en una intolerancia irreversible a la fracción gliadina de las proteínas de trigo, a las prolaminas de centeno (secalinas) y cebada (hordeínas) y posiblemente de avena (avidinas) (Murray, 1999). En los últimos años ha aumentado significativamente la investigación relacionada a la obtención de productos de panadería libres de gluten, con diversas líneas de trabajo que incluyen el uso de almidones, productos lácteos, gomas e hidrocoloides (Ward y Andon, 2002; Gallagher y col, 2003, 2004; Kobulañsky y col., 2004).

Los almidones libres de gluten no forman una fase continua y por lo tanto las masas no presentan la estructura adecuada para lograr una buena calidad. Por lo tanto, los productos de panadería libres de gluten requieren la adición de sustancias poliméricas que impriman propiedades viscoelásticas similares a las de masas con gluten. El efecto de los hidrocoloides en las propiedades reológicas de la masa cruda y su posterior evolución durante el horneado depende de la naturaleza, origen y dosis de los hidrocoloides incorporados, de las condiciones de procesamiento y del resto de los ingredientes empleados. Sin embargo no se han encontrado en la literatura referencias respecto a la formulación de masas libres de gluten para la preparación de tartas o empanadas, a pesar de su amplio consumo a nivel internacional y especialmente en Latinoamérica. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos producidos por la adición de gomas, concentrado de proteína de suero lácteo, huevo en polvo y agua (usados en combinación a distintos niveles), a una mezcla de almidón de maíz y mandioca en las propiedades reológicas y textura de masa para empanadas apta para celíacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la formulación de las masas se utilizaron los siguientes ingredientes: almidón de maíz (Refinerías de Maíz S.A., Argentina), almidón de mandioca (Indecar S.A., Argentina), aceite puro de girasol (Molinos Río de La Plata SACIFI, Argentina), concentrado de proteína de suero lácteo (80% proteína, Arla Food Ingredients S.A., Argentina), gomas xántica y guar (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), huevo en polvo (Tecnovo S.A., Argentina) y NaCl grado analítico. En todas las formulaciones se empleó agua destilada. La relación de almidón de maíz a almidón de mandioca empleada fue de 2:1, la misma relación se utilizó en el caso de goma xántica/goma guar. Se utilizó un experimento factorial completo, 2^4 , donde los factores analizados fueron: gomas (G), concentrado de proteínas de suero (CPS), huevo en polvo (H) y agua (A) todos estos factores a dos niveles, con dos puntos centrales agregados (Tabla 1), formulándose, entonces 17 masas diferentes; la notación elegida y contenidos codificados usados en cada formulación se muestran en la Tabla 2. Todas las formulaciones incluyeron 2% de NaCl y 20% de aceite. Las masas se prepararon en un procesador de alimentos (Universo, Rowenta, Alemania) en la forma tradicional, adicionando los componentes líquidos a la mezcla de sólidos en polvo. Las masas se mantuvieron en recipientes herméticos a 4°C por 24hs antes de estirarlas en láminas de 2mm de espesor.

Tabla 1. Niveles de adición de gomas, concentrado de proteína de suero lácteo, huevo en polvo y agua. Los porcentajes se expresan como g/100g almidón

Niveles	Factor			
	Gomas	Concentrado de suero de leche	Huevo en Polvo	Agua
-1	1.5%	3.5%	3.5%	51%
0	2.25%	5%	5%	53%
+1	3%	6.5%	6.5%	55%

Análisis de Textura

Los análisis objetivos de textura se realizaron en un TAXT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK). Cada formulación se midió por sextuplicado y se reportan los valores promedios. Ensayos de Punción: Se realizaron sobre muestras de 8cm de diam. y 2mm de espesor, utilizando un punzón cilíndrico de 2mm de diam. a una velocidad constante de penetración de 1 mm/s, determinándose la fuerza máxima de ruptura (mN).

Ensayos de Elongación: Para estos ensayos se utilizaron rectángulos de masa de 90x 35x2 mm usando un sistema de mordazas A/TG. La velocidad de ascenso fue de 0.5

mm/s. La fuerza máxima de ruptura por elongación (N) y la deformación en la ruptura (extensión en el momento de ruptura, mm) se obtuvieron de las curvas fuerza vs. deformación.

Tabla 2. Notación y contenidos codificados usados en la formulación

Notación	Gomas (G)	CPS	Huevo en Polvo(H)	Agua (A)
F1111*	-1	-1	-1	-1
F3113	+1	-1	-1	+1
F1313	-1	+1	-1	+1
F3311	+1	+1	-1	-1
F1133	-1	-1	+1	+1
F3131	+1	-1	+1	-1
F1331	-1	+1	+1	-1
F3333	+1	+1	+1	+1
F2222	0	0	0	0
F1333	-1	+1	+1	+1
F3331	+1	+1	+1	-1
F3313	+1	+1	-1	+1
F3133	+1	-1	+1	+1
F1113	-1	-1	-1	+1
F3111	+1	-1	-1	-1
F1311	-1	+1	-1	-1
F1131	-1	-1	+1	-1

* El primer numeral de la notación corresponde a gomas, el segundo a CPS, el tercero a H y el cuarto al contenido de agua. El numeral 1 indica el nivel (-1), el 2 indica el nivel (0) y el 3 corresponde al nivel (+1).

Ensayos Oscilatorios

Los ensayos reológicos dinámicos (G' , G'' vs. frecuencia, (ω)) se realizaron en un reómetro de esfuerzo controlado Rheometer RS600 (Haake, Alemania) utilizando una geometría plato-plato (rugoso, 35 mm diam., 1 mm de distancia entre platos), a 20°C. La frecuencia varió entre 0.09 y 130 s⁻¹. La región viscoelástica lineal se determinó a través de ensayos de barrido del esfuerzo a una frecuencia fija (6.28 s⁻¹). Las formulaciones se analizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Textura Los resultados experimentales de fuerza máxima de ruptura en ensayos de punción (FP) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) del modelo factorial completo.

Todos los términos fueron significativos ($P < 0.05$), excepto tres: CPS, G x CPS y CPS x H x A. Sin embargo, el impacto de los diferentes componentes en FP fue diferente. El factor que más influyó fue el contenido de gomas, ya que explicó un 70.94% de la variación total; aumentar G de 1.5% a 3% incrementó FP en 60mN. En cambio FP disminuyó al incrementarse el contenido de huevo en polvo (de 97mN a 72mN). La interacción G x H fue significativa como se puede ver en la Fig.1a, otro tanto ocurrió con la interacción G x A (Fig 1.b). Con respecto al contenido de agua, al aumentar el mismo la fuerza necesaria para perforar la masa fue menor (de 83mN a 120mN, 12.1% varianza explicada).

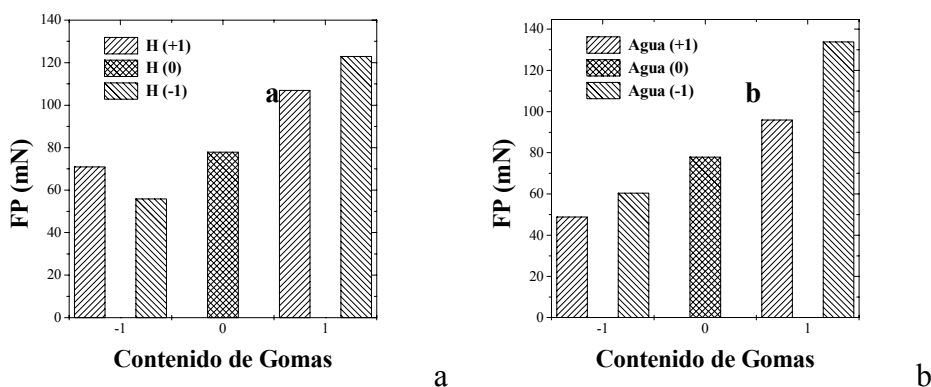


Figura 1. Efecto del contenido de gomas, agua y huevo en polvo (H) en la fuerza de ruptura por punción, FP.

La Tabla 3 muestra los valores medios de las fuerzas máximas de punción obtenidas para las formulaciones de masas libres de gluten formuladas.

Tabla 3. Valores medios de las fuerzas máximas de ruptura correspondientes a ensayos de punción, FP

FP (mN)		FP (mN)		FP (mN)	
F1333	44 ^a	F1331	61 ^{bc}	F3113	103 ^{gh}
F1113	45 ^a	F1111	72 ^{cd}	F3331	109 ^{hi}
F1313	52 ^{ab}	F2222	78 ^{de}	F3131	129 ^{ij}
F1133	54 ^{ab}	F3333	88 ^e	F3111	130 ^j
F1131	54 ^{ab}	F3313	92 ^{fg}	F3311	167 ^k
F1311	55 ^{ab}	F3133	101 ^{gh}		

*Los supraíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Las formulaciones F1333 y F1113 resultaron demasiado blandas y no fue posible realizar con ellas los ensayos de elongación. Solamente tres efectos principales fueron significativos ($P < 0.05$) en el caso de la deformación en el punto de ruptura (máxima elongación, D): el contenido de gomas (G) explicó el 78.3% de la variación total, el

contenido de agua un 3%, mientras que H solamente un 0.8%; la interacción GxA también fue significativa.

La máxima elongación que soporta una masa sin romperse fue proporcional a la máxima fuerza en los ensayos de elongación (FE). Al aumentar la proporción de gomas o huevo en polvo, también se incrementó FE, si bien G produjo cambios mayores que H; en cambio, FE y D disminuyeron al aumentar CPS, H o A. Valores medios de FE y D para los ensayos de elongación se muestran en la Tabla 4 para todas las formulaciones estudiadas.

Tabla 4. Valores medios de la máxima fuerza (FE) y la deformación (D) en el punto de ruptura correspondiente a los ensayos de elongación

	FE (N)	D(mm)		FE (N)	D(mm)		FE (N)	D (mm)
F1133	0.053 ^a	2.3 ^a	F1331	0.071 ^{ab}	5.6 ^{ab}	F3311	0.200 ^e	14.3 ^e
F1311	0.075 ^{ab}	3.7 ^a	F2222	0.115 ^c	7.4 ^{bc}	F3331	0.154 ^d	15.0 ^e
F1313	0.063 ^{ab}	4.0 ^{ab}	F3113	0.206 ^e	10.5 ^c	F3133	0.146 ^{cd}	15.0 ^e
F1111	0.100 ^b	4.6 ^{ab}	F3313	0.162 ^d	11.15 ^{ce}	F3111	0.208 ^e	15.4 ^e
F1131	0.065 ^{ab}	4.7 ^{ab}	F3333	0.141 ^{cd}	11.4 ^{ce}	F3131	0.197 ^e	15.6 ^e

*Los supraíndices distintos indican diferencias significativas (P<0.05)

Los resultados obtenidos en los ensayos de punción y elongación permiten concluir que la formulación con el mayor nivel de goma combinada con el menor contenido de agua ensayado produjo masas de fácil manipulación (altos valores de FP). Además estas formulaciones mostraron también altos valores de FE y D, por lo que resistirían mejor la expansión de volumen que se produce durante las etapas iniciales de cocción debido a la dilatación del aire y del vapor de agua formado.

Ensayos dinámicos oscilatorios (viscoelasticidad lineal)

Los resultados de los ensayos dinámicos oscilatorios se muestran en la Fig. 2, expresados en términos del módulo de almacenamiento (G') y del módulo de pérdida (G''). En todos los casos, las curvas fueron cualitativamente similares; G' fue siempre mayor que G'' en el rango de frecuencias estudiado y las formulaciones evidenciaron un aumento de G' y G'' al incrementar la frecuencia (Fig. 2).

Por lo tanto, las masas presentaron una respuesta predominantemente elástica. En las curvas aparece también una zona "plateau", donde G'' permaneció prácticamente constante, que está relacionada con la formación de entrecruzamientos físicos entre moléculas poliméricas que forman una red tridimensional. Tanto el contenido de gomas

como de agua influyeron significativamente en G' y G'' . La mayor adición de gomas aumentó ambos módulos, mientras que el aumento del contenido de agua provocó la disminución de los mismos

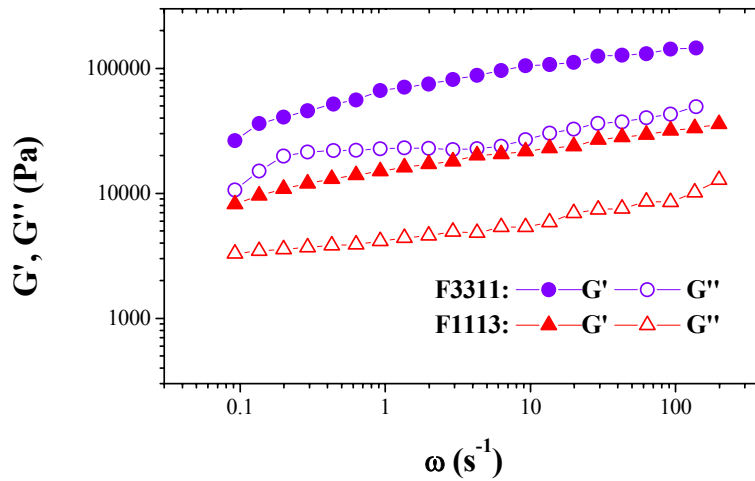


Figura 2. Barrido de frecuencia dinámica para las formulaciones F3311 y F1113. ($P < 0.05$); este efecto también fue informado por Masi y col. (1998) y por Kenny y col. (2001) para masas de harina de trigo (Fig.3 a y b).

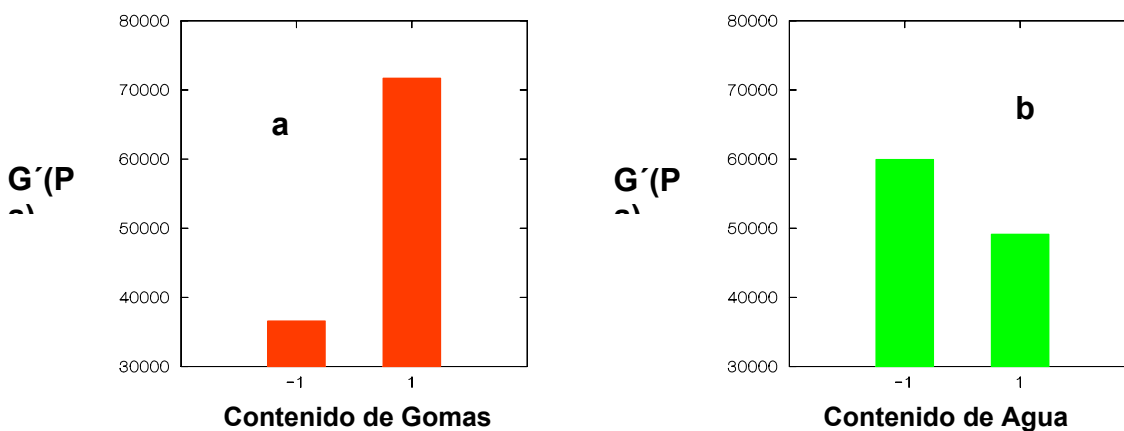


Figura 3. Valores medios del módulo de almacenamiento G' , a 6.28 s^{-1} en función de: a) contenido de gomas, b) contenido de agua

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una masa en base a almidones y gomas que resultaron apropiadas para una producción industrial de este tipo de masa apto para enfermos celíacos. Las formulaciones conteniendo porcentajes más altos de gomas y menor contenido acuoso fueron las más adecuadas en lo referente a su comportamiento reológico. Ambos tipos de ensayos de textura (punción y elongación) condujeron a conclusiones similares que las obtenidas mediante el análisis de los resultados de los ensayos reológicos dinámicos.

BIBLIOGRAFÍA

Gallagher, E., Gormley, T., Arendt, E. (2003) Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering*, 56: 153-161.

Gallagher, E., Gormley, T., Arendt, E. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 143-152.

Kobylaňsky, J., Pérez, OE, Pilosof A. (2004) Thermal transitions of gluten-free doughs as affected by water, egg white and hydroxypropylmethylcellulose. *Thermochimica Acta* 411: 81-89.

Kenny, S., Wehrle, K., Auty, M., Arendt, E.K. (2001). Influence of Sodium Caseinate and whey Protein on Baking Properties and Rheology of Frozen Dough. *Cereal Chem.* 78: 458-463.

Masi, Cavella, s., Sepe, M. (1998). Characterization of Dynamic Viscoelastic Behaviour of Wheat Flour Doughs at Different Moisture Contents. *Cereal Chem.*, 75: 428-432.

Murray, JA. (1999). The widening spectrum of celiac disease. *Am. J. Clinical Nutrition*, 69: 354-365.

Ward, MF. y Andon, SA. (2002) Hydrocolloids as film formers, adhesives and gelling agents for bakery and cereal products. *Cereal Foods World*, 47: 52-55.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Tecno, S.A., Argentina y a Arla Food Ingredients S.A., Argentina, por proveer el huevo deshidratado y el concentrado proteico de suero lácteo. El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y la Universidad Nacional de La Plata.

ESTUDIO DE LA PROTEÓLISIS DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS FYNBO MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MULTIVARIADO

SIHUFÉ Guillermo A., ZORRILLA Susana E. y RUBIOLLO Amelia C.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química Güemes 3450, Santa Fe (Argentina).
Tel.: 342-4559175, Fax: 342-4550944. E-mail: gsihufe@intec.unl.edu.ar

RESUMEN

El seguimiento de la proteólisis durante la maduración de quesos generalmente se realiza mediante técnicas que suelen generar grandes grupos de datos. Los Métodos de Análisis Multivariado son útiles para extraer la información más relevante. En el presente estudio, se utilizó el método de Análisis de Componentes Principales (PCA) para analizar los datos obtenidos en la evaluación de la proteólisis de quesos Fynbo madurados a 3 temperaturas diferentes. El PC1 "loading" (64.5% VAR) permitió diferenciar entre las fracciones que decrecen de aquellas que aumentan durante la maduración. El PC2 "loading" (8.1% VAR) separó las fracciones según el momento del período de maduración en que éstas aumentan notablemente. El PC1 se relacionó con el tiempo de maduración. El contenido de nitrógeno de la fracción soluble en agua a pH 4.6 resultó ser un parámetro adecuado para predecir el tiempo de maduración a las temperaturas estudiadas.

ABSTRACT

Proteolysis study during cheese ripening is generally carried out through techniques that often produce large data sets. Multivariate Analysis Methods are useful to obtain the relevant information. In this study, Principal Component Analysis (PCA) was used to analyze data obtained for evaluating the proteolysis of Fynbo cheeses ripened at 3 different temperatures. PC1 loading (64.5% VAR) allowed differentiating among the fractions that decrease from those that increase during ripening. PC2 loading (8.1% VAR) separated the fractions according to the moment of the ripening period in which they notoriously increased. PC1 was related to the ripening time. The nitrogen content of the soluble fraction in water at pH 4.6 was an adequate parameter to predict the ripening time at the studied temperatures.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas analíticas frecuentemente utilizadas en el área de la química suelen generar grandes grupos de datos, producto de las mediciones realizadas para un número determinado de variables sobre un gran número de muestras. El manejo e interpretación de estos datos para extraer la información más relevante requiere del uso de los llamados Métodos de Análisis Multivariado. El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una de las técnicas de análisis multivariado más antigua y más utilizada.

El objetivo general de PCA es simplificar o reducir la dimensionalidad de los datos, de manera tal de obtener un conjunto de datos con menor cantidad de componentes y con la mínima pérdida de información (Gardiner, 1997). En este sentido, PCA realiza una combinación lineal de las variables medidas para obtener variables derivadas llamadas componentes principales (PC), las cuales son mutuamente ortogonales en el espacio de los componentes principales (Gardiner, 1997). Se considera que el número de componentes principales es adecuado para resumir el conjunto de datos originales cuando acumulan entre el 70 y el 90% de la variabilidad total (Everitt y Dunn, 2001).

Del análisis de las muestras por PCA se obtienen los PC "scores" (puntuación), los que permiten visualizar el agrupamiento de las muestras en este nuevo espacio, y los PC "loadings" (cargas), los que proporcionan una idea de la contribución que tienen las variables originales sobre el agrupamiento de las muestras. Cuanto mayor resulta el valor de los PC "loadings" (positivo o negativo), mayor es su influencia en el agrupamiento de las muestras (Gardiner, 1997).

Los principales cambios bioquímicos que ocurren durante la etapa de maduración de quesos involucran reacciones de hidrólisis de lactosa, de conversión de las grasas en ácidos grasos libres y de hidrólisis de las caseínas. Los cambios primarios son seguidos por reacciones catabólicas más específicas como deaminación, decarboxilación, β -oxidación, etc, las cuales conducen a la obtención de los productos responsables del sabor y aroma característicos de cada variedad de queso. En el caso de la proteólisis, la acción combinada de los distintos sistemas enzimáticos conduce a la formación de productos que varían desde grandes péptidos, a péptidos de tamaño intermedio o pequeño y aminoácidos (Fox y col. 1994). Dichos procesos dependen fundamentalmente de factores tales como la temperatura y la concentración salina del medio donde se llevan a cabo.

Las técnicas empleadas para realizar un seguimiento de la proteólisis durante la maduración de quesos proporcionan grandes grupos de datos, los cuales son analizados de manera más sencilla y adecuada utilizando aquellos métodos estadísticos que

permiten extraer la información más relevante. En tal sentido, PCA resulta una herramienta útil para simplificar el análisis de los perfiles cromatográficos, electroforéticos, etc. Pripp y col. (1999) demostraron que el análisis estadístico multivariado de los perfiles cromatográficos fue una herramienta de mayor poder y objetividad para evaluar la proteólisis durante la maduración de quesos, que el análisis visual de los mismos.

En el presente estudio, se propuso evaluar los resultados obtenidos con diferentes metodologías de seguimiento de la proteólisis durante la maduración de quesos Fynbo a distintas temperaturas, a través de técnicas de análisis multivariado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veintiún quesos fueron salados en una solución de NaCl 190 g/L conteniendo 0.55% de Ca^{2+} para evitar el ablandamiento de los quesos (Geurts y col., 1972). El pH de la solución se ajustó a 5.5 con HCl 1N. El salado se realizó durante 10 h a 12 °C y 90% de humedad relativa. Luego de la etapa de salado, los 21 quesos se dividieron en 3 lotes de 7 quesos cada uno. Un lote de quesos se maduró a 5 °C, otro a 12 °C y el tercer lote se maduró a 16 °C. El período total de maduración estudiado fue de 90 días y se analizaron quesos a distintos tiempos de maduración: 1, 5, 10, 20, 30, 60 y 90 días. Dos zonas de muestreo se seleccionaron de manera que sus contenidos de sal al comienzo de la maduración fueran marcadamente diferentes: la zona central (C) y la zona periférica (P), según Sihufe y col. (2003). La obtención del extracto soluble en agua a pH 4.6, la determinación del contenido de nitrógeno en el mismo y el análisis electroforético de las muestras proveen información acerca del grado de proteólisis alcanzado durante la maduración. Estas determinaciones se realizaron según Sihufe y col. (2003). El análisis cromatográfico de las muestras es utilizado habitualmente para separar los péptidos de menor tamaño presentes en los extractos de queso. Esta determinación se realizó según lo detallado por Sihufe y col. (2005a).

Para realizar el análisis multivariado de las muestras se utilizó el programa Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis electroforético de las muestras fue posible diferenciar y estudiar 6 fracciones con movilidades diferentes: γ -caseína, β -caseína, fracción F1, α_{s1} -caseína, α_{s1} -I- caseína y fracción F2. Las fracciones α_{s1} - y β -caseína disminuyeron durante la maduración, mientras que las fracciones F1, F2, α_{s1} -I- y γ -caseína en general aumentaron durante el período en estudio (Sihufe y col., 2003).

Los perfiles del nitrógeno soluble en agua a pH 4.6 (NS), generalmente usados para el cálculo del índice de maduración, presentaron una clara tendencia creciente durante la maduración para los quesos en estudio. La zona C presentó valores de NS más altos que la zona P principalmente durante los primeros 30 días, lo cual evidencia el efecto del contenido salino sobre la actividad de las distintas enzimas que actúan durante la proteólisis. Además, se observó una diferencia importante entre los perfiles de los quesos madurados a 12 y 16 °C con aquellos madurados a 5 °C principalmente a partir de los 20 días de maduración (Sihufe y col., 2003).

Se obtuvieron los perfiles por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y se analizaron los cromatogramas correspondientes a las muestras de los tratamientos estudiados. Se identificaron y analizaron 21 picos con áreas cromatográficas importantes durante el período en estudio. En la mayoría de los picos analizados se observó un incremento en el área durante la maduración. El tiempo y la temperatura de maduración fueron los factores que más afectaron los perfiles de las áreas de los picos cromatográficos (Sihufe y col., 2005b).

La información obtenida con las distintas técnicas utilizadas para evaluar el desarrollo de la proteólisis durante la maduración de quesos fue analizada en conjunto utilizando el método de PCA. Debido a que los valores de NS, los porcentajes de área relativa de las distintas fracciones electroforéticas y los valores de las áreas de los picos cromatográficos, se encontraban en escalas de medida diferentes fue necesario realizar un cambio de escala de los mismos de manera tal de trabajar con los datos en rangos y variancias similares. Dicho cambio de escala se realizó de manera similar a la propuesta por Furtula y col. (1994), transformando los valores de cada columna en un porcentaje del valor máximo de dicha columna, otorgándose el valor de 100% al máximo de cada columna.

Los primeros dos componentes principales acumularon el 72.6% de la variabilidad total de los datos. La distribución de las muestras en el plano definido por los dos componentes principales muestra un grupo compacto a la derecha del gráfico que incluye a la mayor parte de las muestras con período de maduración menor a 60 días (Figura 1). El tiempo de maduración resultó ser la principal fuente de variación asociada al PC1 (64.5% VAR), observándose además que la separación entre las muestras aumenta hacia el final del período en estudio.

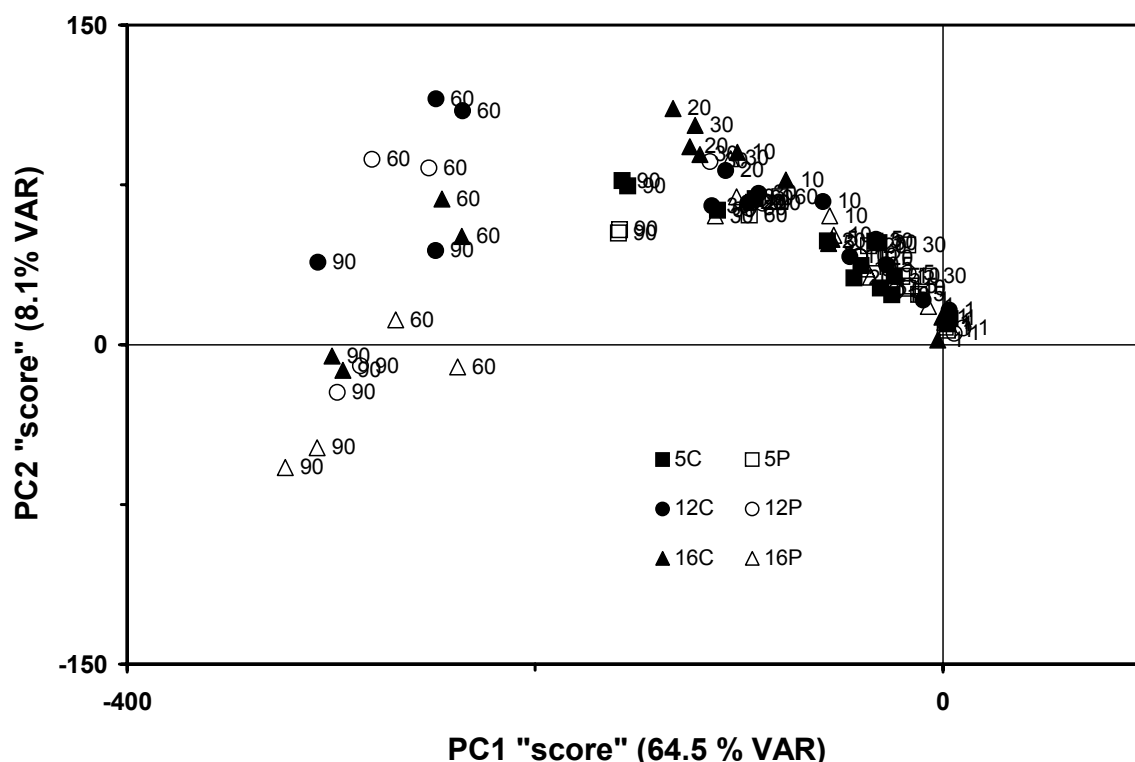


Figura 1. Distribución de las muestras en el plano definido por los dos componentes principales. Los números indican los días de maduración en que se obtuvieron las muestras

El gráfico de los PC “loadings” (Figura 2) permitió diferenciar en base al signo del PC1 “loading”, entre aquellas fracciones que decrecen a lo largo de la maduración (α_{s1} - y β -caseína) de todas aquellas que se incrementan durante este período, encontrándose en este grupo la mayoría de las fracciones electroforéticas, los picos cromatográficos y el NS. Por su parte, el PC2 “loading” (8.1% VAR) separó las fracciones provenientes de la proteólisis según el momento del período de maduración en que éstas aumentan notablemente. Las fracciones con PC2 positivo aumentaron desde el comienzo de la maduración, siendo los picos cromatográficos 5 y 8 los elementos más representativos de este grupo. Las fracciones con PC2 negativo crecen de manera importante recién a partir del primer mes de maduración, siendo la fracción electroforética F2 y el pico cromatográfico 11, los elementos más representativos de este grupo.

Se observó una relación lineal entre el primer componente principal y el tiempo de maduración, obteniéndose coeficientes de regresión (R^2) mayores a 0.9. Esto concuerda con lo observado visualmente en la Figura 1. Por lo tanto, se analizaron las variables con mayor PC1 “loading”, las que estarían fuertemente relacionadas con el tiempo de maduración.

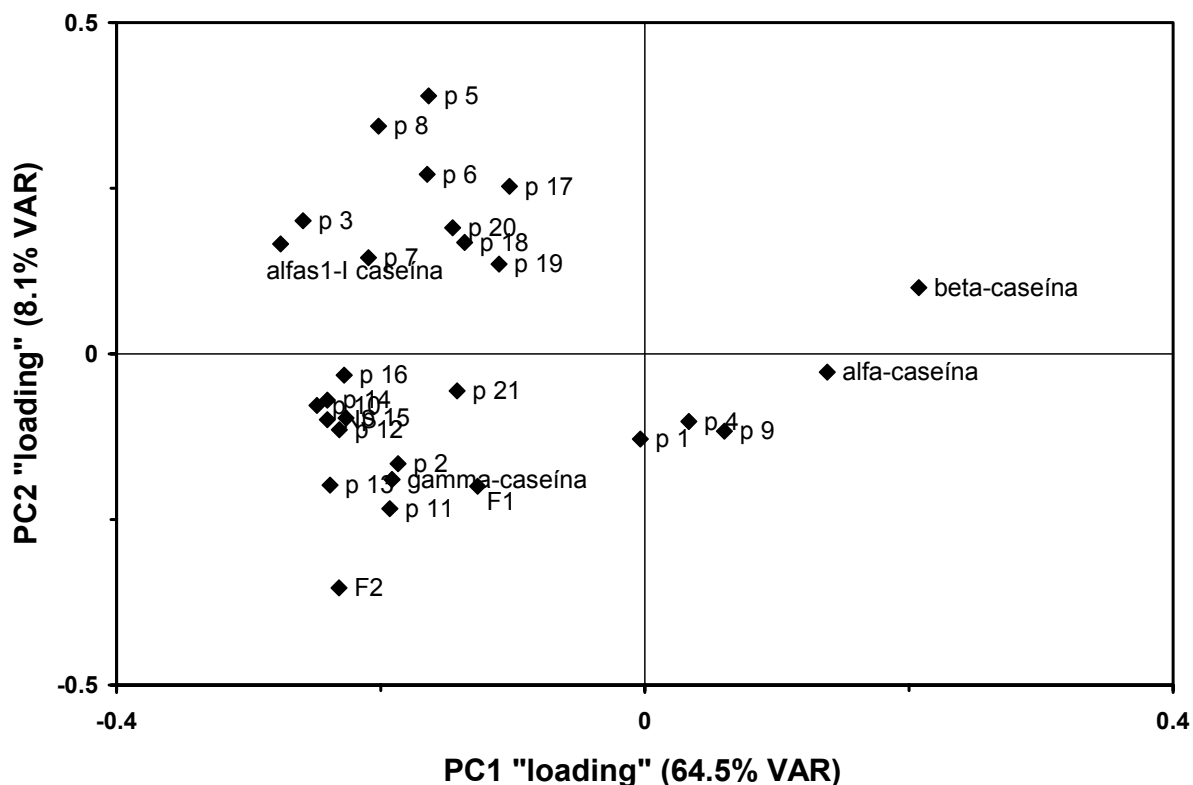


Figura 2. PC “loadings” correspondientes a los picos cromatográficos, el contenido de nitrógeno soluble en H₂O a pH 4.6 y las fracciones electroforéticas

De cada grupo de variables asociado a las técnicas analíticas utilizadas (NS, PAGE, RP-HPLC) se eligió la variable con mayor valor de PC1 “loading” para evaluar su relación lineal con el tiempo de maduración. Las variables elegidas fueron: el pico 3 (RP-HPLC), la fracción electroforética α_{s1-I} -caseína (PAGE) y el NS (Figura 2). Los mejores resultados fueron obtenidos con los valores de NS, ya que los R^2 para las otras 2 fracciones disminuyeron de manera importante a medida que aumentaba la temperatura de maduración del queso.

En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos al realizar la regresión lineal de los valores de NS con el tiempo de maduración a 5, 12 y 16 °C. Los valores del coeficiente de regresión fueron en todos los casos mayores a 0.96. Por lo tanto, el valor de NS durante la maduración, habitualmente relacionado con el índice de maduración, resultó ser un parámetro adecuado para estimar el tiempo de almacenamiento de quesos Fynbo en un rango de temperatura entre 5 y 16 °C, más aún teniendo en cuenta la simplicidad del método analítico.

Tabla 1. Regresión lineal entre el tiempo de maduración (y) y el valor de NS (x).

Zona	Temperatura (°C)	Regresión*	R ²
C	5	$y = -48.16 + 3.50x$	0.961
	12	$y = -13.74 + 1.21x$	0.971
	16	$y = -16.22 + 1.19x$	0.986
P	5	$y = -33.55 + 3.45x$	0.992
	12	$y = -11.20 + 1.21x$	0.993
	16	$y = -7.60 + 0.98x$	0.976

* y (días); x (% de proteína láctea).

CONCLUSIONES

Se usó el método de PCA para simplificar el análisis de la información obtenida a través de diferentes técnicas analíticas utilizadas para evaluar la proteólisis durante la maduración de quesos. La información obtenida fue resumida en dos dimensiones a través del PCA, acumulando las nuevas variables el 72.6% de la variabilidad total de los datos. El primer PC aparece fuertemente vinculado al tiempo de maduración. El gráfico de los PC "loadings" resultó útil para separar a las fracciones analizadas según disminuyan o aumenten durante la maduración y según el momento en que se presente dicha variación. El seguimiento de los valores del NS resultó ser un parámetro adecuado para estimar el tiempo de maduración de quesos Fynbo madurados en un rango entre 5 y 16 °C.

BIBLIOGRAFIA

Everitt B.S. y Dunn G. 2001. Applied multivariate data analysis. Segunda edición. Editorial Arnold, Londres, Inglaterra.

Fox P.F., Singh T.K. y McSweeney P.L.H. 1994. Proteolysis in cheese during ripening. En: Biochemistry of milk products. Editorial The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.

Furtula V., Nakai S., Amantea G.F. y Laleye L. 1994. Reverse-phase HPLC analysis of reference Cheddar cheese samples for assessing accelerated cheese ripening. Journal of Food Science, 59 (3): 533-538.

- Gardiner W.P. 1997.** Statistical analysis methods for chemist. A software-based approach. Editorial The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.
- Geurts T.J., Walstra P. y Mulder H. 1972.** Brine composition and the prevention of the defect "soft rind" in cheese. Netherland Milk Dairy Journal, 26: 168-179.
- Pripp A.H., Shakeel-Ur-Rehman, McSweeney P.L.H. y Fox P.F. 1999.** Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single-strain starters on proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses. International Dairy Journal, 9: 473-479.
- Sihufe G.A., Zorrilla S.E. y Rubiolo A.C. 2003.** Casein degradation of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. Journal of Food Science, 68 (1): 117-123.
- Sihufe G.A., Zorrilla S.E. y Rubiolo A.C. 2005a.** The effect of trichloroacetic acid on water-soluble fractions from Fynbo cheese. Food Chemistry, 93 (2): 305-310.
- Sihufe G.A., Zorrilla S.E. y Rubiolo A.C. 2005b.** Secondary proteolysis of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. Food Chemistry, en prensa.

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE HARINA DE ARROZ DE VARIEDADES CULTIVADAS EN URUGUAY

GILARDI, Virginia B.; VERA, Lucía; ALMANDOS, Gabriela; QUIJANO, Carina; PAVLISKO, Andrea M.; y Durán, Iliá M.

Cátedra de Ciencia y Tecnología de Alimentos - Facultad de Química - Universidad de la República, Gral. Flores 2124 – Montevideo – Uruguay, (05982) 9242675, (05982) 9241906, vgilardi@fq.edu.uy.

RESUMEN

En Uruguay actualmente se cultivan variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) de tipo americano y tropical, índicas y japónicas, que por su rendimiento han sustituido a la variedad estadounidense Bluebelle ampliamente cultivada en la década del 80.

Si bien la mayor utilización del arroz es el consumo directo del grano después de la cocción, cada día se hace más importante la utilización de la harina en la elaboración de diferentes productos alimenticios.

La diversidad de propiedades reológicas y de cocción de las harinas de arroz es reflejo de la diversidad varietal existente.

El comportamiento de las pastas de harina de arroz está determinado por las características de hinchamiento, gelatinización y retrogradación del almidón de arroz.

El comportamiento térmico de las pastas de harina de arroz, medido por termoviscografía resulta un índice altamente sensible para conocer tal diversidad.

En este trabajo se realizó la caracterización química y se estudió el comportamiento viscosográfico de variedades de arroz comerciales (El Paso 144, INIA Tacuarí y EEA 404) y en etapas de cultivo experimental (INIA Olimar y Perla). Estas variedades mostraron una composición química similar y alto contenido de amilosa (mayor a 26 %).

Las propiedades de pasta de las harinas fueron evaluadas utilizando un análisis viscosográfico rápido (RVA).

Las temperaturas de pasta (Pasting temperature) variaron entre 79.8 °C y 87.0 °C, exhibiendo INIA Tacuarí el valor más bajo.

Las variedades Perla y EEA 404 mostraron los valores más altos de viscosidad máxima a 95°C y menor tendencia a la retrogradación, mientras que INIA Olimar y El Paso 144 presentaron mayor estabilidad durante el calentamiento (menor breakdown).

Palabras claves: harina de arroz, caracterización fisicoquímica, propiedades funcionales

ABSTRACT

Nowadays rice varieties (*Oryza sativa* L.) American and Tropical, Indica and Japonica are cultivated in Uruguay. These varieties have substituted the American variety Bluebelle widely cultivated in the 80's.

Even though milled rice is the major form of rice consumed, rice flour have been used increasingly in different food products.

The different reological and cooking properties of rice flours depend on rice varieties. Pasting behavior of rice flour is determined by swelling, gelatinization and retrogradation characteristics of rice starch. Termoviscography is a very sensitive method that allowed to know that properties.

In the present study chemical characterization and viscographic behavior of commercial (El Paso 144, INIA Tacuarí y EEA 404) and experimentally cultivated rice varieties (INIA Olimar y Perla) was done. These varieties showed similar chemical composition and high content of amylose (higher than 26%).

Pasta properties of flours were evaluated using a Rapid Visco Analyser (RVA). Pasting temperatures ranged between 79.8°C to 87.0°C, showing the lowest value INIA Tacuarí. The higher peak viscosity and the lowest retrogradation tendency was found in Perla and EEA 404. The greater stability during heating (lower breakdown) was showed by INIA Olimar and El Paso 144.

INTRODUCCIÓN

La mayor utilización del arroz (*Oryza sativa* L.) es el consumo directo del grano después de la cocción, aunque cada día se hace más importante la utilización de la harina en la elaboración de diferentes productos alimenticios.

Las propiedades funcionales de las harinas de arroz determinan su utilización comercial en la elaboración de diferentes productos alimenticios. Su empleo como aditivo en geles, postres, budines, salsas, cremas heladas y productos similares se ha incrementado notoriamente. Y si bien el arroz carece de gluten, lo que determina que sus propiedades panarias sean inferiores en comparación con trigo y aún con centeno, con frecuencia se emplea su harina en diferentes productos panificados como única materia prima o en mezclas con harinas o almidones de otro origen (Furia, 1972).

La diversidad varietal que existe en relación al arroz cultivado se ve reflejada en la diversidad de propiedades reológicas y de cocción de sus harinas. El comportamiento térmico de las pastas de harina de arroz, medido por termoviscografía resulta un índice altamente sensible para conocer tal diversidad, por cuanto dichas propiedades están

particularmente determinadas por las características de hinchamiento, gelatinización y retrogradación del almidón de arroz (Zhon, 2002).

La producción de arroz en Uruguay ha manifestado desde sus inicios una dinámica particular. A nivel comercial la producción comienza en la década del 30 con el objetivo de abastecer el mercado interno, lográndose el primer saldo exportable en 1936. A partir de dicho año el crecimiento del área cultivada, de los rendimientos, de la producción y de las exportaciones, ha sido sostenido. Uruguay ha llegado a ubicarse en el séptimo lugar entre los exportadores mundiales en la zafra 2002/2003 y en el lugar 17 entre los países productores de arroz en la zafra 2003/2004 (Asociación de Cultivadores de arroz, 2004).

La casi totalidad del área cultivada en el país corresponde a variedades de tipo americano y tropical, índicas y japónicas (EEA 404, El Paso 144 y INIA Tacuarí), obtenidas por programas de mejoramiento genético que por su rendimiento han sustituido a la variedad estadounidense Bluebelle. Las variedades El Paso 144 e INIA Tacuarí representan actualmente el 90% del área cultivada.

Si bien existe abundante información en relación a aspectos agronómicos de estas variedades es limitada la existente con respecto a propiedades funcionales de sus harinas. El conocer las propiedades funcionales de las harinas de arroz obtenidas a partir de las diferentes variedades permitirá definir sus potenciales usos industriales.

En este trabajo se realizó la caracterización química y se estudió el comportamiento viscosográfico de variedades de arroz comerciales y en etapa de desarrollo agronómico cultivadas en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Se utilizó arroz pulido de tres variedades comerciales (EEA 404, El paso 144 e INIA Tacuarí) y dos en etapa de cultivo experimental (INIA Olimar y Perla) de la zafra 2003/2004, suministrado por un proveedor local (Sociedad Anónima de Molinos Arroceros Nacionales, SAMAN). Las harinas se obtuvieron por molienda de granos enteros mediante un molino Perten LM3100 (malla estándar de 0.8mm) y se almacenaron a temperatura ambiente en contenedores herméticos hasta el momento de su análisis. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Caracterización física. La distribución del tamaño de partícula de las harinas de arroz obtenidas (Tabla 1) se realizó por agitación mecánica de 50 g de muestra (tamizador Humboldt modelo H-4325.5f ASTM C136) con tamices U.S. Standard Testing Sieve, ASTM E-11 (mallas # 230, 170, 120, 80 y 60) durante 15 minutos.

Tabla 1. Distribución de tamaño de partícula de las harinas de arroz.

Variedades	U.S. Standard Sieve					
	+60 (%)	+80 (%)	+120 (%)	+170 (%)	+230 (%)	-230 (%)
INIA Tacuarí	18.8	24.5	34.8	17.5	4.3	0.2
EL Paso 144	20.5	39.7	30.7	7.6	1.4	0
INIA Olimar	27.4	24.8	28.7	13.8	5.2	0.1
Perla	27.6	38.6	29.0	4.0	0.8	0
EEA 404	22.1	38.3	30.7	7.4	1.4	0.1

Caracterización química. La composición centesimal se realizó de acuerdo a los métodos de la AACC (2000): humedad 44-15A, proteínas 46-11A, lípidos 30-25 y cenizas 08-01. El contenido de amilosa se determinó por el método de Juliano (1971) a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic modelo Genesys 2 y amilosa de papa (Sigma A0512) como patrón para la obtención de la curva de calibración. Los valores informados corresponden al promedio de determinaciones realizadas al menos por duplicado.

Caracterización funcional. La temperatura de gelatinización y las propiedades de pasta de las harinas de arroz de las variedades estudiadas fueron evaluadas utilizando un Rapid ViscoTM Analyser (RVA) (Newport Scientific Pty. Ltd.). Se utilizó una muestra (3.0 g) con humedad equivalente de 14 %. Se realizó un ciclo de calentamiento-enfriamiento de 3,48 minutos en el intervalo de 50 a 95°C, seguido por un período de 2,30 minutos a 95°C, finalizando con un enfriamiento de 95 a 50°C en 3,48 minutos. Del amilograma se obtuvo la temperatura de pasta, que se utilizó como estimación de la temperatura de gelatinización. Se consideró Breakdown a la diferencia entre el máximo valor de viscosidad a 95°C y la menor viscosidad luego de la etapa de calentamiento y Setback a la diferencia entre la viscosidad al final del enfriamiento y la menor viscosidad luego del calentamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestra la caracterización química de las variedades de arroz analizadas. Las variedades INIA Tacuarí e INIA Olimar se destacan por su mayor contenido proteico (10.2 y 11.0 % respectivamente); el contenido en lípidos y cenizas no presenta mayores diferencias entre todas las variedades.

El contenido de amilosa total, soluble e insoluble se presenta en la Tabla 3. Para amilosa total se obtuvieron valores entre 25.9 y 37.5 %. Considerando la clasificación de Bhattacharya (1982), las variedades El Paso 144, INIA Tacuarí, INIA Olimar y Perla corresponderían a variedades de alta amilosa (> 26 %) y EEA 404 a una variedad de

amilosa intermedia (22 - 26 %). Por el contenido de amilosa insoluble las variedades El Paso 144 e INIA Olimar calificarían como tipo IA, INIA Tacuarí como tipo IIIC y Perla como IIB.

Tabla 2. Caracterización química de las variedades de arroz.

Variedades	HUMEDAD (%)	PROTEINAS** ¹ (%)	CENIZAS* (%)	LIPIDOS* (%)
INIA Tacuarí	12.9	10.2	0.15	0.32
EL Paso 144	12.9	8.7	0.48	0.30
INIA Olimar	12.8	11.0	0.30	0.25
Perla	13.8	8.4	0.33	0.28
EEA 404	12.5	7.7	0.33	0.42

* Valores expresados en base seca, ¹ N × 5.95

Tabla 3. Contenido de amilosa total, soluble e insoluble de las variedades de arroz.

Variedades	Amilosa soluble (g/100 g) *	Amilosa insoluble (g/100 g) *	Amilosa total (g/100 g) *
INIA Tacuarí	22,3	7,1	29,4
El Paso 144	18,4	19,1	37,5
INIA Olimar	15,7	19,6	35,3
Perla	14,7	12,3	27,0
EEA 404	N.D. ¹	N.D. ¹	25,9

* Valores expresados en base seca

¹ N.D.: No Determinado

En la Tabla 4 se presentan las propiedades viscográficas de las variedades de arroz. Las temperaturas de pasta variaron entre 79.8 °C y 87.0 °C, exhibiendo la variedad INIA Tacuarí el valor más bajo, reflejo de la rápida hidratación e hinchamiento de los gránulos de almidón. Las variedades Perla y EEA 404 mostraron los menores valores de Setback (1527 y 1360 cP), mientras que INIA Olimar y El Paso 144 presentaron los menores valores de Breakdown (296 y 475 cP). Ello denota la menor tendencia a la retrogradación de las variedades Perla y EEA 404 y la mayor estabilidad durante el calentamiento de las variedades INIA Olimar y El Paso 144. Los valores más altos de viscosidad máxima a 95°C correspondieron a las variedades Perla y EEA 404 (3307 y 3319 cP).

Tabla 4. Propiedades viscográficas de las variedades de arroz.

Variedades	Temperatura de pasta (°C)	Viscosidad máxima a 95°C (cP)	Breakdown (cP)	Setback (cP)
INIA Tacuarí	79,8	2571	967	1643
El paso 144	81,3	2768	475	2047
Olimar	86,1	2652	296	2095
Perla	87,0	3307	1370	1527
EEA 404	86,1	3319	1360	1458

CONCLUSIONES

La diversidad varietal del arroz cultivado en Uruguay no se ve igualmente reflejada en la caracterización fisicoquímica y funcional de sus harinas.

El alto contenido en amilosa de todas las variedades limita su utilización a nivel industrial y demanda la necesidad de coadyuvantes para mejorar sus propiedades funcionales.

Dentro de la limitada diversidad funcional de las harinas de arroz disponibles en el mercado uruguayo, es posible acceder a algunas variedades que por su comportamiento viscosográfico, ya sea en caliente o en frío, serían adecuadas para utilizar en la elaboración de alimentos que se van a consumir en caliente o que deberán ser refrigerados. Las variedades El Paso 144 e INIA Olimar serían las de elección en el primer caso y EEA 404 y Perla en el segundo.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación de Cultivadores de Arroz (ACA). El arroz en Uruguay, 2004

American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved methods of the AACC.

Bhattacharya, K.R.; Sowbhagya, C.M. and Indudhara Swamy, Y.M. 1982. Quality profile of rice: A tentative scheme for classification. J.Food Sci. 47: 564-569.

Furia, T.E. (Ed.) 1972. Handbook of food additives. CRC Press Cleveland, OH, USA. (pp 305-344)

Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. Cereal Sci. Today 16,11:334-339.

Zhon, Z.; Robards, K.; Helliwell, S. and Blanchard, C. 2002. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes. J.Cereal Sci. 35: 65-78.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ing.Agr. Antonio Vacca (SAMAN Sociedad Anónima Molinos Arroceros Nacionales, Uruguay) por proporcionar las muestras de arroz. A la Dra.Cristina Molina Rosell (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, España) por la realización de los análisis viscosográficos.

El presente trabajo fue parcialmente financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

TRANSICIÓN VÍTREA Y FENÓMENO DE COLAPSO EN SISTEMA CARBOHIDRATOS-AGUA DETECTADOS CON TÉCNICAS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PULSADA

FERREYRA, María G.; DE PIANTE VICIN, Daniel A. y RUBIOLO, Amelia C.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
Güemes 3450, Santa Fe (S3000GLN), Santa Fe, Argentina
Tel. 0342-4559175, Fax: 0342-4550944, E-mail: arubiolo@intec.unl.edu.ar

RESUMEN

La Resonancia Magnética Nuclear pulsada permite estudiar la movilidad de los protones en carbohidratos concentrados. Los protones de la sustancia son orientados en un campo magnético y luego de darle un fuerte pulso de radiofrecuencia se produce una respuesta que es graficada para distintas condiciones. Los cambios de pendiente de las curvas de tiempo de relajación espín-espín (T_2) a diferentes temperaturas determinadas en la fase rígida como tiempo de relajación espín-espín de la fase mas rígida, (T_{2r}) permiten definir una primer transición llamada transición vítrea determinada por la temperatura de transición vítrea (T_g) y otra posterior, llamado fenómeno de colapso determinado por la temperatura de colapso (T_c).

Los ensayos en caramelos de isomaltosa y sacarosa pura llevados a cabo en cápsulas muestran que la T_g es similar mientras que en los ensayos con maltodextrina por su mayor peso molecular es un valor notablemente mayor. En este último caso no se detectó T_c .

El incremento de agua disminuye T_g y aumenta el span de temperatura entre T_g y T_c . Por lo tanto el estado formado después de T_g se mantiene en un rango de temperatura mayor, pero el sólido vítreo es más inestable al disminuir T_g .

Palabras claves: Resonancia Magnética, transición vítrea, fenómeno de colapso, sistemas carbohidratos-agua

ABSTRACT:

The pulse Nuclear Magnetic Resonance technique (NMR) permits to study proton mobility in concentrated carbohydrates. Protons are oriented in a magnetic field and a radiofrequency strong pulse is used to obtain a signal that is analysed. Specifically, characteristic glass transition (T_g) and collapse (T_c) temperatures can be determined by

changes in the slope of the spin-spin relaxation times (T_{2r}) in the rigid components versus temperature (T) curves. T_c is higher than T_g .

T_g and T_c of isomaltose, saccharose and maltodextrine based candies with different water content were determined by NMR. Similar T_g values were obtained for isomaltose and saccharose candies. The T_g of maltodextrine candies was much higher than those measured for isomaltose and saccharose. These results are in direct relationship with the Molecular Weight masses of the sugars. T_g were found to be decreased and the span $T_c - T_g$ increased with the increased of the water content. Such decrease in T_g destabilizes the glassy solid candy. On the contrary, the increment in the $T_g - T_c$ span increases the range of the candy in the stage after T_g

INTRODUCCIÓN:

Los azúcares en los alimentos sólidos se presentan como cristales, o en un estado amorfo o disueltos en el agua que contienen los mismos. El estado amorfo de los azúcares se puede formar por el enfriamiento rápido del líquido fundido o por remoción rápida del solvente desde la solución de azúcar por medio de secado o por liofilizado luego de la formación de hielo.

En las sustancias amorfas a nivel molecular se detectan movimientos translacionales o brownianos, los cuales aparecen también si se eleva la temperatura del sólido hasta su transformación en líquido. Hay dos tipos de movimientos brownianos: el segmental o interno y el movimiento molecular o externo. La temperatura en la que se presenta el movimiento segmental (estado gomoso) se llama temperatura de transición vítrea (T_g). El movimiento segmental en los carbohidratos es producido por sus protones más móviles: los protones de los hidroxilos (-HO) y los protones del grupo exocíclico (-CH₂) que están lejanos al anillo (van den Dries, I.J. y col.;1998).

Elevando la temperatura del carbohidrato por encima de la T_g , la matriz del mismo muestra cambios en sus propiedades físicas visibles macroscópicamente al compararse con las mismas a las temperaturas por debajo de la T_g . Estos cambios son generalmente acompañados con una reducción en la viscosidad. El span de tiempo que es requerido para que ocurra el cambio brusco en propiedades físicas depende de la temperatura del sistema de la segunda transición. La temperatura usualmente referida como la temperatura de colapso (T_c) es una medición de la estabilidad del estado del carbohidrato después de la temperatura de transición vítrea (Buitink, J. y col.; 2000).

Las temperaturas de transición vítrea y el fenómeno de colapso en carbohidratos con bajísimo porcentaje de humedad, así como la diferencia entre las dos temperaturas ($T_c -$

Tg) darían una estimación de la estabilidad del estado vítreo y gomoso (Buitink, J. y col.; 2000). Las moléculas de agua afectan fuertemente la transición vítrea por lo tanto la presencia de humedad aún en bajos porcentajes deprime mucho la temperatura de transición vítrea (Ruan, R. y col.; 1999).

La Resonancia Magnética Nuclear pulsada es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos y uno de sus usos es detectar la relajación de los espines producida principalmente por el acoplamiento dipolar espín-espín o por campos magnéticos locales producidos por los movimientos moleculares.

El objetivo de este trabajo es determinar la movilidad molecular de mezclas de carbohidratos y agua usando técnicas de resonancia magnética nuclear protónica y analizar la disminución del contenido de agua y el incremento del PM (peso molecular) en la variación de las temperaturas de transición detectadas.

Como el movimiento de los protones del componente rígido aumenta en la Tg, se producen tiempos de relajación espín-espín mas largos que permiten determinarla.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Preparación de las muestras: Las muestras molidas de caramelos muy concentrados con alto contenido de isomaltosa, sacarosa y otros con maltodextrina (1.4 % y 2.5%) con diferentes contenidos de agua se empacaron en tubos de 6 mm de diámetro por 40 mm de largo. Estos fueron sellados para prevenir la evaporación de las muestras y luego acomodados en tubos de medición de 10 mm de diámetro para cabezal de temperatura variable identificado en el equipo como PCPH20/10VTS. El sello queda inmerso en el campo de radiofrecuencia donde se efectúa la medición por lo que se usa politrifluorestireno (PTFE) material libre de protones. Otras muestras fueron medidas sin colocar el material sellante.

Las muestras no selladas fueron comparadas con las que se sellaron. También se compararon las muestras de isomaltosa con caramelos de sacarosa y de maltodextrina.

El contenido de humedad se determinó en todas las muestras mediante horno a Microondas marca CEM modelo AVC 80.

Espectroscopía de RMNp: Mediciones en movilidad protónica por RMNp fueron ejecutadas en el analizador de protones, Minispec PC 120, BRUKER (Alemania) obteniéndose tiempos de relajación espín-espín (μs) vs intensidad de la señal (volts) utilizando la técnica de espín-eco Carr-Purcell-Meiboom-Gill (Radosta y col., 1989) cuya secuencia es: pulso de 90° , τ , pulso de 180° , cambio de fase de 90° , 2τ . Para las curvas de tiempo de relajación espín-espín de la fase rígida T_{2r} , (μs) y tiempo de relajación

espín-espín de la fase móvil T_{2m} (μs) vs intensidad de señal M (volts) se adquirieron 30 puntos de datos. En cada punto se hicieron 49 secuencias para cada temperatura. Se varió la temperatura desde 25°C hasta 105°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Se muestran las curvas características de T_{2r} para caramelos con isomaltosa y con sacarosa ambos con 1,4 y 2,5 % de humedad en las figuras 1 y 2.

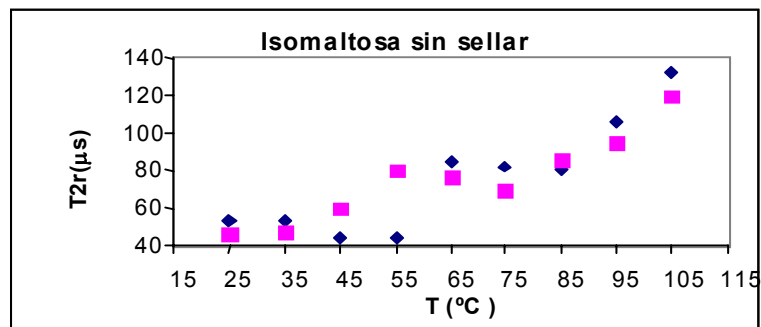


Figura 1. Comparación de movilidad de la fase más rígida de los caramelos concentrados con alto contenido en isomaltosa \blacklozenge 1.4% y \blacksquare 2.5% humedad

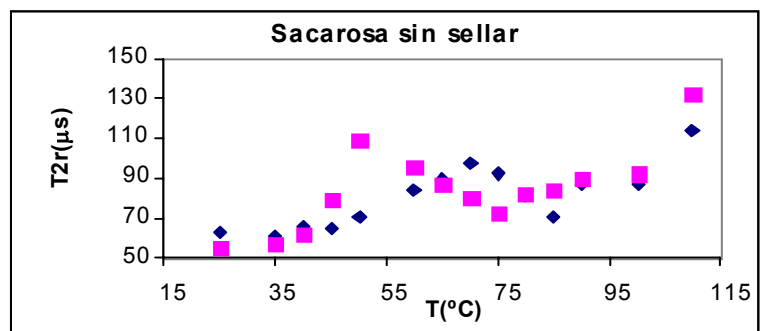


Figura 2. Comparación de movilidad de la fase más rígida de los caramelos concentrados con alto contenido en sacarosa con \blacklozenge 1.4% y \blacksquare 2.5% humedad

En caramelos dietéticos con alto contenido de isomaltosa se obtuvieron $T_g = 54.82$ y 35.89 °C y para los de sacarosa se obtuvieron $T_g = 50.35$ y 39.59 °C para con contenidos de agua del 1.4% y 2.5%. Los valores obtenidos para las muestras de isomaltosa de T_c son 84.94 y 75.84 °C y para las de sacarosa son: de 84.69 y 76.40 °C respectivamente para dichos porcentajes de humedad. En vidrios de dímeros de carbohidratos no sellados con contenido de humedad del 1.4% y del 2.5%, donde la totalidad del agua está estructuralmente ligada, la temperatura de colapso y el fenómeno de colapso concomitante ocurre respectivamente a 30 y 40 °C por encima de T_g .

Para las muestras altamente concentradas se observa que el aumento del contenido de agua produce efectos distintos en la movilidad según los rangos de temperatura de las mismas, decrece en $T < T_g$ porque interactúa fuertemente con los hidroxilos (OH) del carbohidrato pero en $T > T_g$ se incrementa porque el agua produce un mayor volumen libre intermolecular (van den Dries, I.J; 2000a) . Pero este cambio debido al efecto plastificante se presenta a menor temperatura con el aumento del contenido de agua produciendo una fuerte depresión en la T_g . El incremento de agua al disminuir T_g aumenta el span de temperatura entre T_g y T_c y por lo tanto el rango de temperatura del estado gomoso después de T_g es mayor. El sólido vítreo se modifica más rápidamente y es menos estable en el almacenamiento. Los ensayos llevados a cabo en cápsulas sin sellar muestran en la gráfica de T_{2r} vs $T(^{\circ}C)$ un comportamiento más irregular ya que se adiciona el incremento debido al movimiento difusivo del agua.

La primer transición en T_{2m} (figura-3) se observó por un cambio de pendiente mucho menos evidente debido al bajísimo contenido de protones móviles en estas muestras de poca humedad en $T \leq T_g$.

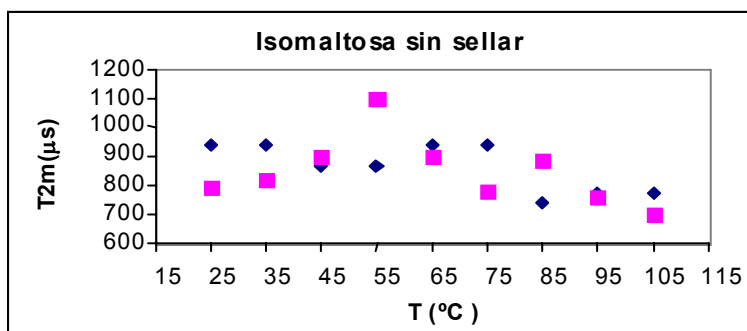


Figura 3. Comparación en T_{2m} de la fase mas móvil de caramelos concentrados con alto contenido de isomaltosa y diferente contenido de humedad, \blacklozenge 1.4% y \blacksquare 2.5%

En la figura 4 se observa que las muestras sin sellar presentaron menor movilidad de los protones después de T_c que las muestras selladas. Esto se debe al menor contenido protónico debido a que el agua se evapora después de T_c , por lo que los puntos de estas muestras presentan la movilidad que se debe solamente a los protones de los carbohidratos que se han vuelto móviles. En los ensayos con muestras selladas con el mismo contenido de humedad se encontró que la pendiente dT_{2r}/dT tiene mayor variación y es más fácil su detección.

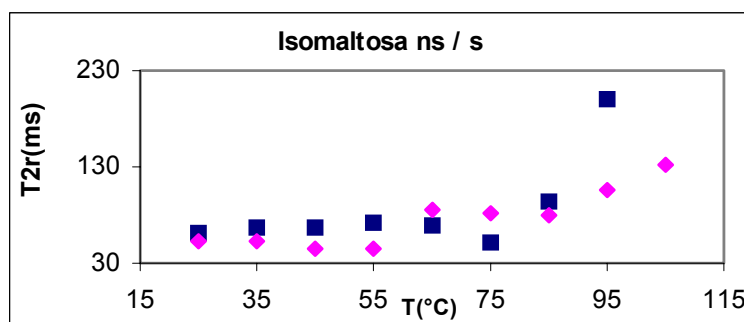


Figura 4: Comparación de movilidad de la fase mas rígida de los caramelos concentrados con alto contenido en isomaltosa con aproximadamente 1.4% humedad de muestras \blacklozenge no selladas (ns) y \blacksquare selladas (s)

Al contrario en la figura 5 de T_{2m} (μ s) vs T ($^{\circ}$ C), después de T_c se detecta que en los ensayos no sellados se produce un mayor cambio debido al aumento en la movilidad del agua.

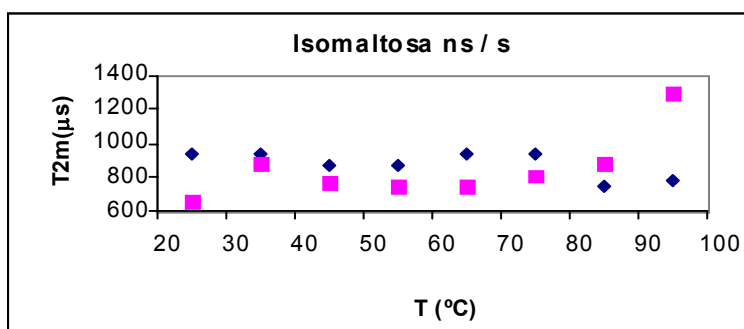


Figura 5: Comparación de movilidad de la fase mas móvil de los caramelos concentrados con alto contenido en isomaltosa con aproximadamente 1.4% humedad de muestras \blacksquare no selladas (ns) y \blacklozenge selladas (s)

Los valores determinados se corresponden con los valores de T_{2r} de los protones en hielo igual a decenas de microsegundos para moléculas de agua directamente ligadas a macromoléculas mediante uniones de hidrógeno, mientras que los valores de T_{2m} de decenas a centenas de milisegundos son los que indican paquetes de agua en estos sistemas. Las fracciones de agua en las muestras utilizadas se encuentra ligada de acuerdo con estas magnitudes (Radosta, S. y col; 1989 y van den Dries, I.J.; 2000b)

Para caramelos dietéticos de isomaltosa y de maltodextrina con 2,5% de humedad se observa que la T_g disminuye para el carbohidrato de menor peso molecular. Los valores determinados para isomaltosa son muy similares al de sacarosa de igual peso molecular, $T_g = 35.59$ $^{\circ}$ C y de 39.59 $^{\circ}$ C . Para la maltodextrina de mayor peso molecular obtenemos

$T_g = 65.18 \text{ }^\circ\text{C}$. (Figura 6) , En el rango de temperatura de trabajo no se detectó la T_c de los caramelos de maltodextrina.

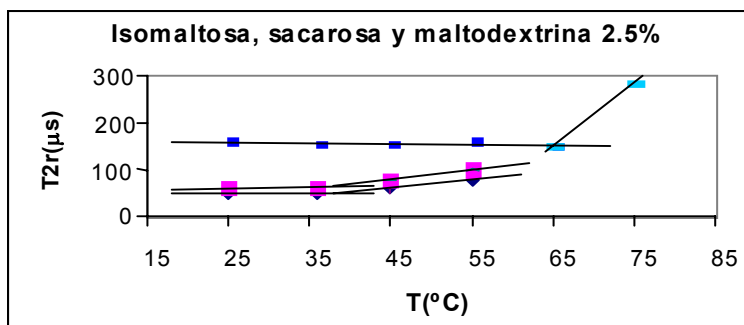


Figura 6: Comparación de T_g para \blacklozenge isomaltosa, \blacksquare sacarosa y \blacksquare maltodextrina Para porcentaje de humedad del 2.5%

Un aumento en T_{2r} y/o en T_{2m} se presenta si disminuye la densidad protónica; desde que las interacciones dipolares decrecen con la sexta potencia de la distancia protón-protón, y/o si los movimientos anisotrópicos o las rotaciones isotrópicas muy lentas se incrementan, desde que ambos promedian parcial o totalmente las interacciones dipolares. Estos cambios en movilidad se corresponden con los cambios de las transiciones vítreas y el colapso estructural de los carbohidratos isomaltosa, sacarosa y maltodextrina.

CONCLUSIONES:

- 1- La movilidad de los protones de los carbohidratos y del agua aumentan con el incremento de temperatura, del contenido de agua y del PM.
- 2- La RMNp determina los valores de tiempos de relajación que permite obtener rápidamente y con ensayos no destructivos la T_g y la T_c por medio de los cambios en movilidad rotacional y de translación difusiva de los protones del agua. Debido a esto se pueden observar efectos de difusión y evaporación.

BIBLIOGRAFÍA:

Buitink, J.; van den Dries, I.J.; Hoekstra, F.A.; Alberda, M. and Heminga, M.A. High Critical Temperature above T_g May Contribute to the Stability of Biological systems. *Biological Journal*. 79(2) 1119-1128. 2000.

Radosta, S.; Schierbaum, F. and Yuriev, W.P.. Polimer-Water Uneraction of Maltodextrina. Parte II: NMR Study of Bound Water in liquid Maltodextrin-Water. *Starch/stärke*. 41 .11, S. 428-430.1989.

Ruan, R.; Long, Z.; Chen, P.; Huang, V.; Almaer, S. and Taub, I. Pulse NMR Study of Glass Transition in Maltodextrina. *Journal of Food Science* . 64, 1, 1999

van den Dries, I.J.; Besseling, N.A.M., van Dusschoten, M.A.; Hemminga, M.A. and van der Linden, E.. Relation between a Transition in Molecular Mobility and Collapse Phenomena in Glucose-Water Systems. *J. Phys. Chem. B.* 104, 9260-9266. 2000a.

van den Dries, I.J.; van Dusschoten, D. and Hemminga, M.A.. Mobility in Maltose-Water Glasses Studied with HNMR. *J. Phys. Chem. B.* 102, 10483-10489. 1998.

van den Dries, I.J.; van Dusschoten, D.; Hemminga, M.A. and van der Linden, E.. Effects of Water Content and Molecular Weight on Spin Probe and Water Mobility in Malto-oligomer Glasses. *J. Phys. Chem. B,* 104, 10126-10132. 2000b.

COMPARACIÓN DE PARÁMETROS REOLÓGICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE RETROEXTRUSIÓN Y VISCOSIMETRÍA ROTACIONAL.

MUÑOZ PUNTES, Ernesto; RUBIO, Luis A.; ROGGIERO, Angel A.; CABEZA, María S.; RODRÍGUEZ, Natalia; SANTIBAÑEZ, María E.

Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (U.N.Cuyo), San Martín 352, San Rafael (Mza.), Argentina, Telefax: +54-2627- 421947/430673, emunoz@.fcai.uncu.edu.ar

RESUMEN

Se determinaron las propiedades reológicas de pulpas de durazno empleando retroextrusión con un analizador de textura. Se modificaron el sistema de calefacción de sonda y el contenedor de muestra. Los parámetros de la ley de potencia se determinaron desde datos fuerza–distancia a diferentes velocidades de sonda.

Los parámetros reológicos se establecieron a 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65°C y a 12.5, 16, 20, 24 y 28°Brix, estudiando el efecto de la temperatura y concentración de sólidos solubles en el índice de consistencia. Los parámetros obtenidos se compararon con los de un viscosímetro rotacional Brookfield, utilizándose Statgraphics plus 4.0 para realizar las pruebas de normalidad, de bondad de ajuste y la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov. Se determinó que no existen diferencias significativas entre ambas técnicas; por lo tanto la retroextrusión es un buen método para predecir propiedades de flujo de pulpas.

Palabras claves: retroextrusión, pulpas de durazno, parámetros reológicos.

ABSTRACT

Rheological properties of peach flesh were determined by back extrusion using a texture analyzer. The sounding line of the temperature system and the sample content were modified to keep constant temperature. Potential law parameters were determined from strength-distance data at different sounding line velocities.

The rheological parameters were measured at a 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 and 65°C and at 12.5, 16, 20, 24 y 28°Brix, studying the temperature and soluble solids contents effects on the consistence index. The parameters were compared with Brookfield rotational viscometer ones. Statgraphics plus 4.0 was used to make normality assays, the adjusted goodness and Kolmogorov-Smirnov no parametrical assay. No significant differences were found between both techniques, so back extrusion is a good method to predict the flow properties of peach flesh.

INTRODUCCIÓN

Se conoce que las propiedades reológicas de los alimentos fluidos o semisólidos son parámetros importantes para muchas actividades industriales como el control de calidad, evaluación de la aceptación por el consumidor o textura, diseño y control de procesos, caracterización de estructura de alimentos y composición.

Se han realizado diversos estudios para determinar las propiedades reológicas de pulpas de frutas utilizando viscosímetros del tipo rotacionales (Muñoz Puentes y col., 2004). Sin embargo, para materiales que tienen consistencia gomosa o partículas en suspensión, un viscosímetro rotacional no puede utilizarse porque exhibe lecturas de torque oscilatorias. La alternativa entonces es la retroextrusión que requiere un equipamiento disponible con facilidad, por ejemplo: barras, cilindros graduados, y una máquina de ensayo de compresión. El corto tiempo relativo y el bajo costo requerido para realizar la prueba hace de ésta una técnica deseable para el control de calidad en el desarrollo de productos.

Steffe y Osorio aplicaron retroextrusión para estudiar el comportamiento de fluidos no Newtonianos con una geometría de cilindro anular/sonda y una máquina de prueba Universal Instron.

Brusewitz y Yu (1995) usaron la retroextrusión en la medición de una suspensión de mostaza con diferentes tratamientos de molienda de la semilla. Lee y col. (1999) compararon y correlacionaron las propiedades texturales de dos variedades de tomates, evaluándolas por análisis sensorial y por mediciones instrumentales con la prensa de corte Kramer y mediante análisis de perfil de textura. Gujral y Sodhi (2001) también usaron la técnica de retroextrusión para estudiar el efecto de la temperatura, concentración de azúcar y sémola de trigo en la preparación del potaje de trigo.

Los objetivos del presente trabajo son: determinar las propiedades reológicas de pulpas de durazno empleando retroextrusión con un analizador de textura, comparar los parámetros obtenidos con los de un viscosímetro rotacional Brookfield, observando si hay diferencias significativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Las determinaciones reológicas de la pulpa de durazno, se efectuaron a las concentraciones, de 12,5, 16, 20, 24 y 28 °Brix, realizándose por triplicado.

Cada muestra así preparada se sometió al ensayo de retroextrusión a: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65°C, utilizando un baño termostático y un volumen de 80 ml para cada ensayo.

Método de retroextrusión. El término retroextrusión se emplea para describir el proceso

donde una *sonda o pistón macizo* desciende a velocidad constante en el interior de un contenedor cilíndrico, cerrado en su base, que contiene la muestra a analizar. Una representación esquemática de dicho dispositivo se muestra en la Figura 1.

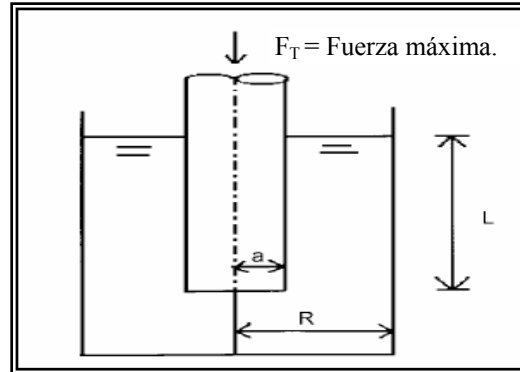


FIGURA 1. Posición de la sonda al finalizar el ensayo. a = radio de la sonda, R = radio del contenedor, L = longitud de la región anular.

Simultáneo al movimiento descendente de la sonda se produce el ascenso del fluido a través de la región anular existente entre la sonda y la pared del cilindro contenedor. La fuerza aplicada por la sonda es registrada en función del tiempo. Se realiza un balance de fuerzas actuantes y resultantes. La fuerza máxima F_T se determinó con un analizador de textura TA-XT2i, utilizando el programa Texture Expert 1.22.

El contenedor de radio $R = 0.00167$ m y la sonda de radio $a = 0.00129$ m se fabricaron en acero inoxidable y se calefaccionó internamente por una resistencia eléctrica, a fin de mantener la temperatura constante durante el ensayo. Las velocidades de sonda a las cuales se realizaron los ensayos fueron 0.0025, 0.0042, 0.005 y 0.0062 m/s y la longitud de la sonda inmersa en la muestra fue de 0.07 m.

La fuerza máxima F_T se determinó desde el gráfico fuerza-distancia, expresada como:

$$F_T = 2 \pi a L \sigma_w + \pi a^2 \Delta P + \rho g L \pi a^2 \quad (1)$$

donde $\rho g L \pi a^2$ es la fuerza de empuje o hidrostática, F_e ; $2 \pi a L \sigma_w$ es la fuerza debida a la tensión de corte en la pared y $\pi a^2 \Delta P$ es la fuerza responsable de que el fluido fluya en dirección ascendente. La fuerza corregida para el empuje F_{ce} se calculó como:

$$F_{ce} = F_T - F_e \quad (2)$$

El índice de consistencia K y el índice de comportamiento al flujo n se determinaron con la siguiente ecuación:

$$K = \frac{F_{ce} kR}{2\lambda^2 \pi L Ra} \cdot \left(\frac{\Phi R}{v_p k^2} \right)^n \quad (3)$$

$$n = \ln \left(\frac{F_{ce2}}{F_{ce1}} \cdot \frac{L_1}{L_2} \right) / \ln \left(\frac{v_{p2}}{v_{p1}} \right) \quad (4)$$

donde Φ = flujo volumétrico adimensional, λ = radio adimensional cuando la tensión de corte $\sigma = 0$, $k = a/R$, v_p = velocidad de la sonda, y los subíndices 1, 2 indican los ensayos realizados a velocidades diferentes.

Los valores de Φ y λ se extrajeron de los gráficos presentados por Osorio (1985). Los valores de K y n fueron los promedios para las cuatro velocidades de ensayo.

Los K y n obtenidos fueron comparados con los determinados por Muñoz y col. (2004). En dicho trabajo se utilizaron viscosímetros Brookfield, modelo LVDV-III y HBDV-III.

El efecto de la temperatura sobre K fue estudiado aplicando una ecuación tipo Arrhenius:

$$K = K_T e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (5)$$

donde K_T es una constante de proporcionalidad, E_a es la energía de activación al flujo ($J.mol^{-1}$), R es la constante universal de los gases ($J.K^{-1}.mol^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (K).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de pulpa de durazno mostraron comportamiento pseudoplástico con valores de n comprendidos entre 0.2703-0.3150 y valores de K similares a los reportados en la bibliografía. En la Tabla 1 se muestra la comparación realizada con los valores obtenidos con los viscosímetros Brookfield. Se aprecia que los valores de K aumentan con la concentración de sólidos solubles y disminuyen con el aumento de la temperatura.

TABLA 1. Valores de índice de consistencia (K) obtenidos con la técnica de retroextrusión y con el viscosímetro Brookfield

$\frac{G}{L}$	Técnica de retroextrusión					Viscosímetro Brookfield.				
	12.5°Bx	16°Bx	20°Bx	24°Bx	28°Bx	12.5°Bx	16°Bx	20°Bx	24°Bx	28°Bx
30	3,767	5,046	10,77	15,481	25,491	4,539	8,003	14,750	23,094	29,512
35	3,566	4,166	9,367	14,993	23,857	4,510	7,321	13,979	21,325	28,028
40	3,165	3,975	9,098	13,798	22,705	4,274	12,84	20,290	27,816	12,838
45	2,866	5,202	8,918	13,163	21,070	4,067	6,881	12,629	19,728	25,894
50	2,704	4,749	8,520	12,915	20,777	3,720	6,210	12,097	17,786	24,934
55	2,024	4,614	8,106	12,142	19,342	3,347	5,725	10,737	17,100	21,291
60	1,762	4,508	7,996	11,683	17,037	3,144	5,339	10,139	15,638	19,494
65	1,753	4,287	7,545	11,785	16,577		4,926	9,090	14,125	19,010

En la Figura 2 se representa el efecto de la temperatura sobre K .

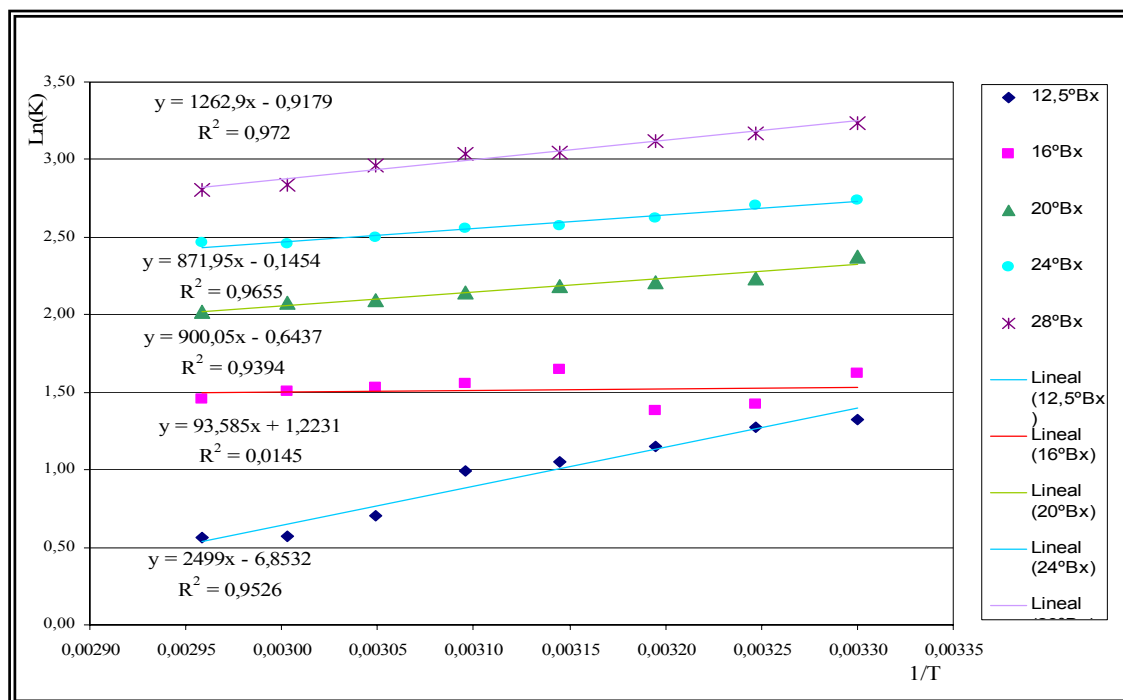


FIGURA 2. Efecto de la temperatura.

En la Tabla 2 se resumen los valores de K_T , Ea/R , R^2 , Ea y Ea media para todas las concentraciones estudiadas. Los valores obtenidos se asemejan a los publicados en la literatura, excepto para 16°Bx, donde debido a errores experimentales no se obtuvo el comportamiento esperado.

TABLA 2. Influencia de la temperatura.

C (°Bx)	K_T (Pa.s ⁿ)	Ea (kJ.mol ⁻¹)	R^2	\bar{Ea} (kJ.mol ⁻¹)
12,5	0,0083	20,778	0,9526	9,3579
16	3,3977	0,7781	0,0145	
20	0,5253	7,484	0,9394	
24	0,8647	7,250	0,9655	
28	0,3994	10,500	0,9720	

Se aplicó la prueba de normalidad usando Statgraphics Plus 4.0 para determinar el tipo de distribución. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El P-value más bajo es igual a 0,00411. Como es menor que 0,01, se puede afirmar con un 99% de confianza que los datos obtenidos por retroextrusión no provienen de una distribución normal.

TABLA 3. Prueba de normalidad sobre los datos obtenidos por la técnica de retroextrusión.

	P-Value
Bondad del Chi-cuadrado computado del ajuste estadístico = 26,8205	0,02031
Estadístico Shapiro-Wilks W = 0,909216	0,00411
Puntuación Z para la asimetría = 1,29041	0,19691
Puntuación Z para la curtosis = -0,738644	0,46012

Para establecer si existen diferencias significativas entre los K determinados por retroextrusión y los determinados con el viscosímetro rotacional Brookfield se aplicó una prueba del tipo no paramétrica. Sólo se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a saber:

Estimado Estadístico total DN = 0,205128

Estadístico de prueba bilateral para grandes muestras K-S = 0,905822

P-value \cong 0,388972

La distancia máxima entre las distribuciones acumulativas es 0.205128, lo cual puede verse en la Figura 3. Como el p-value es mayor o igual a 0.05, no hay una diferencia significativa entre las dos distribuciones con un 95% de nivel de confianza.

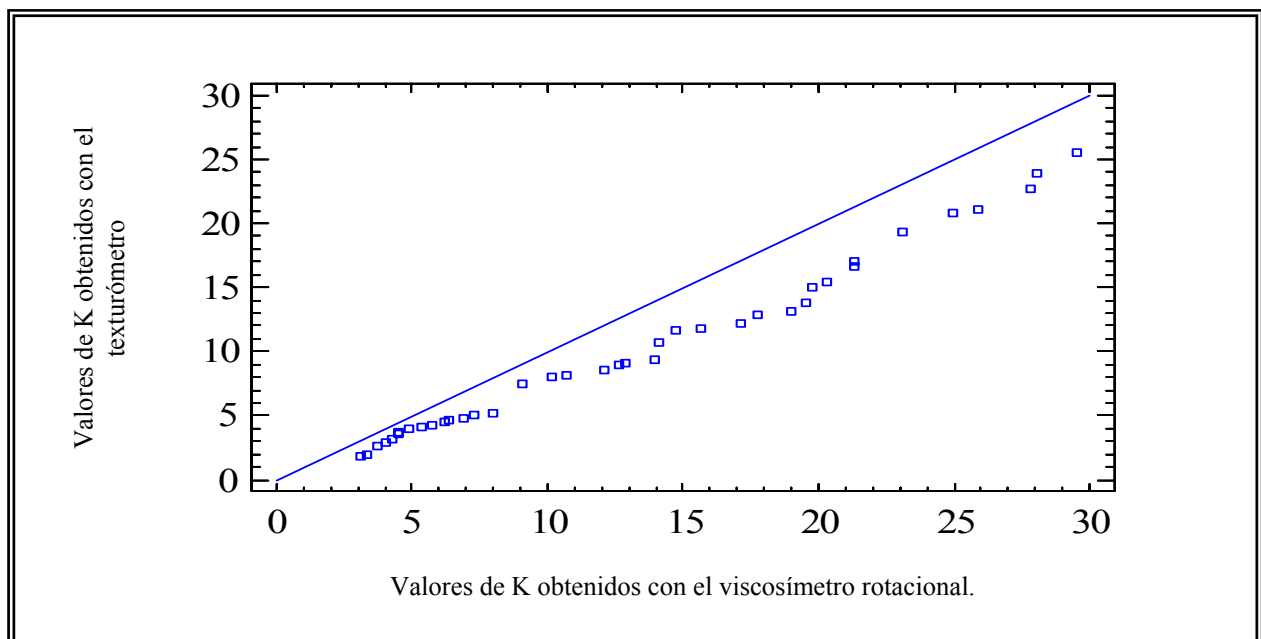


FIGURA 3. Gráfico de cuartiles para la comparación de la técnica de retroextrusión con el viscosímetro Brookfield.

CONCLUSIONES

- Se determinaron el Índice de Consistencia K y de Comportamiento al Flujo n para la

pulpa de durazno. Son similares a los encontrados en la bibliografía, aún cuando se han determinado por otras metodologías.

- Los valores de energía de activación determinados son análogos a los reportados en la literatura. Los bajos valores determinados, revelan que la temperatura ejerce escasa influencia sobre el comportamiento reológico de las pulpas de durazno. Este comportamiento se verificó para todas las concentraciones excepto para 16°Bx.
- La modificación del sistema de calefacción de sonda y de muestra para mantener la temperatura constante durante el ensayo junto con el uso de instrumentos de medición digitales, contribuyeron a disminuir algunos de los errores operativos.
- No existen diferencias significativas entre las dos técnicas para determinar parámetros reológicos de alimentos fluidos, a pesar de que los obtenidos mediante retroextrusión son menores que los determinados con el viscosímetro rotacional Brookfield.

BIBLIOGRAFÍA

Albarado, J. de D. y Aguilera, J.M. (2001). *Métodos para medir propiedades físicas en alimentos.* Ed. Acribia. 61-85, 89-107.

Brusewitz, G.H. y Yu, H. (1996). Back Extrusion Method for Determining Properties of Mustard Slurry. *Journal of Food Engineering*, Vol. 21, 259-265.

Gujral, H.S. y Sodhi, N.S. (2002). Back extrusion properties of wheat porridge (Dalia). *Journal of Food Engineering*, Vol. 52, 53-56.

Ibarz, A. y Lozano, J.E. (1992). Caracterización reológica de pulpas concentradas de ciruela y melocotón. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Vol. 32, 85.

Lee, S.Y., Luna-Guzman, I., Chang, S., Barrett, D.M. y Guinard, J.X. (1999). Relating descriptive analysis and instrumental texture data of processed diced tomatoes. *Food Quality and Preference*, Vol. 10, 447-455.

Muñoz, E. (2004). Propiedades de flujo de pulpas de durazno de la región de Mendoza. *Tesis Doctoral.* Series de Ciencias e Ingeniería de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 125-146, 161-167.

Osorio, F.A. y Steffe, J.F. (1987). Back Extrusion of power law fluids. *Journal of Texture Studies*, Vol. 18, 43-63.

Osorio-Lira, F.A. (1985). Back Extrusion of Power Law, Bingham Plastic and Herschel - Bulkley Fluids. M. S. *Thesis.* Department of Food Sci. and Human Nutrition, Michigan State University, East Lansing, Michigan, U. S. A.

Rao, M.A. (1997). Rheology of liquid food. A Review. *Journal of Texture Studies*, Vol. 8, 135-168.

Rosenthal, A. (2001). Textura de los alimentos - Medida y percepción. *Ed. Acribia. 2*, 7-16, 41-61, 65-73, 92 y 93.

Steffe, J.F. (1996). Rheological methods in food process engineering. Second Edition. East Lansing, Michigan, *Freeman Press*. 13-29, 32-36.

Youn-Chung, K. y Byoung-Seung, Y. (2000). Flow Properties of Kochujang Using Back Extrusion Method. Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea.

CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE PULPAS DE *Prunas pérsica* MENDOZA Y DESARROLLO DEL MODELO DE PREDICTIVO

MUÑOZ PUNTES, Ernesto; CABEZA, María S.; ROGGIERO, Augusto A.; RUBIO, Luis A.

Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (U.N.Cuyo), San Martín 352, San Rafael (Mza.), Argentina, Telefax: +54-2627- 421947/430673, emunoz@fcai.uncu.edu.ar

RESUMEN

Se analizaron distintas muestras de pulpas de durazno de la región de Mendoza, para las siguientes concentraciones: 12,5; 16; 20; 24 y 28°Bx y temperaturas: 30, 40 y 50°C. Todas se corresponden con el modelo de la Ley de la Potencia para fluidos pseudoplásticos.

Se determinaron los parámetros reológicos (Índice de consistencia y de Comportamiento al Flujo) y fisicoquímicos (Sólidos Solubles, Sólidos Totales, pH, Contenido en Agua, Sólidos Insolubles, Acidez y contenido de Pectina) para cada una de las variedades y concentraciones estudiadas. Con los datos obtenidos se efectuaron análisis de Cluster, que permitieron establecer dos grupos con diferencias significativas entre las muestras correspondientes a las variedades estudiadas.

Además, se estudió el efecto de la concentración de sólidos solubles sobre la viscosidad. Finalmente, se obtuvieron ecuaciones para predecir la viscosidad y tensión de corte de las pulpas de durazno en función de los sólidos solubles y la temperatura.

Palabras claves: Reología, Duraznos, Modelo predictivo, Viscosidad.

ABSTRACT

Different peach flesh samples of Mendoza were analyzed, for the following concentrations: 12.5, 16, 20, 24 and 28°Bx and temperatures: 30, 40 y 50°C. They all correspond to the Potential Law model for pseudoplastic fluids.

Rheological parameters (consistency and flow index) and physicochemical parameters (soluble solids, total solids, pH, water content, insoluble solids, acidity and pectin content) for each studied variety and concentration were determined. With this data, a Cluster analyze was done to establish two groups with significant differences between the correspondent samples varieties studied. Also, the effect of the concentration of soluble solids on the viscosity was studied. Finally, equations were obtained to predict the viscosity and shear stress of peach fleshes as a function of soluble solids and temperature.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las propiedades reológicas de los alimentos es de aplicación en: diseño de procesos y equipos en ingeniería, evaluación sensorial, información sobre las estructuras del alimento y control de calidad (Rao y Anantheswara, 1982). El trabajo resulta de importancia para la zona, por ser Mendoza la primera productora del país de pulpa de durazno, destinada a la exportación.

El propósito del presente trabajo es:

- a) caracterizar las propiedades de flujo de pulpas de durazno de la zona de Mendoza, para conformar un banco de datos;
- b) determinar el comportamiento reológico (en flujo y análisis de la tixotropía) en función de la temperatura y de la concentración;
- c) establecer un modelo predictivo del efecto combinado que la temperatura y el contenido de sólidos, ejercen sobre la viscosidad (y la tensión de corte).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó, a lo largo de una campaña, con muestras de pulpa de durazno. Las variedades analizadas fueron: Fortuna, Loadel, Palora, Andross, Bowen, Halford, Sim's Cling, Astengo y Sullivan Cling. La caracterización reológica se realizó sobre muestras de pulpas concentradas preparadas por dilución hasta 12,5; 16; 20; 24 y 28°Bx y temperaturas: 30, 40 y 50°C, efectuándose las mediciones con Viscosímetros Brookfield Mod. LVDV-III y Mod. HBDV- III. Los estudios fisicoquímicos se realizaron en el laboratorio de la Facultad, certificado por normas ISO 9000.

Del análisis estadístico de los datos experimentales, se desprende que el comportamiento reológico de las pulpas responde a la ley de la potencia (Saravacos, 1970; Holdsworth, 1971; Crandall y Nelson, 1975; Rao y Rizvi, 1986).

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Donde: τ es la tensión de corte (Pa), K es el índice de consistencia (Pa.sⁿ), $\dot{\gamma}$ es el gradiente de velocidad (s⁻¹) y n es el índice de comportamiento al flujo (adimensional).

La concentración influencia notablemente la viscosidad aparente de distintas muestras. Se evalúa su influencia sobre el índice de consistencia al flujo (K).

$$K = K_c (C)^a \quad (2)$$

donde " K_c " es una constante de proporcionalidad (Pa.s.°Bx^{-a}), " C " la concentración de la muestra (°Brix) y " a " una constante de proporcionalidad adimensional.

El efecto combinado que la temperatura y el contenido de sólidos ejercen sobre la viscosidad fue evaluado utilizando una ecuación modificada presentada por Fito et. al, 1983:

$$\eta_{ap} = f(T, \dot{\gamma}, C) = A \cdot e^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \cdot C^a \cdot \dot{\gamma}^{(\bar{n}-1)} \quad (3)$$

donde “ η_{ap} ” es la viscosidad aparente (Pa.s), “A” la constante de proporcionalidad (Pa.s.°Brix^{-a}.s⁻¹), “E_a” la energía de activación (kJoule.mol⁻¹), “R” la constante Universal de los gases (kJoule.mol⁻¹.K⁻¹), “C” la concentración (°Brix), “a” la constante adimensional, “ $\dot{\gamma}$ ” el gradiente de velocidad (s⁻¹) y “ \bar{n} ” el índice de comportamiento al flujo medio.

Los valores de “A” y “E_a” se calculan a partir de la siguiente ecuación, que representa la influencia de la temperatura sobre la variable operacional “K”.

$$K_{\theta} = A \cdot e^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (4)$$

A partir de los valores de pH, sólidos totales, humedad, acidez y contenido de pectinas, conjuntamente con tres valores de viscosidad aparente (a 81,1 r.p.m.; a 166,6 r.p.m. y a 243,1 r.p.m.), se diseñó una tabla con la cual se obtuvieron los Clusters, para cada variedad, concentración y temperatura estudiadas. Para ello, se obtuvo el promedio de cada propiedad y su desviación estándar, con lo que se procedió a estandarizar los valores de las propiedades. Haciendo uso de la tabla, los Clusters se resolvieron utilizando el software STATGRAPHICS Plus for Windows 4.10.1998.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales del gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$) con la tensión de corte (τ) han sido ajustadas a la Ley de la Potencia, con el método de los mínimos cuadrados.

Como ilustración se muestran los valores de los análisis fisicoquímicos de la variedad Sim’s Cling (Tabla 1) y los análisis reológicos de las variedades Sim’s Cling y Loadel, modelo: Ley de la Potencia (ecuación 1), en la Tabla 2 y 3.

En la Figura 1, podemos observar que a mayor concentración, mayor tensión de corte para igual gradiente de velocidad; y dentro de una misma concentración, a mayor temperatura, menor tensión de corte.

Estudios similares se efectuaron en las otras 8 variedades, que representan el 90% de las utilizadas industrialmente, exhibiendo todas igual comportamiento.

Tabla 1. Análisis Fisicoquímicas, variedad Sim's Cling (Grupo I)

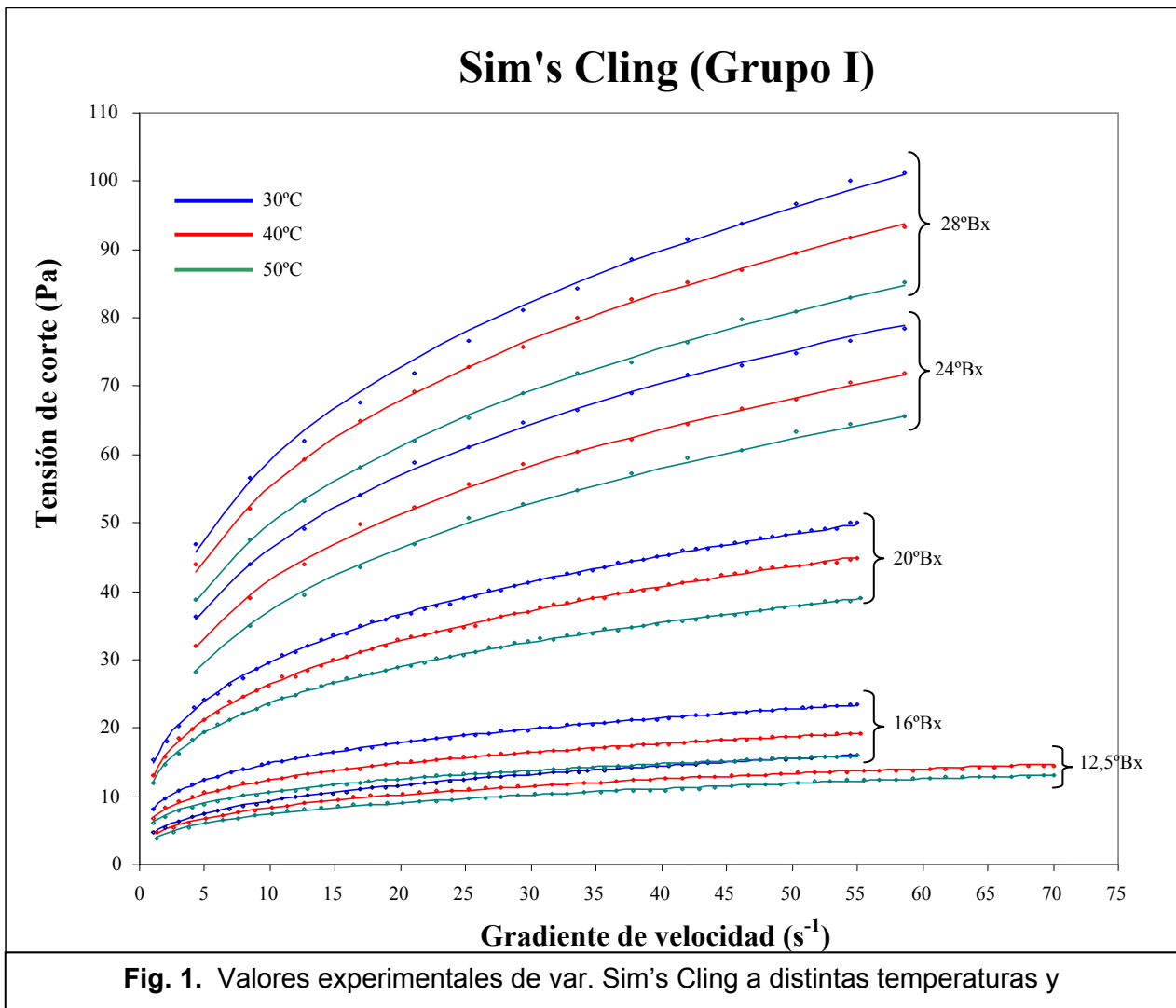
C (°Bx)	pH	Sól. Totales (g/100g)	Humedad (%)	Acidez (meq/kg)	Pectina (mg/kg)
12,5	4,361	13,56	68,76	59,78	1,027
16	4,361	17,05	71,58	69,84	1,238
20	4,360	21,32	74,35	79,58	1,439
24	4,360	25,48	77,08	90,20	1,648
28	4,359	29,46	79,84	100,12	1,843

Tabla 2. Análisis reológico, variedad Sim's Cling (Grupo I)

C (°Brix)	T (°C)	K(Pa.s ⁿ)	n	R ²
12,5	30	4,5394	0,3142	0,9961
	40	4,2746	0,2906	0,9981
	50	3,7202	0,2967	0,9984
16	30	8,0039	0,2667	0,9993
	40	6,8819	0,2557	0,9988
	50	6,2101	0,2340	0,9963
20	30	14,7503	0,3032	0,9989
	40	12,8381	0,3127	0,9995
	50	12,0976	0,2910	0,9992
24	30	23,0940	0,3019	0,9996
	40	20,2908	0,3100	0,9994
	50	17,7869	0,3203	0,9995
28	30	29,5121	0,3019	0,9985
	40	27,8163	0,2985	0,9993
	50	24,9345	0,3005	0,9997

Tabla 3. Análisis reológico, variedad Loadel (Grupo II)

C (°Brix)	T (°C)	K(Pa.s ⁿ)	n	R ²
12,5	30	10,3562	0,2551	0,9982
	40	8,8044	0,2802	0,9964
	50	7,5666	0,2872	0,9928
16	30	14,8765	0,2639	0,9974
	40	14,2659	0,2552	0,9961
	50	10,8069	0,2798	0,9986
20	30	26,3027	0,2337	0,9986
	40	23,1047	0,2447	0,9964
	50	19,1779	0,2558	0,9970
24	30	32,7793	0,3166	0,9952
	40	25,5094	0,3467	0,9898
	50	23,4693	0,3368	0,9960
28	30	38,2825	0,3757	0,9979
	40	37,1279	0,3550	0,9985
	50	29,8470	0,3723	0,9985



Cluster.

Un análisis de Cluster, en base a las propiedades reológicas y fisicoquímicas a las mismas concentraciones, permitió establecer dos grupos por sus diferencias significativas (I: Andross, Bowen, Halford, Sim's Cling, Astengo y Sullivan Cling; II: Loadel, Fortuna, Palora).

Tabla 4. Linealización logarítmica, var. Sim's Cling (Grupo I)			
Temperatura (°C)	K_C (Pa.s.°Bx^{-a})	a	R²
30	0,010919	2,3908	0,995
35	0,011817	2,3452	0,995
40	0,009829	2,3900	0,996
45	0,009177	2,3968	0,992
50	0,008297	2,4106	0,996
55	0,008067	2,3861	0,993
60	0,008283	2,3523	0,992
65	0,006063	2,4283	0,995

Los efectos de la temperatura, la concentración y combinados se efectuaron sobre la variedad Sim's Cling, perteneciente al grupo más representativo.

Efecto de la concentración.

Utilizando la ecuación (2), se obtuvieron los valores de la Tabla 4.

Efecto combinado de la concentración y la temperatura.

Se utilizó la ecuación (4), para encontrar los valores que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de la temperatura sobre K_0 (C), var. Sim's Cling (Grupo I)				
Ln A	A	Ea/R	Ea	R²
-9,7226	5,991.10⁻⁰⁵	1601,2	13,31	0,8535

Finalmente, reemplazando los parámetros hallados con las ecuaciones anteriores y $\bar{n} = 0,293$, se obtuvieron los siguientes modelos propuestos (5 y 6: Grupo I; 7 y 8: Grupo II):

$$\sigma = 5,99.10^{-5}.e^{\left(\frac{1601,2}{T}\right)}.C^{a(t)}. \dot{\gamma}^{0,293} \quad (5)$$

$$\eta = 5,99.10^{-5}.e^{\left(\frac{1601,2}{T}\right)}.C^{a(t)}. \dot{\gamma}^{-0,707} \quad (6)$$

$$\sigma = 9,31.10^{-5}.e^{\left(\frac{2226,4}{T}\right)}.C^{a(t)}. \dot{\gamma}^{0,2972} \quad (7)$$

$$\eta = 9,31.10^{-5}.e^{\left(\frac{2226,4}{T}\right)}.C^{a(t)}. \dot{\gamma}^{-0,7028} \quad (8)$$

El análisis de los datos experimentales y los calculados con este modelo muestran resultados que permiten utilizar las ecuaciones propuestas.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores medidos y los calculados, se realizó un análisis de varianza ($\alpha = 0,05$) entre las columnas de viscosidad aparente medida y la calculada. Los valores de $F < F_{crit}$ (datos no mostrados) para todos los casos, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las viscosidades aparentes medidas y las calculadas, para la variedad de durazno a la que se aplica.

CONCLUSIONES

- De los resultados obtenidos se concluye que los concentrados de durazno se comportan como un fluido pseudoplástico, es decir, para una concentración y temperatura determinadas su viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación, siendo adecuado el uso de la ley de la Potencia para su descripción.
- Con los datos obtenidos, a partir de las caracterizaciones fisicoquímicas y

reológicas, se efectuaron distintos análisis de Cluster que permitieron establecer dos grupos con diferencias significativas entre las muestras correspondientes a las variedades estudiadas.

- La ecuación propuesta ajusta bien con los valores experimentales para el rango de temperaturas y concentraciones estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

Crandall, P.G. y Nelson, P.E., 1975, "Effects of preparation and milling on consistency of tomato juice and puree" en *J. Food Sci*, Vol. 40, p. 710-713.

Fito, P. J., Clemente, G. y Sanz, F. J., 1983, "Rheological behaviour of tomato concentrate (Hot break and Cold break)" en *Journal Food Engineering*, Vol. 2, p. 51-62.

Holdsworth, S. D., 1971, "Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products", en *Journal of Texture Studies*, Vol. 2, p. 393-418.

Rao, M. A. y Anantheswaram, R.C., 1982, "Rheology of fluids", en *Food Processing*, Vol. 36, p. 116-126.

Rao, M. A., 1986, "Rheological properties of fluids foods" en Rao, M. A. y Rizvi, S. H., 1986, *Engineering properties of foods*, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 1-48.

Saravacos, G.D., 1970, "Effect of temperature on viscosity of fruit juices and purees" en *J. Food Sci.*, Vol. 35, p. 122-125.

COMPOSICIÓN ACÍDICA Y CONTENIDO DE CERAS EN ACEITES DE OLIVA VARIETALES ARGENTINOS

BALDONEDO, Noelia ⁽¹⁾; CECI, Liliana N. ⁽¹⁾; MELGAREJO, Martha ⁽²⁾; CARELLI, Amalia A. ⁽¹⁾

(1) PLAPIQUI (UNS-CONICET). La Carrindanga Km. 7, 8000-Bahía Blanca, Argentina. Tel. y Fax: (54-291) 4861700, email: acarelli@plapiqui.edu.ar

(2) Asociación Argentina de Grasas y Aceites (ASAGA). Chacabuco 567-1° Piso, Oficina 48, 1069 - Buenos Aires, Argentina. Tel y Fax: 54-11-43435623, email: mmelgarejo@asaga.org.ar

RESUMEN

Se evaluaron por cromatografía 21 muestras de aceite de oliva virgen cosecha 2004 procedentes de distintas regiones del país. La mayoría de las muestras de la variedad Arbequina presentaron el contenido de ceras y algunos ácidos grasos fuera de los límites fijados por el Consejo Oleícola Internacional (COI). Los altos valores de ceras en estas muestras se debieron fundamentalmente a la gran proporción de componentes parcialmente solubles (C40-C42). La variedad Arbequina presentó un bajo contenido de oleico y alto de linoleico. Se observó una correlación negativa entre la relación oleico/(linoleico+linolénico) y las ceras insolubles que podría atribuirse a las condiciones climáticas cálidas y secas de los cultivos y/o falta de amplitud térmica. Las variedades Barnea y Empeltre cumplieron ambos criterios de pureza. En general, las restantes variedades satisficieron el límite en ceras pero el porcentaje de C18:3 ó C18:1 salió ligeramente de los límites.

Palabras Clave: Aceite de oliva virgen, ácidos grasos, ceras.

ABSTRACT

Twenty-one virgin latest crop (2004) olive oils from different regions of Argentina were examined chromatographically. Most of the Arbequina samples had wax content and some fatty acid percentages off the ranges established by the International Olive Oil Council.

The higher wax content in these samples was mainly due to partially soluble waxes (C40-C42). Arbequina variety showed a low amount of oleic acid and a high linoleic acid content. A negative correlation between O/L+Ln and C44-C46 waxes was observed. This could be explained by environmental conditions. Barnea and Empeltre samples satisfied

both genuineness criteria. In general, the other varieties satisfied the wax content criteria, but either the linolenic or the oleic acid percentage was slightly off limits.

Key words: virgin olive oil, fatty-acid composition, waxes.

INTRODUCCIÓN

La Argentina ha tenido estos últimos años una importante expansión en la producción de aceite de oliva. La zona de producción es amplia en términos de latitud y altitud y no existen antecedentes del comportamiento de los varietales siendo una de las debilidades del sector la falta de tipificación y caracterización de sus aceites. El comercio internacional de aceites de oliva está regido por las directivas del COI que estipula los criterios de pureza. Entre estos criterios se considera la composición en ácidos grasos y el contenido de ceras. Variedades producidas en el Mediterráneo, que se ajustan a los límites establecidos, pueden no cumplirlos cuando son cultivadas en zonas con diferentes condiciones climáticas. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición acídica y el contenido de ceras de aceites de oliva virgen Extra a fin de fijar límites normales de composición de las variedades locales y comparar sus valores con los criterios de pureza internacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de aceites: Se analizaron 21 muestras de aceite de oliva (cosecha 2004) de distintos cultivares procedentes de diferentes regiones de Argentina. Las variedades analizadas, edad y procedencia del olivar, índice de maduración de las aceitunas, como así también la nomenclatura con que se denominarán en adelante los aceites, se indican en la Tabla 1. El sistema de elaboración de los aceites fue continuo por centrifugación con decantadores de dos fases, a excepción de las muestras procedentes de Córdoba en las que se usó decantadores de tres fases. Las temperaturas y tiempos de amasado variaron entre 28 - 35°C y 30 - 90 min, respectivamente.

Materiales: Los reactivos fueron grado analítico, excepto n-hexano, n-heptano y éter etílico los que fueron grado cromatográfico (J. T. Baker). Gel de sílice 60, 70-230 mesh purísima para cromatografía de columna (CC) fue provista por Merck. Estándares de ceras (C32-C44) y de metil ésteres de ácidos grasos (C14-C30) fueron Sigma®.

Composición acídica: Se determinó por cromatografía gaseosa capilar (CGC) según normas COI/T20/Doc. N°24, IUPAC 2.301-2.302 (IUPAC, 1992; COI, 2005). Se utilizó una columna SP2380 de 30m x 0.25mm (0.25µm) de Supelco® con una programación de temperatura de: 170°C (15 min) –4°C/min –240°C (10 min).

Tabla 1- Algunos datos culturales para los aceites de oliva evaluados.

<i>Varietal</i>	<i>Origen</i>	IM	EO	<i>Varietal</i>	<i>Origen</i>	IM	EO
Arbequina				Arauco			
A1	Catamarca	3.2	6	AU	La Rioja	3.4	9
A2	La Rioja	3.3	7	Empeltre			
A3	La Rioja	3.1	9	E	Mendoza	4.8	60
A4	La Rioja	4.2	5	Frantoio			
A5	Catamarca	3.9	5	FR	La Rioja	3.9	6
A6	Córdoba	Verde	50	Manzanilla Californiana			
A7	Córdoba	Envero	50	MC	La Rioja	4.3	7.5
A8	Córdoba	Madura	50	Criolla			
A9	Mendoza	4.5	4-5	MCR	La Rioja	3.2	9
A10	Catamarca	3.3	5	Picual			
Barnea				P1	Catamarca	3.5	6
B1	Catamarca	3.4	7	P2	La Rioja	4.2	5
B2	La Rioja	4.6	6	P3	Catamarca	3.3	5
B3	Catamarca	3.2	5				

IM: Índice de Maduración – EO: Edad Olivar (años).

Contenido y composición de ceras: Se realizó por CC-CGC según norma COI/T20/Doc. N°18/Rev 2 (COI, 2005). Se empleó un cromatógrafo Varian 3700 GLC provisto de FID, inyector “ on column” y una columna capilar HP5 11 m x 0.32 mm (0.52µm) Hewlett Packard®. La programación de temperatura de la columna fue: 80°C – 30°C/min – 200°C (1min)-3°C/min-340°C (20 min); y la del inyector: 80°C-40°C/min-320°C; FID: 350°C.

Análisis estadístico: Todos los análisis se realizaron por cuadruplicado calculándose el promedio y su correspondiente intervalo de confianza a un nivel de significación del 95%. Se aplicó pruebas t para la comparación de medias con una tolerancia de 5% y para la significación de las correlaciones con una tolerancia de 5 y 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se observan los rangos obtenidos de composición en ácidos grasos y la relación oleico/linoleico (o/l) para las variedades estudiadas.

Tabla 2 - Composición relativa en ácidos grasos (metil ésteres, % m/m).

A.G.	A	B	P	AU	E	FR	MC	MCR
C14:0	≤0.05	≤0.05	≤ 0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05
C16:0	15.8–21.8	13.8-14.1	14.5-18.3	19.0	11.7	15.8	16.5	15.6
C16:1	1.6–4.3	1.2-1.4	2.0-3.2	2.3	1.0	1.7	2.1	2.1
C17:0	0.1–0.1	0.0-0.1	0.0-0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C17:1	0.2–0.3	0.1-0.1	0.1-0.2	0.1	0.3	0.1	0.2	0.3
C18:0	1.6–2.0	2.1-2.4	2.2-4.4	2.8	1.8	2.4	3.7	1.7
C18:1	47.9–63.3	60.6-61.1	57.8-69.1	53.7	75.2	63.2	59.9	70.0
C18:2	15.5–22.9	19.4-19.9	7.7-16.5	20.0	8.4	14.8	15.2	8.2
C20:0	0.4–0.5	0.4-0.5	0.4-0.5	0.5	0.3	0.4	0.6	0.4
C18:3	0.6–1.0	0.9-1.0	1.0-1.1	1.0	0.7	1.1	1.1	1.1
C20:1	0.3–0.3	0.2-0.3	0.3-0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4
C22:0	0.1–0.2	0.1-0.1	0.1-0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
C24:0	0.1–0.1	0.1-0.1	0.1-0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
O/L	2.2–4.1	3.0-3.2	3.5-9.0	2.7	9.0	4.3	4.0	8.5

Coefficiente variación (%) para ag > 2 % = 0.01-4.8 y para ag < 2 % hasta 22.5.

Los límites fijados por el coi para aceites de oliva son: c14:0 ≤ 0.05 %, c16:0 entre 7.5 y 20.0 %, c16:1 entre 0.3 y 3.5 %, c17:0 ≤ 0.3 %, c17:1 ≤ 0.3 %, c18:0 entre 0.5 y 5.0 %, c18:1 entre 55.0 y 83.0 %, c18:2 entre 3.5 y 21.0 %, c18:3 ≤ 1.0 %, c20:0 ≤ 0.6 %, c20:1 ≤ 0.4 %, c22:0 ≤ 0.2 %, c24:0 ≤ 0.2 %. Al considerar la variedad arbequina, sólo dos de las diez muestras cumplieron con los límites fijados por el coi. Las muestras que cumplen presentaron un mayor contenido de ácido oleico (a3: 57.49 ± 0.03 y a9: 63.25 ± 0.27), un menor contenido de ácido linoleico (a3: 16.47 ± 0.08 y a9: 15.53 ± 0.22) y una relación o/l más alta (a3: 3.49 ± 0.02 y a9: 4.07 ± 0.08), que los observados para los otros aceites de la misma variedad (o: 47.9-53.6%, l: 19.3-22.9%, o/l: 2.2-2.8). La mayoría de las muestras de esta variedad presentaron contenidos de ácido oleico inferiores y de palmítico ligeramente superiores a los límites legales y cinco de ellas contenidos de ácidos linoleico y/o palmitoleico elevados. Tanto la edad del olivar relacionada con la velocidad de metabolismo de la planta como la temperatura y la amplitud térmica, podrían indicar esta diferencia de comportamiento. La composición en ácidos grasos obtenida difiere notablemente de datos procedentes de cataluña, los que indican valores de oleico de 70.1 a 76.8% y una relación o/l 6.4-8.3 para esta variedad (morelló y col, 2004). Esto sugiere la influencia de las condiciones climáticas en la composición ácida. Al analizar las otras variedades, la muestra de arauco, tuvo también un contenido de oleico bajo y una baja relación o/l. Se han informado en aceites de diferentes variedades y origen, entre ellos argentinos, valores de c18:1 < 55.0 % y de c18:2 > 20.0% (kiritsakis, 1998; alderete y col, 2004). Todas las muestras correspondientes a barnea como la de empeltre

cumplieron con los valores establecidos, mientras que dos de las muestras de picual mostraron sólo una ligera desviación del límite máximo para linolénico (Ln), p1: 1.07 ± 0.01 y p2: 1.10 ± 0.01 . Las muestras de frantoio y manzanilla también presentaron un contenido de linolénico algo elevado, con valores similares a los observados para picual. Las relaciones o/l más altas se observaron para la muestra de empeltre (8.95 ± 0.47) y una de picual (9.01 ± 0.02) que cumplían los criterios del coi.

En la Tabla 3 se presenta el efecto del grado de maduración sobre la composición en ácidos grasos para Arbequina. Entre los ácidos grasos mayoritarios, se observa un incremento significativo en el contenido de linoleico a medida que avanza el proceso de maduración del fruto, y una disminución en el de palmítico en la última fase del mencionado proceso. Es así como el retraso de la cosecha podría originar aceites con contenidos de linoleico fuera de los límites. La relación O/L, disminuye significativamente durante la maduración. Un menor contenido de palmítico al aumentar el índice de maduración se ha informado para aceites de la variedad Koroneiki (Koutsaftakis y col, 2000), mientras que para Picholine se ha encontrado una disminución en palmítico y un incremento en linoleico (Ajana y col, 1998).

La Figura 1 muestra el contenido y composición relativa de ceras (C40-C46) para todos los aceites estudiados. Una muestra de Picual y las de Arbequina, excepto A9, superan ampliamente el criterio establecido por el COI para aceites de oliva vírgenes comestibles (≤ 250 mg/kg). El alto contenido de ceras, se debe fundamentalmente a una mayor proporción de la fracción C40-42, según se observa al comparar los aceites que no se ajustan a los límites fijados con aquellos que sí. Para Arbequina se ha encontrado una correlación negativa entre el contenido de ceras insolubles (C44-46) y la relación O/L+Ln ($r = -0.821$, $p < 0.01$). Para la variedad Picual también se observó que la disminución de O/L+Ln correlaciona fuertemente con el aumento del contenido de ceras insolubles ($r = -0.965$, $p < 0.05$). Finalmente, al comparar las muestras A6, A7 y A8 se observa una disminución del contenido de ceras con el grado de maduración de la aceituna. El alto contenido de ceras en varias muestras puede estar relacionado con las condiciones climáticas de los cultivos. Es conocido que las ceras se encuentran preferentemente en la superficie de las cáscaras de semillas y frutas controlando la transpiración en tiempos de estrés hídrico lo que ocasiona mayor producción de ceras en aquellas plantas desarrolladas en condiciones climáticas adversas de calor y sequía (Hamilton, 1995). Las ceras también actúan como barrera protectora contra plagas, es así que elevados contenidos se han observado en aceites de Empeltre afectados por ataque de moscas en los frutos (Gracia, 2001).

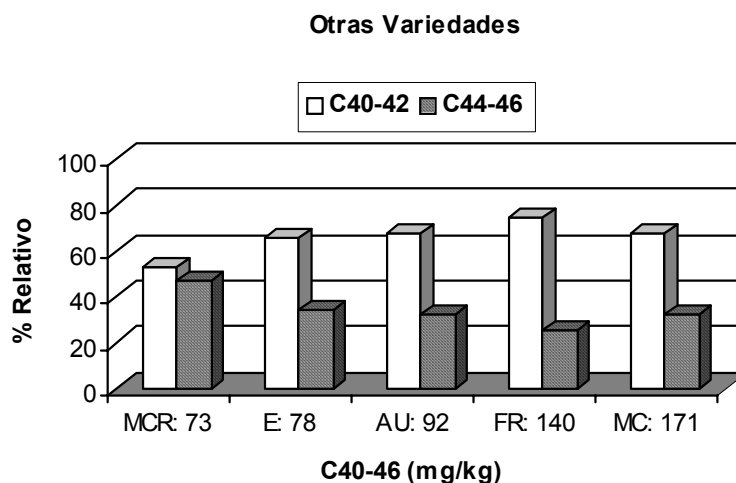
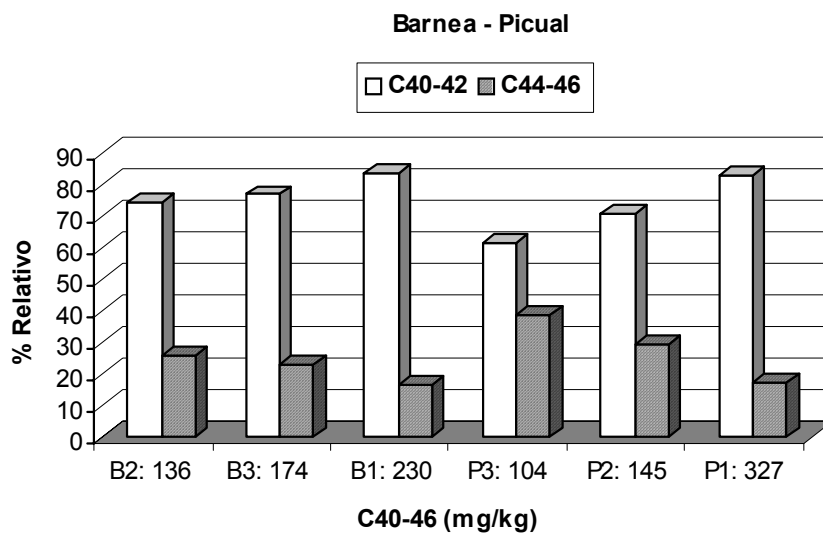
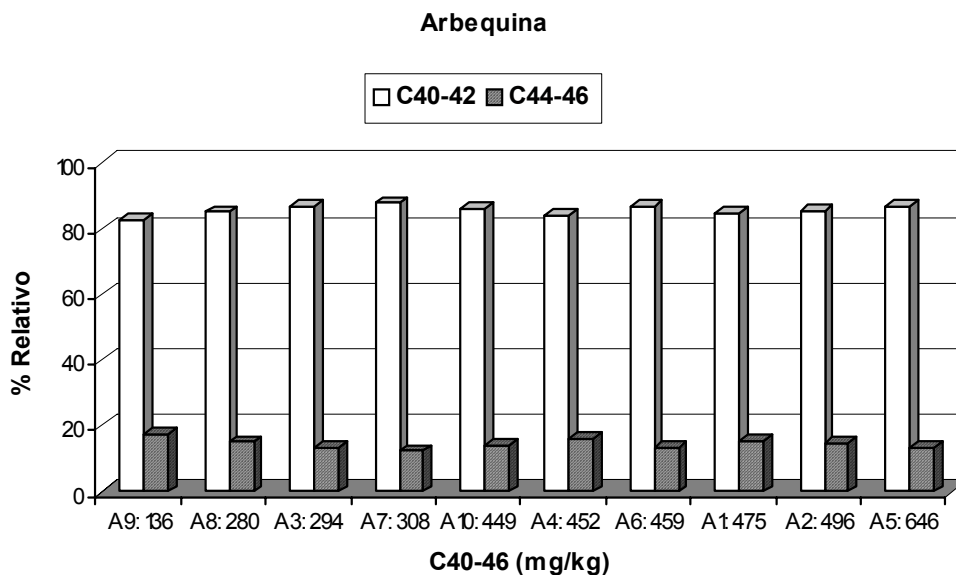


Figura 1- Contenido y composición relativa de ceras (C40-C46) en los aceites analizados.

Tabla 3- Efecto del grado de madurez de las aceitunas sobre los contenidos de ácidos grasos de los aceites (metil ésteres, % m/m) de Arbequina del mismo origen y procesamiento.

A.G.	A6 (Verde)	A7 (Envero)	A8 (Madura)
C14:0	0.024±0.000 ^a	0.025±0.001 ^a	0.023±0.000 ^b
C16:0	20.091±0.131 ^a	20.081±0.061 ^a	19.375±0.063 ^b
C16:1	2.652±0.010 ^a	2.862±0.013 ^b	2.822±0.053 ^b
C17:0	0.133±0.009 ^a	0.111±0.003 ^b	0.104±0.014 ^b
C17:1	0.269±0.004 ^a	0.266±0.003 ^a	0.239±0.008 ^b
C18:0	1.827±0.007 ^a	1.833±0.008 ^a	1.835±0.071 ^a
C18:1	53.594±0.077 ^a	52.564±0.059 ^b	52.639±0.287 ^b
C18:2	19.503±0.042 ^a	20.393±0.033 ^b	21.150±0.338 ^c
C20:0	0.463±0.003 ^a	0.449±0.002 ^b	0.440±0.026 ^{a, b}
C18:3	0.906±0.005 ^a	0.923±0.006 ^b	0.872±0.026 ^a
C20:1	0.306±0.006 ^a	0.268±0.007 ^b	0.285±0.009 ^c
C22:0	0.146±0.003 ^a	0.147± ^a 0.003	0.140±0.012 ^a
C24:0	0.086±0.003 ^a	0.078±0.002 ^b	0.076±0.006 ^b
Oleico\Linoleico	2.75±0.01 ^a	2.58±0.01 ^b	2.49±0.05 ^c

Igual letra en la misma fila indica que no hay diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

Del análisis global puede concluirse que la diferencia en composición de los aceites se debe tanto a factores genéticos como ambientales. El bajo contenido de oleico y los altos contenidos de ceras, fundamentalmente ceras solubles, podrían atribuirse principalmente a las condiciones climáticas cálidas y/o a la escasa amplitud térmica.

BIBLIOGRAFÍA

Ajana H., El Antari A. And Hafidi A. (1998). Fatty Acids And Sterols Evolution During The Ripening Of Olives From The Moroccan Picholines Cultivar. *Grasas Y Aceites* 49: 405-410.

Alderete S., Gómez P., Matías A., Moyano P., Luna M., Dalla Lasta F., Montalbán L. (2004). Influencia de las Condiciones Ambientales en la Composición de Ácidos Grasos de los Aceites de Oliva Virgen de Catamarca. *Aceites y Grasas* 55:336-342.

COI. Consejo Oleícola Internacional. <http://www.internationaloliveoil.org/>

Gracia M. (2001). Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad "Empeltre" en el bajo Aragón. *Grasas y Aceites* 52:52-58.

Hamilton R. Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions. The Oily Press Ltd, Dundee Scotland, 1995.

IUPAC, Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th. Ed., C. Paquot and A. Hautgenne (ed.), Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, 1992.

Kiritsakis A. Olive Oil. From the Tree to the Table 2nd. Ed. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull (U.S.A.), 1998.

Koutsaftakis A., Kotsifaki F., Stefanoudaki E. and Cert A. (2000). Estudio sobre las variaciones de determinados parámetros químicos y de los componentes menores de los aceites de oliva virgen obtenidos de aceitunas recolectadas en distintas fases de maduración. *Olivae* 80:22-27.

Morelló J., Motilva M., Tovar M. and Romero M. (2004). Changes in Commercial Virgin Olive Oil (cv Arbequina) during Storage, with Special Emphasis on the Phenolic Fraction. *Food Chemistry* **85**: 357-364.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible debido al aporte financiero de asaga (asociación argentina de grasas y aceites), conicet (consejo nacional de investigaciones científicas y técnicas) y universidad nacional del sur.

CARACTERÍSTICAS SORCIONALES DEL POLEN RECOLECTADO POR ABEJAS

LEMA, Andrés (1), AGUERRE, Roberto J.(2), SUAREZ Constantino (3)

(1) Industrias, Fac. Agronomía y Agroindustrias, UNSE. Av Belgrano (s) 1912, 4200, Sgo del Estero, Argentina. Tel/Fax: +54-385-4509-538. E-mail: aalema@unse.edu.ar . (2) Tecnología, Univ. Nac. Luján (CONICET), Cruce Rutas 5 y 7, C.C. 221, (6700) Luján, Bs. As., Argentina. rojagu@mail.unlu.edu.ar

(3) Industrias, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria, 1428, Bs. As., Argentina. Tel/Fax: +54-11-4576-3366. E-mail: suarez@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

El polen recolectado por las abejas se presenta como pellets que contienen los gránulos de polen aglutinados mediante sustancias azucaradas, su composición es: 21% de proteínas, 50,6% de hidratos de carbono, 2,25% de lípidos, 15,4% de fibra, 2,88% de minerales y oligoelementos. Se determinaron las isothermas a 5, 15,25 y 35 °C, siendo el rango de a_w 0,1-0,8. La humedad de monocapa BET disminuyó al aumentar la temperatura, este comportamiento es similar al observado para otros alimentos. El efecto de la temperatura sobre los datos de equilibrio se simuló satisfactoriamente mediante una ecuación biparamétrica obtenida a partir del efecto de compensación entalpía-entropía. El calor isostérico y su dependencia con el contenido de humedad se obtuvo a partir de la ecuación de Clausius-Clapeyron. Los calores isostéricos resultaron inferiores al calor latente del agua para humedades entre 3 y 15% (base seca), tendiendo a dicho valor para humedades superiores.

Palabras clave: polen de abeja, isothermas, adsorción, desorción, calor isostérico

ABSTRACT

The pellets of honeybee-collected pollen are a sugared agglutination of pollen granules, the composition of pollen pellets resulted in 21% protein, 50,6% carbohydrates, 2,25% fat, 15,4% fiber, 2,88% minerals. The isotherms were determined at 5, 15,25 and 35 °C, being the a_w range 0,1-0,8. The BET monolayer values decreases with increasing temperature, the similar behavior was observed for other food products.

The effect of temperature on the equilibrium data was satisfactorily modelled by means of a two-parameter equation obtained from enthalpy-entropy compensation theory. Clausius-Clapeyron equation was used to obtain the isosteric heats as function of moisture content.

The isosteric heat resulted lower than the latent heat of pure water for moisture content within 3-15% (dry basis), reaching the value of latent heat at higher moisture contents

INTRODUCCION

El polen colectado por la abeja es una importante fuente de energía y proteínas para consumo humano (Serra Bonheví, 1988). La calidad del mismo depende sin embargo, de la limpieza, secado y condiciones de almacenamiento corrientemente aplicado por los productores de miel. El contenido de agua del polen es un factor determinante para la estabilidad microbiana y organoléptica del producto. Si bien existe bibliografía acerca de la composición de este alimento (Serra Bonheví y Escolà Jordà, 1997; Bell, 1983) no ocurre lo mismo con otros aspectos relacionados con procesos de secado y estabilidad del producto deshidratado. Dada la falta de información referente a la capacidad sorcional de variedades regionales de polen, el presente trabajo estuvo orientado a suministrar información en esa área que permita estimar los requerimientos energéticos y tener información, además, sobre el estado del agua en dicho producto. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue: determinar las isotermas de adsorción de polen monofloral proveniente de la provincia de Santiago del Estero, simular los datos de equilibrio mediante modelos adecuados y finalmente calcular el calor isostérico de sorción y su dependencia con el contenido de humedad.

MATERIALES Y METODOS

Se usó polen monofloral de quebracho colorado, recolectado durante la temporada apícola 2004, de diferentes regiones de la provincia de Santiago de Estero. Las muestras se almacenaron en heladera en recipientes herméticos de vidrio hasta utilizarse en el laboratorio. Se determinó la humedad y composición de las muestras (AOAC, 1995). Humedad a 65°C y 50 mm Hg (Serra Bonheví y Martí Casanova, 1987); proteínas totales (AOAC 14.026); azúcares totales (AOAC 7059); lípidos (AOAC 14026); cenizas (AOAC 7010); fibra dietaria total (AOAC 985.29).

Obtención de las isotermas de sorción

Se determinó la actividad de agua en el rango de a_w 0,1-0,8 a distintos niveles de humedad (2-21%, b.s.); las temperaturas adoptadas fueron 5, 15, 25 y 35 °C. Los valores de a_w para cada nivel de humedad y temperatura se determinaron por triplicado. Se usó un higrómetro eléctrico Rotronic Hygrolab (Rotronic, UK) calibrado con soluciones salinas saturadas de a_w conocida (Falabella y col., 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las isothermas de adsorción de polen se muestran en la Figura 1, puede verse que corresponden al tipo III según la clasificación BET. La temperatura muestra efecto anómalo sobre la curva de equilibrio; al aumentar esta se produce una depresión en el valor de a_w para un dado nivel de humedad. Este comportamiento es opuesto al observado en otros biopolímeros y productos naturales, donde el aumento de temperatura reduce la capacidad de sorción y por lo tanto la humedad de equilibrio.

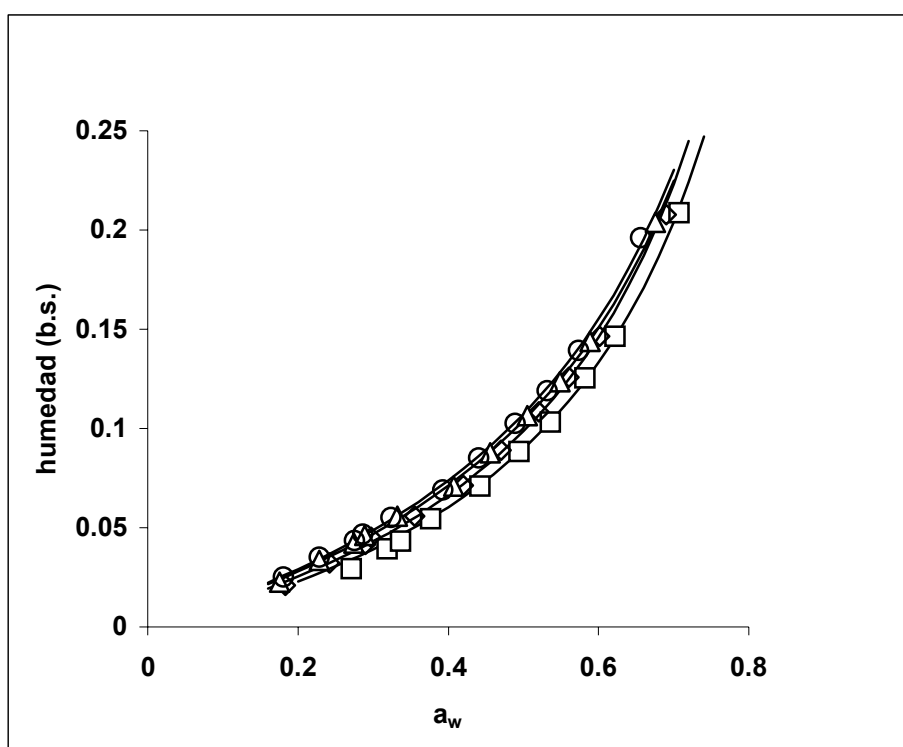


FIGURA 1. Isothermas experimentales de adsorción (\square , \triangle , Δ , \circ) a 5, 15, 25 y 35°C respectivamente e isothermas predichas (—) con la ecuación BET modificada (ecuación 1).

Se usó una modificación del modelo BET (ecuación 1) que ha sido propuesta para isothermas tipo III (Aguerre, Suárez y Viollaz, 1989)

$$m/m_m = (C a_w) / \{(1 - a_w) (1 - C \ln(1 - a_w))\} \quad (1)$$

Donde m es humedad, m_m es humedad de monocapa y C es constante. Los valores de C y m_m obtenidos por regresión se dan en la Tabla 1 donde puede observarse la

disminución del valor de monocapa a medida que la temperatura aumenta. Este comportamiento puede atribuirse a la disminución de los sitios activos como resultado de las interacciones químicas y/o físicas entre los numerosos constituyentes del alimento provocadas por la temperatura.

Tabla 1- Parámetros de la ecuación (1) obtenidos por regresión.

T(°C)	C	m _m	r ²
5	0.054	1.7162	0.9917
15	0.062	1.6518	0.9983
25	0.1698	0.6837	0.9975
35	0.1927	0.6310	0.9968

A partir de la ecuación de Clausius-Clapeyron (ecuación 2), es posible obtener el calor isostérico Q_{iso} a partir de la pendiente de las isósteras de la gráfica de Ln a_w “versus”

$$\left. \frac{\partial \text{Ln } a_w}{\partial T} \right|_m = \frac{Q_{iso}}{RT^2} \quad (2)$$

1/T.

La Figura 2 muestra el calor isostérico en función del contenido de humedad, en línea punteada se señala el calor del agua pura como referencia. Puede apreciarse que el agua de la región transicional (Drost Hansen, 1969) tendría propiedades diferentes de las del agua pura, adsorbida con un calor, proceso exotérmico, que sería menor que el de condensación del agua pura.

Finalmente, los datos de adsorción fueron modelados mediante la ecuación (3), la cual, basada en el principio de compensación entalpía-entropía (Aguerre, Suárez y Viollaz, 1986), permite predecir el efecto de la temperatura sobre la sorción.

$$\psi_\tau \text{Ln } a_w = K_1 K_2^m \quad (3)$$

donde $\psi_\tau = (1/T_\beta - 1/T)^{-1}$; K₁ y K₂ son parámetros caraterísticos de cada material, T_β es la temperatura isocinética y T es la temperatura absoluta. Los valores de los parámetros de

la ecuación 3 obtenidos mediante regresión no lineal de los datos fueron $k_1= 615,0$, $k_2= 4,67 \times 10^{-4}$ y $T_\beta= 164,3$ K. En la Figura 3 puede verse que el ajuste de los datos mediante la ecuación (3) fue satisfactorio ($r^2= 0,9630$).

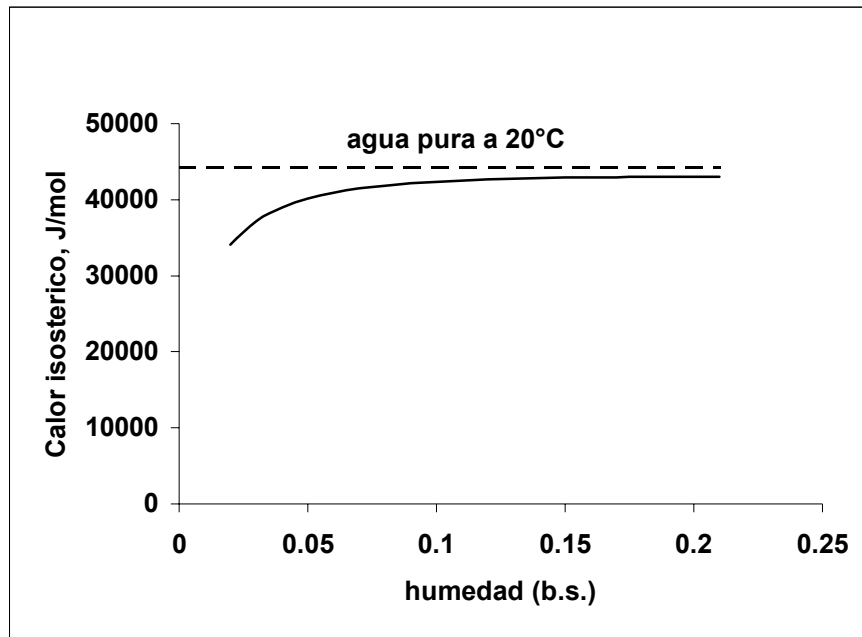


FIGURA 2. Calor isostérico de sorción en función del contenido de humedad

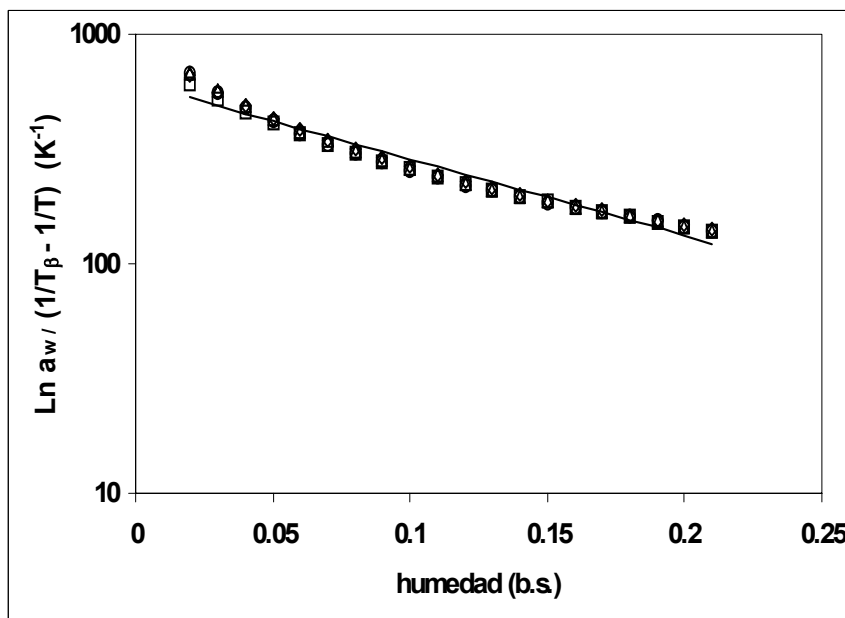


FIGURA 3. Valores experimentales de adsorción (\square , \diamond , Δ , \circ) a 5, 15, 25 y 35°C respectivamente y valores predichos (—) mediante la ecuación (3) para todo el rango de temperatura estudiado (5-35°C).

CONCLUSIONES

Los datos de equilibrio de adsorción de agua de polen fueron modelados satisfactoriamente mediante la ecuación modificada de BET para isothermas tipo III encontrándose que la humedad de monocapa decrece al aumentar la temperatura como en otros alimentos. Sin embargo, se observó efecto anómalo de la temperatura sobre los datos de equilibrio, aumentando la capacidad de adsorción con la temperatura.

La ecuación (2) resultó conveniente para predecir el efecto de la temperatura sobre los datos de equilibrio en todo el rango de a_w estudiado.

El calor isostérico obtenido a partir de la ecuación de Clausius-Clapeyron resultó inferior al calor latente del agua pura para humedades entre 3 y 15% (base seca), tendiendo a dicho valor para humedades superiores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

Aguerre, R.J., Suarez, C., Viollaz, P.E. 1989. *New BET type multilayer sorption isotherms. Part I: Theoretical derivation of the model.*-Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST22,188-191.

Aguerre, R.J., Suárez, C. and Viollaz, P.E. 1986. Enthalpy-entropy compensation in sorption phenomena: application to the prediction of the effect of temperature on food isotherms. *J. Food Sci.* 51:1547-1549.

Association of official analytical chemists (AOAC). 1995. Official methods of analysis (16th ed.). Washington, D.C.:AOAC.

Bell, R.R. 1983. Composition and protein quality of honey bee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. *J. Nutr.*, 113, 2479-2482.

Drost-Hansen W. 1969. Structure of water near solid interfaces. *Ind. Eng. Chem.* 61(11): 10-47.

Falabella, M.C., Aguerre, R.J. and Suárez, C. 1989. Determination of the heat of water vapor sorption by means of electronic hygrometers. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 22, 11-14.

Serra Bonheví, J. 1988. Plant origin of honeybee-collected pollen produced in Spain. An. Asoc. Palinol. Leng. Esp., 4, 73-78.

Serra Bonheví, J. and Escolà Jordà, R. 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. J. Agric. Food Chem., 45, 725-732.

Serra Bonheví, J. and Martí Casanova, T. 1987. Analytical study to determine moisture in honeybee-collected pollen. Ann. Bromatol., 39, 339-349.

ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DEL COLOR, EXTRACTO ACUOSO Y HUMEDAD DURANTE EL PROCESAMIENTO PRIMARIO DE LA YERBA MATE

BRUMOVSKY, Luis A.; FRETES, María R.; ALTERACH, Miguel A. y DIMICH, Marta

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales – Universidad Nacional de Misiones.
Félix de Azara 1552 (3300) Posadas, Misiones. Argentina. TE 03752-422186
e-mail: lab@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Uno de los principales problemas que encuentran los consumidores de yerba mate elaborada es la poca uniformidad de su sabor. El objetivo del presente trabajo fue la determinación del color, extracto acuoso y contenido de humedad producidas en la yerba mate en diferentes etapas del procesamiento para conocer la variabilidad del mismo en diferentes días del año y si dos secaderos producen distintas modificaciones de los parámetros estudiados.

Se encontraron variaciones muy importantes del contenido de humedad en los diferentes días, etapas y secaderos. No obstante, a la salida del secadero se tuvieron diferencias menores del contenido de humedad debido a su bajo valor (< 6 %). Las variaciones del extracto acuoso medidos a la salida del secadero fueron bajas. En cuanto al color, los parámetros “L” y “a” fueron los que más variaron produciendo por este motivo variaciones en la diferencia absoluta de color.

Palabras claves: yerba mate, color, humedad, extracto acuoso, procesamiento.

ABSTRACT

A usual problem that yerba mate consumers find is the low uniformity of it's flavor. The objective of is research was the determination of color, water extract and water content at different processing steps in order to know the processing variability at different days of the year and if two dryers produce different modifications of the studied parameters. An important variation of water content at different days, steps and dryers was found. But low different in the outlet moisture content were found due to its low value (< 6 %). Low variations of water extract in the product were found. Color parameters “L” and “a” had great variations and they produce variations of absolute difference of color.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que encuentran los consumidores de yerba mate elaborada es la poca uniformidad del sabor de este producto, inclusive se detectan variaciones entre paquetes de una misma marca comprados en forma consecutiva.

Las mismas, además de la variabilidad natural, pueden deberse a diversas causas: un procesamiento primario no uniforme, estacionamiento en diferentes condiciones y proporciones variables de la relación hoja/palo.

En las tres primeras etapas del procesamiento (zapecado, presecado y secado) las ramas sufren un tratamiento térmico muy severo que pueden provocar modificaciones físico-químicas importantes además de la pérdida de humedad. Entre estas variaciones se pueden citar los cambios de color, pérdidas de clorofila, cafeína, etc. (Maciel, 1998) El grado de tratamiento térmico es diferente en cada uno de los establecimientos y por lo tanto existirá una variación del sabor por esta causa.

El objetivo del presente trabajo, fue determinar si las variaciones del color, extracto acuoso y contenido de humedad producidas en la yerba mate se deben a la variabilidad de las condiciones del procesamiento que pueda tener un establecimiento industrial en diferentes épocas. Un segundo objetivo fue comparar si distintos secaderos producen diferentes modificaciones de estos parámetros

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó yerba mate en sus diferentes etapas de procesamiento: verde, zapecada, presecada y canchada procedente de una empresa de la zona de Apóstoles, provincia de Misiones, Argentina, procesadas en dos secaderos (1 y 2).

Una vez obtenidas las muestras se separaron las hojas de los palos. Las hojas se molieron en un molino de cuchillas con una apertura de malla igual a 40 mesh y se colocaron en potes de plásticos cerrados e identificados.

Los palos se cortaron en tamaños de aproximadamente 5 cm de longitud y se colocaron en potes cerrados. Los palos procedentes de yerba canchada se molieron para la determinación del extracto acuoso.

Tratamiento de las muestras de hojas verdes

Debido a que las hojas verdes sin tratamiento no pueden ser molidas por su elevado contenido de humedad, a las mismas se le sometió al siguiente tratamiento: se tomaron 70 g de hojas y se colocaron en un microondas marca Golstar (de 1350 W) durante 4 minutos al 100 % de potencia.

Posteriormente a este material se le realizó el mismo tratamiento que a las hojas provenientes de las otras etapas, con el objeto de obtener un grado de molienda similar al de las hojas de las otras etapas.

Determinación del color

El color se determinó utilizando un colorímetro marca Hunter Lab modelo D25-9 (Hunter Associates Laboratory, Reston Virginia). Para la determinación, las muestras se colocaron en cajas de petri de 58 mm de diámetro y 10 mm de altura. Antes de realizar cada medición, el equipo se calibró utilizando sus correspondientes patrones (blanco y negro). Las determinaciones se realizaron utilizando tres recipientes y en cada uno de ellos se realizó la lectura en tres puntos diferentes. Se utilizó la escala de color Hunter Lab (donde "L" es luminosidad, "a" es el eje verde-rojo y "b" es el eje amarillo-azul).

Determinación del extracto acuoso

El extracto acuoso se determinó siguiendo el procedimiento dado por la Norma IRAM Nro. 20510 (1996).

Determinación del contenido de humedad

Se utilizó el procedimiento descrito en la norma IRAM Nro. 20503 (1996), con aproximadamente 2 g de muestra pesada con balanza analítica; se llevo a estufa de aire a 103 +/- 2 °C durante 6 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de humedad

En la tabla 1 se presentan los valores del contenido de humedad promedio y su desviación estándar para las distintas muestras obtenidas en el secadero Nro. 1 en diferentes días. Como se puede observar, las variaciones en cada una de las etapas fueron muy importantes. En el segundo secadero se tuvo una variabilidad similar. Por ejemplo en las hojas zapecadas se tuvieron variaciones entre un 22,9 % y 47,7 % (bs). El contenido de humedad de las hojas a la salida varió entre 1,9 % y 3,9 %.

Extracto acuoso

Las variaciones del extracto acuoso a la salida del secadero no fueron importantes (< 11 %). En el secadero Nro. 1 se obtuvieron valores que variaron entre 39,1 y 44,2 % (bs) para las hojas y de 19,2 y 23,1 % (bs) en los palos; mientras que en el secadero Nro. 2 se obtuvieron valores que variaron entre 39,3 y 43,8 % (bs) para las hojas y de 18,3 y 23,8 % (bs) en los palos. Esto indicaría que esta variable no sufre variaciones importantes debido a los diferentes tratamientos. También se puede observar que el extracto acuoso de las

hojas casi duplica al valor de los palos. Esta relación ya fue encontrada por otros investigadores en yerba mate elaborada (Escalada et al; 1998).

Tabla 1 – Contenido de humedad promedio (% bs) de hojas y palos procedentes del secadero “Nro. 1”. Valores medios \pm desviación estándar de 3 mediciones

Fecha	Hoja verde (*)	Hoja zapecada	Hoja presecada	Hoja canchada	Palo zapecado	Palo presecado	Palo canchado
12/09/03	10,78 \pm 0,09	23,79 \pm 0,52	22,18 \pm 0,14	8,42 \pm 0,00	69,55 \pm 15,12	46,02 \pm 2,31	6,32 \pm 0,47
17/09/03	7,93 \pm 0,03	17,13 \pm 0,00	16,02 \pm 0,02	3,87 \pm 0,00	76,03 \pm 2,16	70,17 \pm 12,6	5,55 \pm 0,32
23/09/03	10,80 \pm 0,09	19,24 \pm 0,2	20,68 \pm 0,14	4,55 \pm 0,21	58,96 \pm 2,68	55,76 \pm 2,59	3,87 \pm 0,08
15/08/04	17,99 \pm 1,27	26,57 \pm 1,19	16,8 \pm 0,04	2,8 \pm 0,04	86,14 \pm 8,21	75,6 \pm 4,04	2,8 \pm 0,02
02/09/04	14,74 \pm 5,07	26,34 \pm 1,85	22,4 \pm 0,03	2,2 \pm 0,07	74,63 \pm 1,24	73,1 \pm 12,60	2,6 \pm 0,11
07/09/04	9,7 \pm 0,33	28,2 \pm 0,35	14,4 \pm 0,10	2,9 \pm 0,11	51,2 \pm 2,53	28,5 \pm 3,08	6,3 \pm 0,12
16/09/04	10,42 \pm 1,74	41,56 \pm 5,40	35,2 \pm 0,20	7,1 \pm 0,06	74,39 \pm 18,81	54,5 \pm 1,06	0,4 \pm 0,07

(*) Tratada con microondas.

Color

La medición de los parámetros de color se realizó solo en hojas molidas. En las tablas 2 y 3 se pueden observar los valores medios y su desviación estándar de 3 mediciones de los parámetros de color “L”, “a” y “b”, para los secaderos 1 y 2 respectivamente.

Las variaciones más importantes se dieron en los parámetros “L” y “a”.

En casi todos los casos el parámetro “L” aumentó en el procesamiento y el de “a” disminuyó en valor absoluto (pérdida del color verde). La variación en los diferentes días y secaderos fue muy importante. Por ejemplo el parámetro de color “a” varió entre -5,46 y -6,77 en el secadero 1 y entre -5,89 y -7,80 en el secadero 2.

Otro parámetro de color que se compara normalmente es el ΔE denominado diferencia absoluta de color. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

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

Donde: L , a y b son parámetros de color de la hoja canchada de yerba mate y L₀, a₀ y b₀ son parámetros de color de la hoja verde de yerba mate tratada con microondas.

Sus variaciones también fueron importantes en los diferentes días y secaderos.

Esta diferencia se debe a la gran variación que sufrieron los dos parámetros de color (L y a).

También se encontraron diferencias de este parámetro en los dos secaderos. En el secadero Nro. 1 varió entre 2,14 y 3,92; mientras que en el 2 varió entre 2,89 y 3,80.

Tabla 2 – Promedios del color de los parámetros L, a y b de hojas provenientes del secadero "Nro. 1". Valores medios \pm desviación estándar de 3 mediciones

Fecha	Hoja verde (*)			Hoja zapecada			Hoja presecada			Hoja canchada		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
12/09/03	35,58 $\pm 0,77$	-10,68 $\pm 0,41$	16,35 $\pm 0,12$	33,69 $\pm 1,74$	-9,07 $\pm 0,31$	14,89 $\pm 1,25$	35,65 $\pm 0,26$	-9,57 $\pm 0,23$	16,03 $\pm 0,22$	35,98 $\pm 0,24$	-8,11 $\pm 0,18$	15,53 $\pm 0,21$
17/09/03	39,25 $\pm 0,32$	-9,85 $\pm 0,31$	17,77 $\pm 0,11$	37,30 $\pm 0,04$	-10,6 $\pm 0,27$	18,11 $\pm 0,07$	38,35 $\pm 0,07$	-9,83 $\pm 0,10$	18,28 $\pm 0,04$	38,39 $\pm 0,21$	-7,37 $\pm 0,31$	16,99 $\pm 0,14$
23/09/03	38,12 $\pm 0,52$	-10,46 $\pm 0,12$	17,61 $\pm 0,34$	36,50 $\pm 1,37$	-8,50 $\pm 0,52$	16,65 $\pm 0,48$	38,96 $\pm 0,29$	-8,47 $\pm 0,54$	17,60 $\pm 0,21$	36,53 $\pm 0,16$	-7,36 $\pm 0,48$	15,81 $\pm 0,05$
15/08/04	35,26 $\pm 0,49$	-8,48 $\pm 0,41$	14,84 $\pm 0,28$	33,57 $\pm 0,44$	6,84 $\pm 0,50$	13,86 $\pm 0,53$	34,61 $\pm 0,22$	-7,88 $\pm 0,42$	14,70 $\pm 0,26$	34,47 $\pm 0,30$	-5,46 $\pm 0,35$	14,12 $\pm 0,23$
02/09/04	35,62 $\pm 1,84$	-8,70 $\pm 0,77$	15,59 $\pm 1,09$	33,38 $\pm 1,24$	-8,33 $\pm 0,47$	13,79 $\pm 1,07$	32,75 $\pm 0,23$	-7,88 $\pm 0,50$	13,56 $\pm 0,27$	35,21 $\pm 0,51$	-6,77 $\pm 0,11$	14,64 $\pm 0,22$
07/09/04	35,62 $\pm 0,23$	-8,57 $\pm 0,47$	15,86 $\pm 0,27$	32,71 $\pm 0,40$	-6,68 $\pm 0,62$	13,17 $\pm 0,22$	34,38 $\pm 0,30$	-7,17 $\pm 0,34$	14,83 $\pm 0,30$	35,28 $\pm 0,47$	-6,75 $\pm 0,37$	14,34 $\pm 0,25$
16/09/04	33,92 $\pm 0,54$	-7,56 $\pm 0,68$	14,78 $\pm 0,24$	29,01 $\pm 0,63$	-4,11 $\pm 0,38$	11,72 $\pm 0,19$	32,36 $\pm 0,21$	-4,73 $\pm 0,32$	12,98 $\pm 0,16$	36,35 $\pm 0,20$	-5,94 $\pm 0,47$	15,13 $\pm 0,10$

(*) Tratada con microondas.

Tabla 3 – Promedios del color de los parámetros L, a y b de hojas provenientes del secadero "Nro. 2". Valores medios \pm desviación estándar de 3 mediciones

Fecha	Hoja verde (*)			Hoja zapecada			Hoja presecada			Hoja canchada		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
12/09/03	39,35 $\pm 0,25$	-13,10 $\pm 0,53$	18,71 $\pm 0,19$	28,68 $\pm 0,08$	-8,13 $\pm 0,11$	13,03 $\pm 0,14$	33,94 $\pm 0,40$	-9,95 $\pm 0,30$	15,71 $\pm 0,20$	---	---	---
15/09/03	35,58 $\pm 0,77$	-10,68 $\pm 0,41$	16,35 $\pm 0,12$	28,95 $\pm 0,24$	-7,81 $\pm 0,25$	13,30 $\pm 0,20$	37,31 $\pm 0,21$	-9,73 $\pm 0,30$	16,86 $\pm 0,20$	---	---	---
17/09/03	40,38 $\pm 0,31$	-10,56 $\pm 0,30$	18,19 $\pm 0,14$	27,00 $\pm 0,46$	-6,41 $\pm 0,51$	11,66 $\pm 0,37$	37,89 $\pm 0,15$	-10,05 $\pm 0,29$	17,49 $\pm 0,11$	40,05 $\pm 0,19$	-7,85 $\pm 0,28$	16,90 $\pm 0,14$
15/08/04	33,07 $\pm 0,12$	-8,00 $\pm 0,53$	13,93 $\pm 0,19$	31,31 $\pm 0,50$	-6,08 $\pm 0,30$	12,86 $\pm 0,12$	33,49 $\pm 0,30$	-6,85 $\pm 0,23$	14,25 $\pm 0,15$	36,28 $\pm 0,13$	-6,29 $\pm 0,36$	15,03 $\pm 0,10$
25/08/04	35,23 $\pm 0,36$	-9,15 $\pm 0,52$	14,64 $\pm 0,38$	32,55 $\pm 0,15$	-7,75 $\pm 0,52$	13,09 $\pm 0,14$	32,74 $\pm 0,24$	-7,86 $\pm 0,50$	13,14 $\pm 0,23$	34,61 $\pm 0,47$	-6,02 $\pm 0,47$	13,75 $\pm 0,20$
02/09/04	33,68 $\pm 0,41$	-8,76 $\pm 0,42$	13,90 $\pm 0,50$	29,43 $\pm 0,35$	-7,30 $\pm 0,51$	11,19 $\pm 0,27$	32,97 $\pm 0,40$	-7,72 $\pm 0,34$	13,04 $\pm 0,20$	36,26 $\pm 0,21$	-7,80 $\pm 0,22$	14,79 $\pm 0,20$
07/09/04	35,42 $\pm 0,54$	-7,73 $\pm 0,20$	14,98 $\pm 0,42$	36,27 $\pm 0,33$	-7,69 $\pm 0,54$	14,83 $\pm 0,27$	35,57 $\pm 0,33$	-8,49 $\pm 0,41$	15,66 $\pm 0,13$	33,09 $\pm 0,41$	-6,49 $\pm 0,13$	13,49 $\pm 0,32$
16/09/04	34,26 $\pm 0,34$	-8,13 $\pm 0,53$	15,36 $\pm 0,30$	28,46 $\pm 0,20$	-4,15 $\pm 0,44$	11,97 $\pm 0,11$	30,30 $\pm 0,30$	-4,95 $\pm 0,26$	11,95 $\pm 0,13$	36,81 $\pm 0,32$	-5,89 $\pm 0,40$	14,90 $\pm 0,10$

(*) Tratada con microondas.

CONCLUSIONES

Al realizar las mediciones del contenido de humedad, extracto acuoso y color en diferentes días, etapas de procesamiento y en dos secaderos; se encontraron diferencias muy importantes del contenido de humedad en las diferentes etapas intermedias, aunque el valor de esta variable a la salida del secadero no tuvo variaciones importantes. El

extracto acuoso de las hojas y los palos en el producto no tuvo variaciones importantes aunque se encontraron diferencias entre ellos.

Las variaciones en las mediciones de color de las hojas que llegaron a los secaderos en los diferentes días fueron bajas. Se tuvieron variaciones importantes de los parámetros “L” y “a” en el procesamiento, teniéndose un aumento del parámetro “L”, y una disminución del valor absoluto del parámetro “a” (pérdida de color verde). Las variaciones de estos 2 parámetros en diferentes días y etapas fueron importantes. También varió la diferencia absoluta de color.

De acuerdo a estos resultados, los diferentes secaderos, tendrían diferentes modificaciones de los parámetros estudiados en los diferentes días y esto podría ser una causa de la variabilidad del sabor de la yerba mate.

BIBLIOGRAFIA

Escalada, M. A.; Schmalko M. E. y Kanzig R. G. 1998. El extracto acuoso como una medida del contenido de palos en la yerba mate. Revista Ciencia y Tecnología Nro. 1, pp. 40-44.

IRAM: Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. 1996. Norma 20503: pérdida de masa por calentamiento a 103 ± 2 °C.

IRAM: Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. 1996. Norma 20510: determinación del extracto acuoso.

Maciel, S. 1998. Estudio de los parámetros de color cafeína y humedad de la yerba mate utilizando gas licuado propano. Tesis de grado de la carrera de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Misiones.

Manual de “Hunter Lab.” .1997. Hunter Associates Laboratory, Inc. USA.

Schmalko, M. E. y Alzamora, S. M. (2001). Color, Chlorophyll, Caffeine y Water Content Variation During Yerba Mate processing Drying technology 19 (3 & 4), 599 –610.

CARACTERIZACIÓN DE POROTO *PHASEOLUS VULGARIS* DE DESCARTE

JIMÉNEZ DE ERRAMOUSPE, Patricia L., LUNA, Estela P. y ARMADA DE ROMANO, Margarita.

Consejo de Investigación. Instituto de Investigaciones para la Industria Química. Universidad Nacional de Salta. Universidad Nacional de Salta. Laboratorio de Alimentos. Avenida Bolivia N° 5150- Tel: 0387-4255362- Fax: 0387-4251006. e-mail:amaru@unsa.edu.ar

RESUMEN

Salta es productora de *Phaseolus vulgaris*. Las heladas afectaron el 77 % de la superficie cultivada en la campaña 2003/04. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el poroto alubia de descarte helado (PD), para su posible aplicación en alimentación humana. Se estudiaron características físico-químicas sobre porotos Alubia estándar (PS) y de descarte (PD). La composición en macrocomponentes fue similar para ambos, excepto en fibra, humedad y cenizas. El pH, Índice de absorción de agua, Índice de solubilidad en agua, densidad, peso y volumen fueron menores en PD, siendo significativas para WAI (índice de absorción de agua) y peso/volumen. Ambos produjeron caldos poco espesos; la ruptura de granos fue mayor en PS, con menor contenido de testa (11,0%) y mayor tiempo de cocción. Los amilogramas mostraron mayor viscosidad para PS de 500 UB frente a 250 UB para PD. La fuerza de corte en muestras crudas, fue mayor en PS, y luego de embebidas mayor para PD. Sin embargo la resistencia a la masticación fue menor en PH en ambos casos.

Palabras claves: poroto de descarte, caracterización físico-química, amilogramas.

CARACTERIZATION OF DISCARDED *PHASEOLUS VULGARIS* BEAN

SUMMARY

Salta is a *Phaseolus vulgaris* producer. The freezes affected 77% of the crops in the campaign 2003/04. The objective of this work was to characterize the discarded bean (PD), for its possible application in human feeding. There were studied physical and chemical characteristics on both standard (PS) and discarded bean (PD). The composition in macrocomponentes was similar for both, except in fiber, humidity and ash. The pH, Index of water absorption, Index of solubility in water, density, weight and volume were lower in PD, being significant for WAI (Water absorption index) and weight/volume. Both produced not very thick broths; the break of grains was bigger in PS, with smaller testa

content (11,0%) and bigger cooking time. The amylographies showed bigger viscosity for PS 500 UB than PD 250 UB. The cut force in raw samples, was higher in PS, and after imbibing higher for PD. However the resistance to the mastication was smaller in PD in both cases.

Keywords: discarded bean, physico-chemical characterization, amylograms.

INTRODUCCION

En los países en vías de desarrollo, las leguminosas, en especial las del género *Phaseolus* representan la principal fuente de proteínas para un gran sector de la población (1). El computo químico del poroto es de 102 %, no presentando aminoácidos limitantes, utilizando como Patrón de referencia el requerimiento de aminoácidos del grupo de 2 a 5 años, dado por la OMS, 1985 (2)

La preparación de *P. vulgaris* incluye el remojo en agua por 8 a 16 horas y cocción por varias horas; la razón es permitir que el agua penetre las capas externas del grano lo cual aseguraría el ablandamiento más rápido durante la cocción (3). A veces, ni el remojo ni la cocción por varias horas son suficientes para alcanzar el ablandamiento deseado del grano, ello es debido a la presencia de defectos en su textura (4); los defectos de textura de los granos están asociados a cambios químicos y estructurales, el llamado defecto "hard to cook" ocasiona que los porotos a pesar de que absorben suficiente agua durante el remojo, no se suavizan durante un período de tiempo razonable de cocción (4,5). La adhesión entre las células y la formación de pectatos son algunas de las causas asociadas a granos duros aún después de la cocción (6,7,8)

Salta es productora de porotos, principalmente alubia, con una producción de 216.226 toneladas por año. Los daños provocados por las heladas llegaron hasta el 76,80 % de la superficie cultivada en la campaña 2003/2004 (INTA EEA Salta), lo que significó grandes pérdidas económicas.

El objetivo de este trabajo, fue caracterizar el poroto alubia de descarte helado (PD), para su posible aplicación en alimentación humana, evitando así el desperdicio de fuentes calóricas y proteicas en regiones de baja disponibilidad de recursos alimentarios y con gran número de grupos poblacionales subnutridos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron granos de *P. vulgaris* variedad *L. alubia* , donados por la Estación Experimental del INTA Salta, cosechados en todas las áreas de cultivo de la provincia de Salta, en condiciones estándar (PS) y la misma variedad helados o de descarte (PD)

El número de muestras fue de: 100 unidades por variedad para PS y PD y/o de 50 gramos obtenida a partir de 100 unidades, transformándolas en harinas con una reducción de tamaño hasta malla 60; dependiendo del estudio a realizar.

Sobre las muestras se determinó: humedad, proteínas, grasa total, cenizas, hidratos de carbono como almidón, según métodos AOAC (12), y la fibra se obtuvo por diferencia.

Los análisis físicos incluyeron : densidad, medición del volumen al compactar en un cilindro de 25 ml 20 g de harina, expresando el resultado como g/ml; y determinación del pH de acuerdo al método AOAC (12). La granulometría se obtuvo agitando por 15 min., 100 g de harina de acuerdo al método descrito por Bedolla y Rooney (15); el índice de absorción de agua (WAI) y solubilidad en agua (WSI) fueron determinados por el método descrito por Anderson y col. (16). La capacidad de absorción de agua (CAA) se determinó registrando el peso inicial de muestras de 100 granos crudos y peso final luego de remojarlos en agua por 12 hs. y se cuantificó mediante la siguiente fórmula :

$$CAA = \frac{(\text{Peso de muestra después del remojo} - \text{Peso inicial de muestra}) \times 100}{\text{Peso inicial de muestra}}$$

La CAA también se determinó en 100 unidades de granos posterior a su cocción.

El tiempo de cocción se determinó de acuerdo al procedimiento de evaluación sensorial descrito por Elías, García-Soto y Bressani (13). El porcentaje de sólidos en el caldo de cocción se evaluó por diferencia de peso, sometiendo 10 ml del caldo o licor de cocción a un secado a 60°C, en cajas de Petri durante aproximadamente 48 h., obteniendo así el espesor de caldo.

Las propiedades de pasta de las harinas crudas de PS y de PD fueron determinadas por amilogramas, utilizando para su medición un viscoamilógrafo Brabender

La resistencia al corte y las características de masticación de ambas muestras, se determinaron en un texturómetro TexturePro-QTS 25, utilizando el accesorio Volodkevitch Bite Jaws, que simula las fuerzas de corte y compresión de la mandíbula humana.

Análisis estadístico: Se trabajó con promedios y sus desvíos estándar. Los datos fueron analizados por t de Student, y coeficiente de correlación de Pearson (18)

RESULTADOS Y DISCUSION

La composición en macrocomponentes, fue similar en ambas muestras (Tabla 1), excepto en el contenido de fibras, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), posiblemente por deshidratación del *P. vulgaris*, se observa también que el contenido de agua en PD es menor que en PS, con un mayor contenido de cenizas en

PD probablemente por adición de materia de carga, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas,

Tabla 1: Composición en macrocomponentes de *Phaseolus vulgaris* estándar y de descarte (g/100 g)

Macrocomponentes	Poroto Estándar (PS)	Poroto Helado (PH)
Hidratos de carbono *	X 54,36 DE 0,04	X 56,98 DE 0,06
Proteínas	X 25,04 DE 0,08	X 25,69 DE 0,07
Grasa Total	X 1,20 DE 0,02	X 1,73 DE 0,03
Cenizas	X 3,86 DE 0,06	X 4,37 DE 0,03
Humedad	X 9,39 DE 0,03	X 8,73 DE 0,04
Fibra	X 6,15 DE 0,06**	X 2,50 DE 0,08**

X: promedio, DE: desvío estándar, *Almidón, ** estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Con referencia a los parámetros físicos (Tabla 2) determinados sobre las harinas de ambas muestras se observa que los valores de pH, WSI y densidad fueron similares para PS y PD, mientras los valores de WAI fueron significativamente menores para PD, por lo tanto los panes elaborados con harinas de PD serían mas secos, cabe recordar que la suavidad, dureza o sequedad de los panes se asocian al WAI. Los valores de WSI presentaron una correlación positiva estadísticamente significativa con respecto al WAI ($r = 0.55$) en PD y PS, lo que indicó que existe asociación entre estas variables.

La densidad de las harinas en g/ml varió entre 0.510 a 0.580 g/ml. Los valores altos de densidad sugieren que son harinas de una granulometría fina que empaican bien en el envase.

Tabla 2. Parámetros físicos de harinas de poroto estándar y de poroto de descarte (malla 60)

MUESTRAS	pH	WAI (g gel/g muestra)	WSI (g/100 g de muestra)	Densidad (g/ml)
M1: Poroto Normal	6,75	1,40 **	25,29	0,58
M2: Poroto de Descarte	6,69	1,06 **	24,81	0,51

** estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

En la Tabla 3, los parámetros físicos determinados sobre muestras de 100 granos enteros demostró la amplitud de las medias del peso y volumen para ambas muestras, siendo esta variabilidad significativa. La capacidad de absorción de agua (CAA), permitió evaluar el grado de permeabilidad de los porotos durante el remojo y detectar el fenómeno de testa dura, relacionado con tiempos de cocción prolongados (18); la CAA varió entre 82,28 y 88,25 para PS y PD respectivamente, lo cual se evidenció en un menor tiempo de

cocción en éstos últimos; observándose igual comportamiento luego de la cocción. El PS presentó una alta correlación positiva estadísticamente significativa ($C=0,80$), lo que indicó que bajos contenidos de testa se relacionan con baja CAA, coincidiendo con autores que opinan que la impermeabilidad de la testa no solo esté dada por el porcentaje de la misma, ya que otros compuestos o estructuras intrínsecas de ésta, pudieran afectar el agua de imbibición (17)

Tabla 3. Características físicas determinadas sobre granos enteros de Porotos estándar y de Porotos de descarte

Muestras	Peso (g)	Volúmen (ml)	Densidad (g/l)	CAA Crudo (%)	CAA Cocido (%)	Tiempo de cocción (minutos)	Espesor de caldo de sólidos (%)	Contenido de Testa (%)
PS	80,76 *	105 *	0,77	82,28 **	19,00 *	120	0,80 **	11,0 **
PD	57,26 *	75 *	0,76	88,25 **	29,74 *	105	0,60 **	16,0 **

* altamente significativo ($p<0,01$), ** estadísticamente significativo ($p<0,05$)

El tiempo de cocción se registró cuando el 90% de los granos presentaron una textura granular suave al paladar, este constituye uno de los parámetros de calidad más importantes en el grano. La variabilidad observada en el tiempo de cocción fue baja ($C.V.= 4,7\%$), con valores ubicados entre los 105 a 120 min., se deduce que los materiales utilizados poseen tiempos de cocción adecuados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la calidad del poroto no sólo está determinada por este parámetro, sino también por su apariencia, sabor, valor nutricional, y otros.

El espesor de caldo, evaluado en términos de porcentaje de sólidos en el caldo de cocción, se ubicó entre el 0.63% al 0.80% , para PD y PS, respectivamente; esto indica que produjeron caldos poco espesos, sobre todo los PS. La ruptura de los granos fue mayor en el PS(con un contenido de testa del 11,0%), y un tiempo de cocción de 120 minutos, mientras que el PD, con mayor contenido de testa (16,0 %) presentó un menor rompimiento del grano y un menor tiempo de cocción. En PD, el espesor de caldo presentó una alta correlación negativa estadísticamente significativa ($c= -0,73$); lo que indicó que caldos poco espesos se relacionan con altos contenidos de testa.

Las propiedades de pasta de las harinas crudas de poroto estándar y de poroto de descarte fueron determinadas por amilogramas, las suspensiones fueron preparadas de acuerdo al contenido de humedad de las harinas y la relación fue de 75,61 g para poroto estándar y 74,78 g para poroto helado. La viscosidad de pico fue de 250 UB para poroto

helado y de 500 UB para poroto estándar (94,5°C), relacionando la viscosidad de pico con la aptitud para panificación, el mejor tipo de miga está dado por suspensiones cuyos picos se ubican entre 400 a 600 UB, siendo de elección en este caso para productos de panificación las harinas de PS. La baja viscosidad de las harinas de PD indicarían que la agresión climática ocasionó una dextrinización del almidón, confiriéndole diferente comportamiento reológico.

La fuerza de corte evaluada en muestras crudas (Gráfico 1), fue mayor en PS, presentando una mayor rigidez y mayor resistencia a la masticación, sin embargo, en muestras crudas luego de embebidas la resistencia al corte fue mayor para PD. Sin embargo la resistencia a la masticación fue menor para PD en ambas muestras –crudas y luego de embebidas.

CONCLUSIONES

Los resultados físico-químicos realizados, indicarían que los PD serían aptos para alimentación humana, siendo sus ventajas el menor tiempo de cocción y su menor resistencia a la masticación. Su uso en panificación se recomendaría en mezclas con otras harinas, y debido a su bajo peso y volumen aumentaría la cantidad de producto a utilizar con respecto a PS.

BIBLIOGRAFIA

Jaffé WG. Nuestros Alimentos Ayer Hoy y Mañana. Fondo Editorial. Acta Científica Venezolana. 1987, P. 83-87.

Organizacion Mundial De La Salud. Necesidades de Energía y Proteínas FAO/OMS/UNU. En serie de Informes Técnicos N° 522, 1985, 71p.

Bressani R, Gómez Brevez RA y Elial L. Calidad nutricional de la proteína de gandum tierno y maduro, y su valor suplementario a cereales. Arch Latinoam Nutr, 1986; 36:1:108-116.

Cid JA, Petenatti E, Arello Muzaber J y De Mucciarelli L. Valor biológico de la proteína foliar de artiplex suberecta. Arch Latinoam Nutr, 1991;41;2:421-427.

Sefa-Deheh S, Stanley D. Textural implications of the microstructure of legumes. Food Technol 1979; 33:77-83.

Stanley D, Aguilera J. Structure and texture in cooked beans. J. Food Biochem. 1985; 9:277-323.

- García E, Lajolo F, Swanson B.** A comparative study of normal and hard-to-cook Brazilian common beans (*Phaseolus vulgaris*): Ultrastructural and histological aspects. Food Structure 1993; 12:47-154.
- Sefa-Dedeh S, Stanley D, Voisey.** Efect of the storage time and conditions on the hard-to-cook defect in cowpea (*Vigna unguiculata*). J Food Sci 1978; 44:790-795.
- Berrios J, Swanson B, Cheong A.** Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Food Resear Inter 1999; 32:669-67
- Del Valle J, Bourne M.** Water absorption and swelling in dry bean seeds. J Food Proc Pres 1992;16:75-98.
- Guzmán-Maldonado H, C Jacinto H y JZ Castellanos.** Manual de métodos para determinar características de calidad en frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). SAGAR, INIFAP, Campo Experimental del Bajío. México. 1995;77 p.
- A.O.A.C. Official methods of analysis of A.O.A.C., International, 16 th, ed. By AOAC International, (1995).
- Elías LG, A García-Soto y R Bressani.** Métodos para establecer la calidad tecnológica y nutricional del frijol *Phaseolus vulgaris*. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Guatemala, C.A. 1986;42 p.
- Gómez MH, LW Rooney, RD Waniska & RL Pflugfelder.** Dry corn masa flours for tortilla and snack food production. Cereal Foods World 1987;32: 372-377.
- Bedolla S, & LW Rooney.** Characteristics of U.S. and Mexican instant maize flours for tortilla and snack preparation. Cereal Foods World 1984;29: 732-735.
- Anderson RH, HF Conway, VF Pfeifer & EL. Griffin Jr.** Gelatinization of corn grits by roll- and extrusion-cooking. Cereal Science Today 1969;14: 4-7; 11-12.
- García- Vela L, Del Valle J., Stanley D.** Hard-to-cook defect in black beans: The effect of soaking in various aqueous SALT solutions. Can. Inst. Sci. Technol. J. 1991; 24:60-67
- Frank, N.M..** Manual de estadística aplicada, Ediciones Hemisferio Sur (1980).

CONTRIBUCION AL ATLAS MUNDIAL DE SELENIO: RESULTADOS PRELIMINARES DE SELENIO EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA EN ARGENTINA

FISSORE Eliana¹, RESNIZKY Sara M.² y GÓMEZ Rosa G³.

¹Alumna de la Fac.de Agronomía y Cs Agroalimentarias. Univ. de Morón. ²CNEA. ³FCEyN. UBA .
²Grupo Técnicas Analíticas Nucleares. CNEA. Av. del Libertador 8250. 1429 - Bs.As. Argentina. Tel/Fax 5 411 6779812. E-mail: resnizky@cae.cnea.gov.ar; ³Dpto Quím. Orgánica. Area Bromatología. FCEyN. UBA .Ciudad Universitaria. 1428-Bs.As. Argentina. Tel/Fax 5 411 4 5763346. E-mail:rgomez107@hotmail.com

RESUMEN

Se determinó la concentración de selenio mediante la técnica de Análisis por Activación Neutrónica Instrumental, en huevos de gallina provenientes de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, consideradas las zonas de mayor producción y distribución de huevos de frescos en Argentina. Los contenidos de Se para clara y yema (valor medio \pm DS y rango) fueron 6.1 ± 1.4 , $3.8-8.3 \mu\text{g}/100\text{g}$ y $34.8 \pm 8,9$, $18.7-56.3 \mu\text{g}/100\text{g}$ respectivamente. El contenido medio de selenio de un huevo se estimó en $8.7 \mu\text{g}$, valor que representa el 16% de la Ingesta Dietética de Referencia de Se de $55 \mu\text{g}$ para un adulto sano. Los valores de la relación entre las concentraciones de Se en clara y yema hacen presumir una suplementación de la dieta con selenio en forma inorgánica en la mayoría de las localidades estudiadas.

Palabras claves: selenio, huevos de gallina, micronutrientes, Análisis por Activación Neutrónica

ABSTRACT

The concentration of selenium in hen's eggs was determined using Neutron Activation Analysis. Eggs were obtained from Buenos Aires and Entre Ríos provinces, both considered the areas with the mayor levels of production of eggs in Argentina. The average (\pm SD) egg-white selenium content ($\mu\text{g}/100\text{g}$) was 6.1 ± 1.4 , with a range of $3.8-8.3$. The corresponding mean yolk selenium value ($\mu\text{g}/100\text{g}$) was $34.8 \pm 8,9$, with a range of $18.7-56.3$. The selenium content of a whole fresh egg was estimated to be $8.7 \mu\text{g}$. The consumption of whole egg would contribute with 16% of the Recommended Dietary Intake of a $55 \mu\text{g}$ for a healthy adult. The average egg-white-selenium / yolk-selenium ratios,

calculated on dry weight basis, indicate a probable diet supplementation with inorganic form of selenium in most of the studied areas.

Key words: selenium, hen eggs, trace elements, Neutron Activation Analysis

INTRODUCCIÓN

El selenio es considerado un microelemento esencial, al que se le atribuyen una considerable cantidad de funciones, reducción de los efectos destructivos de la peroxidación, retraso del proceso de envejecimiento, participación en la biosíntesis de testosterona y desarrollo normal de espermatozoides, reducción de la incidencia de ataques cardíacos y derrame cerebral, prevención del daño oxidativo a los vasos sanguíneos y agente anti-inflamatorio (N.R.C., 1983; Levander y col, 1991; Valiente y col, 2002; AEIA, 2003; National Cancer Institute, 2004). Su deficiencia está ligada a un mayor riesgo de demencia, senilidad, depresión e irritabilidad, virulencia de virus inofensivos. Se sugiere además que ayudaría a controlar el daño celular que puede conducir al desarrollo de cáncer (National Cancer Institute, 2004), aunque no hay evidencias concluyentes al respecto (Valiente y col, 2002).

En los últimos años ante la cantidad de funciones atribuidas al selenio y el estrecho rango entre su deficiencia y su toxicidad, fue intensificado el interés por conocer el estado nutricional de selenio en poblaciones, animales y suelos a nivel mundial, ya que el mismo puede afectar la salud humana en diferente grado dependiendo de la magnitud de la desviación de dicho rango. El contenido de selenio en los alimentos es el principal factor determinante del estado nutricional de selenio en las poblaciones, el que está directamente relacionado con el contenido de selenio de los suelos (Portela, 1994). La distribución de selenio en la biosfera no es constante, existiendo zonas donde se encuentra en bajas concentraciones y otras en las que su abundancia crea problemas de toxicidad. En el primer caso, su deficiencia causa dos enfermedades endémicas en extensas zonas de China: la enfermedad de Keshan (cardiomiopatía) y la de Kashin-Beck (osteoartritis); así como también se ha correlacionado un deficiente estado nutricional en selenio con una elevada incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Resnizky y col, 1999). En zonas de abundancia como Venezuela, un exceso de selenio causa la selenosis, caracterizada por fatiga, caída de cabello y elevada prevalencia de caries (Portela, 1994). Por lo tanto, el contenido de selenio en los alimentos, especialmente los de origen vegetal, puede variar en un amplio rango entre países y en diferentes zonas del mismo país (Oldfield, 1999). En Argentina se ha postulado la existencia de zonas con deficiencia de selenio en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos basándose en

estudios indirectos realizados en bovinos y de zonas con abundancia en las provincias de Córdoba y San Luis (Ruksan y col,1992), hipótesis no confirmadas por la determinación del contenido de selenio en suelos (Oldfield, 1999). En cuanto al contenido de selenio en alimentos y al estado nutricional de selenio en la población, sólo se han publicado algunos datos en trigos cosechados en cinco zonas de la provincia de Buenos Aires (Hack y col, 1996) y en sangre de un grupo de adultos sanos residentes en el Gran Buenos Aires (Hevia y col, 2002) Esto se debe en parte a la dificultad de medición de selenio en bajas concentraciones, siendo el Análisis por Activación Neutrónica una de las técnicas con sensibilidad adecuada para su determinación a nivel de trazas. El estado nutricional de selenio en las poblaciones puede evaluarse por su contenido en los principales alimentos aportadores carnes, cereales y huevos (FAO, 2003). El huevo de gallina se considera como uno de los principales aportadores de selenio de la dieta y es considerado como un buen indicador de la ingesta dietaria de selenio (Ruz y col, 1995).

El objetivo de este trabajo fue determinar contenido y forma en que se presenta el selenio en yema y clara de huevos frescos a fin de aportar datos de composición de este microelemento esencial en alimentos argentinos y contribuir al conocimiento de su estado nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

La elección de las muestras representativas de huevos frescos consumidos en el país se realizó teniendo en cuenta la producción nacional, siendo las provincias de mayor importancia Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fé y Córdoba, con aportes de 45 %, 25 %, 11% y 8 % respectivamente, según datos publicados por la Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). Algunos lotes de 30 a 60 huevos fueron provistos directamente por los mayores productores a través de la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA) y otros comprados en supermercados de venta masiva. Se analizaron 14 lotes de granjas avícolas de las localidades de Pergamino (2 lotes), González Catán, Pilar, Moreno, Manuel Ocampo, General Las Heras, General Rodríguez, Victoria y Marcos Paz de la provincia de Buenos Aires y Ejido Colón - Colonia San José, Viale, Ejido Crespo - Aldea San Rafael, y Crespo de la provincia de Entre Ríos. Los lotes analizados fueron de huevos blancos, de 65g de peso medio, provenientes de gallinas ponedoras de jaula de las líneas híbridas Hy Line, HW Blancas, B300 y Lomans, alimentadas con mezcla de balanceado comercial compuesto por harina de carne, maíz, soja, trigo, girasol, vitaminas y minerales.

Se seleccionó un total de 168 huevos, 12 de cada lote tomados al azar descartando los que presentaban defectos. La muestra analítica consistió de 6 huevos por duplicado de cada lote o granja avícola, según AS 1383 Standards Association of Australia (1974). Los huevos fueron luego roturados en forma manual separándose yema, clara y cáscara. Se pesó cada huevo, yema y cáscara individualmente previo lavado y secado de la última; la masa de clara se obtuvo por diferencia. Se prepararon muestras compuestas conformadas por 6 yemas y 6 claras separadamente, las que se homogeneizaron cuidadosamente con varilla de vidrio evitando la formación de espuma. Para prevenir posibles contaminaciones se evitó el uso de elementos metálicos. Las muestras de yema y clara se analizaron por duplicado para determinar su contenido de humedad y selenio. La determinación de humedad se realizó según método 925.30 AOAC (1990), en estufa de vacío a 100 ± 2 °C hasta peso constante. Para la determinación de selenio se utilizó la técnica de Análisis por Activación Neutrónica en su forma Instrumental, para ello las muestras de clara y yema fueron liofilizadas. Posteriormente, las claras fueron pastilladas y envueltas en foil de polietileno y las yemas fueron envasadas en recipientes de polietileno. Las muestras, los patrones de comparación y los materiales control fueron acondicionados en cápsulas de irradiación de aluminio e irradiados durante 10 horas en el reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza (7 MW de potencia, 6×10^{13} flujo térmico nominal). Una vez transcurrido un tiempo de decaimiento de 25 a 30 días, muestras, patrones y material control fueron medidos en un detector de Germanio Hiperpuro (30% eficiencia, resolución 1.8 keV para el pico de 1332.5 keV de ^{60}Co). Se utilizó el software Gamma Vision para la adquisición de datos y un programa desarrollado en el laboratorio para el cálculo de las concentraciones. La determinación se realizó a través del nucleido ^{75}Se , de 120 días de período de semidesintegración, utilizándose las energías gamma características de 136.0 y 264.7 KeV para los cálculos (Bode, 1996; I.A.E.A, 1990) (Kalousková y col, 1989). Para el aseguramiento de la calidad analítica de los resultados se analizó un material de referencia certificado, IAEA 336-Lichen, del International Atomic Energy Agency, encontrándose un valor de Se de 0.258 ± 0.092 µg/g, siendo el valor certificado de 0.22 (0.18-0.26) µg/g.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las determinaciones de selenio se detallan en la Tabla 1. Los mismos se encuentran expresados como microgramos por 100 gramos de muestra (clara o yema), calculados como promedio de dos determinaciones independientes. Asimismo, para

obtener una estimación de los contenidos de Se en clara y en yema se utilizaron las concentraciones halladas para las muestras y las masas promedio de clara o yema.

Tabla 1. Contenido de selenio en clara y yema de huevos frescos de 14 granjas avícolas de localidades de las provincias de Buenos Aires (*) y Entre Ríos (**).

Localidad	Se en clara		Se en yema	
	µg/ 100 g	µg/clara	µg/ 100 g	µg/yema
Pergamino 1 *	6.7	2.7	37.1	6.7
Pergamino 2 *	8.2	3.4	40.4	7.3
Gonzalez Catán *	5.9	2.4	33.6	5.3
Pilar *	5.5	2.3	35.9	6.0
Moreno *	6.4	2.6	41.3	7.5
Manuel Ocampo *	6.1	2.2	56.3	8.0
Gral Las Heras *	3.8	1.8	36.2	7.0
Gral.Rodriguez *	4.4	1.6	32.0	6.2
Victoria *	7.2	2.7	29.3	5.5
Marcos Paz *	8.3	3.2	27.0	5.7
Ejido Colon-Cnia.San José **	6.8	2.4	26.9	4.5
Viale **	5.0	2.4	18.7	4.8
Ejido Crespo Aldea S. Rafael **	5.4	2.4	30.6	6.1
Crespo **	5.5	2.2	41.8	8.2
Promedio	6.1	2.4	34.8	6.3
SD	1.4	0.5	8.9	1.2
RSD%	22.2	19.2	25.6	18.4
Rango	3.8 - 8.3	1.6 - 3.4	18.7 - 56.3	4.5 - 8.2

En la tabla mencionada se detallan además promedio, desvío estándar, desvío estándar relativo porcentual y rango de los valores mencionados. Los contenidos de selenio para clara y yema determinados en este trabajo son menores que los escasos datos encontrados en bibliografía para otros países (Ruz y col, 1995; Kalousková y col, 1989; USDA, 2004). Las zonas de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos de donde provienen las muestras coinciden con zonas citadas en bibliografía de deficiencia de selenio (Oldfield, 1999; Ruksan y col,1992). Para un huevo entero promedio de 65 g, 40,6 g de clara y 18,5 g de yema se estimó un contenido de selenio de 8,7 µg, que contribuiría al 16 % de la Ingesta Dietética de Referencia de selenio para un adulto sano considerada de 55 µg diarios (Food Nutrition Board, 2004).

El uso del contenido de selenio en huevos de gallina como monitor ofrece importantes ventajas, ya que depende de la cantidad y la principal forma de selenio en la dieta de la gallina. Como las proteínas de la clara se originan en el oviducto, mientras que las de la yema se sintetizan en el hígado, la primera se relaciona con la forma orgánica de selenio en la dieta y la última con la forma inorgánica. Investigaciones previas han encontrado que la distribución del selenio en clara y yema indica el tipo de compuesto de selenio de la

dieta (Ruz y col, 1995), cuando está como selenometionina, forma orgánica presente en fuentes naturales, el contenido de selenio en clara es igual o mayor que el de la yema y si el compuesto de selenio es del tipo inorgánico, como selenito, el patrón de distribución se revierte y aparece más selenio en yema (Latshaw y col, 1975; Naber, 1979; Brätter y col, 1993; Ruz y col, 1995). En este caso, dados los valores encontrados, se presume una suplementación de la dieta con selenito, forma inorgánica de selenio generalmente más utilizada, salvo en las localidades de Victoria, Marcos Paz, San José y Viale. En referencia a la absorción en humanos, el selenio orgánico, por estar en la forma de selenoaminoácidos es activamente absorbido y se almacena en los tejidos manteniéndose en reserva para cuando sea necesario; mientras que el selenio inorgánico, es pasivamente absorbido y pobremente retenido (Levander y col, 1991).

Tabla 2. Valores de peso y humedad de clara y yema; contenido de selenio en clara y yema expresados en $\mu\text{g}/100\text{g}$ en base seca y su relación; correspondientes a lotes de huevos frescos de 14 granjas avícolas de localidades de las provincias de Buenos Aires (*) y Entre Ríos (**).

Localidad	Clara			Yema			Relación Se clara/yema base seca
	peso (g)	hum. %	$\mu\text{gSe}/100\text{g}$ base seca	peso (g)	hum. %	$\mu\text{gSe}/100\text{g}$ base seca	
Pergamino 1 *	40.8	88.6	58.8	18.1	51.8	77.0	0.8
Pergamino 2 *	40.8	87.0	63.4	18.1	52.1	84.3	0.8
Gonzalez Catán *	39.6	88.0	49.6	15.7	49.2	66.2	0.7
Pilar *	42.3	87.8	44.9	16.7	51.6	74.2	0.6
Moreno *	40.3	87.7	52.4	18.2	50.4	83.2	0.6
Manuel Ocampo *	36.2	88.8	54.2	14.3	52.4	118.3	0.5
Gral Las Heras *	47.7	88.2	32.2	19.4	51.7	74.8	0.4
Gral.Rodriguez *	37.0	87.7	35.3	19.3	51.3	65.6	0.5
Victoria *	38.1	87.9	59.2	18.6	52.6	61.9	1.0
Marcos Paz *	38.9	86.9	63.2	21.1	54.4	59.3	1.1
Ejido Colon-Cnia.San José **	35.1	87.7	55.7	16.9	51.2	55.1	1.0
Viale **	47.1	87.4	39.8	25.4	51.9	39.0	1.0
Ejido Crespo Aldea S. Rafael **	44.2	87.8	43.8	20.0	50.0	61.3	0.7
Crespo **	40.5	87.9	45.1	19.7	51.0	85.2	0.5
Promedio	40.6	87.8	49.8	18.7	51.6	71.8	
SD	3.8	0.5	10.0	2.6	1.3	18.5	
RSD%	9.2	0.6	20.0	14.2	2.4	25.8	
Rango	35.07 - 47.70	86.9 - 88.8	32.2 - 63.4	14.3 - 21.41	49.2 - 54.4	39.0 - 118.3	

CONCLUSIONES

Dada la justificada preocupación en países desarrollados por conocer su estado nutricional de selenio, estos resultados preliminares son valiosos planificándose continuar este trabajo para aportar datos estadísticamente representativos a nivel nacional.

AGRADECIMIENTOS

A la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA) por la información brindada y provisión de muestras y a la Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Morón por el apoyo económico que hizo posible la presentación de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

AEIA (2003). Australian Egg Industry Association

AOAC (1990). Official Methods of Analysis. 15th edn.. Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K. ed., Arlington, Virginia, USA.

Bode, P. (1996). Instrumental and Organisational Aspects of a Neutron Activation Analysis Laboratory. Delft University of Technology, Holland.

Brätter, R., Negretti de Brätter, V.E., Oliver, W. And Jaffé, W. (1993). Selenium in human monitors related to dietary intake levels in Venezuela. *J. Trace Electrolytes Health Dis.* 7, pp 111-112.

Food and Agricultural Organisation (2003). Food Composition. www.fao.org/infoods/data

Food Nutrition Board (2004). Dietary Reference Intakes 1997 – 2001. Institute of Medicine, USA.

Hack, A., Brüggermann, J. (1996). Contenido de selenio en trigo argentino. *La Alimentación Latinoamericana*, 214, pp 36-38.

Hevia, S.E., Portela, M.L.P., Resnizky, S.M. (2002). Selenium determination in whole human blood by radiochemical neutron activation analysis: preliminary results in Argentina. *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 23, N°3, Supplement, pp 66– 68.

I.A.E.A (1990). Practical Aspects of Operating a Neutron Activation Analysis Laboratory. International Atomic Energy Agency, TEC-DOC-564, Vienna.

Kalousková, D., Pavlik, H. (1989). Radiochemical Separation of ⁷⁵Se with o-phenyldiamine for INAA of Selenium in Biological Materials. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 129 (1), 59-67.

Latshaw, J.D., Osman, M. (1975). Distribution of Selenium in Egg White and Yolk after Feeding Natural and Synthetic Selenium Compounds. *Poultry Science* 54: 1244 – 1252.

Levander, O.A. y Burk, R.F. (1991). “Selenio” en Conocimientos Actuales Sobre Nutrición, 6° ed., Organización Panamericana de la Salud. Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, 309-315.

- Naber, E.C. (1979).** The Effect of Nutrition on the Composition of Eggs. *Poultry Science* 58: 518-528.
- National Cancer Institute (2004).** Estudio del Selenio y la Vitamina E para Prevenir el Cáncer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96:696-703, USA.
- N.R.C. (1983).** Selenium in Nutrition. National Research Council, Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture, Subcommittee on Selenium, USA.
- Oldfield, J. E. (1999).** Selenium World Atlas. Yves Palmieri Ed., Grimbergen, Belgium.
- Portela, M.L.P. (1994),** Vitaminas y Minerales en Nutrición. López Libreros Editores, Bs. As., Argentina.
- Resnizky, S.M., Dallorso, M.E., Pawlak, E. (1999).** Neutron activation analysis of Se in bovine plasma samples. *Biological Trace Elements Research*, Vol 71-72, pp 343-347.
- Ruksan, B.R. and Zanelli, M.L. (1992).** La Glutación Peroxidasa en la Detección de la Deficiencia de Selenio en Bovinos de la Argentina. XIII Congreso Panam. De Ciencias Vet., Chile.
- Ruz, M., Codoceo, J., Hurtado, S., Muñoz, L., Gras, N. (1995).** Characterisation of the regional distribution of selenium in Chile using selenium in hen's eggs as a monitor. *J. Trace Elements Med. Biol.*, Vol. 9, pp 156-159.
- Standards Association of Australia (1974).** Methods for the chemical examination of eggs and egg products. AS 1383-1974.
- U.S.D.A. (2004).** Nutrient Database for Standard Reference. Release 17
- Valiente, Piccina, Iribarren, Romero Ale (2002).** Preconcentración y Determinación de Selenio por Espectrometría de Absorción Atómica en Muestras Biológicas. 4° Jornadas de Desarrollo e Innovación, CEPIQUE, INTI, Argentina.

EMULSIONES O/W PREPARADAS CON AISLADO DE SOJA Y CASEINATO DE SODIO. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA SOBRE LA ESTABILIDAD FRENTE AL ALMACENAMIENTO CONGELADO

PALAZOLO, Gonzalo G. ⁽¹⁾ y WAGNER, Jorge R. ^(2, *)

⁽¹⁾ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116 (1900) La Plata y ⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 180 (1876) Bernal, Buenos Aires, Argentina. (*) E-mail: jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la influencia de la concentración de muestra en la dispersión acuosa (0,5–2 %) sobre la estabilidad al almacenamiento congelado de las emulsiones o/w preparadas con aislados de soja nativos (AN), desnaturalizados térmicamente (AD) y caseinato de sodio (CS) como muestra control. Cuando las emulsiones AN y AD se congelaron y almacenaron a -80°C (24 h), se desestabilizaron marcadamente, con formación de agregados proteicos interfaciales y aceite separado. En presencia de crioprotectores (glucosa o sorbitol, 1-5%), las emulsiones CS fueron muy estables frente a la coalescencia y la floculación. En cambio, las preparadas con AN se desestabilizaron a bajas concentraciones de muestra (0,5%), debido al elevado grado de floculación y las AD, fueron menos estables a altas concentraciones (2 %), probablemente por la elevada hidrofobicidad superficial de las globulinas desnaturalizadas y la presencia de proteína no adsorbida en la fase acuosa.

Palabras Clave: concentración proteica, congelación, emulsión o/w, proteínas de soja

ABSTRACT

The influence of aqueous phase-sample concentration (0,5-2%) on the stability of o/w native isolate (AN), denatured isolate (AD) and sodium caseinate (CS) emulsions was studied. The AN and AD emulsions treated by freezing at -80°C (24 h), were very unstable against coalescence and oiling off, with interfacial protein aggregates formation. In the presence of cryoprotectors (glucose or sorbitol, 1-5 %), CS emulsions were stable against coalescence and flocculation. AN emulsions were stable only at low sample concentration (0,5 %) probably due to high bridging flocculation degree, whereas AD emulsions were destabilized at high sample concentration (2 %). In this latter case, aromatic surface hydrophobicity high values of denatured 7S and 11S globulins and the

presence of non-adsorbed protein in the aqueous phase would explain the low stability of AD emulsions during freezing and frozen storage.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son utilizadas como agentes emulsificantes no sólo por su capacidad de disminuir la tensión interfacial, sino también porque le imparten rigidez al film interfacial (McClements, 1999). Sin embargo, hay procesos como la congelación que puede afectar negativa e irreversiblemente las características del mismo. En primer lugar, la crioconcentración de los componentes solubles de la fase acuosa no congelada provocan un aumento brusco de fuerza iónica y variación del pH. Además la formación de hielo favorece la exclusión de moléculas de agua de las proteínas adsorbidas en la interfase, con la consiguiente deshidratación del film interfacial. Estos fenómenos, conjuntamente con la presencia de cristales de hielo, serían responsables de la desestabilización de las emulsiones por congelación (Thanasukarn y col., 2004). En este trabajo se evaluó el efecto de la concentración proteica sobre la estabilidad al almacenamiento congelado de emulsiones aceite en agua (o/w) preparadas con aislados de soja nativos y desnaturizados térmicamente. El caseinato de sodio, cuyas proteínas son adicionadas a muchos alimentos emulsionados sometidos a congelación (cremas, helados), se utilizó como muestra control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de aislado nativo (AN): Se preparó según el procedimiento experimental de Mitidieri y Wagner (2002). El contenido proteico de AN fue superior a 90 % (N×6,25).

Preparación de las dispersiones acuosas: Las dispersiones acuosas (0,5, 1 y 2 % p/v) de AN y CS se prepararon en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 (agitación magnética, 2 horas). Por tratamiento térmico (90°C, 5 min.) de las dispersiones acuosas de AN, se obtuvo la dispersión acuosa de AD. La desnaturalización térmica de las proteínas 7S y 11S constitutivas del aislado fue total (Sorgentini y Wagner, 1999).

Preparación de las emulsiones: Las emulsiones se prepararon por homogeneización de dispersiones acuosas y aceite de girasol (proporción 3:1) en dos etapas: I) Obtención de la pre-emulsión con el homogeneizador Ultraturrax (20000 r.p.m, 1 min.) y II) Pasaje de la pre-emulsión en un homogeneizador a válvula de alta presión (Stanted Fluid Power Ltd, Reino Unido). (40 y 4 MPa de presión, primera y segunda válvula, respectivamente; velocidad de flujo: 70 ml/min; tiempo de homogeneización: el suficiente para hacer circular la emulsión 3 veces por el dispositivo).

Congelación de las dispersiones acuosas y emulsiones: Las emulsiones (20 ml) se colocaron en frascos de PVC con tapa y se congelaron y almacenaron a -80°C durante 24 horas. La congelación se llevó a cabo sin y con glucosa o sorbitol como crioprotectores (1, 3 y 5 % en la fase acuosa). La descongelación se realizó en un baño de agua a 20°C .

Determinación del índice de coalescencia y el grado de floculación: La distribución en volumen de tamaño de partícula se determinó por light scattering (Malvern Mastersizer, Reino Unido). Las emulsiones fueron previamente diluidas 1:1 en el mismo buffer utilizado para preparar las dispersiones acuosas o en buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0 con 1 % SDS. El índice de coalescencia (IC) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{IC} = [(D_{43+\text{SDS}} - D_{43\text{in} + \text{SDS}})/D_{43\text{in} + \text{SDS}}] \times 100 \quad (\%)$$

donde $D_{43\text{in} + \text{SDS}}$ y $D_{43+\text{SDS}}$ son los diámetros promedio de partículas en presencia de 1 % SDS de las emulsiones iniciales y congeladas/descongeladas, respectivamente. Por otra parte, el grado de floculación (GF), se calculó como:

$$\text{GF} = [(D_{43} - D_{43 + \text{SDS}})/D_{43 + \text{SDS}}] \times 100 \quad (\%)$$

donde D_{43} es el diámetro promedio de partículas en ausencia de SDS. Este parámetro, a diferencia de IC, puede calcularse tanto para las emulsiones iniciales como para las emulsiones sometidas a congelación (Palazolo y col., 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 a-c se observan las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones AN, AD y CS iniciales (sin congelar). Independientemente de la concentración de muestra el orden creciente de tamaño de partícula fue: $\text{CS} < \text{AD} < \text{AN}$. Las emulsiones iniciales CS tuvieron un comportamiento diferente: el aumento de la concentración de muestra de 1 a 2 % no influyó significativamente sobre el tamaño de partícula. Las α y β -caseínas tienen una estructura laxa y desplegada y a pesar de formar parte de una estructura micelar, se adsorben con gran facilidad en la interfase agua-aceite (Tornberg y col., 1982). Esto determina que las emulsiones resultantes tengan grado de floculación nulo ($\text{GF} = 0$, Figura 2). En cambio, las proteínas constituyentes del AN (globulinas 7S y 11S) son oligoméricas y sus subunidades tienen estructura globular. Este factor favorece la formación de flóculos en las emulsiones resultantes, especialmente a bajas concentraciones de proteína (Figura 2). La desnaturalización térmica de las globulinas 7S y 11S produce la disociación de los oligómeros con un aumento concomitante de la tensioactividad (Palazolo y col., 2004), resultando las emulsiones AD con menor GF y tamaño de gota que las emulsiones AN (Figura 2).

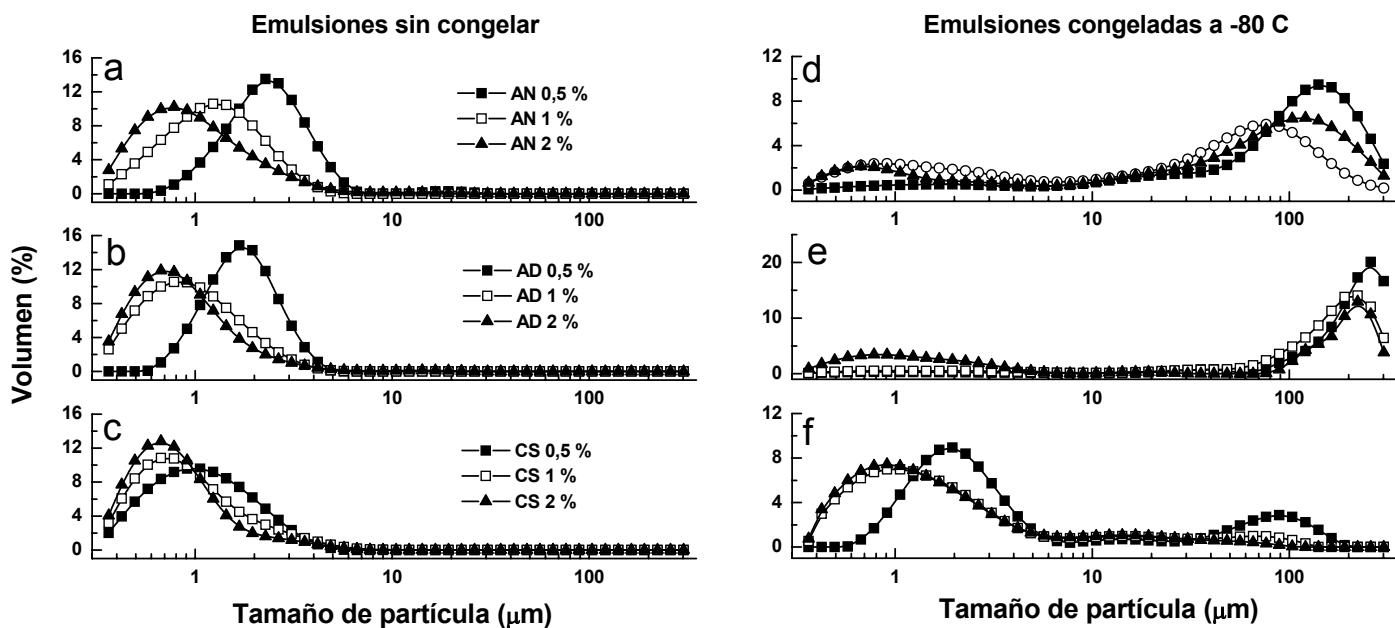


Figura 1: Distribuciones en volumen de tamaño de partícula de las emulsiones AN, AD, CS iniciales (a, b, c) y congeladas a -80°C sin crioprotector (d, e, f). Las distribuciones fueron determinadas en presencia de SDS 1 % y las concentraciones de muestra en las dispersiones acuosas fueron 0,5, 1 y 2 %.

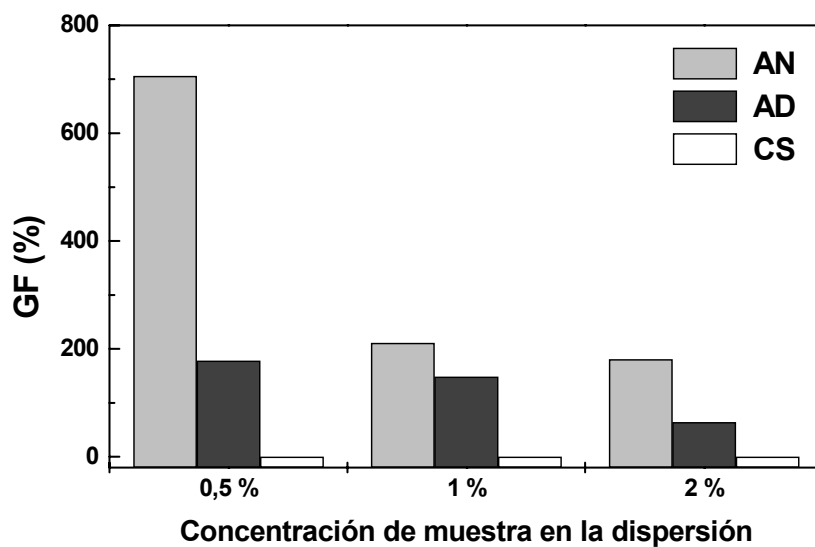


Figura 2: Efecto de la concentración de muestra sobre el grado de floculación (GF) de las emulsiones preparadas con AN, AD y CS sin tratamiento de congelación. Desviación estándar máxima: 5 %

Cuando las emulsiones se congelaron y almacenaron por 24 horas a -80°C , aquellas preparadas con proteínas de soja se desestabilizaron marcadamente (Figura 1 d, e), visualizándose la formación de agregados proteicos insolubles y una capa de aceite separado (oiling off) en la parte superior de la emulsión. La presencia de agregados

proteicos se atribuiría a la alta capacidad de agregación a bajas temperaturas de la globulina 11S (emulsiones AN) o al gran incremento de hidrofobicidad aromática superficial (3,5 veces) de las globulinas desnaturalizadas (emulsiones AD) (Mitidieri y Wagner, 2002). Para estas emulsiones el aumento de la concentración proteica no tuvo ningún efecto protector contra la congelación. Por otra parte, las emulsiones CS congeladas fueron mucho más estables que las preparadas con proteínas de aislados de soja y a diferencia de estas últimas, el incremento en la concentración de muestra estabilizó en mayor medida las emulsiones resultantes (Figura 1f). La hidrofobicidad aromática superficial de CS, a pesar de tener proteínas muy hidrofóbicas como las α y β -caseína, fue casi un 30 % menor que la de AD (Mitidieri y Wagner, 2002). Esto se atribuiría a la presencia de la κ -caseína, la cual está glicosilada. La adsorción de esta proteína en la interfase impediría la formación de agregados en la fase acuosa y en la superficie de las gotas de la emulsión durante la congelación y el almacenamiento congelado, debido a la repulsión electrostática y estérica.

Con la adición de crioprotectores (glucosa o sorbitol, 1-5 % en la fase acuosa) las emulsiones AN, AD y CS fueron mucho más estables frente a la congelación que las congeladas en ausencia de los mismos. Las distribuciones acumulativas en volumen mostradas en la Figura 3 dejan en evidencia claramente el efecto crioprotector ejercido por la glucosa y el sorbitol.

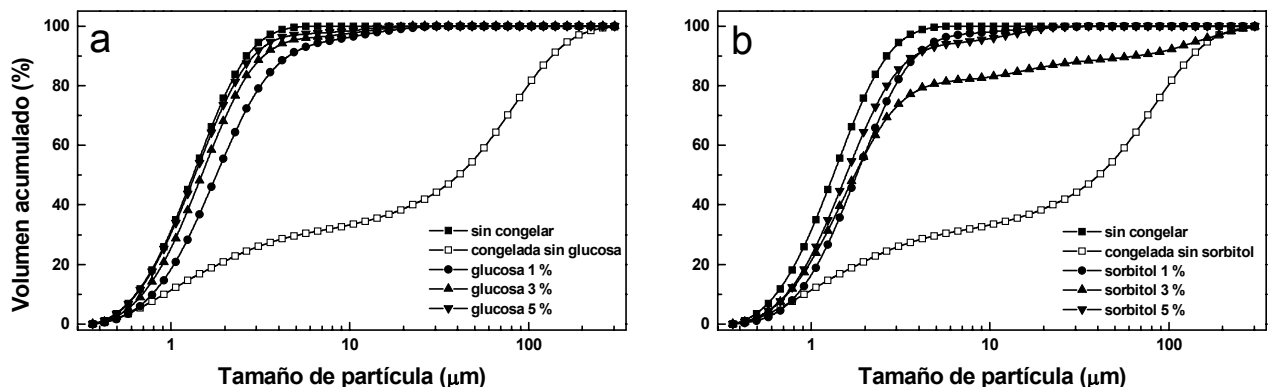


Figura 3: Distribuciones acumulativas de tamaño de partícula de la emulsión AN inicial y congelada a -80°C en ausencia y presencia de: a) glucosa (1, 3 y 5 %), b) sorbitol (1, 3 y 5 %). Concentración de AN en la dispersión: 1 %.

Por otro lado, en la Figura 4 se observa para las emulsiones AN y AD congeladas, la variación de IC y GF en función de la concentración de muestra y del tipo y concentración de crioprotector. No se incluye en esta figura las emulsiones CS congeladas, puesto que todas fueron muy estables (IC y GF \approx 0).

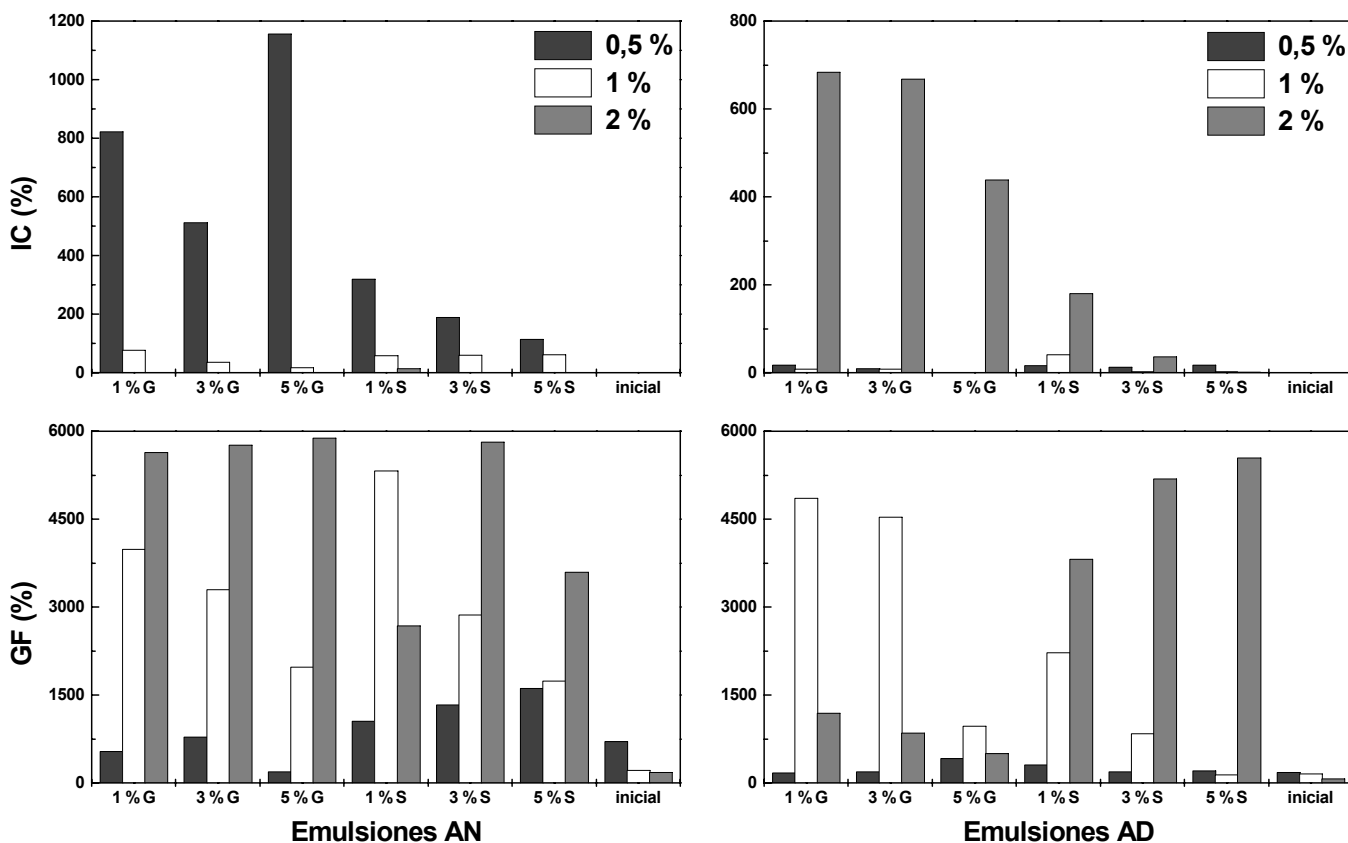


Figura 4: Variación del índice de coalescencia (IC) y el grado de floculación (GF) con la concentración de muestra para las emulsiones AN y AD congeladas a -80°C en presencia de glucosa (G) o sorbitol (S). A fines comparativos se incluye el GF de las emulsiones iniciales. Concentración de crioprotector: 1, 3 y 5 % en la fase acuosa.

A bajas concentraciones de muestra en la dispersión acuosa (0,5 %), las emulsiones AD fueron mucho más estables que las de AN, con GF similares a los de la emulsión inicial e IC cercanos a cero. En cambio para las preparadas con AN, los IC fueron muy elevados especialmente cuando se utilizó glucosa como crioprotector. Por otra parte, cuando la concentración de muestra se elevó a 1 %, la estabilidad de las emulsiones AN y AD frente a la coalescencia fue alta, tanto en presencia de glucosa como de sorbitol. Las emulsiones AD exhibieron valores de IC sólo levemente mayores a los de AN y los GF fueron en todos los casos mayores a los de la emulsiones iniciales. Por último, a la concentración más elevada de muestra ensayada (2 %), las emulsiones AN exhibieron valores de GF muy superiores al de la emulsión inicial. Los flóculos formados no coalescieron durante el almacenamiento congelado, por ende $\text{IC}=0$ en todas las emulsiones. La congelación en presencia de glucosa de las emulsiones AD preparadas con dispersiones 2 %, produjo una desestabilización marcada frente a la coalescencia y con la adición de sorbitol, los valores de IC fueron inferiores, aunque con un alto grado de

floculación. En este caso la influencia negativa de la alta hidrofobicidad superficial de las globulinas desnaturalizadas sobre la estabilidad de las emulsiones AD fue determinante y el efecto se ve reflejado sólo con las dispersiones más concentradas, probablemente debido a la mayor cantidad de proteína no adsorbida en la fase acuosa. El mejor efecto crioprotector del sorbitol a -80° C observado en las condiciones menos favorables (dispersión AN 0,5 % y dispersión AD 2 %) podría atribuirse a la menor tendencia a la cristalización e insolubilización de este compuesto respecto a la glucosa. Ésta última podría ser más eficiente a temperaturas de congelación más altas, donde hay mayor cantidad de moléculas de agua de hidratación disponibles.

CONCLUSIONES

Aunque el aumento de la concentración de muestra en la dispersión acuosa permite preparar emulsiones con menor tamaño de gota y grado de floculación, sólo las de aislado nativo fueron más estables. Las emulsiones preparadas con aislado desnaturalizado, debido a la elevada hidrofobicidad superficial de las globulinas 7S y 11S desnaturalizadas, el aumento de concentración tiene un efecto negativo en la estabilidad frente a la congelación. Por tal motivo, cuando se preparan emulsiones con dispersiones concentradas de aislados de soja, no es conveniente llevar a cabo una desnaturalización térmica total. Por otro lado, tratamientos alternativos como la desamidación y/o la proteólisis parcial o la inclusión de agentes no proteicos como los polifosfatos, podrían otorgar mayor densidad de carga a las gotas de las emulsiones e inhibir la formación de flóculos durante la congelación, tal como se observó con las emulsiones preparadas con caseinato de sodio.

AGRADECIMIENTOS

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2002 09-10768) y Refinerías de Maíz S.A.I.C.F (Pilar, Provincia de Buenos Aires). Jorge R. Wagner es investigador independiente del CONICET y Gonzalo G. Palazolo es becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

BIBLIOGRAFÍA

McClements, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, New York (1999).

Mitidieri, F.E. y Wagner, J.R. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and protein concentration. *Food Research International*. **35**, 547-557 (2002).

Palazolo, G.G.; Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of o/w emulsions. *Journal of American Oil and Chemists' Society*. **81**, 625-632 (2004).

Palazolo, G.G.; Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*. **19**, 595-604 (2005).

Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*. **23**, 489-507 (1999).

Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., and McClements, D.J. Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* **18**, 1033-1043 (2004).

Tornberg, E., Granfeldt, Y., and Hakanson, C. A comparison of interfacial behaviour of three food proteins adsorbed at air water and oil water interfaces. *Journal of Science and Food Agriculture*. **33**, 904-917 (1982).

ESTABILIDAD FRENTE A LA CONGELACIÓN DE EMULSIONES O/W PREPARADAS CON AISLADOS DE SOJA. EFECTO DE LA ADICION DE CRIOPROTECTORES

PALAZOLO, Gonzalo G. ⁽¹⁾ y WAGNER, Jorge R. ^(2,*)

⁽¹⁾ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116 (1900) La Plata y ⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 180 (1876) Bernal, Buenos Aires. Argentina (*) E-mail: jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se estudió la estabilidad frente a la congelación de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja nativo (AN) o desnaturalizado (AD). Las emulsiones AN sin congelar exhibieron un mayor grado de floculación (GF) y tamaño de partícula, respecto a las de AD. La congelación y almacenamiento se realizó a -20° o -80°C (24 hs) sin y con glucosa o sorbitol (1,3 y 5%). En ausencia de crioprotector, las emulsiones se desestabilizaron por coalescencia con formación de agregados proteicos interfaciales y separación de aceite. En presencia de crioprotector, independientemente de la temperatura de congelación, las emulsiones AD fueron las más estables y las emulsiones AN sólo exhibieron mayor estabilidad con glucosa 3 % o sorbitol 5 %. Por consiguiente, la presencia de proteínas desnaturalizadas de soja permitieron obtener emulsiones de menor GF y mayor estabilidad frente a la congelación, aunque es necesaria la adición de un crioprotector.

Palabras Clave: congelación, crioprotector, emulsión, proteínas de soja

ABSTRACT

In the present work, the global stability of emulsions prepared with native (AN) and denatured soybean isolates (AD) was studied. The droplet size and bridging flocculation degree (GF) for AN emulsion were greater than AD emulsion ones. Freezing treatment was carried out at -20° C and -80° C during 24 hours without or with glucose or sorbitol addition (1-5 %). In the absence of cryoprotector, the corresponding emulsions it were highly destabilized by oiling off and interfacial protein aggregates formation. When glucose o sorbitol was added to emulsions, those prepared with AD were very stable independently of freezing temperature whereas the AN emulsions reached a stability only at 3 % glucose or 5 % sorbitol. Therefore, the presence of denatured soy proteins improve the stability of

resulting emulsions against freezing although is always necessary the glucose o sorbitol addition.

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones aceite en agua (o/w) son sistemas heterogéneos de dos fases inmiscibles, una continua y otra dispersa en forma de pequeñas gotas. Aunque las emulsiones son termodinámicamente inestables y tienden a modificarse por distintos métodos de desestabilización (cremado, coalescencia, floculación), pueden hacerse cinéticamente estables por la adición de proteínas u otros agentes emulsificantes. Los productos proteicos de soja más refinados a escala industrial son los aislados y están constituidos por las globulinas de almacenamiento 7S y 11S. Trabajos previos (Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo y col, 2004), mostraron que los aislados nativos y en mayor grado los aislados modificados por tratamientos térmicos poseen excelentes propiedades superficiales. Por otra parte, la necesidad de conservar las emulsiones alimentarias para aumentar su vida útil hace indispensable conocer las alteraciones que puedan producirse por los métodos habituales de almacenamiento: refrigeración y congelación. En la actualidad existen muy pocos estudios sobre el efecto de la congelación sobre emulsiones preparadas con proteínas como únicos agentes emulsificantes. En este trabajo se evaluará el efecto del tipo y concentración de crioprotector sobre la estabilidad al almacenamiento congelado a distintas temperaturas, de emulsiones preparadas con aislados de soja nativos y desnaturalizados térmicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de aislados nativos (AN): Se prepararon según el procedimiento experimental de Mitidieri y Wagner (2002). El contenido proteico de AN fue superior a 90 % (N×6,25).

Preparación de las dispersiones acuosas: Las dispersiones acuosas (0,5 %) se prepararon en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 por agitación magnética durante 2 horas. Por tratamiento térmico (90° C, 5 min.) de las dispersiones acuosas de AN, se obtuvo la dispersión acuosa de AD. La desnaturalización por efecto del tratamiento térmico fue total (Sorgentini y Wagner, 1999). La solubilidad de las dispersiones se determinó de acuerdo al procedimiento experimental descrito en Mitidieri y Wagner (2002). *Preparación de las emulsiones:* Las emulsiones se prepararon por homogeneización de dispersiones acuosas y aceite de girasol (proporción 3:1) en dos etapas: I) Obtención de la pre-emulsión con el homogeneizador Ultraturrax (20000 rpm, 1 min.) y II) Pasaje de la pre-emulsión en un homogeneizador a válvula de alta presión (Stanted Fluid Power Ltd, Reino

Unido). La presión fue de 40 y 4 MPa en la primera y segunda válvula, respectivamente. De acuerdo a la velocidad de flujo (70 ml/min), el tiempo de homogeneización fue suficiente para hacer circular la emulsión 3 veces por el dispositivo.

Congelación de las dispersiones acuosas y emulsiones: Las emulsiones o dispersiones acuosas se colocaron en frascos de PVC con tapa (3 cm de sección transversal) y se congelaron y almacenaron a -20° y -80° C durante 24 horas. La congelación se llevó a cabo en ausencia y presencia de glucosa o sorbitol como crioprotectores (1, 3 y 5 % en la fase acuosa). La descongelación se llevó a cabo en un baño de agua a 20° C.

Determinación de tamaño de partícula: La distribución de tamaño de partícula se determinó por light scattering (Malvern Mastersizer, Malvern Instruments Reino Unido). Las emulsiones fueron previamente diluidas 1:1 en el mismo buffer utilizado para las dispersiones acuosas o en buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0 con 1 % SDS. El índice de coalescencia (IC) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$IC = [(D_{43+SDS} - D_{43in + SDS})/D_{43in + SDS}] \times 100 \quad (\%)$$

donde $D_{43in + SDS}$ y D_{43+SDS} son los diámetros promedio en presencia de 1 % SDS de las emulsiones iniciales y congeladas/descongeladas, respectivamente. Por otra parte, el grado de floculación (GF), se calculó como:

$$GF = [(D_{43} - D_{43 + SDS})/D_{43 + SDS}] \times 100 \quad (\%)$$

donde D_{43} es el diámetro promedio de la emulsión en ausencia de SDS. Este parámetro, a diferencia de IC, puede calcularse tanto para las emulsiones iniciales como para las emulsiones sometidas a congelación. *Determinación de aceite separado. Método de dilución del colorante:* Se determinó siguiendo el procedimiento experimental de Palanuwech y col. (2003). 8 g de emulsión se mezclaron por inversión suave con 2 g de una solución del colorante liposoluble Sudan III (0,001 % p/p en aceite de girasol) y la mezcla resultante se centrifugó a $1500 \times g$ durante 30 min. La fracción de aceite separado (ϕ_s) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\phi_s = [(M_O(A - 1)/M_E\phi)]$$

donde M_O es la masa de la solución del colorante, M_E es la masa de emulsión, ϕ es la fracción en masa del aceite en la emulsión y A es la relación de absorbancias (508 nm) de la solución del colorante antes y después del proceso de extracción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1a muestra la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones iniciales AN y AD. En ausencia de SDS, las distribuciones fueron de carácter bimodal; sin embargo, cuando la determinación se llevó a cabo en presencia del detergente las

emulsiones dieron distribuciones monomodales. Este resultado se atribuiría a la presencia de flóculos formados por el mecanismo de “bridging” en el cual una cadena polipeptídica puede adsorberse simultáneamente sobre dos o más gotas, manteniéndolas firmemente unidas. Dado que la adsorción no es un mecanismo mediado por difusión, la proteína se ve forzada a ingresar a la interfase durante el corto tiempo de homogeneización y no llega a desplegarse totalmente, especialmente si se trata de una proteína globular. Este hecho sumado a la insuficiente cantidad de proteína para cubrir el área creada, favorece la formación de flóculos. Las proteínas de AN son globulares y oligoméricas y cuando se desnaturalizan térmicamente, los oligómeros se disocian y adoptan una estructura más laxa y desplegada, con un aumento de la tensioactividad y la hidrofobicidad superficial (Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo y col., 2004). Esto explicaría el hecho de que las emulsiones AN iniciales tienen un mayor GF y tamaño de partícula respecto a las preparadas con AD (Figura 1b).

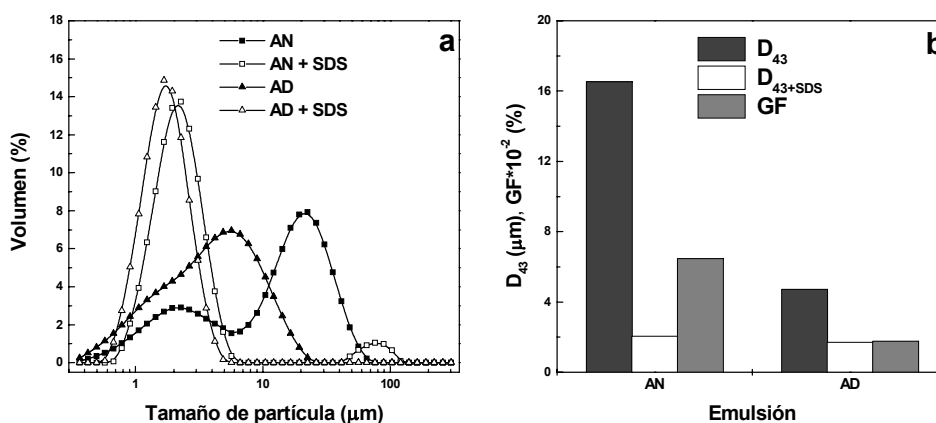


Figura 1: Emulsiones AN y AD iniciales: a) Distribución de tamaño de gota en presencia y en ausencia de SDS y b) Diámetros promedio D_{43} , D_{43+SDS} y grado de floculación (GF). Desviación estándar máxima: 1 % para los diámetros promedio y 5 % para GF.

Cuando las emulsiones AN y AD se congelaron a -20° y -80° C sin adición de crioprotectores, se desestabilizaron marcadamente observándose la formación de agregados proteicos interfaciales y una capa de aceite libre en la parte superior de la emulsión. Los valores de IC fueron muy elevados y el porcentaje de aceite separado fue superior a 30 % (Tabla 1). Una de las proteínas constituyentes de AN, la globulina 11S, tiene una alta capacidad de agregación a bajas temperaturas. La pérdida de solubilidad después de congelar la dispersión acuosa de AN fue de 20%, mientras que la solubilidad de las dispersiones AD fue la misma antes y después de la descongelación (Figura 2). De acuerdo a este resultado, es muy probable que la globulina 11S también tenga capacidad de formar agregados en la interfase, los cuales afectarían negativamente la reología del

film interfacial y promoverían su ruptura durante la congelación. Aunque en la dispersión acuosa las proteínas de AD no pierden solubilidad por el efecto de la congelación, el hecho de que se observen agregados interfaciales y por ende, una baja estabilidad de las emulsiones podría atribuirse a la alta hidrofobicidad superficial de estas proteínas. La presencia de estos agregados interfaciales contribuirían al marcado aumento de tamaño de partícula de las emulsiones sometidas a congelación.

Tabla 1: Efecto de la congelación a -20°C y -80°C sobre el índice de coalescencia (IC) y la fracción de aceite separado (ϕ_s) de las emulsiones AN y AD. Desviación estándar máxima: 5 % para IC y 10 % para ϕ_s

Emulsión	Tratamiento	IC (%)	GF (%)	ϕ_s (%)
AN	sin tratamiento	-	706.34	-
	congelación -20°C	3651.7	93.3	32.1
	congelación -80°C	5135.6	50.8	36.3
AD	sin tratamiento	-	178,2	-
	congelación -20°C	10484.1	13.12	38.4
	congelación -80°C	8072.35	47.51	34.7

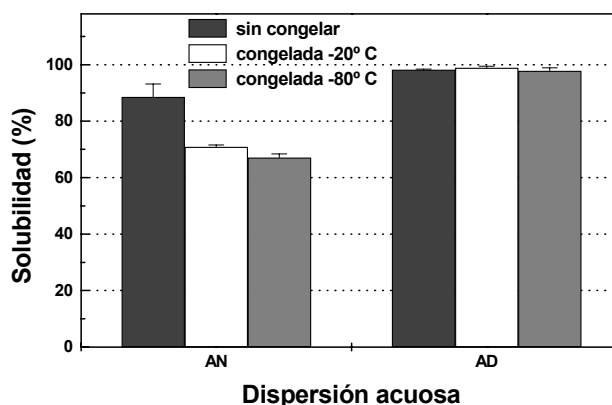


Figura 2: Solubilidad de las dispersiones acuosas de AN y AD (0,5 % muestra/ml de buffer fosfato 10 mM pH 7,0) sin congelar y congeladas a -20°C y -80°C

Por otra parte, se estudió la estabilidad de las emulsiones frente a la congelación y el almacenamiento a -20°C y -80°C en presencia de crioprotectores (glucosa o sorbitol, 1-5 % en la fase acuosa). En la Figura 3 se observan los parámetros de desestabilización IC y GF de las emulsiones AN y AD congeladas y almacenadas a -20°C y -80°C

En todas las emulsiones congeladas en presencia de glucosa y sorbitol, los valores de IC fueron muy inferiores a los de las emulsiones congeladas en ausencia de crioprotector y la fracción de aceite separado fue despreciable. Independientemente de la temperatura de congelación, las emulsiones AN mostraron valores mínimos de IC a 3 % de glucosa y 5 % sorbitol. En general, el sorbitol tuvo un efecto crioprotector más eficiente que la glucosa en todo el rango de concentración, dado que el valor mínimo de IC alcanzado con la adición

de 3 % de glucosa fue superior al parámetro obtenido para las tres concentraciones de sorbitol. Las emulsiones congeladas en presencia de glucosa dieron GF menores al de la emulsión inicial, indicando que parte de los flóculos de la misma coalescieron durante el proceso de congelación. En cambio, en presencia de sorbitol, se observó un incremento del GF de las emulsiones resultado acorde con la formación de nuevos flóculos estables a la congelación. Por otra parte, las emulsiones AD exhibieron una alta estabilidad y no se observaron diferencias en función del tipo y concentración de crioprotector. Como se observa en la Figura 3 los valores de IC fueron muy bajos y los GF fueron similares al de la emulsión inicial. Si se tiene en cuenta el efecto de la temperatura de congelación, las emulsiones AN congeladas a -80°C fueron menos estables que las tratadas a -20°C , probablemente debido a la formación de una mayor cantidad de hielo. En las emulsiones AD, la tendencia fue similar aunque menos pronunciada respecto a las emulsiones preparadas con AN.

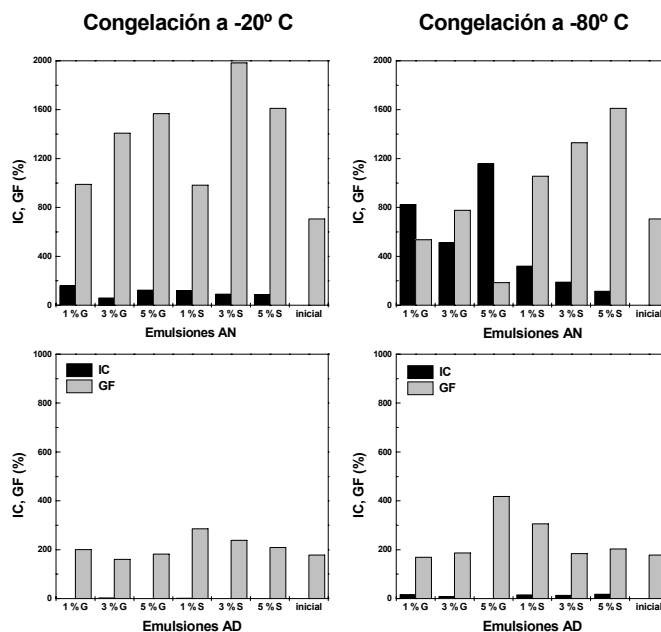


Figura 3

Figura 3: Índice de coalescencia (IC) y grado de floculación (GF) para las emulsiones AN y AD congeladas a -20 y -80°C en ausencia y presencia de glucosa (G) o sorbitol (S). Concentración de crioprotector: 1, 3 y 5 % en la fase acuosa. Desviación estándar máxima: 5 %.

CONCLUSIONES

La formulación de emulsiones con proteínas de soja desnaturalizadas permite obtener emulsiones de menor tamaño de gota y menor grado de floculación en comparación con preparadas con las proteínas nativas. Este resultado se atribuye a la disociación de las

globulinas 7S y 11S, con un aumento concomitante en la tensioactividad y en la hidrofobicidad superficial. Aunque la desnaturalización térmica de las proteínas no le otorga a las emulsiones resultantes ningún efecto protector durante la congelación, la adición de crioprotectores permite obtener emulsiones muy estables con un GF y tamaño de gota similar a las no congeladas. El aumento de la estabilidad podría atribuirse al menor grado de floculación de las emulsiones preparadas con las proteínas desnaturalizadas y a la capacidad de la glucosa y el sorbitol para contrarrestar la tendencia de las mismas a formar agregados interfaciales. Para las proteínas nativas, en cambio los crioprotectores parecen tener un comportamiento diferente. Mientras el sorbitol parece actuar más eficientemente, la glucosa protege sólo en parte y no puede evitar coalescencia. La estrategia para aumentar la estabilidad de las emulsiones preparadas con proteínas nativas de aislado, siempre con la adición de un crioprotector sería el aumento de la concentración proteica y la adición de otros componentes no proteicos que permitan disminuir el grado de floculación, la cual será estudiada en trabajos futuros.

AGRADECIMIENTOS

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2002 09-10768) y Refinerías de Maíz S.A.I.C.F (Pilar, Prov. de Buenos Aires). Jorge R. Wagner es Investigador Independiente del CONICET y Gonzalo G. Palazolo es Becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

BIBLIOGRAFIA

Mitidieri, F.E. y Wagner, J.R. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and protein concentration. *Food Research International*. **35**, 547-557 (2002)

Palanuwech, J., Poniteni, R., Roberts, R.F. y Coupland, J.N. A method to determine free fat in emulsions. *Food Hydrocolloids*. **17**, 55-62 (2003).

Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. y Wagner, J.R. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins: creaming stability of o/w emulsions. *Journal of American Oil of Chemist's Society*. **81**, 625-632 (2004).

Sorgentini, D.A. y Wagner, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*. **23**, 489-507 (1999).

ESTABILIDAD DE EMULSIONES AGUA EN ACEITE (W/O) Y DOBLES (W/O/W) PREPARADAS CON SPANS

MÁRQUEZ, Andrés L.⁽¹⁾, PALAZOLO, Gonzalo G.⁽¹⁾ y WAGNER, Jorge R.^(2,*)

⁽¹⁾ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116 (1900) La Plata y ⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 180 (1876) Bernal. (*) jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo fue estudiar la microestructura y estabilidad de emulsiones modelo preparadas con agua destilada, aceite de girasol refinado y diferentes Spans (20, 40, 60 y 80) como emulsionantes. Se estudiaron los efectos de la concentración de agua (10-70% p/p; con concentración fija de Spans, 1% p/p) y de la concentración de Span 60 (0.5-3% p/p). Se obtuvieron emulsiones w/o con los menores porcentajes de agua (10 ó 20%) y w/o/w con porcentajes mayores. Todas las del tipo w/o sufrieron procesos de coalescencia y sedimentación, mientras que en aquellas w/o/w inestables predominó el cremado. En estas últimas la estabilidad disminuyó a mayor contenido de agua y se incrementó con la concentración de Span, observándose el mismo efecto en sus consistencias: fueron desde líquidas inestables hasta cremas estables. El tamaño de las gotas de aceite de las w/o/w disminuyó con el aumento de Span y también fue afectado por el contenido acuoso.

Palabras clave: Spans; emulsiones w/o; emulsiones w/o/w; cremado; coalescencia; sedimentación.

ABSTRACT

The objective was to study the microstructure and stability of model emulsions prepared with distilled water, refined sunflower oil and different Spans (20, 40, 60 and 80) as emulsifiers. The effects of water concentration (10-70% w/w; at one Spans concentration, 1% w/w) and Span 60 concentration (0.5-3% w/w) were studied. Emulsions with the lower proportions of water (10 or 20%) were w/o and with a major water concentration were w/o/w. All the w/o emulsions were destabilized by coalescence and sedimentation processes, while creaming was observed in those w/o/w emulsions that were unstable. In the last ones, the stability decreased with more water content and increased with more Span concentration; the same effect was observed in their consistencies: they were from

unstable liquids to stable creams. The oil droplet size of w/o/w emulsions decreased with the increment of Span and was also affected by the water content.

Key words: Spans; w/o emulsions; w/o/w emulsions; creaming; coalescence; sedimentation.

INTRODUCCIÓN

Los "Spans" son emulsionantes no proteicos ampliamente utilizados en la preparación de emulsiones del tipo agua en aceite (w/o) y agua en aceite en agua o dobles (w/o/w) por su mayor carácter hidrofóbico que hidrofílico (bajos HLB). La estabilidad de las emulsiones preparadas con diferentes Spans ha sido estudiada anteriormente (Opawale y col., 1998), pero no con un método relativamente objetivo, como puede ser el uso de un equipo QuickScan. El objetivo de este trabajo fue obtener emulsiones modelo w/o y w/o/w y estudiar características tales como su estabilidad y distribución de tamaños de gota. Éste sería un paso previo a un estudio posterior, que se vinculará con la aplicación de estas emulsiones en la formulación de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Aceite de girasol refinado (Molinos Río de la Plata S.A., Avellaneda, Argentina); agua destilada; Span 20 (monolaurato de sorbitan, Fluka Chemika, HLB = 8.6, líquido a temp. amb.); Span 40 (monopalmitato de sorbitan, Sigma, HLB = 6.7, temp. de fusión = 48°C por DSC); Span 60 (monoestearato de sorbitan, Sigma, HLB = 4.7, temp. de fusión = 54°C por DSC); y Span 80 (monooleato de sorbitan, Fluka Chemika, HLB = 4.3, líquido a temp. amb.).

Preparación de las emulsiones: Se mezcló el Span correspondiente con aceite en proporciones en peso; para lograr homogeneización de la mezcla, se fundió a 60°C en los casos de los Spans sólidos (40 y 60), mientras que con los líquidos (20 y 80) un leve mezclado manual a temperatura ambiente fue suficiente. Se agregó agua destilada en proporciones en peso (peso total de la muestra: 50 gr.) y se homogeneizó mediante el uso de un equipo Ultraturrax (24000 rpm, 2 min); en los casos en los que hubo calentamiento previo, la homogeneización se llevó a cabo en caliente (60°C). Con Span 60 se varió la concentración de agua (de 10 a 70% p/p) y del emulsionante (0.5 a 3% p/p). Con los otros Spans sólo se varió la concentración de agua (10 a 70% p/p) manteniendo fija la concentración del emulsionante (1% p/p).

Estudios de estabilidad global de las emulsiones: *La estabilidad global de diferentes emulsiones se determinó por medidas de dispersión de luz en un analizador óptico vertical*

QuickScan (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Este equipo permite hacer un barrido de la emulsión a lo largo del tubo de medida en diferentes instantes, obteniéndose una serie de perfiles del porcentaje de backscattering (%BS) y transmisión en función del tiempo (Pan y col., 2002). A partir de los perfiles correspondientes, se obtuvieron los valores promedio de %BS en la zona 6.5-10 mm (%BS_{6.5-10}); dicha zona corresponde a la parte inferior del tubo que contiene la muestra. Para estudiar la estabilidad de las emulsiones frente al cremado se definió la constante $K_{0.1}$ como $(BS_{in\ 6.5-10} * t_{0.1})^{-1}$, en donde $t_{0.1}$ es el tiempo en el cual el %BS_{6.5-10} disminuye el 10% de su valor inicial (%BS_{in 6.5-10}).

Microscopía óptica: Las micrografías se obtuvieron con un microscopio Leica DMLB. Para determinar si la fase continua correspondía a agua o aceite, se tiñó las muestras con colorante rojo Ponceau 4R, el cual le otorga un color rojizo a dicha fase si ésta es acuosa.

Distribución del tamaño de gotas: La distribución del tamaño de gotas de aceite de las emulsiones w/o/w se realizó utilizando un analizador de partículas (Malvern Mastersizer 2S, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El diámetro promedio de Sauter (d_{32}), que es una medida del área creada durante el proceso de homogeneización (Walstra, 1983), se obtuvo a partir de la distribución en volumen, definiéndose como:

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{\sum_{i=1}^n \frac{V_i}{d_i}}$$

donde V_i es el volumen de aceite contenido en partículas de diámetro d_i . Las medidas se llevaron a cabo al menos por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por microscopía se observó que con Spans 40 y 60 (emulsionantes sólidos a temperatura ambiente) las emulsiones con 10-20% de agua fueron del tipo w/o, habiendo inversión de fases entre las concentraciones de 20 y 30% de agua y obteniéndose así emulsiones w/o/w a partir de dicho punto (el punto de inversión se mantuvo en este rango al variar la concentración de Span 60 de 0.5 a 3%). El mismo efecto fue observado con los Spans 20 y 80 (emulsionantes líquidos a temperatura ambiente) con la diferencia de que la inversión de fases se produjo entre 10 y 20% de agua. La Figura 1 muestra como ejemplo micrografías de una emulsión w/o (a) y una w/o/w (b).

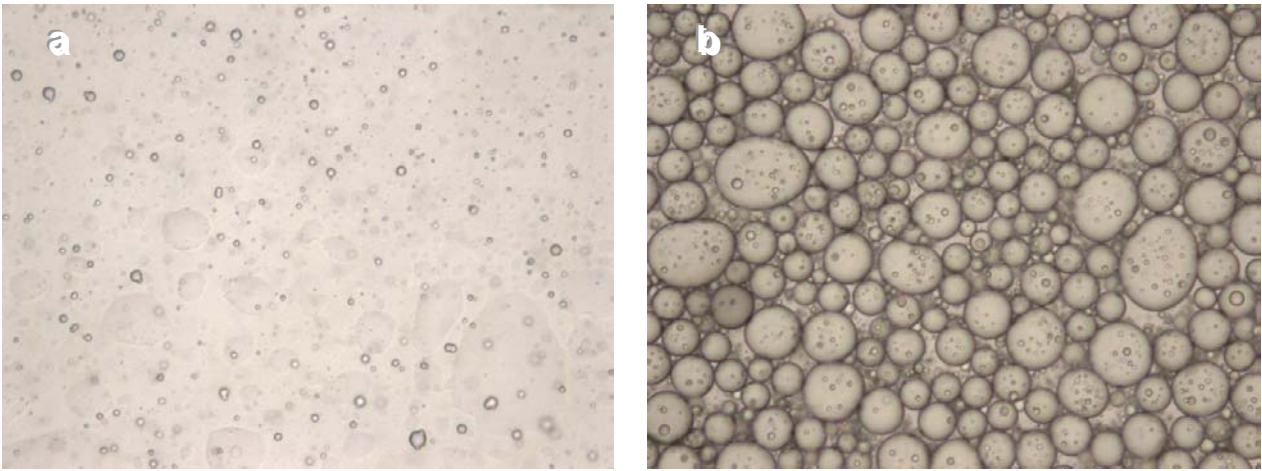


Figura 1: Micrografías (20x) de emulsiones: **a)** Span 40 (1%) con 20% de agua (w/o); **b)** Span 60 (1%) con 40% de agua (w/o/w).

El estudio de estabilidad de las emulsiones mostró que las tipo w/o sufrieron procesos de coalescencia y sedimentación (Figuras 2a-d).

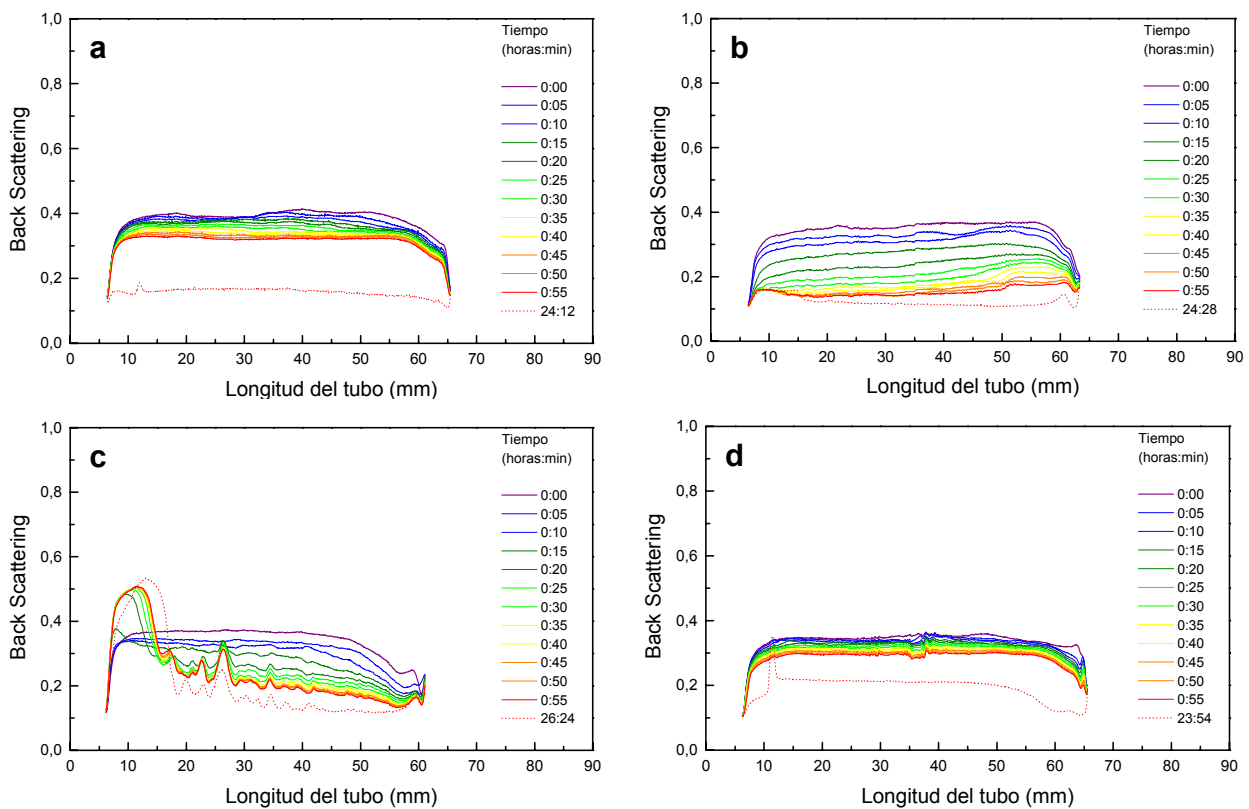


Figura 2: Perfiles de porcentaje de backscattering (%BS) en función de la altura del tubo para emulsiones w/o: **a)** Span 20 (1%) con 10% de agua; **b)** Span 40 (1%) con 20% de agua; **c)** Span 60 (1%) con 20% de agua; **d)** Span 80 (1%) con 10% de agua.

La coalescencia de las gotas de agua es confirmada por la disminución de los %BS a lo largo del tubo. Un examen visual de las muestras indicó que luego de 24 horas también hubo sedimentación de gotas de agua debido a que se observó una fase continua

diferente (acuosa) en el fondo del tubo (confirmado por teñido con rojo Ponceau). El hecho de que en estos casos se observaron perfiles de transmisión prácticamente nulos tras 24 horas (datos no mostrados), indicaría la presencia de partículas capaces de dispersar la luz en esa fase acuosa; por microscopía se confirmó que se tratan de gotas de aceite. La estabilidad de tales gotas de aceite estaría dada por el HLB de los Spans; con los Spans 60 y 80 (Figuras 2c y 2d), más hidrófobos, se observó un aumento del %BS en o cerca del fondo, indicando acumulación de partículas, mientras que con los Spans 20 y 40 (Figuras 2a y 2b) la disminución del %BS a lo largo de todo el tubo indicaría coalescencia de estas gotas de aceite así como de las gotas de agua de la parte superior. En un análisis microscópico previo a la desestabilización se pudo observar la existencia de “lagunas” de agua con gotas de aceite, rodeadas por la fase lipídica continua. El descenso de tales lagunas por separación gravitacional, arrastrando consigo a las gotas de aceite, explicaría los resultados observados.

Con respecto a las emulsiones w/o/w, en todos los casos en los que hubo desestabilización el proceso predominante fue el cremado. Esto pudo observarse en los perfiles de %BS, los cuales se corren desde el fondo hacia arriba en el tubo; en la Figura 3 se muestran ejemplos de una emulsión w/o/w inestable (a) y una estable (b).

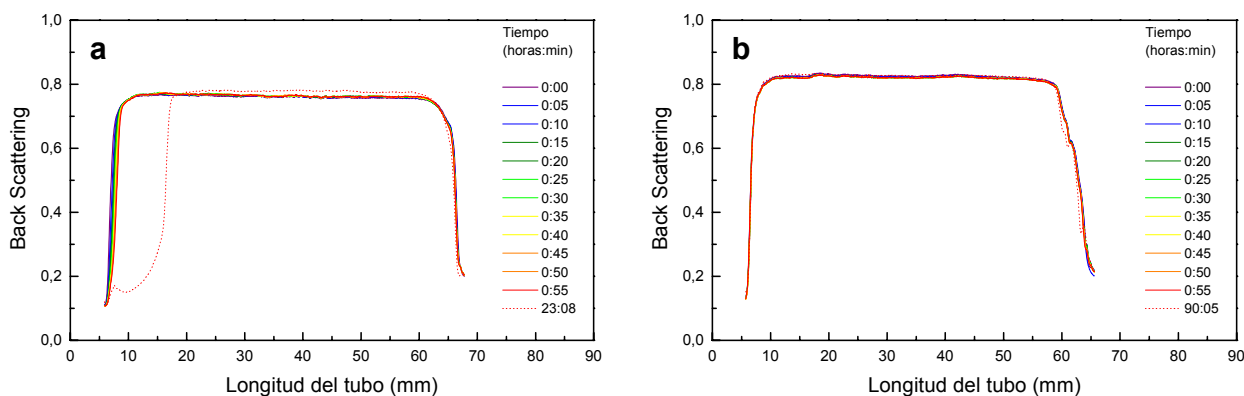


Figura 3: Perfiles de porcentaje de backscattering (%BS) en función de la altura del tubo para emulsiones w/o/w: **a)** Span 60 (0.5%) con 50% de agua (inestable); **b)** Span 60 (2%) con 50% de agua (estable).

Con todos los Spans se observó que a menor contenido acuoso hubo un aumento en la consistencia de las muestras, adjudicada al mayor empaquetamiento de las gotas de aceite (con pequeñas gotas de agua dentro de ellas; observado por microscopía). Sin embargo, esto ocurrió en mayor medida con los Spans 40 y 60; el hecho de que éstos sean sólidos a temperatura ambiente favorecería el marcado aumento de viscosidad de

las muestras por solidificación de la interfase. Un aumento en la concentración de Span 60 también favoreció en gran medida un aumento en la consistencia de estas emulsiones. Posteriormente se estudió el efecto de la concentración de Span 60 y de agua sobre la estabilidad de las emulsiones w/o/w, expresada como la constante de cremado $K_{0.1}$ (Figura 4a). Como era esperable, se observó que la estabilidad aumenta ($K_{0.1}$ disminuye) con el aumento de emulsionante; a partir de una concentración de 2% de Span 60, el valor de $K_{0.1}$ fue nulo en el rango de concentración de agua estudiado, manteniéndose estas muestras totalmente estables por al menos 4 días. Con respecto a la influencia de la concentración de agua (a relativamente bajas concentraciones de Span), un aumento de la misma provocó una disminución de la estabilidad (aumento de $K_{0.1}$) debido probablemente a una mayor movilidad de las gotas de aceite (lo cual favorece su desplazamiento hacia la parte superior del tubo) dada por un aumento de cantidad de fase acuosa continua.

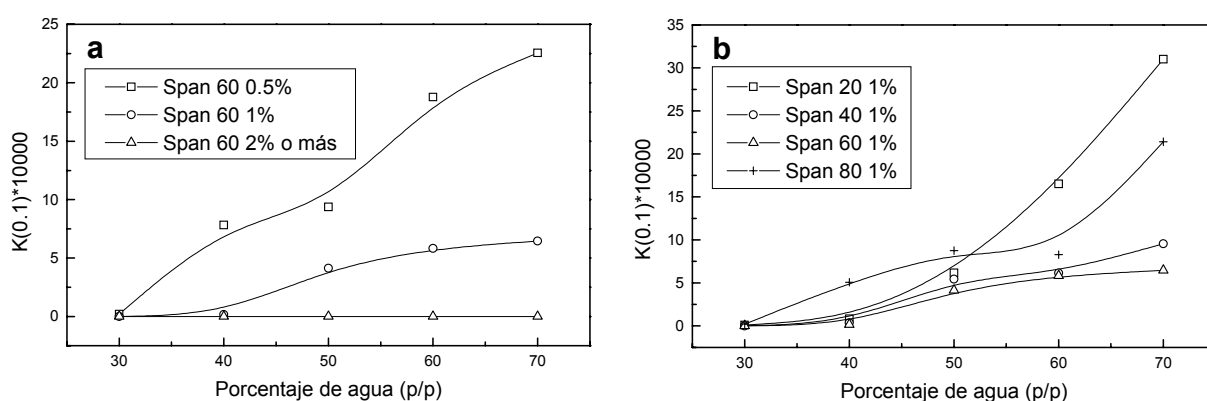


Figura 4: a) Efecto de las concentraciones de agua y de Span 60 sobre el valor de la constante de cremado ($K_{0.1}$) para emulsiones w/o/w; b) Efecto de la concentración de agua y tipo de Span sobre $K_{0.1}$ para emulsiones w/o/w.

El estudio del efecto del tipo de Span (Figura 4b) indicó que con una concentración de 30% de agua la estabilidad fue muy alta en todos los casos. A mayores porcentajes de agua, las emulsiones preparadas con Span 60 fueron las más estables debido a los valores más bajos de $K_{0.1}$; con Span 40 fueron levemente menos estables, mientras que con los Spans 20 y 80 se observó mayor inestabilidad. Estos resultados están vinculados directamente a la viscosidad de las muestras: una mayor consistencia otorgó una mayor estabilidad, por verse restringida la movilidad de las gotas de aceite. Además de la consistencia, un factor secundario sería el HLB del emulsionante, dado que con Span 60 (HLB = 4.7) hubo mayor estabilidad que con Span 40 (HLB = 6.7), especialmente a 70% de agua, al mismo tiempo que con Span 80 (HLB = 4.3) se obtuvieron muestras más

estables que con Span 20 (HLB = 8.6) a 60 y 70% de agua. Por lo tanto, un HLB menor favorecería la estabilidad a altas concentraciones de agua.

Finalmente se analizó la distribución y variación del tamaño de las gotas de aceite en las emulsiones w/o/w. En todos los casos se observó una distribución de carácter bimodal (dato no mostrado). Los valores obtenidos fueron relativamente bajos especialmente teniendo en cuenta el método de homogeneización empleado. Un aumento en el contenido de Span 60 produjo una disminución considerable del diámetro medio de gota (d_{32}) debido a la posibilidad de formar más área interfacial (Figura 5a). Con respecto al efecto del contenido acuoso (Figura 5b) se observó un leve aumento del tamaño de partículas con el incremento de agua en el rango 30-50% de agua, probablemente debido a que un mayor empaquetamiento restringe la movilidad y coalescencia de las gotas durante la homogeneización. En cambio, en el rango 50-90% de agua se notó una marcada disminución del tamaño de gotas; dado que a partir de 50% de agua las partículas alcanzarían un grado de libertad que no cambiaría mucho con el incremento de agua, aquí el factor predominante sería que un menor contenido de aceite favorece un menor tamaño de partícula, como ha sido determinado anteriormente en emulsiones o/w (Márquez y col., 2005). En cuanto a la influencia del tipo de Span utilizado, se observó un muy leve aumento del d_{32} con la disminución del HLB del emulsionante: Span 20, $6,03 \mu\text{m}$ < Span 40, $6,45 \mu\text{m}$ < Span 60, $6,68 \mu\text{m}$ \approx Span 80, $6,69 \mu\text{m}$ (valores correspondientes a a 1% de Span con 50% de agua). Estos últimos resultados indicarían que una mayor afinidad del emulsionante a la fase acuosa continua favorecen la formación de partículas de menor tamaño; sin embargo, esto no está directamente relacionado con la estabilidad de las muestras, demostrando el mayor efecto de la consistencia.

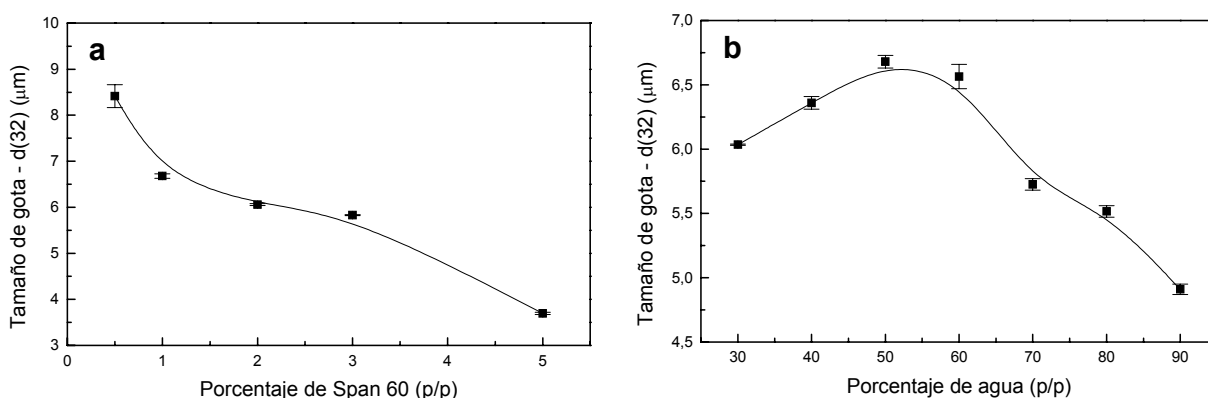


Figura 5: a) Efecto de la concentración de Span 60 sobre el tamaño de gota (d_{32}) de emulsiones w/o/w con 50% de agua; b) Efecto de la concentración de agua sobre el d_{32} de emulsiones w/o/w preparadas con Span 60 (1%).

CONCLUSIONES

Los procesos de desestabilización predominantes en emulsiones w/o preparadas con Spans son la coalescencia y la sedimentación, mientras que en las w/o/w se observa cremado. La estabilidad de las w/o/w depende mayormente de la consistencia de las muestras, la cual aumenta con el aumento de Span y con la disminución del contenido de agua; los Spans sólidos también otorgan mayor consistencia y estabilidad. Los tamaños de gotas de estas últimas emulsiones son menores con un mayor contenido de Span, mientras que la concentración de agua también influye en los mismos pero en menor medida. Un mayor HLB del emulsionante produce tamaños de partícula un poco menores a pesar de que también tiende a hacer que las emulsiones w/o/w sean menos estables a altas concentraciones de agua. Emulsiones de estos tipos podrían ser aplicadas en alimentos tales como cremas y mayonesas, permitiendo, por ejemplo, el aislamiento de sustancias incompatibles con componentes de la fase acuosa continua por su inclusión en la fase acuosa interna.

BIBLIOGRAFÍA

Márquez A.L., Palazolo G.G. y Wagner J.R. (2005). Emulsiones tipo crema preparadas con leche de soja 1: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites*, **56(1)**, 59-66.

Opawale F.O. y Burgess D.J. (1998). Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **197**, 142-150.

Pan L.G., Tomás M.C. y Añon M.C. (2002). Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*, **5**, 135-143.

Walstra P. (1983). Formation of emulsion. En *Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory*, p. 57-127. Becher P. (Editor). Marcel Dekker Inc., New York.

REACCION DE MAILLARD: EFECTO COMBINADO DE AZÚCARES DE DISTINTA REACTIVIDAD

NARANJO, Gabriela B., PEREYRA GONZALES, Adriana S., VIGO, María S., MALEC, Laura S.*

Departamento de Química Orgánica, Area Bromatología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pabellón 2. Ciudad Universitaria. 1428 – Bs. As. Argentina. TEL/FAX 54 11 4576 3346. E-mail: malec@qo.fecn.uba.ar

RESUMEN

Se estudió la variación de la velocidad de reacción de Maillard en un sistema caseína-azúcar cuando se incorpora otro azúcar de diferente reactividad. Para ello se analizó la cinética de pérdida de disponibilidad de lisina y de disminución de azúcares en dos sistemas modelo con caseína y glucosa o lactosa y en un tercero conteniendo ambos azúcares.

Al reemplazar parte de la glucosa por lactosa, se observó una marcada disminución de la velocidad de reacción respecto del sistema que contenía sólo glucosa, a pesar de que este azúcar, más reactivo, sigue estando en exceso respecto de lisina. Esto puede atribuirse a que la temperatura de transición vítrea (T_g) de lactosa es mucho mayor que la de glucosa. Por lo tanto, al agregar lactosa, el valor de $T-T_g$ resulta menor que el del sistema que contiene sólo glucosa, disminuyendo la movilidad de los reactantes y, por lo tanto, sus velocidades de reacción.

ABSTRACT

The variation of the Maillard reaction rate in a casein-sugar system when this sugar was partially replaced by other of different reactivity was studied. Kinetics of available lysine loss and sugar decrease in two model systems with casein and glucose or lactose and other containing both sugars were analyzed. In this last system, when glucose was partially replaced by lactose, the reaction rate notably decreased, in spite of glucose was still in excess. This can be attributed to the higher glass transition temperature (T_g) of lactose than glucose. When lactose was added, $T-T_g$ resulted much lower than that of the system containing only glucose, decreasing the mobility of reactants.

Palabras clave: Maillard, lisina disponible, azúcares.

INTRODUCCION

La reacción de Maillard es una de las más frecuentes en alimentos. Esta reacción se produce por condensación de grupos carbonilo libres, generalmente provistos por azúcares reductores, y grupos amino de aminoácidos o proteínas.

La velocidad de la reacción de Maillard depende de diversos factores, entre ellos, la naturaleza del azúcar (Mauron, 1981; Labuza y Baisier, 1992). En algunos trabajos en que se comparó la reactividad de diversos azúcares se ha observado que los monosacáridos son más reactivos que los disacáridos (Mauron, 1981; Baxter, 1995; Naranjo et al., 1998). Actualmente existe una gran variedad de alimentos que contienen más de un azúcar. Particularmente entre los productos lácteos, varios contienen glucosa además de lactosa, azúcares de muy diferente reactividad. En la literatura disponible no se han hallado estudios que evalúen si la presencia de un segundo azúcar influye en la velocidad de reacción del primero.

El objetivo de este trabajo fue estudiar cómo se modifica la velocidad de la reacción de Maillard en un sistema caseína-azúcar, en condiciones moderadas de temperatura y baja a_w , cuando se incorpora otro azúcar de diferente reactividad.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de muestras

Se prepararon 2 sistemas modelo, caseína-glucosa y caseína-lactosa, con relación molar inicial azúcar:lisina de 3:1, y un tercer sistema caseína-glucosa-lactosa, con relación molar lisina-/glucosa-/lactosa 1:1,5:1,5. Las mezclas fueron equilibradas a a_w 0,33 con solución saturada de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (p.a.) y posteriormente almacenadas en frascos de vidrio con cierre hermético a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Se retiraron muestras a intervalos regulares de tiempo y se colocaron a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

Métodos Analíticos

La actividad de agua de los sistemas fue determinada utilizando un higrómetro Vaisala Humicap HMI 31 (Vaisala OY, Helsinki, Finlandia) equipado con un sensor HMP 35 (Troller y Scott, 1992).

El contenido de nitrógeno se determinó por duplicado por el método de Kjeldahl.

Para la valoración de lisina disponible se utilizó el método espectrofotométrico con o-ftaldialdehído y N-acetil-L-cisteína (Medina Hernández y García Alvarez-Coque, 1992). Las muestras fueron disueltas en solución de SDS 2% y la absorbancia fue medida por triplicado a 335 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 (USA).

El contenido de azúcares se determinó por cromatografía gas-líquido de los trimetilsilil derivados de la fracción de carbohidratos libre (Troyano et al., 1991), utilizando un cromatógrafo gaseoso Shimadzu 17A (Japan), equipado con inyector split-splitless, detector de ionización de llama y una columna capilar DB-1701, 30 m x 0.25 mm di x 0.25 μ m espesor de película (J&W Scientific, USA). Las inyecciones fueron realizadas en modo split, con relación 1:10. La temperatura del inyector y detector fue de 275°C en el caso de glucosa; el análisis se llevó a cabo utilizando el siguiente programa de temperatura: 1 minuto a 200°C, luego un incremento hasta 220°C a 20°C/min, seguido de otra rampa desde 200°C hasta 250°C a 30°C/min, manteniendo esta temperatura durante 7 minutos. Para el análisis de lactosa las temperaturas de inyector y detector fueron de 285°C; el programa de temperatura utilizado fue de 2 minutos a 250°C y posteriormente un incremento a 260°C a 10°C/min, manteniendo esta temperatura durante 10 minutos. Para el análisis de ambos azúcares en el tercer sistema las temperaturas de inyector y detector fueron de 300°C; el programa de temperatura utilizado fue de 1 minuto a 200°C, luego un incremento a 220°C a 20°C, seguido de otra rampa desde 220°C hasta 270°C a 50°C/min, manteniendo esta temperatura durante 11 minutos.

Análisis de los datos

Las constantes de velocidad fueron calculadas por análisis de regresión utilizando Statgraphics Plus 3.0 (Manugistics Inc., 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de estudiar cómo varía la velocidad de reacción de Maillard al combinar dos azúcares de diferente reactividad, se analizó la cinética de pérdida de disponibilidad de lisina y de disminución de azúcares en dos sistemas modelo con caseína y glucosa o lactosa y en un tercero conteniendo caseína y una mezcla equimolar de ambos.

En la Fig. 1 se observa la pérdida de lisina disponible en los tres sistemas. En los tres casos existe una buena correlación en el primer orden de reacción, coincidiendo con la mayor parte de los antecedentes bibliográficos. Por lo tanto, las curvas se graficaron en escala semilogarítmica.

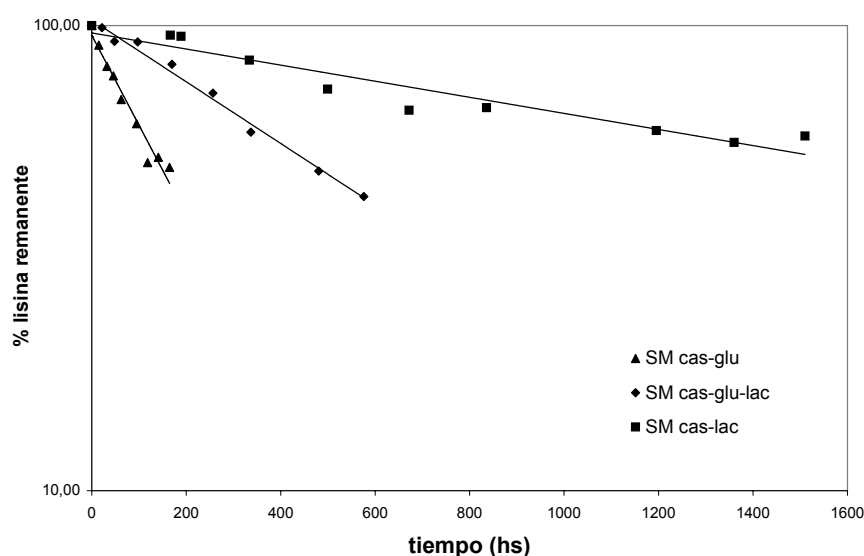


Figura 1. Pérdida de lisina disponible en los sistemas modelo de caseína con glucosa, lactosa y mezcla equimolar de glucosa y lactosa.

En la Tabla 1 figuran las constantes de velocidad y sus coeficientes de correlación (R^2).

Tabla 1. Constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible y de disminución de azúcares en los sistemas modelo de caseína con glucosa, lactosa y mezcla equimolar de glucosa y lactosa. Límite de confianza = 95 %.

	$k_{lisina} \times 10^{-3} (h^{-1})$	R^2	$k_{azúcar} \times 10^{-4} (mol.h^{-1})$	R^2
cas-lac	0.39 ± 0.05	0.92	1.16 ± 0.07	0.98
cas-glu	4.45 ± 0.34	0.96	8.29 ± 0.68	0.96
cas-glu-lac	1.56 ± 0.11	0.99	lac 1.20 ± 0.11 glu 3.86 ± 0.54	0.94 0.88

Las constantes de velocidad de reacción para los sistemas con glucosa y lactosa difieren en un orden de magnitud (11:1 para $k_{lis(glu)}: k_{lis(lac)}$). Naranjo et al. (1998), trabajando a la misma temperatura, pero a una a_w más elevada (0,52), también encontraron mayor reactividad para el monosacárido, pero las diferencias entre ambas constantes fue mucho menor. En la velocidad de la reacción de Maillard tiene influencia la diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y la T_g del sistema (Buera y Karel, 1995; Bell, 1996), debido a que a mayor $T-T_g$ aumenta la movilidad de los reactantes. A igual temperatura de tratamiento, esta diferencia se incrementa al aumentar la a_w , ya que disminuye la T_g del sistema (Jouppila & Roos, 1994). En productos lácteos y sistemas azúcar-caseína la T_g es muy cercana a la de los azúcares presentes (Jouppila & Roos, 1994; Haque &

Roos, 2004). Por lo tanto la considerable diferencia encontrada entre las constantes en el presente trabajo puede atribuirse, además de a las diferentes reactividades del mono y disacárido, a que las T_g de ambos azúcares son muy distintas (31°C y 101°C para los azúcares anhidros respectivamente, Roos, 1993). A la a_w utilizada (0,33), $T-T_g$ para el sistema con lactosa es cercana a cero y por lo tanto la movilidad es mucho menor que en el sistema con glucosa, cuya T_g a esta a_w es muy inferior a la temperatura ambiente. En cambio en las condiciones usadas por Naranjo et al. (1998) (a_w 0,52), las T_g de ambos azúcares se encontraban muy por debajo de la temperatura ambiente, siendo entonces la movilidad de los reactantes elevada en ambos sistemas; por lo tanto, la diferencia entre las velocidades de pérdida de lisina disponible en este caso, se debían sólo a la mayor reactividad del monosacárido respecto del disacárido.

Una tendencia similar se observó en las velocidades de disminución de azúcares (Fig. 2), aunque la cinética, en este caso, se ajustó al orden cero. La proporción entre las constantes (Tabla 1) para glucosa y lactosa fue, en este caso, 7:1.

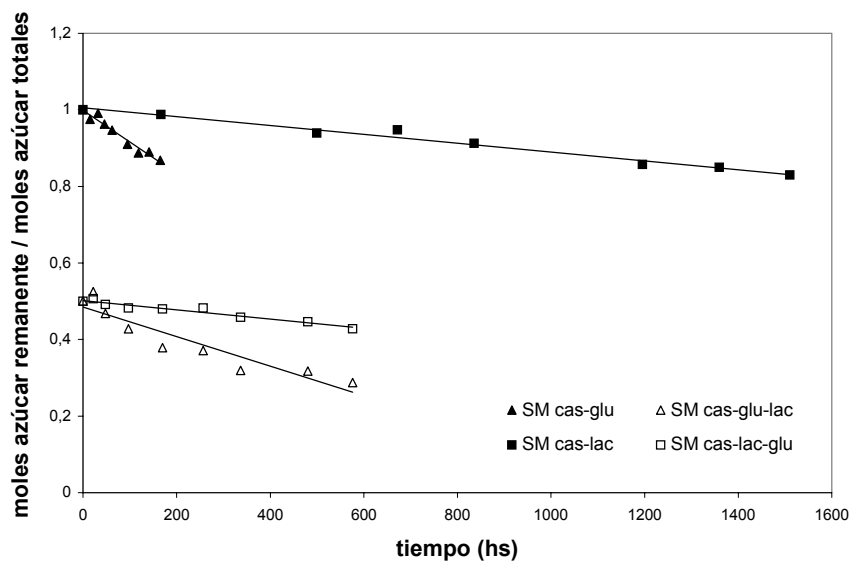


Figura 2. Disminución de azúcares en los sistemas modelo de caseína con glucosa, lactosa y mezcla equimolar de glucosa y lactosa.

En el tercer sistema, el contenido total inicial de azúcares se mantuvo igual, pero la cantidad de cada uno de ellos se redujo a la mitad. Al comparar este sistema con el que contiene sólo glucosa, se encontró que la velocidad de pérdida de disponibilidad de lisina se redujo a la tercera parte y la de disminución de glucosa a la mitad. Este marcado descenso de la velocidad de reacción de Maillard no puede atribuirse únicamente a la

menor cantidad inicial del azúcar más reactivo, ya que éste sigue estando en exceso respecto de lisina. Debe tenerse en cuenta, además, que al reemplazar la mitad de glucosa por lactosa, se produce un aumento en la T_g del sistema que contribuiría a disminuir la velocidad de reacción por una pérdida de movilidad de los reactantes.

Por lo tanto, al reemplazar parte de un azúcar por otro, no sólo debe considerarse la diferente reactividad de cada uno de ellos en las reacciones de pardeo, sino también el modo en que su presencia afecta la movilidad de las sustancias del sistema involucradas en la reacción.

BIBLIOGRAFÍA

Baxter, J.R., 1995. Free amino acid stability in reducing sugar systems. *Journal of Food Science*, 60, 405-408.

Bell, L.N., 1996. Kinetics of non-enzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and the glass transition. *Food Research International*, 28, 591-597.

Buera, M.P. & Karel, M., 1995. Effect of physical changes on the rates of nonenzymic browning and related reactions. *Food Chemistry*, 52, 167-173.

Haque, Md. K. & Roos, Y.H., 2004. Water plasticization and crystallization of lactose in spray-dried lactose/protein mixtures. *Journal of Food Science*, 69, FEP23-FEP29.

Jouppila, K. & Roos, Y.H., 1994. Glass transition and crystallization in milk powders. *Journal of Dairy Science*, 77, 2907-2915.

Labuza, T.P. y Baisier, W.M., 1992. The kinetics of nonenzymatic browning. En: *Physical Chemistry of Foods*. Ed. Schwartzberg, H.G. y Hartel, R.W., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 595-649.

Mauron, J., 1981. The Maillard reaction in food: a critical review from the nutritional standpoint. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 5-35.

Medina Hernández, M.J. & García Álvarez-Coque, M.C., 1992. Available lysine in protein, assay using o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric method. *Journal of Food Science*, 57, 503-505.

Naranjo, G.B., Malec, L.S. y Vigo, M.S., 1998. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chemistry*, 62, 309-313.

Roos, Y.J., 1993. Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 238, 39-48.

Statgraphics Plus 3.0 (Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA, 1997)

Troller, J.A. y Scott, V.N., 1992. Measurement of water activity (*aw*) and acidity. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3rd edition, Eds. Vandezant, C. y Splittstoesser, D.F., American Public Health Association, Washington, U.S.A., p.143.

Troyano, E., Olano, A., Fernández-Díaz, M., Sanz, J. y Martínez-Castro, I., 1991. Gas-chromatographic analysis of free monosaccharides in milk. *Chromatographia*, 32, 379-382.

INFLUENCIA DE LOS AZUCARES PRESENTES EN LECHE DE BAJO CONTENIDO EN LACTOSA EN LA VELOCIDAD DE REACCION DE MAILLARD

NARANJO, Gabriela B., PEREYRA GONZALES, Adriana S., VIGO, María S., MALEC, Laura S.*

Departamento de Química Orgánica, Area Bromatología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pabellón 2. Ciudad Universitaria. 1428-Buenos Aires. Argentina. TEL/FAX 54 11 4576 3346. E-mail: malec@qo.fcen.uba.ar

RESUMEN

En este trabajo se comparó el efecto de cada uno de los azúcares presentes en la leche parcialmente delactosada en la reacción de Maillard.

Para ello se analizó la velocidad de disminución de estos azúcares y de disponibilidad de lisina en tres sistemas que contenían caseína y glucosa, galactosa o lactosa a 37°C y actividad acuosa (a_w) 0,33. El mayor daño nutricional se produjo en el sistema con galactosa siendo la velocidad de disminución de lisina el doble que en el sistema con glucosa, a pesar de que ambos son monosacáridos reductores con estructuras similares. La velocidad de pérdida de disponibilidad de lisina en el sistema con lactosa fue considerablemente menor, disminuyendo en un orden de magnitud respecto a la de los monosacáridos. La relación entre las constantes de velocidad para la disminución de cada azúcar en los tres sistemas fue similar a la observada para la pérdida de lisina.

Palabras clave: Maillard, leche delactosada, lisina disponible, azúcares.

ABSTRACT

The effect of each sugar of low lactose milk on the Maillard reaction was compared. Kinetics of lysine and reducing sugars loss in three systems containing casein and glucose, galactose or lactose at 37°C and water activity (a_w) 0.33 was analyzed.

The highest nutritional damage corresponded to the system with galactose. Lysine loss rate was twofold higher than that of glucose system, in spite of the fact that both are reducing sugars with similar structures. Lysine loss rate in the system with lactose was tenfold lower. The ratio among the rate constants for sugar decrease for the three systems was similar to those for available lysine loss.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas alimentarias pueden sufrir deterioro en su valor nutricional durante el procesamiento y/o almacenamiento de los alimentos, debido principalmente a la reacción de Maillard que se produce en presencia de azúcares reductores (Kaanane y Labuza, 1989; Mauron, 1990). Durante la etapa temprana de esta reacción se bloquean grupos amino de aminoácidos esenciales lo que impide su biodisponibilidad (Hurrell et al., 1983; Mauron, 1990). Entre ellos el más afectado es la lisina por su grupo α -amino libre, siendo éste un aminoácido esencial que suele ser limitante en muchos alimentos.

Los productos lácteos constituyen un gran aporte nutricional a la alimentación humana, en especial, por la buena calidad de sus proteínas. Por lo tanto, la pérdida de disponibilidad de lisina que puede producirse durante su almacenamiento sería indeseable. Sin embargo, cuando la lactosa es el único azúcar reductor presente, el daño no suele ser importante, ya que reacciona lentamente (Hurrell et al., 1983).

En las leches de bajo contenido en lactosa, destinadas a personas que sufren de intolerancia a este azúcar, en las que la lactosa es parcialmente hidrolizada a glucosa y galactosa, el daño nutricional es mucho mayor (Mittal et al., 1989; Paul y Mathur, 1993), ya que los monosacáridos reaccionan a mayor velocidad con los grupos amino libres (Baxter, 1995; Naranjo et al., 1998).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de glucosa, galactosa y lactosa en la reacción de Maillard en sistemas con caseína durante su almacenamiento a baja a_w y temperatura moderada.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de muestras

Se prepararon 3 sistemas modelo compuestos por caseína y glucosa, galactosa o lactosa, con relación molar inicial azúcar:lisina de 3:1. Las mezclas se suspendieron en solución buffer de pH 6,5, se liofilizaron y se equilibraron a a_w 0,33 con solución saturada de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (p.a.). Posteriormente se colocaron en frascos de vidrio con cierre hermético y se almacenaron a 37 °C. Se retiraron muestras a intervalos regulares de tiempo y se colocaron a -18 °C hasta el momento de su análisis.

Métodos Analíticos

La determinación de la actividad de agua de los sistemas se llevó a cabo con un higrómetro Vaisala Humicap HMI 31 (Vaisala OY, Helsinki, Finlandia) equipado con un sensor HMP 35 (Troller y Scott, 1992).

El contenido de nitrógeno se determinó por duplicado por el método de Kjeldahl. Para la valoración de lisina disponible se utilizó el método espectrofotométrico con o-ftaldialdehído y N-acetil-L-cisteína (Medina Hernández y García Alvarez-Coque, 1992). Las muestras fueron disueltas en solución de SDS 2% y la absorbancia fue medida por triplicado a 335 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 (USA).

El contenido de azúcares se determinó por cromatografía gas-líquido de los trimetilsilil derivados de la fracción de carbohidratos libre (Troyano et al., 1991), utilizando un cromatógrafo gaseoso Shimadzu 17A (Japan), equipado con inyector split-splitless, detector de ionización de llama y una columna capilar DB-1701, 30 m x 0,25 mm di x 0,25 μ m espesor de película (J&W Scientific, USA). Las inyecciones fueron realizadas en modo split, con relación 1:10. La temperatura del inyector y detector fue de 275°C en el caso de glucosa y galactosa; el análisis se llevó a cabo utilizando un programa de temperatura: 1 minuto a 200°C, luego un incremento hasta 220°C a 20°C/min, seguido de otra rampa desde 200°C hasta 250°C a 30°C/min, manteniendo esta temperatura durante 7 minutos. Para el análisis de lactosa las temperaturas de inyector y detector fueron de 285°C; el programa de temperatura utilizado fue de 2 minutos a 250°C y posteriormente un incremento a 260°C a 10°C/min, manteniendo esta temperatura durante 10 minutos.

Análisis de los datos

Las constantes de velocidad fueron calculadas por análisis de regresión utilizando Statgraphics Plus 3.0 (Manugistics Inc., 1997).

RESULTADOS Y DISCUSION

Para comparar el efecto de los azúcares presentes en la leche delactosada en la reacción de Maillard, se analizó la velocidad de disminución de estos azúcares y la de disponibilidad de lisina en tres sistemas que contenían caseína y cada uno de estos hidratos de carbono.

La Fig. 1 muestra la pérdida de lisina disponible en cada sistema. Al graficar el porcentaje de lisina disponible remanente en función del tiempo en una escala semilogarítmica, se obtuvieron relaciones lineales, indicando una cinética de orden uno en los tres casos.

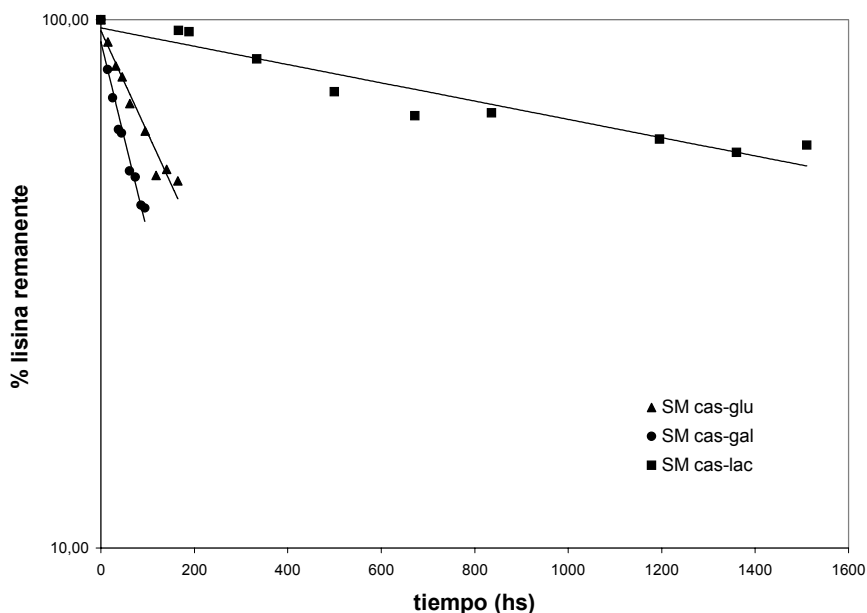


Figura 1. Pérdida de lisina disponible en los sistemas modelo de caseína con glucosa, galactosa y lactosa.

Las constantes de velocidad ($k_{lis(gal)}$, $k_{lis(glu)}$ y $k_{lis(lac)}$ para cada uno de los respectivos sistemas), así como los valores de los coeficientes de correlación (R^2) correspondientes se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible y de disminución de azúcares en los sistemas modelo de caseína con glucosa, galactosa y lactosa. Límite de confianza = 95 %.

	$K_{lisina} (10^{-3})$	R^2	$K_{azúcar} (10^{-4})$	R^2
Lactosa	0.39 ± 0.05	0.92	1.16 ± 0.07	0.98
Glucosa	4.45 ± 0.34	0.96	8.29 ± 0.68	0.96
Galactosa	8.33 ± 0.62	0.96	17.0 ± 1.7	0.95

Puede observarse que el daño nutricional fue mucho menor en el sistema con lactosa, en el que la pérdida de lisina disponible fue importante sólo luego de períodos prolongados. Por el contrario, en los sistemas conteniendo glucosa y galactosa, la pérdida resulta elevada aún a tiempos muy cortos.

Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que durante el almacenamiento de leches en polvo de bajo contenido en lactosa la pérdida de valor nutricional sería mucho mayor que en las leches comunes debido al considerable aumento de la velocidad de reacción que ocurre por la presencia de monosacáridos.

van Boekel (1996) y Naranjo et al. (1998) también reportaron mayores velocidades de reacción de Maillard para monosacáridos que para lactosa. El primero encontró que la

relación entre las constantes de glicosilación para galactosa y lactosa en sistemas líquidos a alta temperatura, oscilaba entre 4:1 a 6:1, dependiendo de la temperatura. Sin embargo, en este trabajo la relación entre dichas constantes fue mucho mayor (21:1). Esta diferencia puede atribuirse a las distintas condiciones en que se realizaron ambos estudios, ya que las temperaturas de tratamiento y las a_w fueron muy diferentes. En la velocidad de la reacción de Maillard tiene influencia la diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y la de transición vítrea (T_g) del sistema (Buera y Karel, 1995; Bell, 1996), ya que a mayor $T-T_g$ aumenta la movilidad de los reactantes. En particular, a la a_w de este estudio la T_g de galactosa es mucho menor que la de lactosa, por lo que $T-T_g$ para ambos sistemas resulta muy diferente. Para el sistema con lactosa $T-T_g$ es cercana a cero, en cambio en el sistema con galactosa esta diferencia es de alrededor de 37°C , por lo que la movilidad de los reactantes en este último resulta mucho mayor. En el trabajo de van Boekel (1996), la a_w es alta en los dos sistemas que se comparan siendo $T-T_g$ muy elevada en ambos. En consecuencia, las diferencias de velocidad entre ambos sistemas resultan menores.

Al comparar las constantes entre los sistemas con galactosa y glucosa se observó, en concordancia con otros autores (Kato et al., 1986; Brands et al., 2001), que la velocidad de reacción con la primera fue mayor que con la segunda. La velocidad de pérdida de lisina disponible en el sistema con galactosa resultó el doble que con glucosa, a pesar de que ambos son monosacáridos reductores con estructuras semejantes. En la velocidad de reacción de los azúcares en Maillard tiene influencia la proporción de la forma acíclica del azúcar. A temperatura ambiente, esta proporción es 10 veces mayor para galactosa que para glucosa (Hayward y Angyal, 1977; Bunn y Higgins, 1981), siendo ésta probablemente la causa de la menor reactividad de este último azúcar.

En la Fig. 2 se observa la disminución de la proporción de cada azúcar en el sistema correspondiente y en la Tabla 1 figuran las respectivas constantes de velocidad (k_{gal} , k_{glu} y k_{lac}) y los valores de R^2 . La disminución del contenido de azúcares se ajustó a una cinética de orden cero. En otros trabajos realizados a temperaturas más elevadas se encontró que los azúcares participan, además, en otro tipo de reacciones, como isomerizaciones y degradación a ácidos carboxílicos (Brands et al, 2001; Brands et al, 2002; Brands et al., 2003). Sin embargo, la relación entre las constantes de disminución de lisina y de azúcares obtenidas en este estudio fueron similares en ambos casos: 15: 7: 1 para k_{gal} : k_{glu} : k_{lac} y 21: 11: 1 para $k_{lis(gal)}$: $k_{lis(glu)}$: $k_{lis(lac)}$, a pesar de las diferencias en los órdenes de reacción; además, la relación entre los moles de lisina y azúcares consumidos a lo largo del almacenamiento osciló alrededor de 1 en los tres sistemas. Esto permite

suponer que en las condiciones de tratamiento de este trabajo la principal reacción sería la de Maillard, probablemente a causa de la relativamente baja temperatura utilizada.

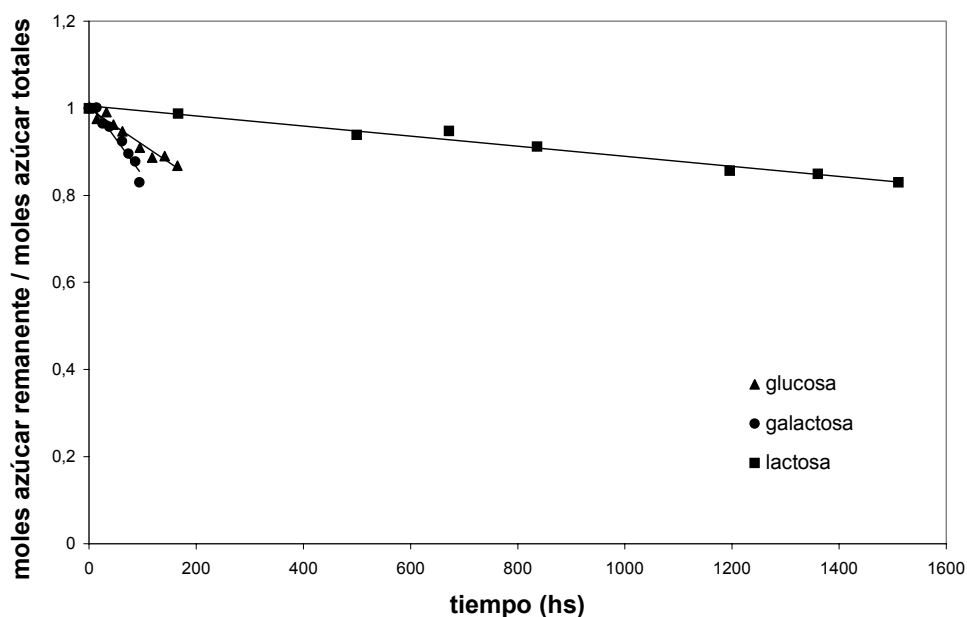


Figura 2. Disminución de azúcares en los sistemas modelo de caseína con glucosa, galactosa y lactosa

BIBLIOGRAFIA

Baxter, J.R., 1995. Free amino acid stability in reducing sugar systems. *Journal of Food Science*, 60, 405-408.

Bell, L.N., 1996. Kinetics of non-enzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and the glass transition. *Food Research International*, 28, 591-597.

Brands, Carline M.J. & van Boekel, Martinus A.J.S., 2001. Reactions of monosaccharides during heating of sugar - casein systems: Building of a reaction network model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4667-4675.

Brands, Carline M.J. & van Boekel, Martinus A.J.S., 2002. Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide-casein system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6725-6739.

Brands, Carline M.J. & van Boekel, Martinus A.J.S., 2003. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharides-casein systems. *Food Chemistry*, 83, 13-26.

- Buera, M.P. & Karel, M., 1995.** Effect of physical changes on the rates of nonenzymic browning and related reactions. *Food Chemistry*, 52, 167-173.
- Bunn, H.F. & Higgins, P.J., 1981.** Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213, 222-224.
- Hayward, L.D. & Angyal, S.J., 1977.** A symmetry rule for the circular dichroism of reducing sugars, and the proportion of carbonyl forms in aqueous solutions thereof. *Carbohydrate Research*, 53, 13-20.
- Hurrell, R.F., Finot, P.A. y Ford, J.E., 1983.** Storage of milk powders under adverse conditions. 1. Losses of lysine and other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. *British Journal of Nutrition*, 49, 343-354.
- Kaanane, A. y Labuza, T.P., 1989.** The Maillard reaction in foods. En: *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition*, Alan R.Liss, Inc, 301-327.
- Kato, Y, Matauda, T, Kato, N, Watanabe, K & Nakamura, R. 1986.** Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 351-355.
- Mauron, J., 1990.** Influence of processing on protein quality. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36, S57-S69.
- Medina Hernández, M.J. & García Álvarez-Coque, M.C., 1992.** Available lysine in protein, assay using o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric method. *Journal of Food Science*, 57, 503-505.
- Mittal, S.B., Hourigan, J.A. y Zadow, J.G., 1989.** Effect of UHT treatment, storage time and temperature on the available lysine of UHT recombined and UHT recombined lactose hydrolysed milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 44 (nov), 88-90.
- Naranjo, G.B., Malec, L.S. & Vigo, M.S., 1998.** Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chemistry*, 62, 309-313.
- Paul, S.C. y Mathur, B.N., 1993.** Effect of lactose hydrolysis on some nutritional characteristics of spray-dried lactose-hydrolysed infant formula. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 48 (nov), 49-51.
- Statgraphics Plus 3.0, 1997.** Manugistics Inc., Rockville, Maryland, USA.
- Troller, J.A. y Scott, V.N., 1992.** Measurement of water activity (a_w) and acidity. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3rd edition, Eds. Vandezant, C. y Splittstoesser, D.F., American Public Health Association, Washington, U.S.A., 143.
- Troyano, E., Olano, A., Fernández-Díaz, M., Sanz, J. y Martínez-Castro, I., 1991.** Gas-chromatographic analysis of free monosaccharides in milk. *Chromatographia*, 32, 379-382.

van Boekel, M.A.J.S., 1996. Kinetic modelling of sugar reactions in heated milk-like systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 245-266.

ESTUDIO DE LA REHIDRATACIÓN DE ALLIÁCEAS DESHIDRATADAS

FERNANDEZ, Leticia, PEZZUTTI, Adriana y CROCI, Clara, A.

Dpto. de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS), Avda. Alem 1253, (8000) Bahía Blanca
TE: 0291-4595100- E-mail: ccroci@criba.edu.ar

RESUMEN

Se estudió la influencia de la temperatura, la agitación y la concentración salina del medio de hidratación sobre la pérdida de sólidos y la cinética de rehidratación de escamas de ajo y trozos de cebolla deshidratados de origen comercial.

En general el porcentaje de pérdida de sólidos en los productos totalmente rehidratados fue significativo para todas las variables analizadas. Un aumento en la temperatura de 30 a 60°C produjo un incremento en las velocidades de rehidratación y de pérdida de sólidos en ambos productos. La agitación favoreció la dinámica de reconstitución y la pérdida de solutos. Contrariamente, la adición de cloruro de sodio retardó la rehidratación y la liberación de material sólido cuando la concentración aumentó a 0.5M. No se encontraron diferencias cuando la concentración incrementó de 0.5 a 1M. Además, el producto rehidratado presentó un mayor contenido de agua que el fresco; probablemente debido a una mayor concentración de componentes higroscópicos.

Palabras Claves: ajo, cebolla, *Alliáceas*, rehidratación, pérdida de sólidos

ABSTRACT

In this work we have studied the influence of temperature, agitation and salt concentration in the hydration media over the loss of solids and the rehydration kinetics of dehydrated garlic flakes and onion pieces of commercial origin.

In general, the loss of solids percentage in fully rehydrated products was significant in all the variables analyzed. A temperature increase from 30 to 60°C produced an increase of rehydration and loss of solids velocities in both products. Agitation favored the reconstitution dynamics and the loss of solutes. On the other hand, the addition of sodium chloride delayed rehydration and the release of solid material when the concentration increased to 0.5 M. No differences were found when the concentration increased from 0.5 to 1M. Also, the rehydrated product showed a higher water content than the fresh one, probably due to a higher concentration of hygroscopic components.

keywords: garlic, onion, *Alliaceas*, rehydration, loss of solids

INTRODUCCION

La remoción de agua de las células vegetales cambia algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Estas modificaciones juegan un rol importante en los cambios que tienen lugar en los vegetales luego del secado, en especial en la capacidad de rehidratación (Horn y Sterling, 1982).

La rehidratación es un proceso complejo que tiende a la restauración de las propiedades del material fresco y puede ser considerada como una medida del daño causado al material por el secado y otros tratamientos previos a la rehidratación. El tiempo de rehidratación y el contenido de agua a saturación del vegetal rehidratado son dos parámetros frecuentemente considerados para la selección y diseño del proceso de secado (Lewicki, 1998; Krokida y Marinos-Kouris, 2003). El incremento en la masa del producto durante la rehidratación es el resultado de dos fenómenos simultáneos: la absorción de agua y la pérdida de sólidos (Lewicki, 1998). En particular, el estudio de la rehidratación de ajo y cebolla deshidratados resulta de interés tanto para la industria de alimentos como para el consumo doméstico.

Si bien existe información referida a la capacidad de rehidratación de productos secos, la misma proviene del uso de diferentes metodologías y de distintos modos de expresión de los resultados (Lewicki, 1998; Horn y Sterling, 1982; Bhattacharya, 1995; Maskan, 2001). Por otra parte son pocos los estudios que consideran la pérdida de solutos durante la rehidratación. Finalmente son escasos los antecedentes en la literatura acerca del efecto de diferentes condiciones de rehidratación sobre la reconstitución de ajo y cebolla deshidratados (Krokida y Marinos-Kouris, 2003).

El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto de las condiciones de rehidratación sobre la pérdida de sólidos y la cinética de rehidratación de ajo y cebolla deshidratados de origen comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre escamas de ajo y trozos de cebolla deshidratados obtenidos comercialmente. Las experiencias de rehidratación se realizaron de la siguiente forma: se pesaron muestras de aproximadamente 3 g de producto y se rehidrataron por inmersión en 50 mL de agua destilada contenidos en un recipiente de 100 mL. El aumento de peso de las muestras en función del tiempo se registró con una balanza analítica (± 0.0001 g) luego de ser escurridas durante dos minutos y secadas con papel absorbente. Se

realizaron experiencias variando la temperatura (30, 45 y 60°C) y la concentración salina del medio de rehidratación (0, 0.5 y 1M NaCl). También se evaluó el efecto de la agitación del medio (100 rpm). Las condiciones estándar de rehidratación fueron: agua destilada sin agitación y 30°C. Para obtener el peso seco de las muestras se empleó un liofilizador (HETO/ FD 8.0) que operó a 7.6 Pa. El contenido de agua (X) fue expresado en base seca: gramos de agua/gramos de producto seco (g/g bs). Se consideró que el contenido de agua final obtenido en cada experiencia es el contenido de humedad de equilibrio o de saturación. El porcentaje de pérdida de sólidos (% PS) fue definido como:

$$\% \text{ PS} = (1 - \text{peso seco de la muestra rehidratada} / \text{peso seco inicial}) \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el efecto de la temperatura sobre el contenido de agua y el porcentaje de pérdida de sólidos durante la rehidratación de ajo y cebolla deshidratados. Se observa que un aumento de 30 a 60°C produce un incremento tanto en la velocidad de rehidratación como en la de pérdida de sólidos.

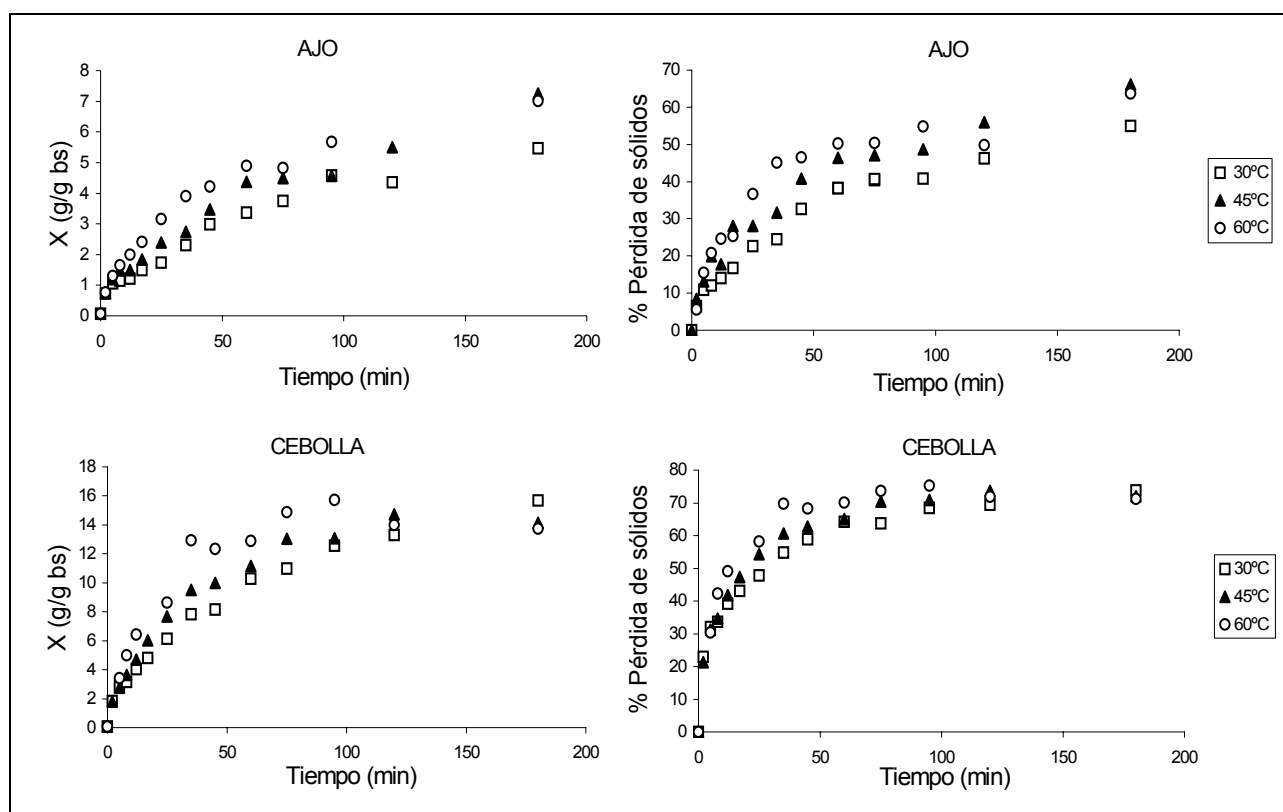


FIGURA 1. Efecto de la temperatura sobre la rehidratación y el porcentaje de pérdida de sólidos en ajo y cebolla deshidratados.

Una influencia positiva de la temperatura sobre la rehidratación de ajo y cebolla deshidratados también fue informada por Krokida y Marinos-Kouris (2003). Estos encuentros son de esperar dado que la mayoría de los mecanismos físicos que explican

el movimiento del agua dentro de un producto, capilaridad, difusión líquida y de vapor entre otros, se ven favorecidos con el aumento de temperatura (Van Arsdel y col., 1973; Pezzutti, 1995). En particular, las velocidades iniciales de rehidratación variaron entre 0.071 y 0.175 g/g bs min en ajo y entre 0.278 y 0.488 g/g bs min en cebolla cuando la temperatura incrementó de 30 a 60°C, mientras que los rangos de variación en las velocidades iniciales de porcentaje de PS para ajo y cebolla respectivamente fueron: 0.905 - 1.602 min⁻¹ y 1.565 - 4.632 min⁻¹. Se observó también que en el caso de ajo un aumento en la temperatura de 30 a 45°C incrementa el contenido de agua de equilibrio y el porcentaje de pérdida de sólidos final. En cebolla, los cambios en la temperatura del agua de rehidratación parecen no afectar el contenido de agua de equilibrio y el % PS final.

La agitación favoreció la dinámica de reconstitución y la de pérdida de sólidos en ambos productos (Figura 2). Un resultado similar ha sido encontrado por Neubert y col. (1968). Estos autores han atribuido este comportamiento al efecto de la agitación sobre la

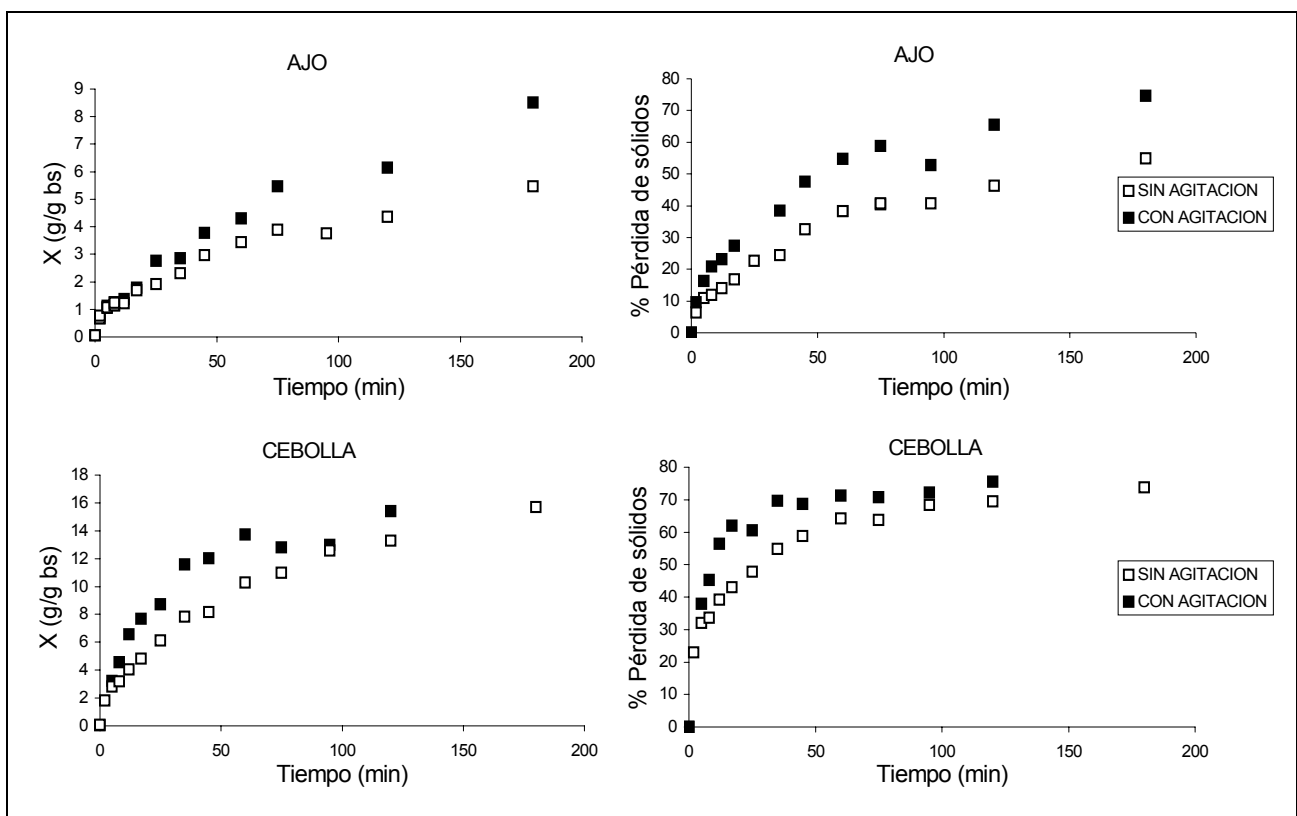


FIGURA 2. Efecto de la agitación sobre la rehidratación y el porcentaje de pérdida de sólidos en ajo y cebolla deshidratados.

restitución del volumen original de la célula. Puntualmente, las velocidades iniciales de rehidratación se incrementaron en un 45 y un 86 % en ajo y cebolla respectivamente cuando la rehidratación se llevó a cabo con agitación. En cuanto al % PS, las velocidades iniciales aumentaron un 51 % en ajo y un 122 % en cebolla. En la reconstitución de ajo

deshidratado, la capacidad total de rehidratación y la pérdida de sólidos resultó ser superior cuando el proceso se realiza con agitación. Contrariamente, en cebolla la agitación no parece tener efecto sobre estos parámetros.

La adición de cloruro de sodio al medio de rehidratación hasta una concentración 0.5M, retardó la rehidratación y la liberación de material sólido (Figura 3). Las velocidades de rehidratación iniciales disminuyeron de 0.071 a 0.053 g/g bs min para ajo y de 0.278 a 0.186 g/g bs min para cebolla, lo cual se podría deber a una disminución en la transferencia de calor y masa en la superficie del producto (Van Arsdel y col., 1973). En cuanto al % PS, la velocidad inicial decreció de 0.905 a 0.662 min⁻¹ en ajo y de 1.565 a 1.177 min⁻¹ en cebolla. Por otra parte, no se observaron diferencias importantes durante la rehidratación y la PS cuando la concentración de NaCl incrementó de 0.5 a 1M. En ambas *Alliáceas*, el contenido de agua y la pérdida de sólidos en el equilibrio resultaron inferiores cuando la reconstitución se realizó en el medio salino. Resultados similares han sido hallados por Horn y Sterling (1982) y Neubert y col. (1968) en ensayos sobre rehidratación de zanahoria y apio respectivamente. La disminución en la capacidad y velocidad de rehidratación puede ser explicada sobre la base del efecto del NaCl sobre la permeabilidad de la pared celular.

El contenido de agua en ajo y cebolla frescos se encuentra dentro del rango comprendido entre 1.7 y 2.3 g/g bs en ajo y entre 4.2 y 11.2 g/g bs en cebolla (Pezzutti, 1995). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los productos rehidratados presentan un mayor contenido de agua que el fresco (entre 3.49 y 8.52 g/g bs para ajo y entre 9.37 y 15.72 g/g bs para cebolla). Este resultado ha sido informado previamente por otros autores (Haas y col., 1978; Lewicki, 1998; Maskan, 2001). Este hecho podría ser debido a la pérdida de sólidos, la cual conduciría a una mayor concentración de componentes higroscópicos en la matriz sólida del producto rehidratado. Es de destacar la importante pérdida de sólidos que tiene lugar durante la rehidratación en todas las condiciones analizadas: entre un 40.8 y un 74.6 % en ajo y entre un 66.1 y un 75.5 % en cebolla. Por lo tanto surge la necesidad de considerar la pérdida de sólidos en el cálculo del contenido de agua para cada tiempo de rehidratación. Si bien muchos autores reconocen la importancia de considerar la PS, son pocos los estudios disponibles que han tenido en cuenta la corrección debido a este fenómeno (Lewicki, 1998; Krokida y Marinos-Kouris, 2003).

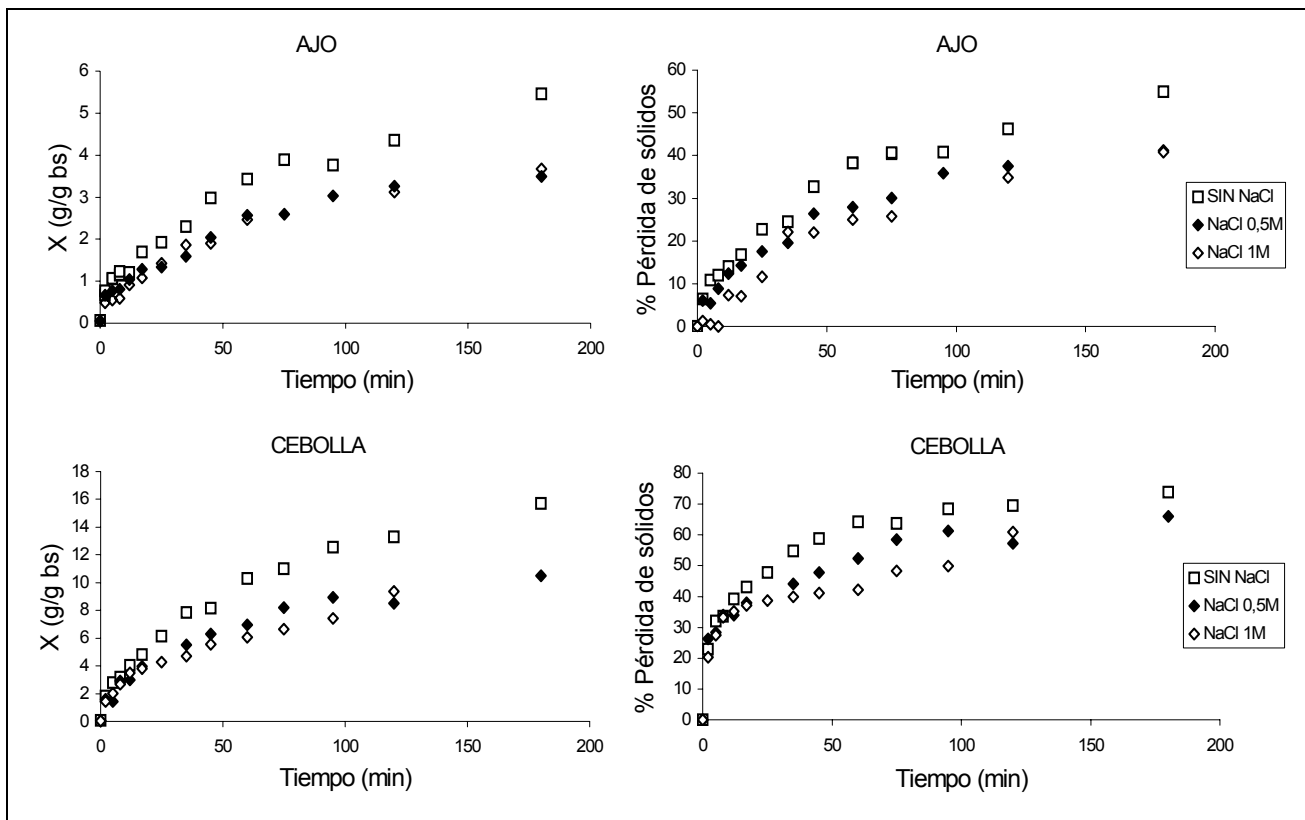


FIGURA 3. Efecto del cloruro de sodio sobre la rehidratación y el porcentaje de pérdida de sólidos en ajo y cebolla deshidratados.

De lo expuesto se puede concluir que existiría una relación directa entre el comportamiento de rehidratación de ajo y cebolla y la pérdida de sólidos asociada. Dicha relación también ha sido encontrada por Bhattacharya (1995) en su estudio sobre la rehidratación de semolina.

Finalmente se encontró que una cinética de rehidratación (dX/dt) de primer orden con respecto al contenido de humedad representa convenientemente los datos experimentales ($r^2 > 0.909$ para ajo y $r^2 > 0.862$ para cebolla). El porcentaje de pérdida de sólidos en función del tiempo de rehidratación puede ser ajustado adecuadamente con un polinomio de tercer orden ($r^2 > 0.973$ para ajo y $r^2 > 0.815$ para cebolla).

CONCLUSIONES

El aumento en la temperatura y la agitación del medio de hidratación favorecieron las velocidades de rehidratación y de PS en ajo y cebolla. En ajo también se observó un incremento en el contenido de agua de equilibrio y en el porcentaje final de PS. En ambos productos, la adición de cloruro de sodio disminuyó las velocidades de rehidratación y de pérdida de sólidos, la capacidad de rehidratación y el porcentaje final de PS.

BIBLIOGRAFIA

- Bhattacharya, S. 1995.** Kinetics of hydration of raw and roasted corn semolina. *J. Food Engng.* 25, 21-30.
- Haas, G. J., Prescott JR, H. E. y Cante C. J. 1974.** On Rehydration and respiration of dry and partially dried vegetables. *J. Food Sci.* 39, 681-684.
- Horn, G. R. y Sterling, C. 1982.** Studies on the rehydration of carrots. *J. Sci. Food Agric.* 33, 1035-1041.
- Krokida, M. K. y Marinos-Kouris, D. 2003.** Rehydration kinetics of dehydrated products. *J. Food Engng.* 57, 1-7.
- Lewicki, P. P. 1998.** Some remarks on rehydration of dried foods. *J. Food Engng.* 36, 81-87.
- Maskan, M. 2001.** Drying, shrinkage and rehydration characteristics of kiwifruits during hot air and microwave drying. *J. Food Engng.* 48, 177-182.
- Neubert, A. M., Wilson III, C. W., y Miller W. H. 1968.** Studies on celery rehydration. *Food Technol.* 22, 1296-1301.
- Pezzutti, A. 1995.** Diseño y simulación de la deshidratación de ajo y cebolla. Tesis, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Van Arsdell, W. B., Copley, M. J. y Morgan, A. I. 1973.** Food dehydration. Vol 1-Drying Methods and Phenomena. AVI Pub. Co., Inc. Westport, Conn.

INFLUENCIA DEL SOLVENTE SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)

CALDERÓN, Natalia L., PÉREZ, Mónica B., CROCI, Clara A.

Dpto. de Química, Universidad Nacional del Sur. Avda. Alem 1253 – (8000) Bahía Blanca.
TE: 0291-4595100 – E-mail: ccroci@criba.edu.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto del metanol, el etanol y el agua sobre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en extractos de hojas de romero. La actividad antioxidante se evaluó *in vitro* a través de dos sistemas modelo: la reducción del Fe^{3+} y el atrapamiento del radical estable DPPH. Los resultados mostraron que el solvente de extracción afectó significativamente la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los extractos. Se determinó que el metanol sería el solvente recomendado para preparar extractos de hojas de romero con elevada actividad antioxidante, la cual estaría directamente relacionada con el elevado nivel de compuestos fenólicos observado en el extracto metanólico.

Palabras clave: romero, actividad antioxidante, DPPH*, poder reductor, compuestos fenólicos.

ABSTRACT

In this work, we evaluated the effect of methanol, ethanol and water on the antioxidant capacity and phenolic compounds content of rosemary leaves extracts. Antioxidant activity was evaluated *in vitro* by means of two model systems: Fe^{3+} reduction and DPPH radical-scavenging assays. The results showed that the extraction solvent affected significantly the antioxidant activity and the phenolic compounds content of rosemary leaves extracts. It was determined that methanol would be the recommended solvent to prepare rosemary leaves extracts with high antioxidant activity, which would be directly related to the high level of phenolic compounds observed in the methanolic extract.

INTRODUCCIÓN

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una hierba conocida por su potente actividad antioxidante, por sus propiedades antibacterianas y antimutagénicas y también como agente quimiopreventivo (Oluwatuyi y col., 2004). La capacidad antioxidante del romero

ha sido relacionada principalmente con dos diterpenos fenólicos, el ácido carnósico y el carnosol, y en menor medida con otros compuestos tales como rosmanol, iso y epirosmanol (Hopia y col., 1996). En los extractos vegetales la actividad antioxidante es fuertemente dependiente del solvente de extracción debido al diferente potencial antioxidante de compuestos con diferente polaridad (Moure y col., 2001). Por tal motivo, es de interés realizar estudios comparativos para seleccionar un solvente óptimo que provea un extracto con máxima actividad antioxidante. El objetivo de este trabajo preliminar fue evaluar el efecto de tres solventes de diferentes polaridades (metanol, etanol y agua) sobre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de extractos de hojas de romero. La actividad antioxidante se evaluó *in vitro* a través de dos sistemas modelo: la reducción del Fe^{3+} y el atrapamiento del radical estable DPPH.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Material vegetal

El romero se cosechó en estado de floración, se lavó y sus hojas se secaron a 37°C. Las hojas secas se molieron en mortero y el polvo obtenido se conservó en desecador a temperatura ambiente.

- Preparación de los extractos

Los extractos se obtuvieron usando metanol, etanol o agua. El polvo seco de romero (0.025 ~ 1.5 g) fue mezclado con 50 mL del solvente y la mezcla se colocó a 40 °C en baño ultrasónico por 2hs. Posteriormente los extractos se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue inmediatamente usado para los ensayos.

- Evaluación de la actividad antioxidante

a) Poder reductor (PR): Se determinó sobre los extractos metanólico, etanólico y acuoso, evaluando la transformación de Fe^{3+} a Fe^{2+} de acuerdo al método de Oyaizu (1986). La absorbancia fue medida a 700 nm; una mayor absorbancia indica un mayor poder reductor.

b) Ensayo del DPPH[•] : La actividad antioxidante de los extractos de romero fue medida en términos de su capacidad para donar hidrógeno o para atrapar radicales, usando el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) (Brand-Williams y col., 1995). La actividad antioxidante de los extractos fue expresada como el porcentaje de inhibición (PI) del radical DPPH y fue calculada como:
$$\text{PI} = [(A_C - A_M) / A_C] \times 100$$
 donde A_C = absorbancia del control (conteniendo todos los reactivos excepto la muestra) y A_M = absorbancia de la muestra. El valor CE_{50} (concentración de extracto que causa una

reducción del 50% en la absorbancia del DPPH*) fue determinado mediante un análisis de regresión lineal.

- Contenido de compuestos fenólicos totales

La concentración de fenólicos totales en los extractos se determinó empleando el reactivo de Folin-Denis (AOAC, 2000), usando ácido tánico como estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antioxidante

a) Poder reductor: El PR de los extractos metanólico, etanólico y acuoso se estudió en un rango de concentraciones entre 0.5 y 30 mg romero seco/mL de solvente (Fig. 1). Para los tres solventes, el PR incrementó con la concentración hasta los 15 mg/mL. Globalmente, dentro de este rango de concentraciones (0.5-15 mg/mL) el orden del PR de los extractos fue metanólico y etanólico > acuoso. Cabe destacar que, a la concentración de 5 mg/mL, las diferencias en el PR debido al solvente fueron altamente significativas ($P < 0.01$). Para concentraciones superiores a 15 mg/mL el PR se mantuvo constante en su máximo valor (alrededor de un valor de absorbancia de 2.3) y no se observaron diferencias debido al solvente. Valores superiores a los observados en nuestro trabajo fueron informados por Dorman y col. (2003) para extractos acuosos de hojas de romero. De los resultados obtenidos es evidente que los extractos crudos de hojas de romero pueden actuar como donores de electrones y pueden reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables, y de ese modo finalizar las reacciones radicalarias en cadena.

b) Ensayo del DPPH* : La actividad antioxidante de extractos de hojas de romero fue evaluada a través del porcentaje de inhibición del radical DPPH (PI) y del CE_{50} . El PI se analizó en un rango de concentraciones entre 0.5 y 30 mg romero seco/mL de solvente; su comportamiento en función de la concentración fue semejante al observado para el PR (datos no mostrados). Los valores de PI para concentraciones de extracto de 2, 5 y 10 mg/mL se muestran en la Tabla 1. Para los tres solventes, el valor de PI incrementó con el aumento de la concentración. En la Tabla 1 también puede verse que la concentración de extracto que disminuyó un 50% la concentración de DPPH (CE_{50}) fue significativamente más baja para metanol (4.85 mg/mL) que para etanol y agua ($P < 0.01$), los cuales presentaron un valor de CE_{50} de 7.05 y 11.2 mg/mL, respectivamente. Sobre la base de estos resultados y dado que la efectividad de las propiedades antioxidantes se correlacionan inversamente con el valor de CE_{50} , el extracto metanólico sería el de mayor actividad antioxidante. Valores menores de CE_{50} que los aquí presentados fueron

informados por otros autores para extractos acuosos y metanólicos de hojas de romero (Dorman y col., 2003) (Kosar y col., 2005).

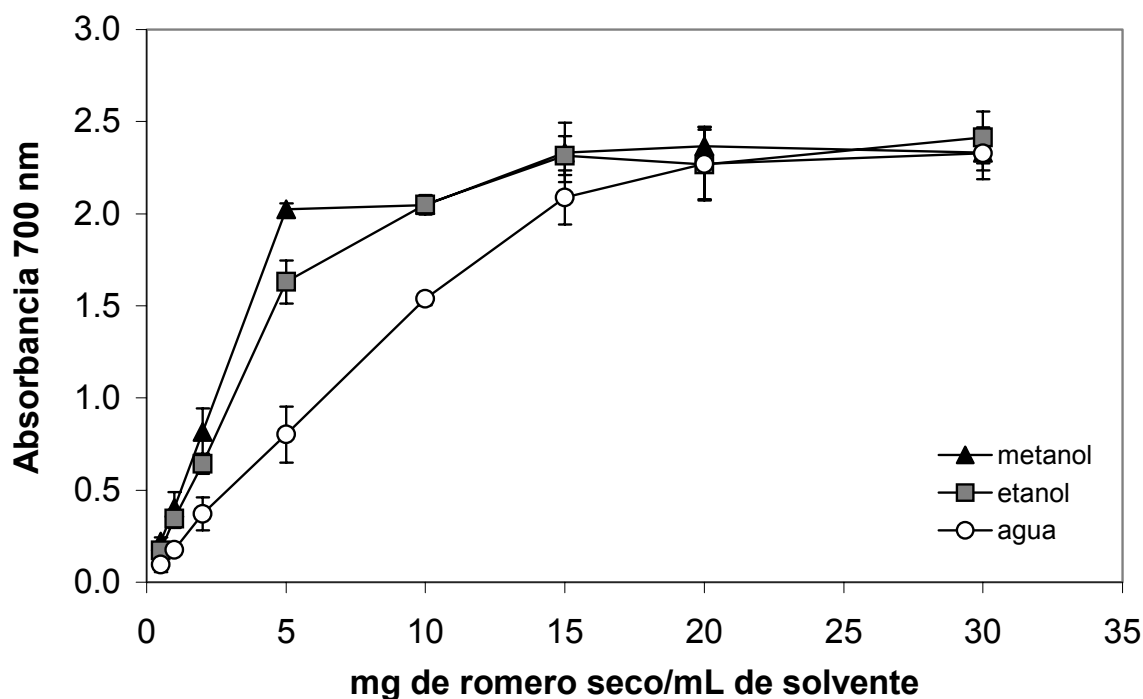


Figura 1. Poder reductor de los extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de hojas de romero. Cada valor es expresado como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

En relación con la actividad antioxidante, las disparidades observadas entre nuestros resultados y lo informado por los autores previamente citados, podrían tener su explicación en diferencias en la composición de los extractos. Las variaciones composicionales podrían ser explicadas teniendo en cuenta que factores tales como las condiciones de extracción, el origen geográfico de la planta y el momento de cosecha pueden influir en la composición de los extractos obtenidos. El solvente de extracción afectó significativamente el contenido de compuestos fenólicos totales, el cual fue expresado como mg equivalentes de ácido tánico. Dicho contenido fue 90.3 ± 8.6 , 73.7 ± 2.5 y 47.3 ± 9.1 mg/100 g romero seco, para metanol, etanol y agua, respectivamente. La concentración de fenólicos en extractos de romero, expresada como mg equivalentes de ácido gálico, ha sido informada por otros autores. Para extractos acuosos Dorman y col. (2003) y Zheng y Wang (2001) han encontrado que dicho contenido es 185 mg/g extracto y 22.19 mg/g peso fresco de hierba, respectivamente. Por otra parte, para extractos metanólicos Kosar y col. (2005) observaron que la concentración de fenólicos totales es 190 mg equivalentes de ácido gálico/g extracto.

Varios autores han informado acerca de la existencia de correlaciones entre el contenido de fenólicos y actividad antioxidante. Velioglu y col. (1998) reportaron un significativo coeficiente de correlación entre el contenido de fenólicos totales y la actividad antioxidante

de frutas seleccionadas, vegetales y granos. En cambio, Kähkönen y col. (1999) han observado que la capacidad antioxidante de extractos vegetales no necesariamente se correlaciona con altas cantidades de compuestos fenólicos. Del análisis de nuestros resultados surge que para los extractos de hojas de romero existe una relación directa entre el contenido de fenólicos totales y su actividad antioxidante.

Tabla 1. Actividad antioxidante de los extractos de hojas de romero evaluada mediante el ensayo del radical DPPH. Cada valor es expresado como la media \pm desviación estándar (n=3).

Solvente	PI *			CE ₅₀ (mg/mL)*
	2 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	
Metanol	18.77 \pm 2.16	54.35 \pm 2.26	68.15 \pm 3.15	4.85 \pm 0.53 ^a
Etanol	14.65 \pm 4.22	37.83 \pm 2.08	69.80 \pm 1.29	7.05 \pm 0.25 ^b
Agua	10.24 \pm 2.31	22.93 \pm 2.42	43.56 \pm 3.37	11.2 \pm 0.68 ^c

Cada valor es expresado como la media \pm desviación estándar (n=3). Valores con distintas letras fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$).

PI y CE₅₀ fueron calculados en el estado estacionario (180 min).

Fenólicos totales

CONCLUSIONES

Este estudio muestra los efectos del metanol, el etanol y el agua como solventes de extracción sobre la actividad antioxidante de extractos de hojas de romero. La capacidad de los extractos para donar hidrógeno fue probada *in vitro* a través de la evaluación del poder reductor y la actividad atrapadora del DPPH*. De los solventes evaluados, el metanol sería el de elección en la preparación de extractos de hojas de romero con elevada capacidad antioxidante. Dicha capacidad se relacionó en forma directa con el elevado nivel de compuestos fenólicos observado en el extracto. La presencia de diterpenos fenólicos estaría asociada, presumiblemente, con las propiedades antioxidantes de los extractos de hojas de romero. En este sentido, sería necesario realizar otros estudios con el fin de elucidar la identidad de los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas de romero.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC (2000). Official Methods of Analysis, 17 ed. Association Official Analytical Chemists.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*. 28, 25-30.

Dorman, H.j.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. (2003). Characterization of the antioxidant properties of de-odourized aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*. 83, 255-262.

Hopia, A.I., Huang, S., Schwarz, K., German, J.B., Frankel, E.N. (1996). Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *J. Agric. Food Chem*. 44, 2030-2036.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 47, 3954-3962.

Kosar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem*. 91, 525-533.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. 72, 145-171.

Oluwatuyi, M., Kaatz, G.W., Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochem*. 65, 3249-3254.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem*. 46, 4113-4117.

Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem*. 49, 5165-5170.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur.

PARÁMETROS SORCIONALES PARA MANÍ EN VAINA

MONTENEGRO Raúl A.⁽¹⁾; POTES Laura B.⁽¹⁾; PALACIOS Tomás R. ⁽¹⁾; RIVAROLA, Mariela⁽¹⁾;
GINER Sergio A. ^(2,3,4)

⁽¹⁾Fac. de Ingeniería, Univ. Nac. de Río Cuarto. Ruta 36, km. 603, Río Cuarto (5800) - Argentina

⁽²⁾CIDCA, Fac. de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata- Argentina

⁽³⁾Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata- Argentina

⁽⁴⁾Investigador de la Comisión de Investigaciones Científicas, Prov. de Buenos Aires, Argentina
e-mail: secado@ing.unrc.edu.ar

RESUMEN

Se determinan experimentalmente isothermas de sorción de maní tipo Virginia Runner, para el conjunto vaina-grano (vainas llenas). Se realizaron experiencias a cuatro temperaturas en el rango de trabajo utilizado a nivel industrial (15, 25, 35 y 45 °C), obteniéndose el equilibrio mediante un equipo de laboratorio basado en el método higrométrico. Se aplican a estos datos las ecuaciones de Chung-Pfost modificada, Halsey modificada, Henderson modificada, Oswin modificada, la ya clásica isoterma GAB, y la isoterma de Nollist-Dumont, seleccionadas en base a su probada aplicabilidad en alimentos similares. Se presentan los parámetros ajustados a los datos experimentales para las ecuaciones seleccionadas, y se exponen gráficamente las curvas resultantes para las isothermas. Se estableció que la ecuación de Halsey modificada es la que mejor ajusta a los datos obtenidos. Adicionalmente, se discuten comparativamente los valores de estabilidad microbiana para almacenamiento, en base al valor de a_w igual a 0,7.

Palabras claves: maní, secado, isoterma, sorción

ABSTRACT

Sorption isotherms were experimentally determined for in shell peanuts, cv. Virginia Runner at four temperatures: 15, 25, 35 and 45 °C, i.e., in the practical drying temperature range. Measurements were carried out in an electronic water activity meter (Novasina), by the hygrometric method. The following models, preliminary chosen based on their proven ability to predict food isotherms, were fitted to the data by non-linear least squares: modified Chung-Pfost, modified Halsey, modified Oswin, GAB, and Nollist-Dumont, a modified version of the Smith model. Using the coefficient of determination (r^2) as parameter for establishing the goodness of fit, the

modified Halsey equation was selected as the most accurate to predict the experimental data. With this model, safe moisture contents for storage of in shell peanuts were calculated at different temperatures, using the criterion of water activity = 0,7.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maní es de importancia prioritaria para la zona del sur de Córdoba, y el estudio del comportamiento de su variedad mas difundida permitirá optimizar la simulación de los equipos de producción.

En la literatura se proponen varios modelos para la desorción de cereales y de oleaginosas. Entre ellas, los mejores ajustes suelen lograrse con modelos de tres parámetros, por adecuarse mejor al perfil sigmoide clásico en estos productos. En base a lo anterior, se seleccionaron, con el fin de ajustarlas a los datos experimentales del material de origen nacional, las ecuaciones de Chung-Pfost modificada, de Oswin modificada, de Henderson modificada, de Halsey modificada, y de Nellist-Dumont. Asimismo, se estudió el ajuste de la isoterma GAB, a través de una modificación que contempla la influencia de la temperatura. Los datos experimentales para el ajuste de parámetros se obtuvieron trabajando sobre maní de producción nacional, en base a un equipo que opera según el método higrométrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó sobre maní Virginia Runner, suministrado por una empresa acopiadora de la zona. Las muestras fueron secadas hasta distintos valores de humedad, y conservadas refrigeradas. Dado que los procesos de secado por lotes (discontinuo) se llevan a cabo a no mas de 32 °C, y que los secaderos continuos elevan la temperatura hasta los 40°, se decidió fijar las temperaturas experimentales en 15, 25, 35 y 45 °C, de modo de cubrir tanto los valores de trabajo en la operación de secado como las condiciones térmicas durante el almacenamiento.

Las determinaciones de equilibrio se realizaron a través del método higrométrico, mediante un equipo Thermoconstanter Novasina TH200. Las muestras incluyeron grano y cáscara en su proporción original, de modo de obtener equilibrios correspondientes a vaina llena de maní (cáscara mas grano). Una vez finalizada la determinación, se estableció la humedad final del material mediante secado en estufa, a 130 °C durante 3 horas y determinación de la pérdida de peso. Para las cuatro temperaturas, se determinaron un total de 55 puntos.

En todos los casos, el ajuste de parámetros se realizó por medio del software estadístico Systat. Las ecuaciones seleccionadas fueron las de Chung-Pfost modificada, Oswin modificada, Henderson modificada, Halsey modificada, de Nellist-Dumont, y la ecuación G.A.B. Las mismas se explicitan a continuación:

Ec. de Chung-Pfost modificada: $ME = -1/B * \ln(-(T+C)/A) * \ln(a_w)$

Ec. de Oswin modificada: $ME = (A+B*(T)) / (1/a_w - 1)^{(1/C)}$

Ec. de Henderson modificada: $ME = 0.01 * (-(\ln(1 - a_w) / (A*(T+C))))^{(1/B)}$

Ec. de Halsey modificada: $ME = -(EXP(A+B*(T)) / \ln(a_w))^{(1/C)}$

Ec. de Nellist-Dumont: $ME = A - B * \ln(1 - a_w) - C * \ln(T)$

El nivel de ajuste de las ecuaciones desarrolladas se estableció en base al coeficiente de determinación r^2 . Los valores hallados para los parámetros de estas ecuaciones se listan en la tabla 1.

Tabla 1. Ajuste a los datos experimentales, de las isotermas Chung-Pfost modificada, Oswin modificada, Henderson modificada, Halsey modificada, y Nellist-Dumont.

Modelo \ Parámetros	A	B	C	r^2 (corregido)
Chung-Pfost mod.	519,500	22,892	136,317	0,895
Oswin modificada	0,0669	-0,00015	2,382	0,938
Henderson modif.	0,00026	1,345	194,406	0,903
Halsey modif.	-5,800	-0,0042	2,000	0,946
Nellist-Dumont	0,04751	0,05584	0,00735	0,932

La ecuación G.A.B., resultado de una modificación propuesta por Anderson, de Boer y Guggenheim sobre la ecuación de BET, responde a la siguiente formulación básica:

$$ME = [W_m * C * k * a_w] / [(1 - k * a_w) * (1 - k * a_w + C * k * a_w)]$$

El proceso de ajuste de la ecuación G.A.B. se realizó en base a la modificación propuesta por Gely y Giner (1996), para superar las dificultades en la determinación del parámetro C, y al mismo tiempo contemplar la influencia de la temperatura.

En base a los datos experimentales, se ajustaron parámetros para la isoterma GAB a

cada una de las cuatro temperaturas disponibles. Los valores obtenidos para los parámetros C y k se exponen en la tabla 2 .

Se tomaron valores promedio para estos dos parámetros, resultando $C_m = 222,54$ y $k_m = 0,852$.

Utilizando estos parámetros, se ajustó la isoterma modificada de GAB propuesta por Gely y Giner, de la forma:

$$ME = [(a+b*T)*C_m*k_m* a_w] / [(1- k_m* a_w)*(1- k_m* a_w + C_m*k_m* a_w)]$$

obteniéndose para los parámetros a y b: $a = 0,0391$; $b = -10,1* 10^{-5}$

Tabla 2. Ajuste de la isoterma GAB para las cuatro temperaturas

Temperatura	W_m	C	k	r^2 (corregido)
15 °	0,034	792,52	0,918	0,894
25 °	0,037	42,627	0,834	0,922
35 °	0,035	48,161	0,859	0,883
45 °	0,045	6,767	0,797	0,846

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 1, la isoterma de Halsey modificada resulta ser la que mejor ajusta a los datos obtenidos, con un coeficiente de determinación r^2 de 0,946. Sin embargo, las demás ecuaciones muestran también valores muy cercanos.

En las Figuras 1 y 2 se muestran las curvas correspondientes a la temperatura de 35 °C, trazadas en base a los parámetros ajustados, y puede observarse una gran coincidencia entre las mismas.

En lo que refiere a valores de seguridad para almacenaje, para un valor de a_w igual a 0,7 establecido por razones de estabilidad microbiológica, los resultados muestran un alto nivel de coincidencia para las seis ecuaciones considerada. A modo de ejemplo, para la temperatura de 25 °C, los valores varían entre un máximo de 9,6 % (b.s.) suministrado por la ecuación de Cheng-Pfost modificada, hasta un mínimo de 8,7 % según la isoterma de Halsey modificada. Los valores de seguridad, para las isotermas estudiadas y las temperaturas ensayadas, se muestran en la tabla 3. Dado que hemos establecido que la ecuación de Halsey modificada es la mas representativa, por ser la que mejor ajusta a los datos experimentales obtenidos, el valor de humedad de seguridad para uso industrial correspondería a 8 % en base húmeda.

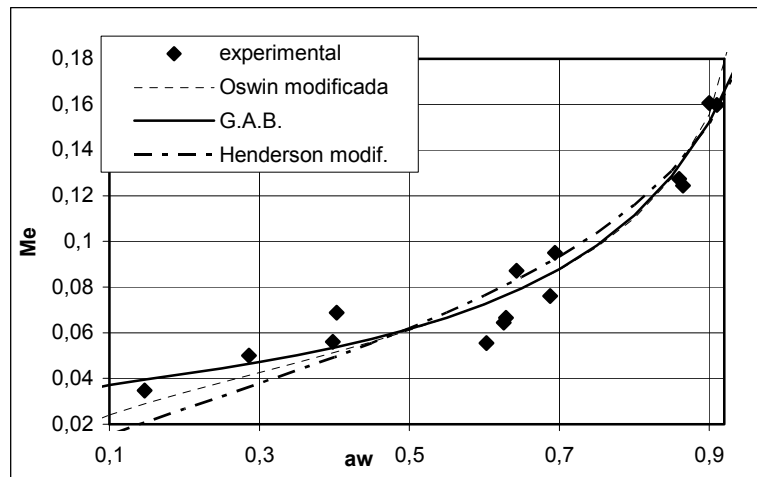


Figura 1. Ajuste a los datos experimentales, de las isothermas G.A.B., Oswin modificada, y Henderson modificada.

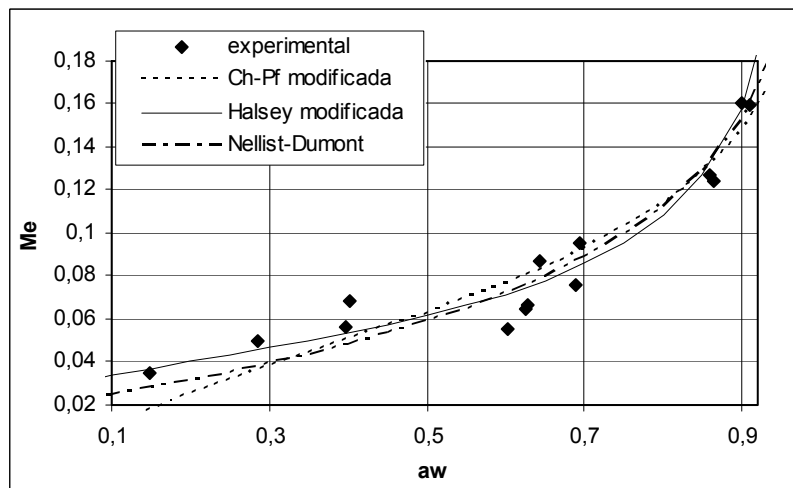


Figura 2. Ajuste a los datos experimentales, de las isothermas Chung-Pfost modificada, Halsey modificada, y Nellist-Dumont.

Comparación con datos publicados

En los estándares de la American Society of Agricultural Engineers (ASAE, 2001) se exponen datos de equilibrio de productos de origen agrícola, y entre ellos el maní en vaina llena. En la figura 3 se presenta gráficamente una comparación de la isoterma de Oswin modificada, para maní en vaina a 35 °C, utilizando parámetros presentados por ASAE, y utilizando parámetros desarrollados en este trabajo. El mismo documento de ASAE presenta una gráfica de contenido de humedad en base húmeda en función de humedad relativa, de donde resulta para la temperatura de 35 °C un valor de humedad de seguridad de 8,3 % b.h., lo que representa una buena correspondencia con el valor de 8 % b.h. encontrado en el presente trabajo.

Tabla 3. Humedad de la seguridad (b.s.) en función de la temperatura, según las distintas isotermas

Temperatura	15 °	25 °	35 °	45 °
Cheng-Pfost modificada	0,099	0,096	0,093	0,090
Oswin modificada	0,092	0,090	0,088	0,086
Halsey modificada	0,089	0,087	0,086	0,084
Nellist-Dumont	0,095	0,091	0,088	0,086
Henderson modificada	0,100	0,097	0,093	0,090
G.A.B.	0,093	0,090	0,088	0,085

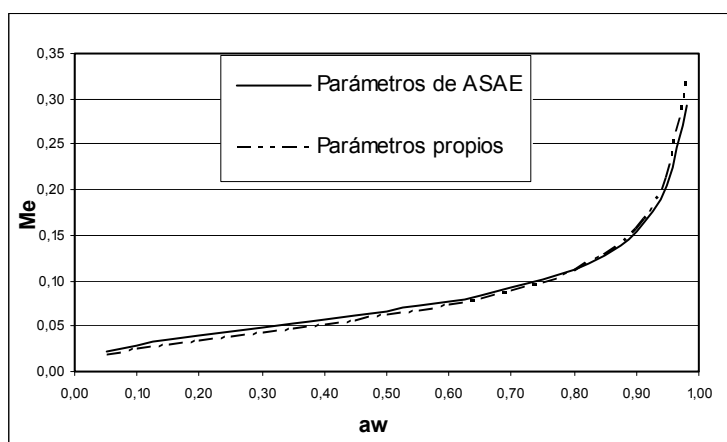


Figura 3. Comparación del uso de la isoterma de Oswin modificada, con parámetros publicados por ASAE, y con parámetros desarrollados en este trabajo, a 35 °C.

Por otra parte, en la comunicación de Chen (2000), se exponen parámetros de la isoterma de Halsey modificada, para grano, cáscara y vaina llena de maní. El trazado de la isoterma para vaina llena que resulta de esos parámetros se expone en la Figura 4, comparados con la curva resultante de utilizar los parámetros desarrollados en este trabajo.

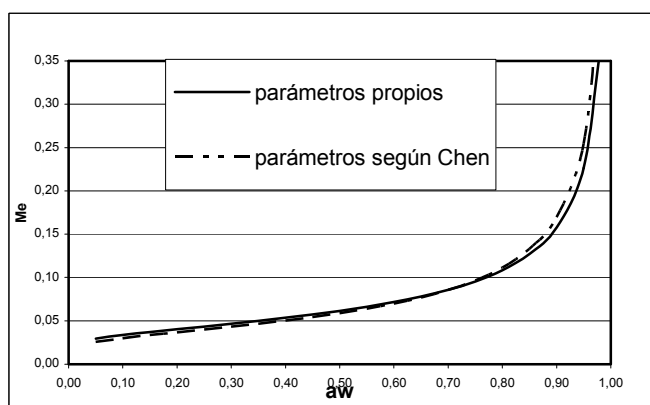


Figura 4. Comparación entre la isoterma obtenida y la establecida por Chen, para maní en vaina llena, a 35 °C.

CONCLUSIONES

El estudio realizado muestra que las ecuaciones disponibles en la literatura son capaces de describir adecuadamente el equilibrio de desorción para maní en vaina llena. Se determinó que entre los modelos ensayados, el que mejor aproxima los datos experimentales resultó el correspondiente a la ecuación de Halsey modificada.

Se observa una muy buena coincidencia entre las isotermas ajustadas según datos obtenidos a partir de maní de producción nacional, con respecto a la información existente en bibliografía en base a maní de origen norteamericano.

Nomenclatura

A, B, C	parámetros de las isotermas
a, b	parámetros de la ecuación G.A.B. modificada
a_w	actividad del agua, decimal
k	parámetro de la ecuación G.A.B. original
ME	humedad del material, decimal, base seca
T	temperatura, ° C
W_m	humedad de monocapa, ecuación G.A.B.

BIBLIOGRAFÍA

ASAE (2001). Moisture Relationships of Plant-based Agricultural Products. ASAE Standards D245.5 Jan01. Agricultural Engineering Yearbook, pp 522-538. St. Joseph, MI, USA.

Chen, Ch. (2000). A Rapid Method to determine the Sorption Isotherms of Peanuts. J. Agric. Eng. Res. **75**, 401-408

Gely, M.C. and Giner, S.A. (1996) Isotherms of Maize and Soybeans. Study of the GAB equation at different temperatures. Proceedings of the 6th Latin American Congress of Heat and Mass Transfer. Vol. II pages 1217-1222. Florianópolis, SC, Brazil.

CINÉTICA DE SECADO DE MANÍ. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA DEL AIRE, Y DE LA HUMEDAD INICIAL DEL GRANO EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIFUSIVIDAD EFECTIVA.

POTES Laura B.⁽¹⁾; PALACIOS Tomás R.⁽¹⁾; MONTENEGRO Raúl A.⁽¹⁾; Montero Verónica⁽¹⁾; GINER Sergio A.^(2,3,4)

⁽¹⁾Fac. de Ingeniería, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36, km. 603, Río Cuarto (5800) - Argentina E-mail: secado@ing.unrc.edu.ar

⁽²⁾CIDCA, Fac. de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata ⁽³⁾Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata ⁽⁴⁾Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

En el desarrollo de modelos de lecho fijo, para secado de maní, se requiere de cinéticas que representen adecuadamente las condiciones variables de un lecho industrial. En este trabajo se verifica si más allá de la adimensionalización de las humedades de maní con los valores iniciales y de equilibrio se podía encontrar una influencia definida de la humedad relativa y temperatura del aire de secado y humedad inicial del grano. Se realizaron experiencias a humedades iniciales del maní de 0,134; 0,189 y 0,215, base seca, para tres niveles de humedad relativa del aire: 45%, 55% y 65% a temperatura constante. Se encontró que la influencia de la humedad relativa del aire de secado puede neutralizarse por adimensionalización mientras que no ocurre lo mismo con la influencia de la humedad inicial del maní en vaina y temperatura. Los datos se ajustaron con un modelo difusivo de tiempo cortos para obtener la difusividad efectiva.

Palabras claves: secado maní, difusividad, capa delgada.

ABSTRACT

During the development of fixed bed drying models for in shell peanuts, one of the key steps is to introduce a suitable kinetic (thin layer drying) equation that help predict the variable conditions of a commercial dryer. In this work, the effect of variables as air temperature, relative humidity and initial moisture content was assessed. Kinetic experiments were carried out for initial in shell peanut moisture contents of 0.134; 0.189 and 0.215 d.b., each for three relative humidity levels: 45%, 55% and 65% at constant temperature. An analytical, short time diffusional model was applied to drying curves in order to determine water effective diffusivity of in shell peanuts. The influence of relative humidity was found to be adequately interpreted by expressing moisture content in

dimensionless form. However, this procedure does not account for the effect of the initial moisture content. The influence of temperature is strong and cannot be interpreted by the dimensionless moisture but by the dimensionless time.

INTRODUCCIÓN

El maní es un cultivo de gran importancia regional y el secado constituye una etapa crítica en el proceso de industrialización de esta oleaginosa, con consecuencias trascendentes sobre la calidad del producto. Se debe secar el producto completo (vainas llenas) y ello le confiere a esta operación características particulares. La humedad de cosecha del maní debe reducirse a alrededor de 9% b.h. para alcanzar un $a_w = 0,7$ que le permita ser microbiológicamente estable. El secado debe realizarse a baja velocidad y la temperatura no debe ser mayor a 35°C para evitar que se produzca deterioro de la calidad estructural de la semilla juntamente con pérdida de aromas y sabores característicos. (Cundiff et al, 1996).

El conocimiento de las relaciones entre velocidad de secado, condiciones iniciales de los granos y del aire es fragmentario y no se dispone todavía de un método integrado de diseño, optimización y control del proceso de secado. Para contribuir a estos fines, se están desarrollando modelos de lecho fijo que utilizan una ecuación cinética de transferencia de materia característica del grano. En estos estudios, se ha notado que los ensayos convencionales de cinética de secado pueden no representar adecuadamente las condiciones variables de un lecho fijo industrial, especialmente en lo concerniente a las humedades relativas del aire, que puede conducir al ajuste de parámetros cinéticos de limitada utilidad. Se analiza el efecto de la temperatura sobre la cinética y se verifica si más allá de la adimensionalización de las humedades de maní en vaina con los valores iniciales y de equilibrio existe una influencia definida de la humedad relativa del aire de secado y humedad inicial del grano, complementando el estudio de cinética de capa delgada realizado en un trabajo anterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material utilizado: Se seleccionaron muestras de maní en vaina tipo Virginia Runner, a las que se humectó artificialmente, partiendo de una humedad de recibo de 7% base húmeda. La humedad se determinó utilizando el método de la A.O.C.S, Ab 2-49(AOCS, 1994) .

Se tomaron nueve muestras de maní en vaina, de 600g cada una y se las rehumectó a distintos valores de humedad inicial para el secado. Para lograr una distribución uniforme

de la humedad dentro del grano se mantuvieron las muestras humectadas en recipientes plásticos herméticos, refrigeradas a 4°C, para evitar el deterioro por desarrollo de microorganismos. Los valores de humedades finales obtenidos fueron: 0,134; 0,189 y 0,215 decimal base seca.

Equipo: Para el secado en capa delgada se utilizó la bandeja para capa delgada de un secadero de planta piloto.

La cámara de secado consiste en una columna vertical de sección rectangular de dimensiones internas 320 x 350 x 355 mm. Uno de los lados de la columna posee 8 aberturas que permite ubicar (de abajo hacia arriba) un lecho de arena, para homogeneizar el flujo de aire, la bandeja para el secado en capa delgada y 6 recipientes en forma de cajones, con sus correspondientes bandejas, que aportan, estos últimos, una altura total de lecho de 1,20 m. para estudios de secado en lecho fijo.

Las dimensiones de la bandeja para el secado en capa delgada son 320 x 350 mm x 355 mm, está construida en acero inoxidable, tiene un fondo con perforaciones cuadradas (10 x 10 mm), y el aire pasa a través de ella de abajo hacia arriba. Para evitar que la presión de aire disminuya, por fugas de aire, todas las aberturas poseen burletes y la bandeja puede extraerse y reponerse con rapidez.

Este secadero consta de un ventilador centrífugo, de 1380 RPM, caudal máximo de 0,33 m³/s que impulsa el aire ambiente a través de todo el sistema. El aire, posteriormente circula por una tubería (diámetro interior: 104 mm) hacia una brida de orificio. Antes de ingresar a la cámara de secado, el aire es humectado y calentado. La humectación se realiza en un equipo, diseñado a tal efecto, consistente en una cámara en la que agua con nivel controlado, se evapora por el calor suministrado por resistencias de 10 KW. Estas resistencias son controladas a través de un autotransformador de salida variable, Variostat, con tensión de entrada 3x 380V y tensión de salida 3x (0-440) V. El aire humectado es calentado por tres módulos de resistencias eléctricas de (0.5 Kw cada una) reguladas con controlador digital PID (C), con termocupla tipo K, software compatible con windows.

El equipo permite la conexión de termocuplas para medir temperaturas del aire de secado, y del sólido conectados a un adquisidor de datos, como así también la temperatura del aire ambiente. Para este trabajo sólo se empleó la bandeja de capa delgada, para estudios de cinética de secado, con aire de condiciones controladas en humedad relativa y temperatura.

Las muestras a secar se colocaron en la bandeja de capa delgada del secadero. Esta bandeja permite una rápida extracción y reinsertión, sin ocasionar pérdidas de material. Se realizaron pesadas periódicas en una balanza digital, resolución 0,01 g.

Las muestras de vaina llena de maní y a las distintas humedades iniciales, se secaron a tres niveles de humedad relativa del aire de secado (45%, 55% y 65%) a una temperatura de 34 °C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 1 y 2 se muestran las condiciones de operación de las corridas realizadas, para maní en vaina con condiciones de humedad relativa del aire constantes y con temperatura del aire de secado constantes, respectivamente. En las diferentes columnas se muestra: humedad inicial de la vaina llena (W_o), temperatura de bulbo seco del aire a la entrada al secadero (T_a), temperaturas de bulbo seco y húmedo del aire ambiente (T_{bs} , T_{bh}), Humedad relativa del aire ambiente (H_{ra}), humedad relativa a la temperatura de secado (h_{rs}), humedad de equilibrio de vaina llena (Palacios y otros, 2001).

Los datos experimentales adimensionalizados, usando las condiciones de la tabla 2, de un trabajo anterior, (Potes y Giner, 2002) muestran en la figura 1 el importante efecto de la temperatura.

Tabla 1. Condiciones de operación para vaina llena de maní para humedades relativas del aire de secado constantes.

W_o dec.,b.s.	T_{bs} ° C	T_{bh} ° C	H_{ra} decimal	T_a ° C	Hr decimal	W_e dec.,b.s
0,134	19,56	14,40	0,570	34	0,45	0,0678
	18,72	14,44	0,788	34	0,55	0,0822
	26,00	17,95	0,470	34	0,65	0,0985
0,189	28,57	18,45	0,381	34	0,45	0,0678
	26,00	16,30	0,362	34	0,55	0,0822
	24,43	15,26	0,372	34	0,65	0,0985
0,215	21,83	15,64	0,537	34	0,45	0,0678
	20,58	16,80	0,687	34	0,55	0,0822
	23,70	14,90	0,387	34	0,65	0,0985

La influencia de la humedad relativa del aire de secado puede neutralizarse por adimensionalización, según puede verse en la figura 2 para una humedad inicial de vaina llena y tres niveles de humedad relativa del aire de secado.

El análisis de la figura 3 muestra que a medida que transcurre el tiempo de secado las curvas se separan, con mayores velocidades para mayores humedades iniciales de la vaina llena, lo que indicaría una influencia de la humedad inicial de la vaina llena, tal lo encontrado por Giner y Mascheroni (2002) y Giner y Gely (2005) para trigo y soja.

Tabla 2. Condiciones de operación para vaina llena de maní para temperaturas del aire de secado constantes

W_o dec.,d.b.	T_a ° C	T_{db} ° C	T_{wb} ° C	H_{ra} decimal	H_r decimal	W_e dec.,d.b.
0.1242	20	15.00	9.49	0.4830	0.3510	0.0565
	28	15.39	9.00	0.4274	0.1961	0.0339
	34	18.83	10.03	0.3028	0.1250	0.0212
	42	19.50	12.77	0.4653	0.1304	0.0199
0.1400	20	19.70	14.14	0.5571	0.5066	0.0815
	28	21.66	16.50	0.5966	0.4086	0.0633
	34	13.91	9.97	0.6111	0.1830	0.0298
	42	17.53	12.56	0.5736	0.1390	0.0218
0.1850	20	13.64	10.96	0.7254	0.4850	0.0743
	28	8.55	6.03	0.6856	0.1970	0.0355
	34	8.86	6.20	0.6702	0.1450	0.0248
	42	14.93	11.84	0.7032	0.1460	0.0236
0.2461	20	15.72	9.29	0.4130	0.3190	0.0524
	28	15.89	10.89	0.5512	0.2556	0.0442
	34	15.13	9.10	0.4548	0.1453	0.0248
	42	12.31	6.32	0.3960	0.0694	0.0068

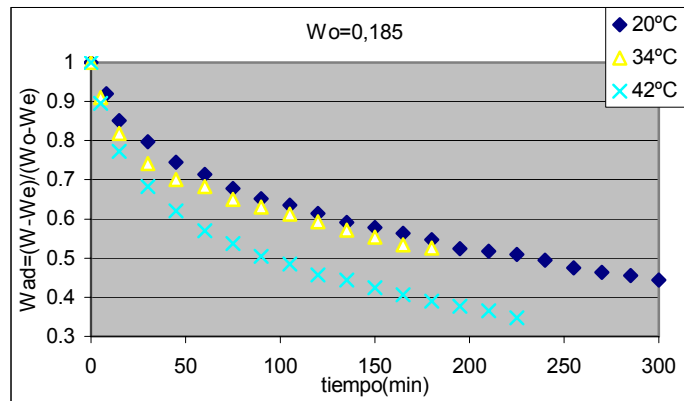


Figura 1. Humedad de los granos en función del tiempo para secado de maní a 20°C, 34°C y 42°C. Humedad inicial $W_o = 0,185$ dec. b.s.

Los datos experimentales obtenidos se interpretaron con un modelo analítico difusivo simplificado para tiempos cortos: ecuación de Becker (Giner 1999) que surge de la expansión en serie de Maclaurin de una solución para medio semiinfinito.

Para las áreas específicas a_{vo} de la ecuación se tomaron áreas esféricas equivalentes, utilizándose un valor promedio a partir de los datos medidos. Se ajustaron en un solo paso todos los datos de t , W_{ad} , W_o y T , con el software SYSTAT, utilizando el método de ajuste Quasi Newton.

La expresión utilizada fue:

$$W = W_e + (W_o - W_e) \left[1 - \frac{2a_{vo}}{\sqrt{\pi}} \sqrt{D \cdot t} + 0.331 \cdot a_{vo}^2 D \cdot t \right] \quad (1)$$

donde

$$D = D_0 \text{Exp} \left(- \frac{E_a}{R(T + 273.16)} \right) \quad (2)$$

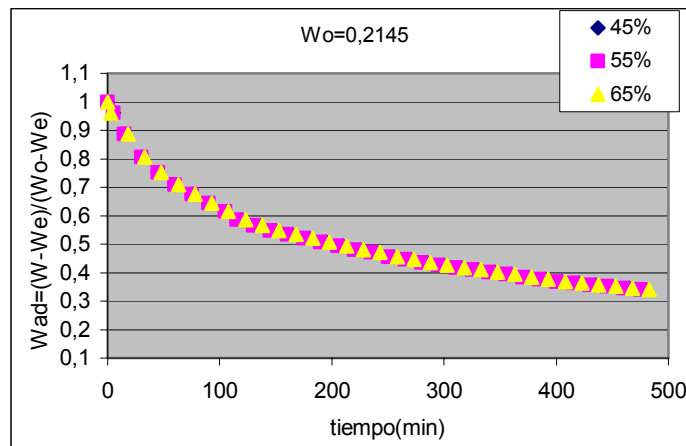


Figura 2. Humedad adimensional de los granos en función del tiempo para secado de maní 45%, 55% y 65%. Humedad inicial $W_o = 0,2145$ dec. b.s.

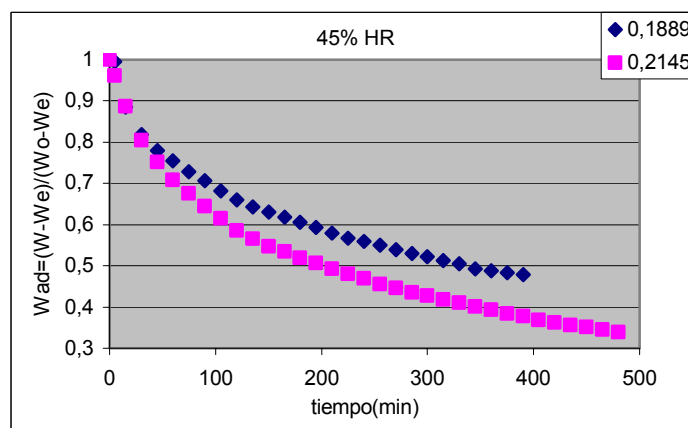


Figura 3. Humedad adimensional en función del tiempo para distintas humedades iniciales de maní en vaina para 45% HR de aire de secado y $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los valores obtenidos para D_0 y E_a fueron $1,37 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ y $5663,4 \text{ cal/mol}$, respectivamente con un valor de $r^2 = 0,912$. En la figura 4 se realiza una comparación de datos experimentales con el modelo propuesto para tres curvas de secado dimensionales,

para maní en vaina variando en forma simultánea humedad inicial y humedad relativa del aire de secado para una temperatura de 34°C.

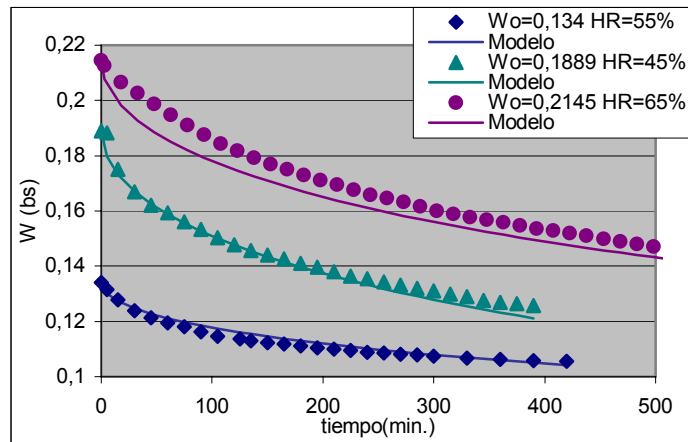


Figura 4. Humedad de maní en vaina para 34°C y tres condiciones de secado diferentes, de humedad inicial del maní y HR del aire de secado para datos experimentales y modelo .

CONCLUSIONES

La temperatura del aire de secado muestra una fuerte influencia en la cinética, mientras que el efecto de la humedad relativa del aire de secado puede neutralizarse por adimensionalización.

La humedad inicial de la vaina llena tiene una ligera influencia sobre el parámetro de transporte, resultados que deberían confirmarse a través de más experiencias para asegurarlo estadísticamente.

Los datos experimentales fueron muy bien ajustados por un modelo difusivo de tiempos cortos. El factor pre exponencial y la energía de activación obtenida por el ajuste fueron $1,37 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ y $5663,4 \text{ cal/mol}$, respectivamente .

NOMENCLATURA

a_{vo}	area específica	m^2/m^3
D	coeficiente de difusión efectiva	m^2/s
Do	factor preexponencial del coeficiente de diifusividad efectiva de la ecuación de Arrenihus	m^2/s
E_a	energía de activación de Arrhenius	
	J/mol	
W	humedad promedio, decimal base seca	kg /kg
W _e	humedad de equilibrio, decimal base seca	kg /kg

Wo	humedad inicial, decimal base seca	kg
/kg		
R	constante de los gases	
J/(mol K)		
t	tiempo	s
T	temperatura	°C

BIBLIOGRAFÍA

AOCS (1994) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist Society, AOCS Press, Champaign, IL.

Cundiff J., Baker K. 1996. "Curing Quality Peanuts in Virginia". Virginia Cooperative Extension. Virginia State University. Publication N°: 442-062.

Giner S., Mascheroni R. 2002. "Diffusive Drying Kinetics in Wheat. Part 2. Applying the Simplified Analytical Solution to Experimental Data. Biosystems Engineering 81(1), 85-97.

Giner S., Gely M. 2005. "Mass Transfer Parameters of Two Current Soybean Cultivars for Drying Simulation". Aceptado para publicación en *Empromer* 2005.

Giner S. 1999. Diseño de Secadora Continuas de Trigo. Simulación de Transferencia de Calor y Materia y de Pérdidas de Calidad. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de la Plata.

Palacios T, Potes L., Montenegro R., Giner S. 2001. "Estimación de humedad de equilibrio para el conjunto vaina-grano en maní de procedencia argentina". Proceedings, Octavo Congreso Latinoamericano de Transferencia de Calor y Materia. 307-310.

Potes L., Giner S. 2002. Cinética de Secado de Maní. Determinación de la Difusividad Efectiva con un Modelo Pseudohomogéneo Usando Datos Medidos. IX Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Editado en soporte electrónico área 2, trabajo 2.8.

ENERGÍA DE REPULSIÓN ELECTROSTÁTICA ENTRE PARTÍCULAS DE JUGO CLOUDY A DISTINTAS CONCENTRACIONES

GENOVESE, Diego B. y LOZANO, Jorge E.

PLAPIQUI (UNS-CONICET) Camino La Carrindanga Km 7, Bahía Blanca, Argentina.
Fax: (0291) 486-1600. E-mail: jlozano@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

La turbiedad de un jugo cloudy de manzana está constituida por partículas coloidales de carga negativa. La estabilidad de dicha turbiedad dependerá de la suma de fuerzas de interacción entre partículas. El objetivo del presente trabajo fue determinar una de estas fuerzas, la de repulsión electrostática, en función de la distancia entre partículas. A tal fin se determinaron las propiedades físicas de la fase líquida (constante dieléctrica, viscosidad, densidad, fuerza iónica y espesor de la doble capa eléctrica), así como las de la fase dispersa (potencial de superficie y radio medio de partícula) del jugo cloudy a distintas concentraciones. Si bien el potencial de superficie permaneció constante, se encontró que la energía de repulsión electrostática disminuye al aumentar la concentración de jugo, debido a la reducción de la constante dieléctrica del líquido y a la compactación de la doble capa eléctrica que rodea a las partículas.

Palabras Clave: jugo, turbiedad, partícula, coloidal, repulsión

ABSTRACT

Cloudy apple juice turbidity is constituted by negatively charged colloidal particles. Stability of that turbidity will depend on the sum of interaction forces between particles. The aim of the present work was to determine one of those forces, the electrostatic repulsion's one, as a function of inter-particle distance. With that purpose, physical properties of the liquid phase (dielectric constant, viscosity, density, ionic strength, and thickness of the electrical double layer) as well as those of the dispersed phase (particle's surface potential and mean radius) of cloudy apple juice at different concentrations were determined.

Although surface potential remained constant, it was found that electrostatic repulsion energy decreases at increasing juice concentrations, due to the reduction of the liquid's dielectric constant and the compactation of the electrical double layer surrounding the particles.

INTRODUCCIÓN

La turbiedad estable de un jugo opalescente de manzana (JOM) o “cloudy” está constituida por un fino material particulado que permanece en suspensión. Por lo tanto, el JOM puede modelarse como una poli-dispersión de partículas en una solución acuosa de azúcares, pectina, ácidos orgánicos y sales. Esta fase líquida o “suero” puede considerarse como una solución electrolítica de cationes metálicos (principalmente K^+) y una variedad de aniones orgánicos e inorgánicos. Por su parte, la fase dispersa está constituida por partículas coloidales de carga eléctrica negativa (Van Buren, 1989; Genovese and Lozano, 2004).

La carga superficial atrae los iones de carga opuesta (contraiones) del electrolito, y repele los iones de igual carga (co-iones), generando una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (McClements, 1999). Cuando dos partículas se aproximan, la interacción entre sus dobles capas genera una fuerza de repulsión electrostática. Si las partículas se aglomeran o no dependerá del balance total entre las fuerzas de atracción de Van der Waals, repulsión electrostática y repulsión por hidratación (Genovese and Lozano, 2004). La turbiedad será estable mientras las partículas permanezcan separadas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estimar la energía de repulsión electrostática (U_E) entre partículas de JOM a 25°C y distintas concentraciones de sólidos solubles (X [°Brix]).

Teoría

La expresión para calcular U_E en función de la distancia entre superficies de partículas (h) depende de la relación entre el radio medio de partícula (a) y el espesor de la doble capa eléctrica (κ^{-1}) conocido como la longitud de Debye. Para $\kappa \cdot a > 10$, y potenciales de superficie (ψ_0) independientes de h y menores de 25 mV (McClements, 1999; Quemada and Berli, 2002):

$$U_E(h) = 2\pi\varepsilon\psi_0^2 a \ln[1 + \exp(-\kappa h)] \quad (1)$$

donde ε es la permitividad de la fase líquida, calculada como $\varepsilon = \varepsilon_0 \varepsilon_r$, siendo ε_0 la permitividad en el vacío y ε_r la permitividad relativa o constante dieléctrica. En general se considera que ψ_0 es aproximadamente igual al potencial en el plano de corte, conocido como potencial zeta (ξ) (Overbeek, 1977; McClements, 1999). La longitud de Debye está dada por:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\varepsilon k_B T / 2eFI} \quad (2)$$

donde I es la fuerza iónica del electrolito, T es la temperatura, k_B y F son las constantes de Boltzmann y Faraday, respectivamente, y e es la carga electrónica elemental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del JOM y su suero

Se compró un cajón de manzanas de la variedad Granny Smith en el mercado de abasto local. Las manzanas fueron molidas y prensadas en nuestra planta piloto. El jugo de prensas fue calentado hasta 80°C mediante inyección de vapor vivo, para inhibir la actividad enzimática y microbiana. Después de enfriado, el jugo fue centrifugado (4200 g x 15 min) y filtrado (papel de filtro Whatman #1) para remover las partículas más grandes e inestables. Para separar su fase líquida, parte del JOM fue micro-filtrado a través de una membrana celulósica (E04WP04700, MSI, Westboro, MA) de 0.45 μm de paso. Tanto el JOM como el suero fueron concentrados bajo vacío hasta $X > 50^\circ\text{Brix}$ en un evaporador rotativo (Rotavapor R-151, Büchi, Switzerland), y posteriormente re-diluidos a 10, 20, 30, 40 y 50°Brix mediante reconstitución con agua destilada.

Medición de Propiedades Físicas

Las propiedades físicas del JOM y su suero en todo el rango de concentraciones fueron determinadas a 25°C, al menos por triplicado. El porcentaje de sólidos solubles (°Brix) se midió en un refractómetro Abbe Mark II (Reichert, USA). La movilidad electroforética (μ_E) del JOM fue medida en un analizador Malvern Zetasizer 3000 y convertida internamente a valores de ξ , por medio de la ecuación de Smoluchowsky (válida para $\kappa \cdot a \gg 1$):

$$\xi = (\eta/\varepsilon)\mu_E \quad (3)$$

donde η es la viscosidad del suero. En el mismo analizador se midió la distribución de tamaños de partículas del JOM de 10°Brix, por la técnica photon correlation spectroscopy (PCS). La viscosidad cinemática ($\nu = \eta/\delta$) del suero se midió en viscosímetros capilares de vidrio tipo Cannon-Fenske, previamente calibrados con agua destilada y soluciones de sacarosa (Wolf et al, 1987; Liley et al, 1999). La densidad (δ) del suero se determinó en un picnómetro de 45.70 ml de capacidad, previamente calibrado con agua destilada. Asumiendo que I es directamente proporcional a X , se aplicó la ecuación:

$$I = I_0(X\delta/X_0\delta_0) \quad (4)$$

donde I_0 es la fuerza iónica del JOM de 10°Brix (Genovese and Lozano, 2004). Para obtener ε en función de X , se combinaron datos de agua, jugo de manzana de 11.5°Brix

(Nelson and Bartley, 2002), y soluciones de sacarosa de 20, 40 y 60°Brix (Kent and Kress-Rogers, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La disminución de ε_r con X fue correlacionada con un polinomio cuadrático ($R^2 = 0.998$). Los valores calculados se muestran en la Tabla 1. Como se esperaba, tanto η como δ aumentaron con X (Tabla 1). En consecuencia, los valores de I (Eq.4) también aumentaron con X (Tabla 1). Siguiendo la Ec.2, el incremento en I y la reducción en ε produjeron una disminución de κ^{-1} con X (Tabla 1), que se explica como la compactación de la doble capa eléctrica por el aumento en la concentración del electrolito.

Tabla1. Propiedades físicas de la fase líquida del jugo cloudy a distintas concentraciones: constante dieléctrica, viscosidad, densidad, fuerza iónica y espesor de la doble capa eléctrica que rodea las partículas.

X	ε_r [-]	η [cp]	δ [g/cm ³]	I [mol/m ³]	κ^{-1} [nm]
10	76.21	1.405	1.037	20.58	2.089
20	72.49	2.353	1.080	42.91	1.411
30	67.35	4.372	1.128	67.10	1.088
40	60.78	9.488	1.180	93.51	0.875
50	52.79	25.38	1.233	122.3	0.713

A pesar del aumento del cociente η / ε (Eq.3), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de ξ a distintas concentraciones, lo que significa que los cambios en la fase líquida no modificaron la carga superficial de las partículas, y por lo tanto se tomó el promedio global, $\xi = -10.68 \pm 0.89$ mV.

Utilizando los valores precedentes y $a = 331 \pm 2$ nm (Eq.1), se calcularon los perfiles de $U_E(h)$ en unidades de energía térmica ($k_B \cdot T$) para las distintas concentraciones de jugo. Se puede observar (Fig.1) que U_E disminuye con X , debido principalmente a la reducción en ε , mientras que los cambios en κ^{-1} sólo afectan a las pendientes de las curvas.

CONCLUSIONES

La disminución de la energía de repulsión electrostática al aumentar la concentración del jugo cloudy no necesariamente implica una menor estabilidad, ya que ésta depende de la energía total de interacción entre pares de partículas. Por lo tanto, el objetivo de nuestros futuros trabajos será estimar las restantes fuerzas coloidales de interacción

(atracción de Van der Waals, repulsión por hidratación) y determinar su efecto sobre las propiedades del coloide (tales como estabilidad y viscosidad).

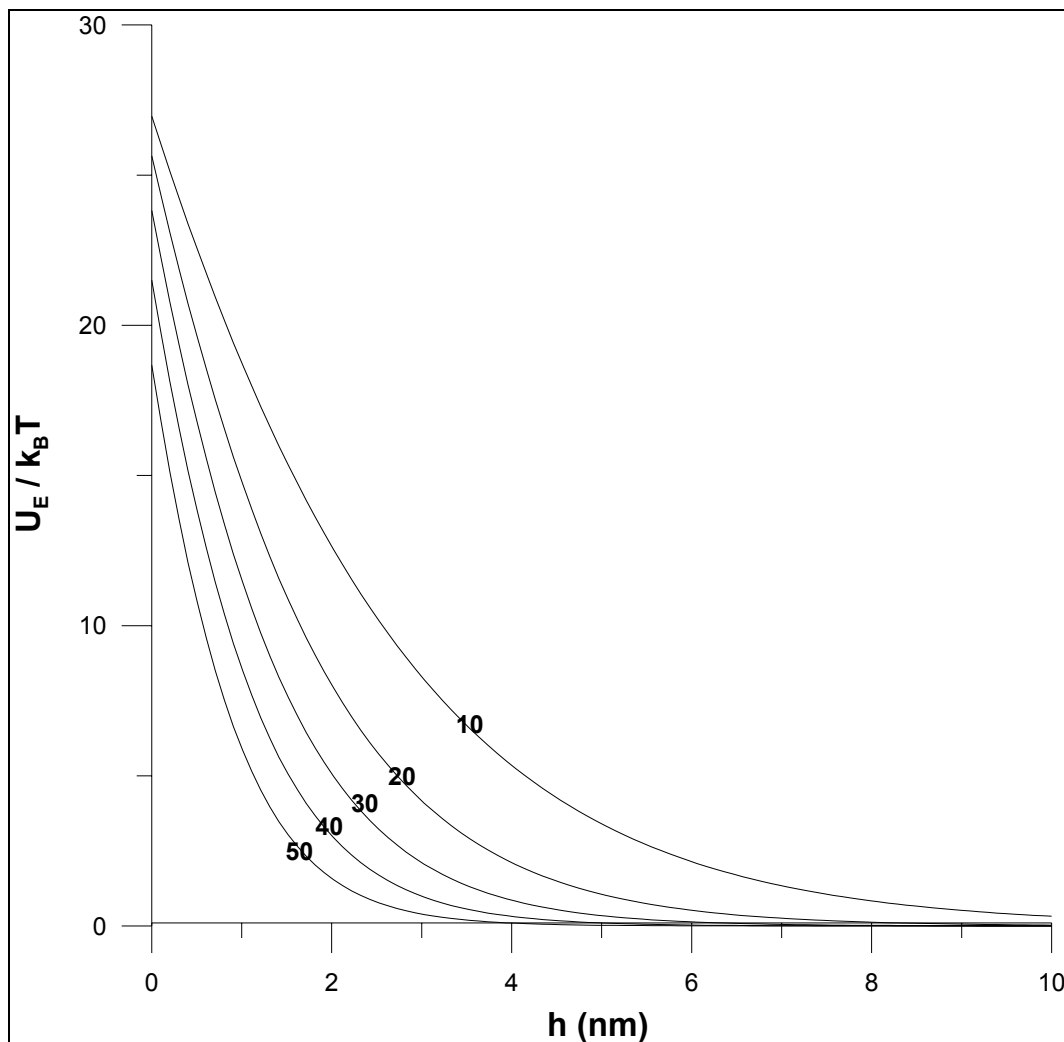


Figura 1. Energía de repulsión electrostática en función de la distancia entre pares de partículas de jugo cloudy a distintas concentraciones

BIBLIOGRAFÍA

Genovese, D. B. and Lozano, J. E. 2004. Stability of cloudy apple juice colloidal particles modeled with the extended DLVO theory. *Proceedings of Isopow 9*, Mar del Plata, Argentina.

Kent, M. and Kress-Rogers, E. 1987. The COST 90bis Collaborative Work on the Dielectric Properties of Foods. In *Physical Properties of Foods–2*. Elsevier, London.

Liley, P.E., Thomson, G.H., Friend, D.G., Daubert, T.E. and Buck, E. 1999. Physical & Chemical Data. En *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7th ed. R.H. Perry, D.W. Green and J.O. Maloney (Eds.), McGraw-Hill Companies, Inc.

McClements, D. J. 1999. Colloidal Interactions. In Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Nelson, S. O. and Bartley Jr., P.G. 2002. Frequency and Temperature Dependence of the Dielectric Properties of Food Material. *Transactions of the ASAE*, 45(4): 1223-1227.

Overbeek, J.Th.G. 1977. Recent Developments in the Understanding of Colloid Stability. En *Colloid and Interface Science*. M. Kerker, A.C. Zettlemoyer and R.L. Rowell (Eds.), Academic Press Inc., New York.

Quemada, D. y Berli, C. 2002. Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98: 51-85.

Van Buren, J. P. 1989. Causes and Prevention of Turbidity in Apple Juice. In *Processed Apple Products*. D.L. Downing (Ed.), Van Nostrand Reinhold, New York.

Wolf, A.V., Brown, M.G. and Prentiss, P.G. 1987. Concentrative Properties of Aqueous Solutions: Conversion Tables. En *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 68th ed. R.C. Weast, M. J. Astle and W. H. Beyer (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al subsidio PICT: 09-0816, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

PROPIEDADES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS DE ARROZ (Var. *NUTRIAR F.C.A. Y F.*)

PINCIROLI, María²; MARTÍNEZ, Nora¹; BEZUS, Rodolfo²; VIDAL, Alfonso² y AÑÓN, M. Cristina¹.

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criología de Alimentos (CIDCA) 47 y 115, 1900-La Plata, Bs. As. Argentina. Te.: 0221-4249287. ² Programa Arroz, Universidad Nacional de La Plata. Cc31,1900-La Plata, Bs. As. E-mail: mpincirol@ceres.agro.unlp.edu.ar

RESUMEN

En la actualidad se está incrementando la incorporación de fracciones de arroz como ingrediente alimentario y la utilización de harinas del grano integral. El propósito de este trabajo fue evaluar las diferencias de las propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de harinas provenientes de arroz pulido (P) e integral (I).

De acuerdo a análisis electroforéticos, los aislados proteicos I y P presentaron diferencias menores en su composición proteica, mostrando, sin embargo, diferencias en sus propiedades funcionales frente a la variación de pH. El aislado P presentó su máxima solubilidad a pHs ácidos (pH 2) y actividad espumante superior a pH 3 que en medio alcalino. Por otro lado, el aislado I, mostró mejores propiedades de solubilidad y espumado en medio alcalino. La muy buena actividad espumante de estos aislados en las condiciones mencionadas debe ser considerada en la elaboración de productos alimenticios que utilicen la harina de arroz como ingrediente.

ABSTRACT

The inclusion of rice seed fractions as food ingredients as well as the utilization of brown rice flour has increased during the last years. The purpose of this work was to study the differences in structural and functional properties of protein isolates prepared from integral (I) and polished seed (P) flours.

According to electrophoretic analyses, P and I isolates showed minor structural differences, nevertheless, they presented important differences in their functional properties under diverse pHs. The highest solubility of P isolate was displayed at acid media (pH 2) and its foaming activity was better at pH 3 than in alkaline media. On the other hand, the I isolate showed better solubility and foaming properties in alkaline than in acid media. These isolate foaming activities, under the indicated conditions, are good enough to be considered when food products including rice components are designed.

Palabras clave: Proteínas de arroz – glutelinas – capacidad espumante – aislados proteicos - electroforesis

INTRODUCCIÓN

El arroz constituye uno de los principales alimentos para el 60% de la población mundial, siendo la base de la alimentación en los países asiáticos donde la población tiene una tasa de crecimiento del 1.8% anual (Katsube–Tanaka *et al.*, 2004). En países occidentales se está incrementando el uso de este cereal como ingrediente en geles, helados y formulaciones para bebé debido a sus propiedades hipoalérgicas y a las características de su almidón que permite la formación de pasta blanda e incolora (Chastril, 1992).

Los componentes mayoritarios del endosperma del grano de arroz son el almidón (80%) y las proteínas (8%). Si bien las proteínas se encuentran en baja proporción, su calidad nutricional es elevada en comparación a otros cereales pues posee un alto contenido en lisina (Ju *et al.*, 2001). La fracción proteica mayoritaria, las glutelinas, tienen un peso molecular aproximado de 60 kD y consiste en una colección heterogénea de polipéptidos unidos por puentes disulfuro (Yamagata *et al.*, 1982 Zhao *et al.*, 1983). Bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, las glutelinas pueden disociarse en dos fracciones: polipéptidos ácidos y básicos con masas moleculares de 28,5-39 kD y 20-23 kD respectivamente (Snow and Brooks, 1987). Otras fracciones proteicas minoritarias del grano de arroz son las prolaminas y, aun en menor proporción, albúminas y globulinas. Las proteínas de almacenamiento, presentan una localización específica y diferencial en los tejidos del grano de arroz, siendo más abundantes en embrión albúminas y globulinas, mientras que glutelinas y prolaminas estarían ubicadas preferentemente en endosperma (Krishnan and Withe, 1997).

Si bien se conoce en profundidad la estructura, ubicación y síntesis de las proteínas de arroz (Larkins and Vasil, 1997), es muy escasa la información acerca de sus propiedades funcionales, habiéndose estudiado parte de la funcionalidad de las proteínas del embrión (Sawai and Morita, 1970).

El uso más difundido del arroz es como grano pulido constituido fundamentalmente por endosperma, aunque en la actualidad se está incentivando el consumo de arroz integral (endosperma más aleurona embrión y pericarpio). Las propiedades diferenciales de las proteínas de estos dos tipos de arroz no han sido hasta el momento estudiadas en profundidad y su conocimiento sería de gran utilidad para su inclusión como ingrediente en la industria alimentaria.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las diferencias entre las propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de harinas provenientes de arroz pulido (P) e integral (I) de la variedad Nutriar. Esta variedad posee un 30 % más de proteína que el promedio de las variedades cultivadas y ha sido obtenida en el marco del Programa Arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aislados. Se utilizó harina de arroz de la variedad Nutriar F.C.y F. de grano pulido (P) e integral (I), se realizó la extracción a pH 12 y se precipitó a pH 6. Los precipitados I y P se suspendieron en agua, neutralizaron y liofilizaron.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizaron de acuerdo la técnica descrita por Laemmli (1970) utilizando un equipo Bio-Rad modelo Mini Protean II. Se utilizaron geles con una concentración de acrilamida de 14% (p/v) con gel apilador de acrilamida de 4% (p/v).

Solubilidad. Se suspendieron las muestras (1mg/mL) en sistemas buffer de pHs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 y fuerza iónica $\mu = 50$ mM, y se mantuvieron por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. La concentración proteica del sobrenadante luego de centrifugar 20 min a 15.000g se determinó por el método de Lowry.

Espectrometría en el ultravioleta. Se determinaron los espectros de absorción en el UV de las soluciones provenientes de las medidas de solubilidad a distintos pH utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se realizaron barridos en el rango de longitud de onda de 210 a 310 nm, con un intervalo de lectura de 1 segundo y una velocidad de 120 nm/seg.

Actividad espumante. La capacidad de formar y estabilizar espumas de los aislados se determinó mediante el registro de la conductividad del líquido (Loisel *et al.*, 1993). Las espumas se formaron por burbujeo de N₂ (caudal 100 ml/min) a través de 6 ml de dispersiones 1 mg proteína total/ml en buffer de pH 3 y 9. Se determinaron la velocidad de incorporación de solución a la espuma, v_0 (en ml/seg) y el volumen máximo de líquido en la espuma (V_{max}), indicativos de la capacidad de formar espuma, y el tiempo que tarda en drenar el 50% del V_{max} ($t_{1/2}$) como medida de la estabilidad de la espuma. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de proteínas a partir de harinas de grano pulido (P) y de grano integral (I) mostró rendimientos similares, siendo los mismos de 9 ± 1 y $10,2 \pm 0,5$ g de proteína /100g de harina, respectivamente.

Ambos aislados fueron analizados mediante SDS-PAGE (Figura 1). De acuerdo a sus perfiles el componente proteico más abundante fue la glutelina, con polipéptidos de alrededor de 30 kD (A en la Figura) y 20 kD (B, en la Figura), presentando ambos una menor proporción de prolaminas (bandas de bajo peso molecular) y globulinas (bandas de variado peso molecular) (Snow and Brooks, 1987).

Sin embargo, la composición polipeptídica no fue exactamente la misma en ambos aislados ya que un polipéptido de alrededor de 20 kD (flecha blanca en la Figura) estaba casi ausente en el aislado I mientras que el aislado P presentó menor proporción de un polipéptido de 25 kD (flecha llena). Esto se puede explicar considerando la diferente composición en proteínas de reserva que contienen las capas más externas del grano (pericarpio y aleurona) con respecto al endosperma (Krishnan and White, 1997).

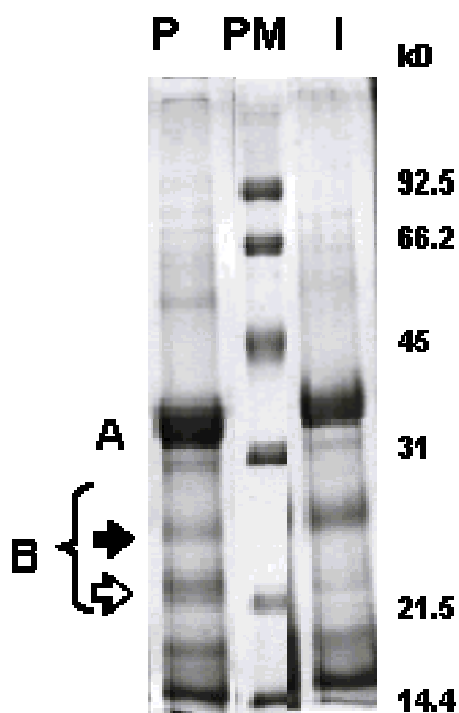


Figura 1. SDS-PAGE en condiciones reductoras de los aislados provenientes de grano pulido (calle P) e integral (calle I). Calle PM, proteínas patrón de peso molecular. A la derecha se muestran los valores de sus masas moleculares en kD.

Se analizó la solubilidad de los aislados a distintos pHs obteniéndose los resultados de la Tabla 1.

Si bien ambos aislados mostraron un comportamiento acorde con la presencia mayoritaria de glutelinas en su composición, con mayores solubilidades a pHs ácidos y alcalinos (celdas sombreadas en la tabla), los valores alcanzados por cada uno fueron diferentes. El aislado I mostró máxima solubilidad a pH 10 mientras que P, con menor solubilidad en medio alcalino, presentó el valor máximo a pH 2 (Tabla 1, filas con sombreado más oscuro). Estas diferencias podrían deberse a una mayor abundancia de globulinas en el aislado I ya que las mismas están preferentemente ubicadas en el embrión (Sawai and Morita, 1970). Ante esta posibilidad, se analizaron mediante SDS-PAGE las proteínas solubles e insolubles de los dos aislados a los distintos pHs. En La Figura 2 se muestran los respectivos perfiles. En ellos se puede observar que la intensidad de las bandas en los perfiles de solubles e insolubles son complementarios y concuerdan con los valores de la Tabla 1. Por ej, es notable la mayor intensidad de los perfiles de las proteínas solubles del aislado I a pHs 9, 10 y 11 y del aislado P pH 2. A su vez, en estos perfiles, las bandas más intensas son similares, tanto para I como para P, lo que sugiere que a esos pHs se solubilizan especies proteicas semejantes. Cabe mencionar que la proteínas solubles a pH 3 del aislado P contienen menor proporción de bandas de muy bajo y muy alto peso molecular (indicados con llaves en la Figura), que corresponderían a las globulinas, más abundantes en el aislado I.

Tabla 1. Solubilidad de los aislados P e I

pH	Solubilidad (%)	
	P	I
2	53,27 ± 3,9	31,55 ± 0,2
3	20,46 ± 2,9	10,45 ± 0,2
4	3,44 ± 0,6	1,59 ± 0,1
5	2,97 ± 0,5	0,94 ± 0,1
6	0,66 ± 0,2	0,73 ± 0,2
7	3,74 ± 0,4	0,21 ± 0,1
8	4,03 ± 0,5	5,58 ± 0,6
9	7,45 ± 0,6	49,05 ± 5,1
10	13,09 ± 0,7	60,38 ± 0,2
11	9,15 ± 0,76	47,91 ± 1,7

%= g de proteína disuelta /100 g de proteína.

Se analizaron los aislados solubles a los distintos pHs mediante espectroscopia en el UV, los espectros a los pHs de mayor solubilidad se muestran en la Figura 3.

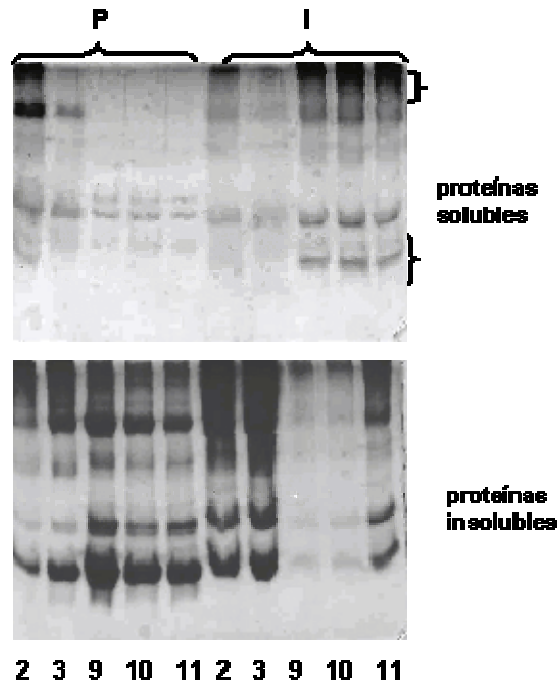


Figura 2. SDS-PAGE de proteínas solubles e insolubles a distintos pHs. Gel superior, proteínas solubles, gel inferior proteínas insolubles. Las calles de los dos gels están alineadas y se corresponden. Los números debajo de las calles indican los pHs en los que se encontraban las correspondientes proteínas. En la parte superior están indicadas las calles en las que se sembraron los aislados I y P respectivamente.

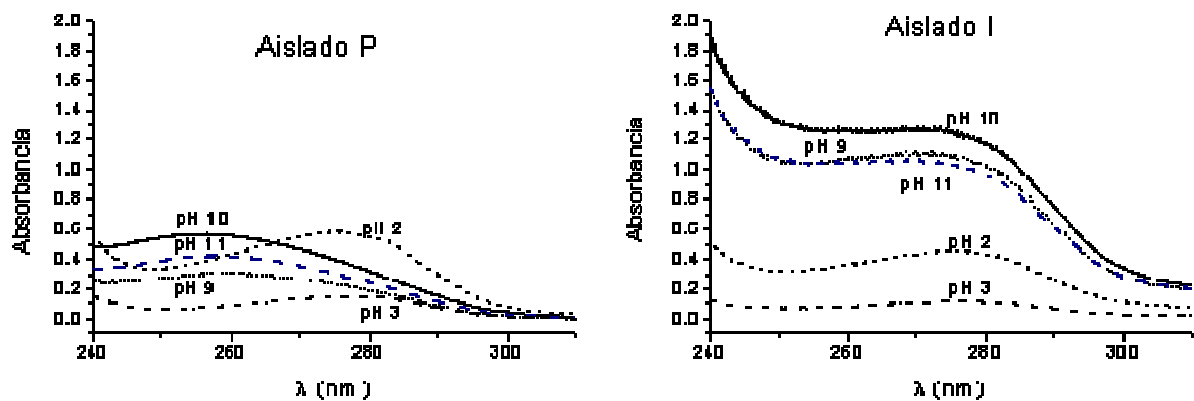


Figura 3. Espectros de absorción en el UV de aislados P e I disueltos en tampones cítrico/citrato pH 2 y pH 3, y tampones borato pHs 9, 10 y 11. Los pHs están indicados en los respectivos perfiles

Los valores de absorbancia alcanzados por el aislado I, mayores que los del aislado P, se correlacionan con su mayor solubilidad. Los espectros de I presentan similares valores de longitud de onda en el máximo de absorbancia (λ_{max}) lo que indicaría que en todos los casos es un mismo tipo de proteína la que está disuelta. La relación entre los valores de absorbancia alcanzados a los distintos pHs está de acuerdo con las solubilidades de I en cada condición (Tabla 1). Por otro lado, en el aislado P, los espectros a pHs alcalinos son diferentes a los de pHs ácidos. Aquellos presentan un máximo a $\lambda = 260$ nm indicando que el componente más abundante disuelto a esos pH correspondería a ácidos nucleicos. A partir de los espectros del aislado P, se puede observar un comportamiento diferencial de los ácidos nucleicos y las proteínas en cuanto a solubilidad a pHs ácidos y alcalinos, lo cual sugiere que no habría interacción entre el contaminante mencionado y las proteínas.

Se determinó la actividad espumante de los aislados a pHs 3 y 9, que fueron las condiciones menos extremas en que presentaron aceptable solubilidad. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 2 donde figuran los parámetros V_{max} y $t_{1/2}$ indicativos de la capacidad de formación de espuma y de la estabilidad de la espuma, respectivamente. Ambos aislados presentaron una buena actividad espumante a los pHs de máxima solubilidad (a pH 3 para P y a pH 9 para I) desarrollando espumas compactas, de burbujas esféricas y pequeñas. Los parámetros obtenidos (Tabla 2) fueron superiores a los mostrados por un aislado de soja en medio salino neutro (Jorge Ventureira, comunicación personal). Estos resultados indican la importancia de la presencia de proteína soluble para el desarrollo de espumas por proteínas de arroz. Sin embargo no afectarían a esta propiedad pequeñas diferencias en composición o solubilidad, como lo demuestran los resultados anteriores.

Tabla 2: Capacidad de formación y estabilidad de las espumas de los aislados I y P a distintos pHs

Aislado	pH	V_{max} (ml)	$t_{1/2}$ (minutos)
P	3	$4,7 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,4$
P	9	$1,3 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$
I	3	$1,8 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
I	9	$5,1 \pm 0,1$	$2,52 \pm 0,05$
Soja buffer A*	7,5	2,96	0,76

*Jorge Ventureira, comunicación personal

CONCLUSIONES

Dos aislados proteicos provenientes de harina integral (aislado I) y de harina de grano pulido (aislado P) presentaron diferencias menores en su composición proteica, las cuales, sin embargo, se reflejaron en diferencias funcionales frente a la variación de pH. El aislado P presentó su máxima solubilidad a pHs ácidos (pH 2) y actividad espumante superior a pH 3 que en medio alcalino. Por otro lado, el aislado I, mostró mejores propiedades de solubilidad y espumado en medio alcalino. La muy buena actividad espumante de estos aislados en las condiciones mencionadas debe ser considerada en la elaboración de productos alimenticios que utilicen la harina de arroz como ingrediente.

BIBLIOGRAFIA

- Chastril J. 1992.** Correlation between the physicochemical and functional properties of rice. *J. Agric. Food Chem.*, 40 (6) pp 1683-1686.
- Ju Z. Y., Hettiartachchy N.S., and Bath N. 2001.** Extraction, Denaturation and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *J. Food Sci.*, 66(2) pp 229-232.
- Katsube-Tanaka T., Duldulao J.B.A., Kimura Y., Iida S., Yamaguchi T., Nakano J. and Utsumi S. 2004.** The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. *Biochim. Biophys. Acta* 1699 pp 95-102.
- Krishnan H. B. and White J. A. 1997.** Protein body formation and immunocytochemical localization of globulins and glutelins in developing rice. (*Oryza sativa L.*) embryos. *Crop Sci.*, 37 pp 932-939.
- Larkins B.A. and Vasil I.K. 1997.** Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. Ed. Kluwer Academic Publishers.
- Loisel W., Guéguen J. and Popineau Y. En: Food Proteins. Structure and functionality. 1993.** K. D. Schwenke and R. Mothes, Eds. VCH Weinheim. Germany. pp 320-323.
- Sawai H. and Morita Y. 1970.** Studies of γ globulin of rice embryo. Part II. Separation of three components of γ globulin by ion exchange chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 34, pp. 53
- Snow S.D. and Brooks J.R. 1987.** Fractionation of Rice Glutelin Polypeptides using gel Filtration Chromatography. *J. Food Sci.* 54 (3) pp 731-735.
- Yamagata H., Sugimoto T., Tanaka K. and Kasai Z. 1982.** Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.* 70: 1094.

Zhao W., Gatehouse J.A. and Bouter D. 1983. The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains, homology to pea legumin. FEBS Lettr. 162: 96

INFLUENCIA DE PROTEÍNA DE SOJA HIDROLIZADA Y SIN HIDROLIZAR EN GELES DE κ -CARRAGENANO

TRINKS, Fernando P., PILOSOFF, Ana.M.R.

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina. Tel.: +54 (011) 4756-3377. E-mail: apilosof@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Las proteínas de soja hidrolizadas (PH) y sin hidrolizar (PS) junto al κ -carragenano (κ C) son ingredientes ampliamente utilizados en la industria para otorgar un conjunto de propiedades funcionales de las cuales algunas (dureza, temperatura de gelificación, temperatura de fusión, viscoelasticidad, etc) fueron estudiadas.

Se observa en los sistemas κ C/PH respecto de κ C/PS: una disminución de la dureza, aumento de adhesividad, de elasticidad, aumento de temperatura de gelificación, disminución de temperatura de fusión, aumento de viscoelasticidad.

Los diagramas de fase a pH neutro mostraron una zona de mayor compatibilidad entre proteínas y polisacáridos para los sistemas con proteína hidrolizada. La incompatibilidad entre κ C y proteína de soja es la causa de la sinergia observada en las propiedades texturales y térmicas de los geles.

Palabras clave: proteína de soja, hidrólisis, carragenano, propiedades funcionales, separación de fases.

ABSTRACT

Hydrolyzed soy proteins (PH) and non hydrolyzed soy proteins (PS) mixed with κ -carrageenan (κ C) are widely used ingredients in the food industry.

They are employed to achieve certain functional properties; among them some (i.e.: hardness, gelling and fusion temperature, viscoelasticity) were studied. It is observed in κ C/PH systems in comparison to κ C/PS a drop in hardness and in melting temperature and a raise in gelling temperature, viscoelasticity, adhesivity and elasticity.

At neutral pH, phase diagrams showed a greater compatibility zone between proteins and polysaccharides in systems where protein had been hydrolyzed.

INTRODUCCIÓN

El κ -carragenano (κ C) es un polisacárido extraído de las algas rojas ampliamente utilizado en la industria principalmente como gelificante, espesante y estabilizante.

Forma geles termorreversibles en presencia de cationes (Tziboula y Horne, 1998; Ould Eleya y Turgueon, 2000). Puede ser utilizado para la estabilización y formación de estructura de productos refrigerados, por ejemplo mousses, emulsiones, helados, derivados lácteos, etc.

Las proteínas de soja se utilizan en análogos de productos lácteos, pastas, alimentos para infantes, panadería, snacks, sopas, derivados cárnicos y otros alimentos, (Hoogenkamp H. W., 1995). Esto es posible debido a sus múltiples propiedades funcionales como ser textura, elasticidad, estructura, ligazón (agua, grasas), gelificación, regulación de viscosidad, emulsificación y propiedades nutricionales como también organolépticas sin olvidarse de su bajo costo, bajo contenido en calorías y grasas. La hidrólisis de estas proteínas y su uso en combinación con polisacáridos, posibilitan el mejoramiento de productos de mayor calidad nutricional y funcional. La hidrólisis enzimática produce una reducción del tamaño molecular y cambios en la polaridad que se traducen en un aumento de solubilidad proteica. Así mismo la hidrólisis más extensa puede reducir la alergenicidad (Millán et al., 2000).

Las soluciones acuosas de mezclas de biopolímeros por encima del pH isoelectrico de la proteína son susceptibles a una separación de fases lo cual influye en el comportamiento complejo de estas mezclas (Norton y col., 2003).

Dada la limitación de conocimientos con respecto a las interacciones entre biopolímeros, especialmente proteínas-polisacáridos, el presente trabajo se enfoca en el estudio de las mezclas de κ -carragenano (κ C) con proteína de soja sin hidrolizar (PS) e hidrolizada (PH) y las propiedades funcionales derivadas de las interacciones entre los mismos (dinámica de gelificación, fusión y textura).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó κ -carragenano (Sanofi Bioindustrias, Argentina) al 1,0% (p/v) en búffer 5 mMol/L KH_2PO_4 / K_2HPO_4 pH = 7,0. Se calentó la solución a 60°C durante 20 minutos (Baeza y col., 2001). Se usaron dos tipos de aislado de proteína de soja (Samprosoy, Brasil): 90 NB y 90 HI. La proteína 90 NB se hidrolizó hasta un 5% de grado de hidrólisis (DH) (Zylberman, Pilosof 2002). Se dispersan en agua destilada a 4% y 12% (p/v). Los sistemas mixtos fueron luego obtenidos mezclando los componentes individuales en relación 1:1 a una temperatura de 60°C.

Se realizaron determinaciones reológicas para evaluar las temperaturas de gelificación, fusión y viscoelasticidad. Se utilizó un reómetro dinámico marca Paar Physica (MCR 300) de plato paralelo PP30/s, diámetro 29,95 mm. Las muestras fueron previamente calentadas a 50°C y luego volcadas sobre el plato base calentado a la misma temperatura.

La temperatura de gelificación se determinó construyendo una rampa de enfriamiento desde 50°C hasta 5°C (2,25 °C/min) usando una frecuencia de 1Hz y deformación de 0,01%. Luego se mantuvo ese valor de temperatura constante durante 3 minutos variando la frecuencia variable (frec. 5 a 0,05 hz, deformación 0,01%, tiempo 2,5 minutos). A continuación, para obtener la temperatura de fusión, se usó una rampa de calentamiento de 5°C hasta 50°C (2,25°C/min) a frecuencia y deformación constantes (Baeza y col., 2002). La temperatura a la cual el módulo elástico y viscoso se cruzaron fue tomada como el punto gel. La temperatura de fusión fue establecida de manera análoga cuando los dos módulos se cruzaron nuevamente durante el calentamiento. La viscoelasticidad relativa fue determinada como $\tan \delta$ (G''/G') donde G'' es el módulo viscoso. Se reporta el promedio de muestras por duplicados.

Se realizó un análisis de perfil de textura sobre geles cilíndricos de 19 mm de diámetro y 15 mm de altura usando un equipo Stable Micro Systems TA-XT2i con un cabezal cilíndrico de 36 mm de diámetro a una velocidad 0,5 cm/s, compresión 30% y fuerza detonante 2 grs. Los parámetros estudiados fueron dureza, adhesividad y elasticidad. Las muestras se dejaron previamente al análisis a 25°C. Se reporta el promedio de muestras por duplicados.

Para la determinación del diagrama de fases de los sistemas PS-κC y PH-κC se vertieron muestras de 10 ml de mezclas de diferente concentración inicial de PS o PH y κC (previamente calentadas a 60°C) en tubos falcon los cuales fueron llevados a 45°C durante 24 hs (Langendorff y col., 2000) Luego se registraron los volúmenes separados de cada fase y se determinó proteína y polisacárido en las distintas fases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El calentamiento de dispersiones de κC por encima de 60°C, produce la hidratación del polisacárido y la molécula adopta una conformación de “cadena al azar” (random coil). En presencia de proteína de soja sin hidrolizar (PS), se observa una separación de fases debida a la incompatibilidad termodinámica entre ambos biopolímeros (Tolstoguzov, 2003). El diagrama de fases (**Figura 1**) muestra la curva binodal, por debajo de la cual las mezclas forman sistemas de una sola fase. Por encima de la misma se separan en una

fase superior rica en κ C y una inferior rica en proteína. La hidrólisis de la proteína (PH) aumenta el rango de compatibilidad de los biopolímeros, debido a al menor tamaño molecular.

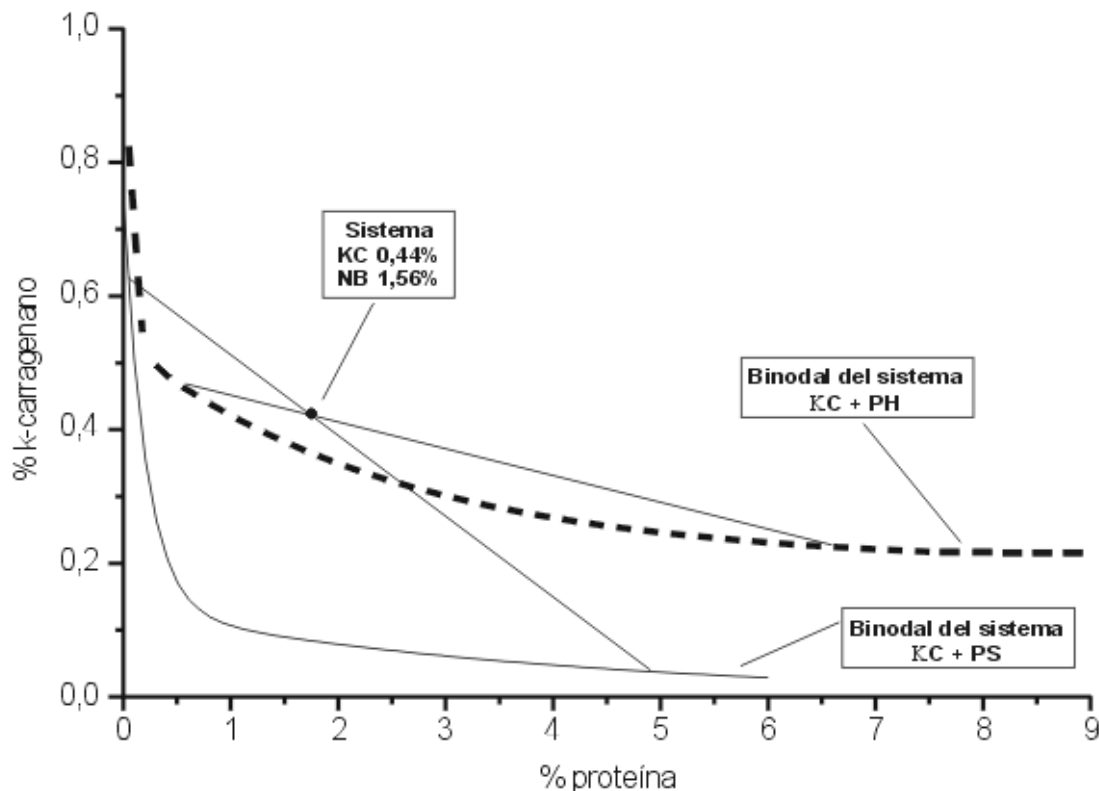


Figura 1. Diagrama de fases

Durante el enfriamiento de las mezclas ocurre la transición “cadena al azar” a “hélice” (coil-helix) del κ C a la temperatura de gelificación. La **Tabla 1** muestra las temperaturas de gelificación y posterior fusión para los geles de κ C solo y las mezclas de κ C + PS (NB y HI) y mezclas de κ C + PH (sólo NB).

Se observa un aumento en ambas temperaturas en los sistemas mixtos respecto de κ C solo. No se observaron diferencias significativas entre los sistemas conteniendo HI o NB. Los efectos sinérgicos entre PS y κ C en la gelación se deben a incompatibilidad termodinámica que produce una concentración de ambos componentes (**Figura 1**). La hidrólisis de la proteína NB produce un incremento ulterior entre 4 y 7°C de Tgel que podría atribuirse a alguna interacción específica debido al aumento de la polaridad de los polipéptidos formados que pueden favorecer el complejamiento a través de los grupos SO_4^- del κ C.

Los ensayos de viscoelasticidad (**Tabla 1**) muestran que el agregado de proteína aumenta el carácter viscoelástico de los geles de κ C. Existe una disminución de $\tan \delta$ en los geles con PH respecto a PS, aumentando de esta forma la viscoelasticidad. Los ensayos de textura de los geles muestran que la dureza es ligeramente mayor en el caso de las mezclas κ C-NB sin hidrolizar que en las mezclas con PH. La adhesividad y elasticidad de los geles se incrementa visiblemente en la mezcla con PH (**Tabla 2**). Los parámetros de dureza y adhesividad se vieron fuertemente incrementados en las muestra con proteínas, ya sean PH o PS, respecto del polisacárido solo, mientras que para la elasticidad el k-carragenano aislado se comporta de forma similar a la mezcla con proteína hidrolizada (**Tabla 2**).

Tabla 1. Temperatura de gelificación y fusión de geles y viscoelasticidad relativa ($\tan \delta = G'' / G'$) de κ C y de los sistemas mixtos.

Muestra	T° gel	T° fusión	G'	G''	$\tan \delta$
κ C 0,5%	18,61 ± 0,01	36,33 ± 0,01	49 ± 3	7,5 ± 1,0	0,152 ± 0,062
κ C 0,5% + HI 2%	21,25 ± 0,01	43,95 ± 0,44	143 ± 2	13 ± 1	0,091 ± 0,002
κ C 0,5% + HI 6%	23,86 ± 0,01	45,6 ± 1,0	491 ± 11	40 ± 1,2	0,081 ± 0,004
κ C 0,5% + NB 2%	20,45 ± 0,01	43,23 ± 0,5	151 ± 1	14 ± 1	0,101 ± 0,003
κ C 0,5% + NB 6%	25,05 ± 0,01	46,8 ± 1,3	501 ± 30	47 ± 1,3	0,094 ± 0,002
κ C 0,5% + NB (H) 2%	27,80 ± 0,01	42,22 ± 0,55	215 ± 2	9,3 ± 0,2	0,043 ± 0,001
κ C 0,5% + NB (H) 6%	29,65 ± 0,01	43,25 ± 0,44	430 ± 5	18,5 ± 0,5	0,0428 ± 0,001

(H): proteína hidrolizada (DH = 5%)

Tabla 2. Parámetros de textura de geles de κ C y de los geles mixtos

Muestra	Dureza	Adhesividad	Elasticidad
κ C 0,5%	27,25 ± 2,5	- 0,67 ± 0,02	0,97 ± 0,03
κ C 0,5% + NB 2%	42,80 ± 0,02	-1,63 ± 0,07	0,84 ± 0,04
κ C 0,5% + NB 6%	51,93 ± 0, 66	-3,83 ± 0,07	0,870± 0,002
κ C 0,5% + NB (h) 2%	38,40 ± 0,78	-2,22 ± 0,04	0,99 ± 0,01
κ C 0,5% + NB (h) 6%	50,61 ± 0,41	-5,18 ± 0,07	0,96 ± 0,05

CONCLUSIONES

La existencia de incompatibilidad entre el κ C y las proteínas de soja facilita la gelificación del κ C y permite controlar las características térmicas y texturales de los geles. La hidrólisis limitada de la proteína promueve aún más la gelificación del κ C (a mayores temperaturas) y otorga mayor carácter viscoelástico. El sinergismo observado entre ambos biopolímeros puede ser aplicado en formulaciones alimentarias específicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero de la Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

Baeza, R. ; Carp, D.J.; Martelli, P. and Pílosof A.M. Mixed Biopolymer Gels Of κ -Carragenan And Soy Protein Isolate. D. Renard, G. Della Valle and Y. Popineau (Eds.). The Royal Society Of Chemistry, p. 190-200 (2001).

Baeza, R. ; Carp, D.J.; Pérez, O.E.; and Pílosof A.M. κ -Carrageenan-Protein Interactions: Effect of Proteins on Polysaccharide Gelling and Textural Properties. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie (35), p. 741-747 (2002).

Hoogenkamp H. W. Proteína Vegetal: Valor Tecnológico En Alimentos Cárnicos, Avícolas y Vegetarianos. Protein Technologies International Inc., p. 27-28 (1995).

Langendorff, V.; Cuvelier G.; Michon, C.; Launay, B.; Parker, A.; De Kruif, C. Effects of Carrageenan Type On The Behaviour Of Carrageenan / Milk Mixtures. Food Hydrocolloids, 14, p. 273-280 (2000).

Millán, F.; Vioque J; Sánchez-Vioque R.; Clemente A.; Pedroche J.; Bautista J. Hidrolizados Proteicos Para La Preparación De Alimentos Específicos. Millán, F.; Vioque J; Bautista J. (Eds.), Jornada Internacional Sobre Proteínas Alimentarias. Universidad de Sevilla, p. 99-108 (2000).

Norton, I.T.; Frith, W.J. Phase Separation In Mixed Biopolymer Systems. Dickinson E. and Van Vliet T. (Eds.), Food Colloids: Biopolymers And Materials, The Royal Society Of Chemistry, p. 282-296 (2003).

Ould Eleya, M.M. ; Turgueon, S.L. Rheology Of κ -carrageenan and β -lactoglobulin Mixed gels. Food Hydrocolloids, 14, p. 29-49 (2000).

Tolstoguzov, V. B. Some Thermodynamic Considerations In Food Formulation. Food Hydrocolloids, 17, p. 1-23 (2003).

Tziboula, A. ; Horne, D.S. Influence Of Milk Proteins On Gel Transition Temperature And Mechanical Properties Of Weak κ -carrageenan Gels. Williams, P.A. ; Phillips, G.O. (Eds.), Gums And Stabilizers For The Food Industry, The Royal Society Of Chemistry, p. 202-211 (1998).

Zylberman, V.; Pilofof, A.M. Relationship Between The Glass Transition, Molecular Structure And Functional Stability Of Hydrolyzed Soy Proteins. Levine, H. (Ed.), Amorphous Food And Pharmaceutical Systems, The Royal Society Of Chemistry, p. 158-167, (2002).

EFECTO DE LA PRESENCIA DE AZUCARES SOBRE LA ESTABILIDAD DE CLARA DE HUEVO DESHIDRATADA Y SUS PROPIEDADES DE ESPUMADO

CARP, Dina J.^(1,3) y PILOSOFF, Ana M.R.^(2,3)

¹ Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ingeniería, ² Universidad Nacional de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, 1428 – Buenos Aires. T.E.: 0541-4576-3377, FAX: 0541-4576-3366, email: amiodosky@intramed.net.ar

RESUMEN:

Se estudió el efecto de sacarosa y trehalosa en la estabilidad de clara de huevo deshidratada (CH) almacenada a baja actividad de agua ($A_w = 0,22$). La temperatura de almacenamiento de 45°C, fue superior a la temperatura de transición vítrea (T_g) para CH sola, pero no para el resto de los sistemas donde se observó un incremento de T_g .

Se observó una disminución de la velocidad de pardeamiento (60%) en presencia de ambos azúcares. Se evaluaron las propiedades de espumas producidas por batido. A tiempos cortos de almacenamiento, un cierto grado de desnaturalización de la CH favoreció la estabilidad al drenaje de la espuma y el volumen de espumado. Ambos azúcares retardaron inicialmente dicho mejoramiento, debido a un efecto protector sobre la desnaturalización de la proteína. El efecto presentado por la trehalosa fue mayor. La sacarosa sólo protegió a tiempos cortos, posiblemente debido a una posterior hidrólisis de la misma durante el almacenamiento.

Palabras claves: clara de huevo – estabilidad - trehalosa – sacarosa – espumas – transición vítrea

ABSTRACT:

The effect of trehalose and sucrose, on the storage stability ($A_w = 0.22$) of dry egg white (EW) was studied. Storage temperature, 45°C; was higher than the glass transition temperature (T_g) for egg white alone, but not for the others systems, because an increase in T_g was observed. A great decrease in the browning rate (60%) was observed in the presence of sugars. At short times, a little degree of protein denaturation increased drainage stability and foam volume of foams made by whipping. These increments were initially delayed by the presence of sugars, probably due to a protection effect on the

denaturation process. Trehalose effect was greater. Sucrose only protected at short times, probably because an hydrolysis process during storage.

INTRODUCCIÓN

La clara de huevo es ampliamente utilizada como ingrediente funcional en numerosos productos alimenticios (merengues, suflés, bizcochos, tortas, mousses, etc.) debido a sus excelentes propiedades espumantes. Es habitual su comercialización en estado deshidratado, sola o en preparaciones con otros componentes.

El proceso de deshidratación o el almacenamiento posterior puede producir una pérdida de la funcionalidad de la clara de huevo por lo cuál se hace necesario desarrollar estrategias para su estabilización. En el presente trabajo, se estudió el efecto de azúcares no reductores, sacarosa y trehalosa sobre la conservación de las propiedades de espumado de clara de huevo deshidratada.

Existen dos hipótesis para explicar los mecanismos por los cuales los azúcares protegen la integridad de los biomateriales: una sugiere que la habilidad para estabilizar las proteínas durante la deshidratación se debe a la formación de uniones por puentes de hidrógeno entre los azúcares y las proteínas, reemplazando moléculas de agua cuando ésta es removida, manteniendo la estructura terciaria de la proteína y previniendo la desnaturalización (Crowe y col., 1993). La segunda hipótesis se relaciona con la habilidad de los azúcares para formar estructuras vítreas durante la deshidratación en condiciones adecuadas (Slade y col., 1991). La eliminación de agua de un material proteico, conduce a la forma amorfa de las proteínas. Las mismas se encontrarán vítreas o gomosas, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad. La disminución de la movilidad molecular en el estado vítreo, debido a la elevada viscosidad de estos sistemas, minimiza los cambios conformacionales de las proteínas que conducen a la desnaturalización y las reacciones de entrecruzamiento, como la formación de puentes disulfuro o de agregación vía uniones hidrofóbicas.

La reacción de Maillard, que involucra grupos amino y azúcares reductores, puede causar pérdida de funcionalidad en las proteínas almacenadas, además de un color inaceptable o disminución del valor nutricional. Esta reacción puede ser afectada por el fenómeno de transición vítrea, pues en ciertas circunstancias, puede estar limitada por los procesos de difusión (Buera y col., 1995). El uso de azúcares no reductores como la sacarosa y la trehalosa puede ser beneficioso pues no participan en reacciones de pardeamiento, a menos que hayan sido previamente hidrolizadas (O'Brien, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de clara de huevo (CH) fresca, se prepararon muestras con y sin agregado de azúcares, que fueron congeladas a -20°C y posteriormente liofilizadas durante 48 hs (liofilizador Stokes). Se utilizó sacarosa (S) (Mallinkrodt) o trehalosa (T) (SIGMA) en relación 1:1 y 1:0,5 (g masa seca CH : g de S o T). El porcentaje de sólidos en clara de huevo liofilizada fue de $13,7\pm 0,2\%$. Las muestras liofilizadas se equilibraron a $A_w = 0,22$ (solución saturada de acetato de potasio, SIGMA) a $25\pm 0,4^{\circ}\text{C}$, y luego se almacenaron a $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta 8 semanas.

Estudio de las propiedades de espumado:

Se colocaron en una probeta graduada (3 cm de diámetro) 20ml de buffer $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,005 M pH 7, Na_3N 0,02%, se agregó la masa de muestra adecuada para obtener una concentración proteica final de 3%p/p y luego se adicionaron 10 ml de buffer. Se agitó (agitador Griffin & George a 6000rpm) durante 3 min. a 20°C .

Se confeccionó una escala empírica (numerada del 1 –6) por evaluación visual del aspecto de la espuma: espuma de alta consistencia, tipo merengue, espeso: 6 – 5; merengue suave: 4 – 3; espuma de baja consistencia (no merengada): 2 y no espuma: 1.

La capacidad de espumado se calculó como:

$$\%FE = (\text{Volumen de espuma} - 30\text{ml}) \cdot 100 / 30\text{ml}$$

Se midió el volumen de líquido drenado en función del tiempo (Elizalde y col. 1991). El

siguiente modelo se aplicó para obtener parámetros cinéticos: $v_L(t) = \frac{V_L \cdot t}{(b + t)}$; donde $v_L(t)$

es el volumen de líquido drenado al tiempo t : V_L es el volumen máximo de líquido drenado y b es el tiempo necesario para que drene $V_L/2$.

La constante de velocidad de drenado fue calculada como: $k_{dr} = \frac{1}{V_L \cdot b}$, $[k_{dr}] = (\text{ml} \cdot \text{min})^{-1}$

Pardeamiento: Se utilizó un colorímetro Labscan Hunterlab. Angulo de observación: 10° ; iluminante: D. Se realizó el promedio de 5 determinaciones. Se calculó el índice de pardeamiento de la muestra como: $BR = 100 \cdot \frac{(X/(X + Y + Z) - 0.31)}{0.172}$

La velocidad de pardeamiento fue evaluada aplicando un modelo exponencial correspondiente a una cinética de primer orden: $Br(t) = Br_0 + (Br_{\max} - Br_0) (1 - \exp(-k_b \cdot t))$

donde: $Br(t)$ es el índice de browning al tiempo t , Br_0 y Br_{\max} corresponden al browning de la muestra a tiempo 0 y a tiempo infinito respectivamente, y k_b es la constante de velocidad, $[k_b] : \text{min}^{-1}$.

Calorimetría diferencial de barrido: Entre 10 – 20 mg de muestra fueron analizados en un DSC Mettler TA4000 con software TA 72. Cápsulas de aluminio de 40µl se calentaron de 0 a 125°C, a una velocidad de 10°C/min.

RESULTADOS

La clara de huevo almacenada a 45 °C en ausencia de azúcares perdió las propiedades espumantes luego de 3 semanas. El aspecto de las espumas obtenidas fue cambiando con el tiempo de almacenamiento, formándose merengues menos consistentes (Tabla 1).

Tabla 1: Aspecto de la espuma a diferentes tiempos de almacenamiento Escala empírica (numerada del 1 –6)

Tiempo (semanas)	CH	CH:S 1:1	CH:S 1:0,5	CH:T 1:1	CH:T 1:0,5
0	4	6	5	5	5
0,14	5	6		5	
0,43	4	5		6	
1	3	4	4	5	4
2	2	3	3	4	3
3	1	3		4	
4	1	3		3	
8	1	3		3	

La presencia de azúcares contribuyó enormemente a la conservación de la capacidad espumante de la clara de huevo CH (Figura 1), manteniéndose en sus valores originales hasta por lo menos 8 semanas.

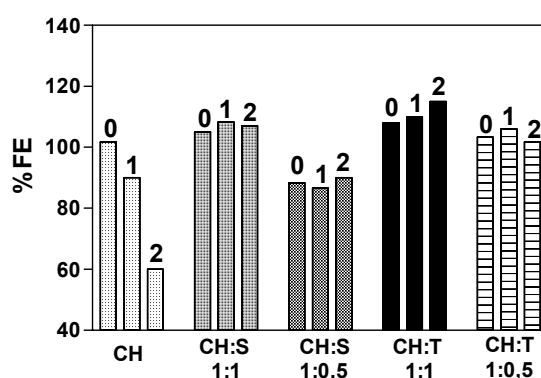


Figura 1: Variaciones en la capacidad de espumado (%FE) a distintos tiempos: 0, inicial; 1 y 2 semanas.

Inicialmente, en presencia de azúcar, se formaron espumas con aspecto de merengues consistentes, que presentaron una mayor inestabilidad (kdr más altas, Figura 2) que el

merengue más suave formado por CH sola. La estabilidad al drenaje de las espumas aumentó con el tiempo aún cuando la calidad de la espuma fue menor.

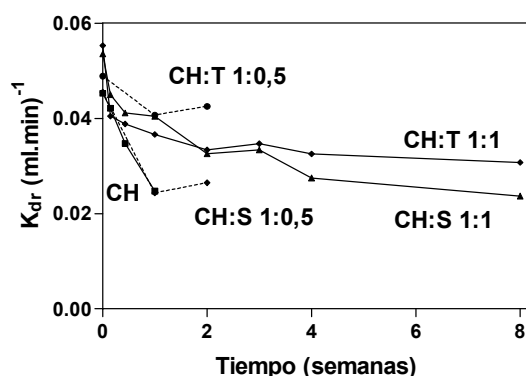


Figura 2: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las constantes de velocidad de drenaje K_{dr} .

A tiempos cortos (menores a una semana) una desnaturalización parcial de la CH favorece la estabilidad de la espuma y el volumen de espumado. La presencia de azúcar generó a estos tiempos espumas más inestables, pero permitió su formación a tiempos más largos, por un efecto protector, inhibiendo o disminuyendo la velocidad de desnaturalización de la proteína. El agregado de trehalosa presentó una mayor protección del sistema mientras que la sacarosa sólo protegió a tiempos cortos, posiblemente debido a una posterior hidrólisis de la misma durante el almacenamiento (Schebor y col., 1999). Una relación proteína: sacarosa (1:0,5) resultó insuficiente para un efecto protector de la proteína (Figura 2). Por el contrario, parecería que a tiempos cortos, esa relación proteína: trehalosa hubiera presentado un efecto protector mayor. El análisis calorimétrico diferencial mostró un incremento en la temperatura de transición vítrea (T_g) en presencia de azúcares (Tabla 2). Asimismo se observó una disminución entálpica en la desnaturalización de la proteína ($a \cong 112^\circ\text{C}$, datos no mostrados).

Tabla 2: Temperaturas relacionadas con el fenómeno de transición vítrea

Sistema	$T_{inicial}$ °C ±2	T_{media} °C ±2	T_{final} °C ±2	$\Delta(T_{inicial} - T_{final})$ °C	$\Delta(T_{alm} - T_g)$ °C	Δc_p J/(g.K)
CH	28	40	51	23	5	0,29
CH:S 1:1	43	46	50	7	-1	0,65
CH:T 1:1	52	54	56	4	-9	0,59
CH:S 1:0.5	48	49	51	3	-4	0,19
CH:T 1:0.5	51	52	53	2	-7	0,14

T_{alm} : temperatura de almacenamiento, 45°C

En todos los sistemas ocurrieron reacciones de pardeamiento aún cuando la temperatura de almacenamiento fue menor que la Tg (Tabla 2 y Figura 3).

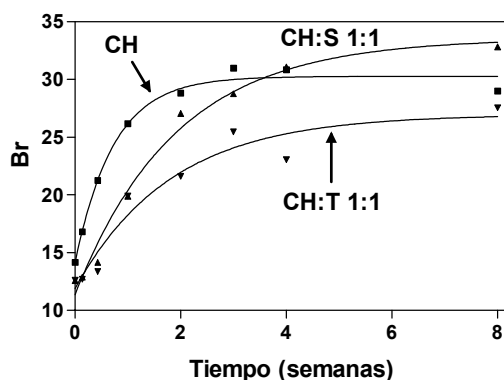


Figura 3: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el índice de pardeamiento.

Tabla 3: Parámetros relacionados con la velocidad de pardeamiento

Parámetros	CH	CH:S 1:1	CH:T 1:1
Br_0	14,1±1,2	11,3±0,8	11,9±1,2
Br_{max}	30,86±0,9	33,88±1,5	27,0±1,8
K_b	1,3±0,3	0,52±0,08	0,55±0,18
R^2	0,967	0,987	0,944

La disminución de la velocidad de pardeamiento (Tabla 3), K_b , fue similar en presencia de cualquiera de los azúcares ($\cong 60\%$), lo cual puede relacionarse con la mayor Tg observada, en concordancia con resultados descritos por Karmas y col. (1992) sobre el efecto de Tg sobre reacciones de pardeamiento. El mayor pardeamiento observado en presencia de sacarosa con respecto a la trehalosa (Tabla 3, mayor Br_{max}) también fue observado en otros sistemas (Terebiznik y col. 1998; Schebor y col. 1999). quienes lo relacionaron con la hidrólisis de la sacarosa. La sacarosa sufre un importante grado de hidrólisis aún en sistemas deshidratados y a temperaturas menores que Tg, mientras que la liberación de azúcares por hidrólisis de la trehalosa es despreciable en condiciones similares (Schebor y col., 1999). Kreilgaard y col. (1998) encontraron que los solutos que formaban una fase amorfa estabilizaban a las proteínas en un mayor grado que aquellos que cristalizaban durante la liofilización. Sin embargo, sólo proveían óptima y adecuada estabilidad durante el almacenamiento los solutos amorfos que eran capaces de formar

uniones puente hidrógeno con la proteína, y preservar su estructura nativa en el sólido deshidratado, siendo óptimo cuando las fases amorfas presentaban valores de Tg superiores a la temperatura de almacenamiento. Sun y col. (1998) y Terebiznik y col. (1998), sugirieron que una mayor estabilidad de sistemas conteniendo trehalosa estaría asociado a varias propiedades de la trehalosa en estado vítreo: un bajo volumen libre, una movilidad molecular restringida y una gran habilidad para resistir la separación de fases y la cristalización durante el almacenamiento.

CONCLUSIONES:

Desde el punto de vista del volumen de espumado y de la calidad de la espuma, el efecto de ambos azúcares es similar. En relación a la estabilidad al drenaje, un cierto grado de desnaturalización de la proteína produce un mejoramiento en dicho proceso. Las variaciones en el pardeamiento y en las propiedades de espumado, no están unívocamente vinculadas.

Si bien la trehalosa mostró una mayor protección al pardeamiento, lo cual, mejora el aspecto y presentaría una mayor protección a la desnaturalización de la proteína, su mayor costo y el aporte de un sabor diferente también deberían considerarse.

BIBLIOGRAFÍA

Buera, M.P. and Karel, M. (1995) "Effect of physical changes on the rates of nonenzymic browning and related reactions", *Food Chemistry*, 52: 167-173

Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Carpenter, J.F. (1993) "Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis", *Biopharmacy* 6: 28-37.

Elizalde, B.E.; Giaccaglia, D.; Pilosof, A.M.R. and Bartholomai G.B. (1991) "Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams", *Journal of Food Science*, 56(1): 24 - 26.

Karmas, R.; Buera, M. P. and Karen, M. (1992) "Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 873 – 879.

Kreilgaard, L.; Frokjaer, S.; Flink, JM.; Randolph, TW. and Carpenter, JF. (1998) "Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid", *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 360(1):121-134.

O'Brien, J. (1996) "Stability of trehalose, sucrose and glucose to nonenzymatic browning in model systems", *Journal of Food Science* 61: 679-682.

Schebor, C.; Burin, L.; Buera, M.P. and Chirife, J. (1999) “Stability to hydrolysis and browning of trehalose, sucrose and raffinose in low-moisture systems in relation to their use as protectants of dry biomaterials”, *Lebensmittel - Wiss. u. - Technol.*, 32: 481-485.

Slade, L. and Levine, H. (1991) “Beyond water activity. Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30: 115-360.

Sun WQ. Davidson P. (1998) “Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices – Effects of phase separation and crystallization”, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1425(1):235-244.

Terebiznik, M.R.; Buera, M.P. and Pilofof, A.M.R. (1998) “Thermostability and browning development of fungal α -amylase freeze-dried in carbohydrate and PVP matrices”, *Lebensmittel - Wiss. u. - Technol.*, 31: 143-149.

CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO EN LA INTERFASE AIRE – AGUA: ADSORCIÓN Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS PELÍCULAS

PÉREZ, Oscar E.¹; CARRERA-SÁNCHEZ, Cecilio²; RODRÍGUEZ-PATINO, Juan M². Y PILOSOFF, Ana M.¹.

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina. Fax: 54-11-45763366. E-mail: apiloso@di.fcen.uba.ar.

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, c/. Prof. García González, 1. 41012, Sevilla. Spain. E-mail: jmrodri@us.es

RESUMEN

El concentrado de Proteínas de Suero Lácteo (WPC) es una mezcla de proteínas con numerosas y diversas funcionalidades. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de este concentrado de proteínas en la estructura de las películas formadas en la interfase aire – agua. Las concentraciones de WPC en las experiencias oscilaron entre 5·10⁻⁵% y 1% p/p. Temperatura y pH fueron constantes, 20 °C y 7 respectivamente. El WPC mostró actividad superficial a concentraciones mayores a 10⁻⁵%. Las isothermas π - A presentaron una inflexión a una presión superficial crítica (π_{cr}) para finalmente colapsar. π_{cr} representa la transición entre una estructura más expandida, estructura I a una más condensada, estructura II. A presiones mayores acontece el colapso de la película (π_c). El carácter sólido de la película (E_d) aumenta al adsorberse las moléculas en la interfase, llegando a un máximo cuando éstas adoptan una estructura muy condensada.

Palabras clave: Proteínas o concentrado desuerolácteo-lactoglobulina, lactalbùmina, seroalbùmina- absorción, comportamiento en interfase aire-agua.

ABSTRACT

Whey proteins concentrated (wpc) is a proteins mixture with several and different functionalities. The aim of this work was to evaluate wpc behaviour on the structure of films formed at the air-water interface. The wpc concentration used was between 5·10⁻⁵% and 1% p/p. Temperature and ph were kept constant, 20°C and 7 respectively. Wpc showed surface activity at concentrations higher than 10⁻⁵%. π -a isotherms showed inflections at critical surface pressure value (π_{cr}) to finally collapse. π_{cr} point to the transition from an expanded structure to a more condensed one. At higher surface

pressure values the collapse of the monolayer occurs (σ_c). The solid character of the films (e_d) increased as the molecules adsorb at the interface, reaching a maximum value when the films adopt the more condensed structure.

INTRODUCCIÓN

El concentrado de proteínas de suero lácteo (wpc) es una mezcla de proteínas con numerosas y diversas potencialidades. Las principales proteínas presentes en wpc son la α -lactoglobulina (α -lg), α -lactalbúmina (α -lac) y seroalbúmina bovina (bsa), son además las responsables de las propiedades de hidratación, gelificación y de la actividad interfacial (cayot y lorient, 1997). Estas proteínas se comportan como surfactantes en la interfase aire-agua, debido a su naturaleza anfifílica. Una vez adsorbidas, orientan sus residuos hidrofílicos hacia la fase agua y los hidrofóbicos hacia la fase aire (damodaran, 1997). Como consecuencia de este ordenamiento molecular y de la formación de un film interfacial la tensión superficial disminuye. Ya que las propiedades interfaciales están relacionadas al comportamiento macroscópico de espumas y emulsiones, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de este concentrado de proteínas en la dinámica de formación de películas en la interfase aire-agua y en su estructura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Concentrado de proteínas de suero lácteo

el wpc en polvo fue provisto por milka frank-santa fe, argentina. Su composición fue la siguiente: 78.9% de proteínas, determinado por el método de kjeldhal (nx6.25), aoac (1980), lactosa 5%, grasa 6%, cenizas 4,3% y 5,6% de humedad. El análisis de los pesos moleculares y de la intensidad de las bandas, bajo la opción de test volumétrico, se realizó con el programa bio-rad molecular analyst/pc molecular imager, versión 4.1. Del total de proteínas en este concentrado, el 44% correspondió a α -lactoglobulina, el 20,1% a α -lactalbúmina, un 8% a bsa y el resto corresponde a inmunoglobulinas y un grupo de otras proteínas llamadas proteosa-peptona (mulvihill & donovan, 1987).

Presión superficial de equilibrio

El valor de presión de equilibrio (σ_e) fue calculada como $\sigma_e = \sigma_0 - \sigma_e$; donde (σ_e) es la tensión superficial de equilibrio y σ_0 es la tensión superficial de equilibrio del agua y se registró a través de un tensiómetro de wilhelmy [sigma 701-ksv (finlandia)] por medio de una placa de platino conectada al tensiómetro. El rango de concentraciones estudiadas osciló entre 10^{-6} -1% p/p.

Isotermas σ -a y características estructurales

La variación de la presión superficial (σ) vs. Área molecular (a) se estudió a través de una balanza tipo wilhelmy (ksv 3000, finlandia) como fue descrito previamente por rodríguez-patino et al (2001). El wpc fue disuelto en un buffer comercial (trizma-sigma), el ph y la fuerza iónica fueron 7 y 0,05m respectivamente. 150 μ l de una solución 0,02% de wpc fueron esparcidos en la interfase de acuerdo a la técnica de trurnit (1960). La reproducibilidad de la presión superficial resultó mayor que $\pm 0,4$ mn/m.

La elasticidad de las películas fue obtenida de las isothermas σ - a como: $e = -a (d\sigma/da)$. El módulo dilatacional superficial (e^*) de los films con sus componentes elástica y viscosa (e_d y e_v) y la tangente del ángulo de pérdida ($tg \delta$) fueron obtenidos por compresiones y expansiones sinusoidales periodicas de la película en equilibrio.

Dinámica de formación de las películas en la interfase aire-agua

La dinámica de adsorción y el desarrollo de estructura del film fueron monitoreados simultáneamente en un tensiómetro de gota, automatizado, según la metodología empleada por rodríguez-patino et al (1999). Las concentraciones empleadas oscilaron entre 10^{-4} – 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 - isoterma de adsorción de wpc

El wpc utilizado mostró actividad superficial a concentraciones de $5 \cdot 10^{-5}$ % p/p. A partir de esta concentración el ascenso en la presión superficial exhibe un comportamiento gradual. Como puede observarse en la fig 1 la presión superficial se incrementó marcadamente con la concentración de wpc en la subfase. La tendencia al estado de equilibrio comienza en el punto donde la presión superficial alcanza su máximo valor sobre todo el rango de concentraciones considerado, en este caso 0,10%. Se ha reportado previamente concentraciones de saturación para α -lg pura de 1% (carrera-sánchez, 2001).

Los principales componentes de wpc presentan importante actividad superficial (cornec et al, 2001; guzey et al, 2003) y su comportamiento individual permite explicar la forma compleja de la isoterma de adsorción. Los valores de las presiones superficiales a las cuales tiene lugar la transición desde una estructura molecular expandida a una condensada (σ_{cr}) y el colapso de la monocapa (σ_c) para películas generadas separadamente por los componentes puros de wpc, α -lg, α -lac y bsa, son señalados en la fig 1 (cornec et al, 2001).

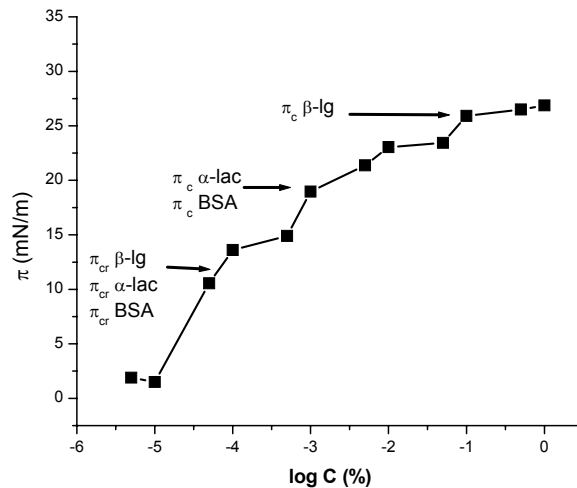


Figura 1. Isotherma de adsorción para WPC, pH 7, I=0,05M

A presiones de 10 – 12 mn/m ocurriría la transición de una estructura expandida a una condensada para todas las proteínas, causando una primera meseta en la curva π – concentración. La segunda meseta observada en la fig 1 correspondería a la saturación de la interfase debido a α -lac y bsa, cuyas monocapas colapsan a $\pi_c \approx 17,8 - 20$ mn/m, respectivamente. La β -lg que es el componente mayoritario y con mayor actividad superficial es el responsable del aumento de π hasta valores cercanos a 25 mn/m, en el cual colapsa la monocapa.

3.2 - Características Estructurales

Las características estructurales y morfológicas de las películas de WPC dependen de la presión superficial y de la composición de la monocapa, por lo cual los resultados deben ser interpretados a la luz de la composición del WPC y de las posibles interacciones de sus componentes. $\pi_{cr}=12$ mN/m representa la transición entre una estructura más expandida, *estructura I* a una más condensada, *estructura II*. A esta transición estructural contribuirían tanto la β -lg como α -lac y BSA que individualmente presentan π_{cr} entre 10 y 12 mN/m. Sin embargo, el efecto predominante de la β -lg, debido a su concentración, ubicaría a π_{cr} del WPC en un valor más cercano al de esta proteína. A presiones mayores acontece el colapso de la película, correspondiendo este valor al colapso de las películas de β -lg que es la proteína mayoritaria del suero (Rodríguez-Patino et al, 2001).

La monocapa de WPC esparcida sobre la interfase aire –agua presentó histéresis (Fig 2), este fenómeno es atribuido a la reorganización molecular de la monocapa a medida que es comprimida entre las barreras y puede ser comprobado a través de la repetitividad de los ciclos de compresión-expansión. Garofalakis & Murray (1999) han obtenido resultados similares para películas adsorbidas de β -lactoglobulina en idénticas condiciones

experimentales. Estos investigadores encontraron que isothermas sucesivas realizadas con tres horas de diferencia eran coincidentes.

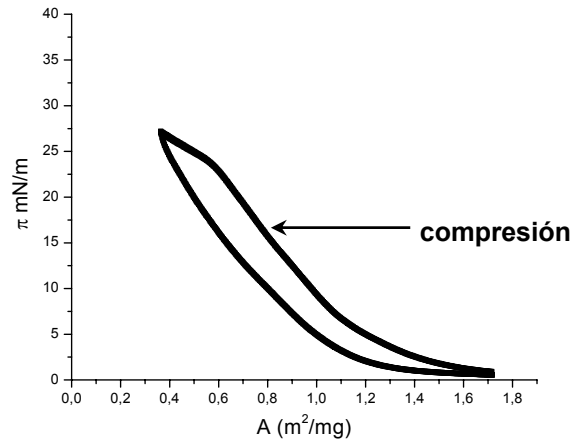


Figura 2. Isotherma $\pi - A$ correspondiente a un ciclo de compresión – expansión de la monocapa de WPC, 30 min después de esparcida la proteína

En la Fig 3 se representa la elasticidad en función de la presión superficial, calculada a partir de las isothermas $\pi - A$.

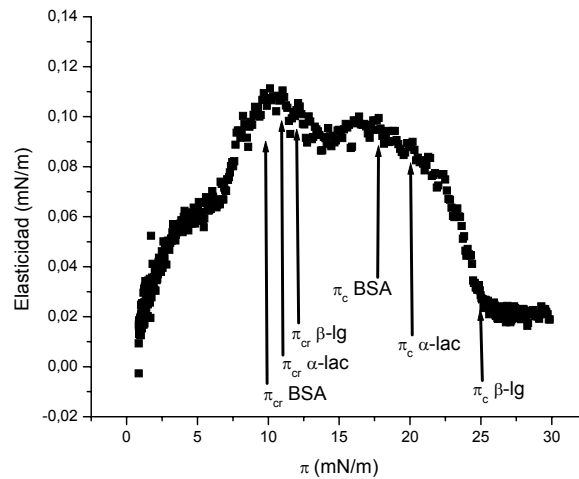


Figura 3. Elasticidad versus π , para monocapa esparcida de WPC. π_{cr} : transiciones estructurales y π_c : colapso de la monocapa

Puede advertirse la existencia de máximos, los cuales están asociados a eventos moleculares que están ocurriendo en la interfase a medida que la monocapa se

comprime. Esto es, transiciones que sufrirían los componentes proteicos de WPC individualmente y las posibles interacciones entre estos. En esta figura se señalan las presiones superficiales a las que acontecen las transiciones estructurales y el colapso de las monocapas de los componentes individuales de WPC. Puede verse que la máxima elasticidad se logra alrededor de π_{cr} para la proteína (10 – 12 mN/m) cuando las moléculas pasan de una conformación más expandida a otra más condensada. Cuando las moléculas de proteína adoptan una configuración condensada ($\pi > \pi_{cr}$), la elasticidad disminuye y cae a valores mínimos cuando la monocapa colapsa (25 mN/m).

3.3 - CARACTERÍSTICAS DILATAcionales SUPERFICIALES

El valor de E_d puede relacionarse directamente a la cohesividad y a la resistencia que ofrece la película a la deformación (Gerbanowsky et al, 2003). La Fig 4 muestra la variación de E_d con la presión superficial, y se señalan con flechas las transiciones estructurales de la monocapa correspondientes a cada componente del suero lácteo.

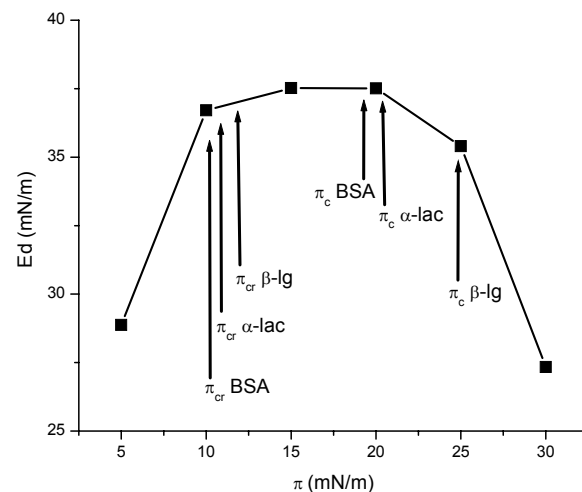


Figura 4. E_d versus π , a una frecuencia de deformación de la monocapa de 20 mHz. π_{cr} : transiciones estructurales, π_c : colapso de la monocapa

Se puede observar que estos cambios coinciden con aumentos o disminuciones de E_d . El carácter sólido de la película (E_d) aumenta al adsorberse las proteínas en la interfase, llegando a un máximo cuando se adopta una estructura muy condensada, altamente empaquetada. La disminución de E_d comienza netamente a partir de los 20 mN/m, debido en primer lugar al colapso de la α -lac y BSA y luego a 25 mN/m de la β -Ig. De acuerdo a Mackie et al (1999), el valor mínimo de E_d a elevadas presiones superficiales caracteriza al punto de colapso de la monocapa. Las monocapas de WPC en la interfase aire – agua,

presentaron un carácter viscoelástico, con valores de $tg \delta$ comprendidos entre 0 y 0,5. Estos valores indican el carácter de gel de la monocapa (Tung & Dynes, 1982).

3.4 - Cinética de adsorción de WPC en la interfase aire – agua

Al aumentar la concentración en la subfase la presión superficial también aumenta, o sea que la difusión de la proteína a la interfase está facilitada a altas concentraciones en la subfase (Rodríguez-Patino et al, 1999).

El comportamiento de E_d a lo largo del tiempo de adsorción puede observarse en la Fig 5.

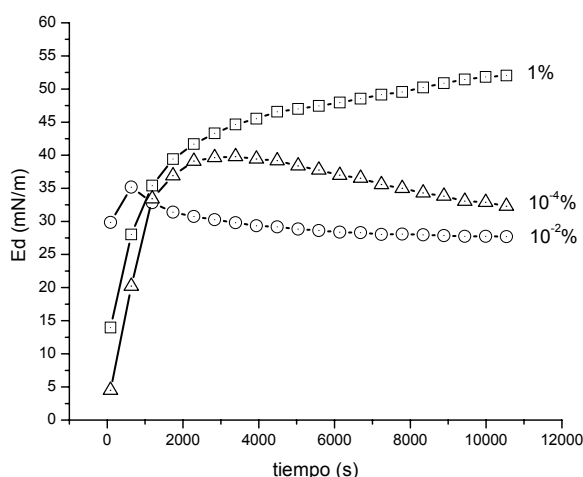


Figura 5. Evolución de E_d con el tiempo de adsorción a distintas concentraciones de WPC en la subfase (1, 10^{-2} y $10^{-4}\%$)

Cuando la concentración de WPC en la subfase fue de 1% p/p, los valores de E_d aumentaron continuamente, por lo menos en el lapso de tiempo considerado. Es decir que la componente elástica del módulo dilatacional superficial no alcanza un estado de equilibrio, incluso a largos tiempos de adsorción (12000 s). Dado que en estas condiciones se alcanza la presión de colapso el cual ocurrió alrededor de 25 mN/m, el aumento de E_d podría reflejar un aumento de la rigidez de la película debido a la formación de multicapas (Benjamins et al, 1996). Tanto a concentraciones de 10^{-4} como a $10^{-2}\%$ p/p, la monocapa se encuentra en una estructura menos condensada lo cual explicaría el descenso del carácter sólido después de 2500 y 500 s respectivamente. Las películas de WPC presentaron un comportamiento viscoelástico en todo el periodo de tiempo estudiado presentando valores de $tg \delta$ que oscilaron entre 0,05 y 0,45, sin embargo, $tg \delta$ aumentó con la concentración de proteína en la subfase indicando que a

bajas concentraciones de proteína en la subfase predomina el carácter elástico de la película.

CONCLUSIONES

La isoterma de adsorción de WPC manifestó cambios graduales con el aumento de concentración. Los cambios de pendiente de la isoterma $\Gamma - A$ estarían relacionados a las transiciones estructurales de la monocapa de WPC a la cual contribuyen todos sus componentes, esto es α -lg, α -lac y BSA. WPC ha mostrado gran capacidad de reorganización en la monocapa, como puede deducirse de la histéresis observada.

Desde el punto de vista dinámico, la adsorción de WPC a la interfase aire –agua estuvo favorecida a altas concentraciones en la subfase. E_d varía con la concentración en la subfase, indicando transiciones estructurales en la interfase las cuales dependerán a su vez de la concentración interfacial. Las películas interfaciales de WPC presentan una viscoelasticidad elevada, la cual indica una buena habilidad para estabilizar sistemas espumados.

BIBLIOGRAFÍA

Benjamins, J.; Cagna A.; Lucassen-Reynders E.H. (1996). Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloids Surfaces A* 114: 245-254.

Carrera-Sánchez, C. (2001). Estructura, Estabilidad y Características Reológicas de Películas de Proteínas y Lípidos. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

Cayot, P. & Lorient, D. (1997). Structure-Function relationships of whey proteins. En: *Food Proteins and their Applications*. Damodaran & Paraf, Eds. Marcel Dekker, New York.

Cornec, M.; Dennis, A. K. & Narsimhan, G.. (2001). Adsorption dynamics and interfacial properties of α -lactalbumin in native and molten globule state conformation at air-water interface. *Food Hydrocolloid* 15: 303-313.

Damodaran, S. (1997). Protein-Stabilized foams and emulsions. En: *Food Proteins and their Applications*. Damodaran & Paraf, Eds. Marcel Dekker, New York.

Garofalakis, G. & Murray B. S. (1999). Effect of film ageing on the surface properties of lactoglobulin and lactoglobulin+sucrose stearate monolayer. *J. Colloids Surfaces B* 12: 231.

Guzey, D.; McClements, D. J. & Weiss J. (2003). Adsorption kinetics of BSA at air-sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration. *Food Research International* 36: 649-660.

- Mackie, A. R.; Gunning, A. P.; Wilde, P. J. & J. Morris. (1999).** The orogenic displacement of proteins from the air/water interface by surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* 210: 157.
- Mulvihill, D.M. & Donovan, M. (1987).** Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Sci. and Technology*, 11: 43-75.
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R., and Carrera, C. (1999).** Adsorption of whey protein isolate at the oil/water interface as a function of processing conditions: a rheokinetic study. *J Agric. Food Chem.* 47, 2241.
- Rodríguez-Patino, J.M.; Carrera-Sánchez, C; Rodríguez-Niño, M.R. & Cejudo-Fernández, M. (2001).** Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface. *J. Colloid and Interface Sci.* 242: 141-151.
- Trurnit, H.J. (1960).** A theory and method for the spreading of protein monolayer. *J. Colloid Interface Sci.* 15:1.
- Tung, C.Y.M. & Dynes, J. (1982).** Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems. *J. Applied Polymer Sci.* 27: 569-580.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo de la Universidad de Buenos Aires, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina y del Programa CYTED a través del Proyecto XI.17.

EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SENSORIALES EN PANES ENRIQUECIDOS NUTRICIONALMENTE

SAIZ, Amelia, I., MANRIQUE, Guillermo D., PÉREZ BORLA, Olinda y FRITZ, Rosalía

Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350. Nivel 2. 7600. Mar del Plata. Buenos Aires. ARGENTINA. Tel. 0223 4756167. e-mail: aisaiz@mdp.edu.ar

RESUMEN

Se diseñaron mezclas de harinas de trigo/maíz y trigo/soja, con o sin gluten como aditivo, de manera de incrementar el valor nutricional de los panes en vitamina A y fibra dietaria para los primeros y en proteínas ricas en lisina para el caso de los últimos. Los panes de trigo/maíz obtuvieron calificaciones organolépticas superiores a los de trigo/soja. La adición de gluten mejoró el volumen específico de los panes mixtos, aunque en menor grado que el de los panes de trigo. Las mezclas de trigo/maíz produjeron panes con mayor volumen específico que las de trigo/soja. Los panes de trigo con 15% de maíz y 5% de gluten tuvieron las mejores características físicas y organolépticas. Dicho pan resultó enriquecido en 22,4UI de vitamina A/100g y en 50,2% de fibra dietaria respecto del de trigo; su volumen específico fue 20% mayor que la correspondiente mezcla trigo/soja, obtuvo la mayor aceptabilidad del panel evaluador (75%) y sus micrografías mostraron alvéolos redondeados con distribución homogénea, lo que explicó la obtención de una miga esponjosa y firme.

ABSTRACT

Wheat-corn and wheat-soy flour mixtures, with or without addition of gluten, were designed in order to obtain breads nutritionally enriched. Breads obtained from wheat-corn mixtures were enriched in vitamin A content and dietary fiber, while those prepared from wheat-soy mixtures resulted with a higher level of lysine-rich proteins. Gluten addition enhanced in every cases the specific volume of mixed-flour breads, although the effect was more pronounced for the wheat breads. Wheat-corn mixtures produced breads of larger specific volume than wheat-soy ones.

Bread prepared with a 80:15:5 wheat-corn-gluten mixture was selected by the panels as optimal in regard to physical and organoleptic characteristics. From this mixture resulted a bread enriched with 22,4 IU of vitamin A/100 g of bread and with almost 50% of dietary fiber, compared with wheat bread. Its specific volume was 20 % major than the same

bread obtained from wheat-soy mixture, being the sensory acceptability of 75 %. Micrographs of selected breads showed rounded and smooth alveolus with a homogeneous distribution, which was in agree with a more spongy and firm crumb observed in this case.

Palabras Clave: panes; trigo-soja-maíz; microestructura; evaluación sensorial.

INTRODUCCIÓN

El trigo es el cereal más importante en términos de producción de harinas y consumo de panes a nivel mundial (Shewry y Tatham, 1994). Tradicionalmente los panes blancos (de harina de trigo) fueron y siguen siendo los de mayor consumo. Sin embargo, en años recientes los avances tecnológicos y los cambios de hábitos en la alimentación han incrementado el consumo de panes elaborados con mezclas de harinas y de panes negros. El principio básico de las mezclas puede aplicarse a distintos niveles de tecnología y organización de la comunidad desde la familia a la industria alimentaria, debiendo siempre considerar que la suplementación de un alimento básico debe responder a especificaciones nutricionales, tecnológicas o sanitarias (Tagle, 1980)

Respecto al valor nutricional de la harina de trigo, se tiene en cuenta que ésta es una buena fuente de energía y otros nutrientes aunque el trigo es considerado nutricionalmente pobre, debido a que las proteínas de este cereal son particularmente deficientes en aminoácidos esenciales como lisina y treonina. Las harinas de legumbres aumentan significativamente el contenido de proteínas, algunos minerales y las vitaminas del complejo B. Es así que la suplementación de harina de trigo con harina de soja mejora la calidad nutricional de los productos de trigo (Sharma y col., 1999). Diversos ensayos realizados con harinas de soja completa o desgrasada, agregadas a harina de trigo en niveles de 10-15 %, separadamente o en combinación con harina de cebada, mostraron que los panes elaborados con el agregado de harina de soja desgrasada y cebada, a niveles del 15 %, eran organoléptica y nutricionalmente, más aceptables. En cuanto a su composición estos panes mostraron mayor contenido de proteínas, lisina total, fibra dietaria, β -glucanos y minerales (Dhingra y Jood, 2002). Por otra parte la harina de soja contiene un 60 % mas de fibra soluble que la harina de trigo (USDA, 2004)

La harina de maíz y los panes elaborados con harina de trigo suplementada con harina de maíz se caracterizan por presentar una importante concentración de almidón total ($70,5 \pm 1,6$ g/100g sobre base seca); una fracción de almidón resistente (RS) de $2,2 \pm 0,7$ g/100g sobre base seca y un contenido mayor de fibra dietaria (15,7 g %), factores que pueden afectar la digestión y el tránsito intestinal de los alimentos (Tas y El, 2000)

La harina de maíz presenta además un contenido apreciable de compuestos carotenoides y una concentración de vitamina A superior en un 80 % a la harina de trigo (USDA, 2004) La adición de gluten ha sido probado como un mejorador efectivo de la harina de trigo, resultando su aporte proteico de importancia en las masas y panes de trigo (Saiz y col.,1997)

En general las proteínas del gluten son pobres en lisina y treonina, las de la soja lo son en metionina y las de maíz en triptofano y lisina. Con la mezcla de estas proteínas se compensan en parte los déficit de lisina y del 2do aminoácido limitante (Friedman y Brandon, 2001)

En este trabajo se diseñaron mezclas de trigo-maíz y trigo-soja de manera de incrementar el valor nutricional de los panes en vitamina A y fibra dietaria para las primeras y en proteínas ricas en lisina, para el caso de las últimas. La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite caracterizar propiedades físicas y atributos de textura de un alimento, como así también visualizar aspectos distintivos de moléculas como proteínas y gránulos de almidón presentes en el mismo (Prabhasankar y col. 2003); los cambios de microestructura así visualizados se relacionaron con atributos de color de la corteza, características de la miga, volumen específico y aceptabilidad global .

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron harinas de trigo 000 no aditivada, maíz, soja no desgrasada y gluten de trigo que fueron caracterizados de acuerdo a los contenidos de humedad, proteínas, cenizas, grasas, fibra bruta, según los métodos de la AOAC (1990)

Para los ensayos de panificación realizados con las mezclas de harina se siguieron las normas de la SAG (1952). Se prepararon mezclas con harina de trigo y harina de maíz en una proporción de 5,10,15 y 20 %, sin y con el agregado de 5 % de gluten; y mezclas realizadas con soja en las mismas proporciones. La masa se preparó utilizando los tiempos de mezclado, prefermentación y fermentación obtenidos del alveograma realizado sobre la harina de trigo. La harina de maíz se suspendió en agua a 80 °C y se procedió al mezclado. Sobre los panes resultantes se realizaron los siguientes ensayos :

Volumen: Se midió usando un equipo de Chopin. El volumen específico se calculó como la relación entre volumen y peso por cada 100 g de pan.

Color: El color de la corteza se evaluó por comparación con una escala, utilizando como referencia el poder tintorial de un colorante caramelo comercial clase I ($K_{0,56}$) definido como la absorbancia a 560 nm de una solución al 0,1 % del mismo

Análisis sensorial se realizó mediante pruebas de tipo afectivo evaluándose el grado de satisfacción (color de la miga, olor, sabor, textura) y de aceptabilidad de los panes. Para ello se utilizó una escala verbal de cinco puntos variando desde: preferencia: “me gusta mucho” (2) y “me gusta” (1); indiferencia: ni me gusta ni me disgusta (0); a rechazo: “me disgusta mucho” (-2) y “me disgusta” (-1). Se trabajó con un panel de 30 jueces no entrenados.

Micrografías : Fueron ensayadas en un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL, modelo JSM-6460 LV (Japón). Las muestras fueron metalizadas con Au/Pd previo secado a 60 °C durante toda la noche.

RESULTADOS

Los resultados de la composición de las harinas se muestra en la tabla 1, a diferencia de la harina de trigo, la harina de maíz y la harina de soja son fuente de vitamina A y de fibra alimentaria. La soja además posee un contenido elevado de proteínas y es fuente de lisina.

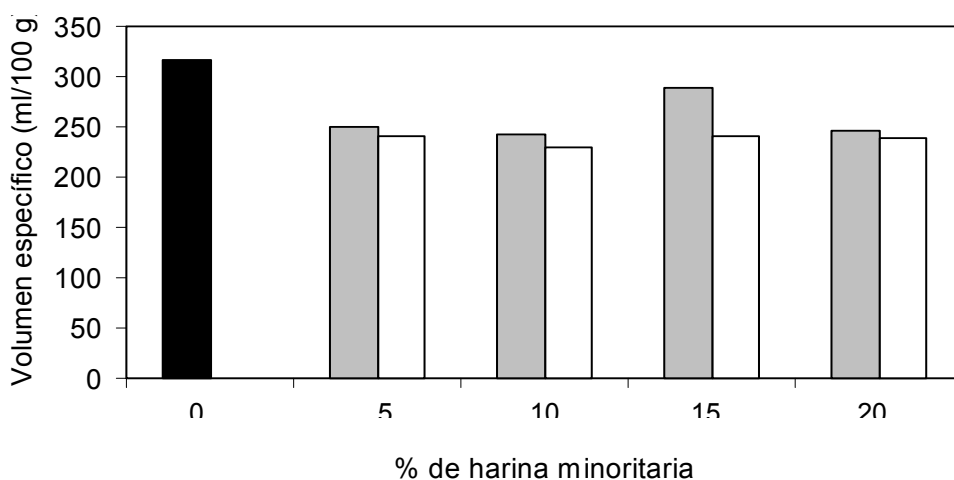
Los resultados de volumen específico obtenidos para los panes elaborados con las distintas mezclas ensayadas y con trigo sin adicionar se muestran en las Fig. 1 y 2. En todos los casos la adición de maíz o soja redujo el volumen respecto de los panes elaborados solo con trigo, lo que es predecible dada la naturaleza no panificable de las harinas adicionadas

TABLA 1. Composición porcentual de harinas de trigo 000 (no enriquecida), soja entera, maíz y gluten . A excepción del contenido de vitamina A que se extrajo de datos publicados (USDA, 2004), los demás valores fueron obtenidos utilizando metodología de la AOAC (1990).

HARINA	Humedad (%)	Proteínas (%)	Grasas (%)	Fibra alimentaria		Vitamina A (UI/100g)	Cenizas (%)
				Soluble	Insoluble		
Trigo 000	10,4	9,2	1,4	1,5	1,6	0	0,5
Soja	7,2	36,7	22,7	5,3	6,0	120	4,5
Maíz	13	6,8	3,9	2,3	11,4	214	1,5
Gluten	8,8	75,2	0	0	0	0	0,7

A su vez el agregado de gluten aumentó el volumen de los panes en todos los casos. El gluten tiene la capacidad de formar una estructura de red disminuyendo la difusión del CO₂ (He y Hosseney, 1991; Jan y col., 1995) y aportando proteínas que determinan la estructura y propiedades viscoelásticas de la masa y la capacidad de retención de agua

de la harina (Tatham y col. 1985). En particular, este efecto resultó mas significativo en las masas de soja que en las masas elaboradas con las mismas proporciones de harina de



maíz, aunque con un efecto mejorador inferior al que fue comprobado en las masas de trigo (Saiz y col. 1997).

FIGURA 1. Volumen específico de panes obtenidos con trigo y distintas proporciones de harina de maíz (barras grises) y harina de soja (barras blancas). La barra negra corresponde a un pan con 100 % harina de trigo.

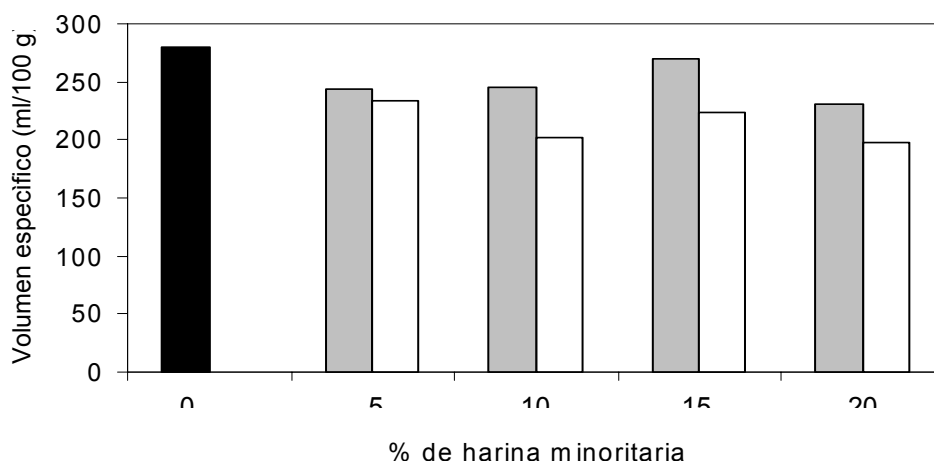
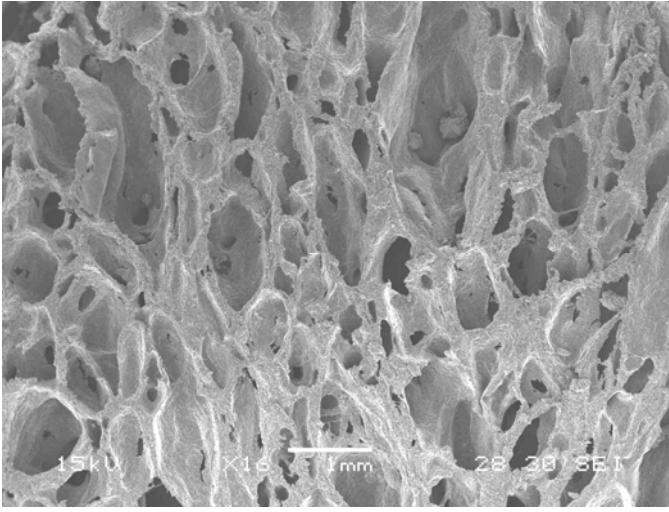


FIGURA 2. Volumen específico de panes obtenidos con trigo y distintas proporciones de harina de maíz (barras grises) y harina de soja (barras blancas), todos conteniendo 5% de gluten como aditivo. La barra negra corresponde a un pan con 95% harina de trigo y 5% de gluten .

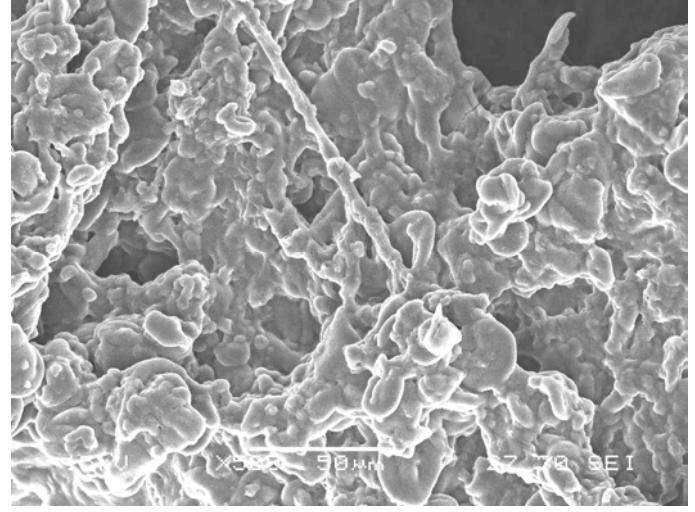
Por otro lado, los panes elaborados con mezclas trigo-maíz resultaron de mayor volumen comparados con aquellos provenientes de mezclas trigo-soja, comportamiento que también se observó en las mezclas equivalentes conteniendo gluten. Así, el pan

conteniendo 15 % de harina de maíz y 5 % de gluten resultó con un volumen específico 20 % mayor que el elaborado con el mismo porcentaje de soja. Estos panes presentaron un incremento en el contenido de vitamina A de 22,4 UI/100 g pan y de 50,2 % de fibra alimentaria con respecto a un pan de trigo. El volumen de los panes es tomado habitualmente como un parámetro de calidad en la industria panadera y junto con la evaluación sensorial permiten definir la calidad del producto.

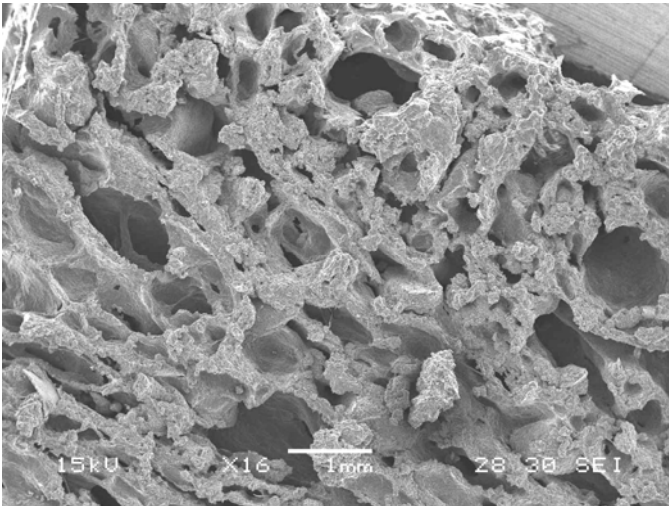
En cuanto a la evaluación organoléptica este pan obtuvo 75 % de aceptabilidad. Si bien el pan elaborado con una mezcla conteniendo 10 % de soja presentó una aceptabilidad de 80 % y un índice de preferencia de 100 % para el atributo de sabor, la mezcla elaborada con 15 % de harina de maíz y 5 % de gluten presentó los mayores índices de preferencia en todos los atributos evaluados, color 100 %, olor 83 %, sabor 67 % y textura 83 %. Una característica diferencial importante entre los panes elaborados con dichas mezclas resultó ser el color de la corteza, que se evaluó en 73 % y 42 % del poder tintóreo ($K_{0,56}$) de un colorante caramelo clase I, respectivamente. La microestructura de los panes de trigo, trigo con 15 % de harina de maíz y trigo con 15 % de harina de soja agregada pueden observarse en las figuras 3 a, b y c. En los panes de trigo se observa una matriz cohesiva y homogénea con alvéolos alargados, bastante diferente de las microestructuras observadas en las mezclas con maíz y soja, en éstas se observa una red más rugosa, densa, discontinua y con alvéolos irregulares. En las micrografías 3 d, e y f se observa con mayor detalle la red proteica y los gránulos de almidón. En el pan con soja se observa la formación de una red mas cerrada en comparación con los otros casos, probablemente debido a la interacción entre las proteínas de soja y gluten, lo que se corresponde con una miga mas compacta y con características organolépticas menos aceptable. Lampart-Szezapa y Jankiewicz 2003, en un experimento modelo determinaron las interacciones entre la globulina de la soja 11S y las fracciones proteicas del gluten de trigo, observando la formación de un complejo de alto PM entre la globulina 11S y la prolamina del trigo y complejos de bajo PM formados entre albúmina/globulina y fracciones del gluten, dispersos en el medio. En la microestructura del pan trigo-maíz la red de gluten aparece asociada a estructuras provenientes del maíz, con gránulos de almidón dispersos en forma regular, lo que contribuiría a la firmeza de la miga. Se ha postulado la interacción entre la zeína del maíz y las proteínas del gluten. Cuando la proteína del maíz es calentada por encima de 35 °C, es decir, por encima del rango de su temperatura de transición vítrea, puede interaccionar con las proteínas del gluten mejorando las propiedades reológicas y de levado de la masa y el volumen de pan (Bugusu y col. 2002)



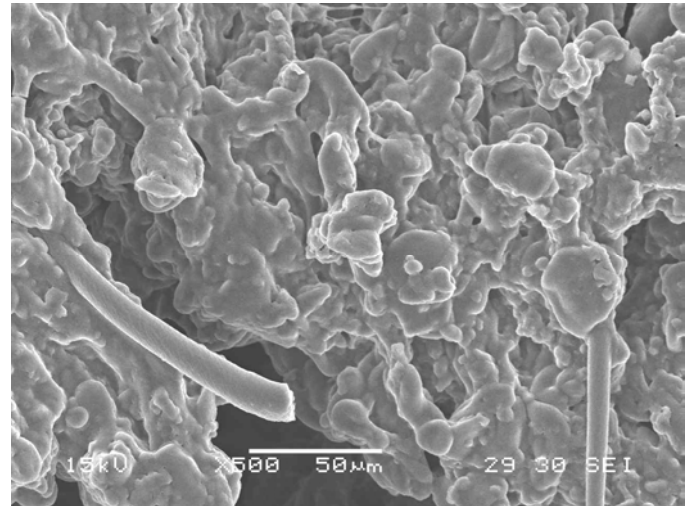
a



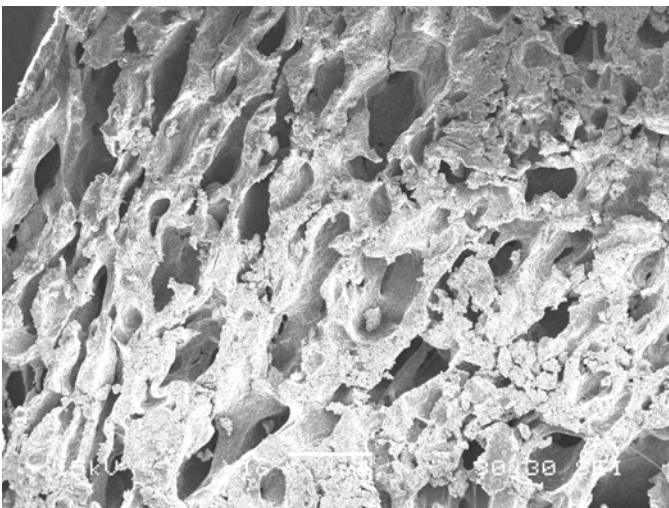
d



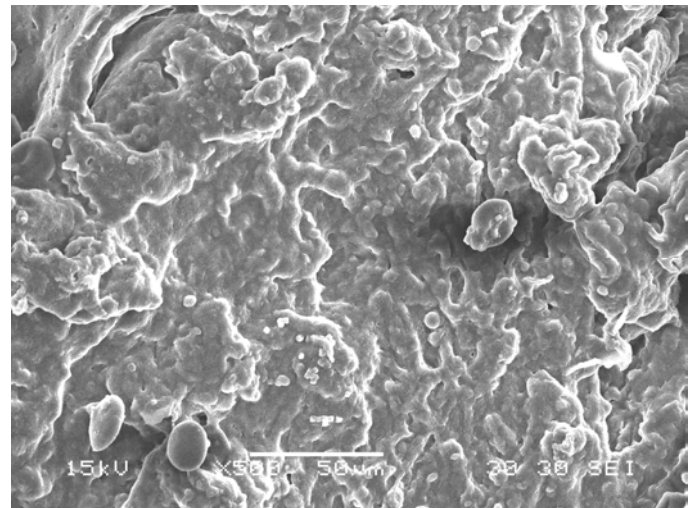
b



e



c



f

FIGURA 3: Micrografías electrónicas de barrido x16 (a, b y c) y x500 (d, e y f) correspondientes a la miga de panes obtenidos con harinas de trigo (a y d), trigo-maíz 85:15 (b e) y trigo-soja 85:15 (c y f).

CONCLUSIÓN

Los panes elaborados a partir de una mezcla de trigo, maíz y gluten resultaron enriquecidos nutricionalmente y con caracteres físicos y sensoriales atractivos para el consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Analytical Chemists (AOAC).1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). Methods 923.03, 925.10, 932.04 Maryland: AOAC International.

Bugusu, B.A., Rajwa, B., Hamaker, B.R. 2002. Interaction of maize zein with wheat gluten in composite dough and bread as determined by confocal laser scanning microscope. *Scanning* Vol. 24(1) :1-5

Dhingra, S. y Jood, S. 2002 Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. *Food Chemistry* Vol. 77(4): 479-488

Friedman, M. and Brandon, D.L. 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry* Vol. 18 (6): 533-550

He, H. and Hosseney, R. C. 1991. Differences in gas retention, protein solubility and rheological properties between flours of different baking quality. *Cereal Chemistry*, 68 (5), 526-530 .

Jan, Z., Ellis, P. R., and Schofield, J. D.1995. Mini Review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread. *Journal of Cereal Science*, 21, 215-230.

Lampart-Szezapa, E. and Jankiewicz, M 1983. Changes in the protein complex of wheat dough affected by soybean 11S globulin: Part 2: The interaction of soybean 11 S globulin with gluten proteins. *Food Chemistry* Vol. 10 (2): 97-109.

Prabhasankar, P.,Indrani, D., Jyostsna Rajiv and Venkateswara Rao, G. 2003. Scanning electron microscopic and electrophoretic studies of the baking process of south Indian parotta- an unleavened flat bread. *Food Chemistry* Vol. 82: 603-609

S.A.G. (1952). Método de panificación experimental del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Decreto 13005. Poder Ejecutivo Nacional. Buenos Aires, República Argentina.

Saiz, A. I., Pérez Borla, O., Fritz, R. (1997). El gluten como mejorador de harinas de trigo. *Alimentaria*, 280, 83-87.

Sharma, S., Sekhon, K.S. y Nagi, H.P.S. 1999. Suitability of durum wheat for flat bread production. *Journal of Science and Technology* 36: 61-62

Shewry, P.R. y Tatham, A.S. 1994. Wheat endosperm proteins and their impact on human mankind. In S. Martino al Cimino (Ed.) *Wheat kernel proteins: molecular and functional aspects* (pp.19-26) University of Tuscia. Viterbo, Italy.

Tagle, M. A. 1980. Nutricion. Ed. Andres Bello 2da Ed. Santiagp de Chile. Chile.

Tas, A.A. and El, S.N. 2000. Determination of nutritionally important starch fractions of some Turkish breads. *Food Chemistry* Vol. 70 (4): 493-497.

Tatham, A. S., Mifflin, R. S. and Shewry, P. R. (1985). The β -turn conformation in wheat gluten proteins: Relationship to gluten elasticity. *Cereal Chemistry*, 62 (5), 405-412.

USDA, SR 17. 2004. <http://Nutritiondata.com/facts.html> Nutrition facts and food composition: wheat flour, soy flour and corn flour.

RELACION ENTRE EL DESARROLLO DE ESCALDADURAS Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS EN PIEL DE BERENJENAS

CONCELLON, Analía¹; ZURITA, María E.; GATTO BICAIN, María I.; CHAVES, Alicia R.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Universidad Nacional de la Plata (UNLP), CONICET - Calles 47 y 116; (1900) La Plata, Buenos Aires; Argentina. Telefax: +54 221 4890741 / 4249287 – E-mail: aconcell@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

Las berenjenas utilizadas (Money Maker N°2) poseen un color púrpura-negro en la zona centro y púrpura-rojizo en la piel debajo del cáliz del fruto o zona superior, siendo ésta zona la de mayor susceptibilidad al frío. En este trabajo se evaluó la variación del contenido de compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y antocianinas) y sus respectivas capacidades antioxidantes durante el almacenamiento a 0°C, en la piel de ambas zonas (centro y superior). Se halló que la fracción de flavonoides fue la mayoritaria, aunque la fracción de fenoles simples mostró la mayor capacidad antioxidante. Por otro lado, la piel de la zona superior del fruto fue la de menor capacidad antioxidante. El contenido relativo de las tres fracciones fenólicas podría incidir en el grado de desarrollo de escaldaduras (síntoma de daño por frío) durante el almacenamiento a bajas temperaturas.

Palabras Claves: berenjena, daño por frío, antioxidantes, flavonoides, antocianinas, fenoles

ABSTRACT

Eggplants employed here (Money Maker N°2) have a purple-dark color on the central zone and purple-reddish on the skin under fruit calyx or superior zone. In this work, it was studied the variation of phenolic contents (simple phenols, flavonoids and anthocyanins) and their respective antioxidant capacities during storage at low temperatures, on the skin of both zones (central and superior). Results showed that the content of flavonoid fraction was the highest, but the simple phenols fraction had the highest antioxidant capacity. By other side, fruit skin from superior zone had the lowest antioxidant capacity. The relative content of phenolics fractions could influenced the evolution level of scald (chilling injury symptom) during storage at low temperature.

Keywords: eggplant, chilling injury, antioxidants, flavonoids, anthocyanins, phenols

INTRODUCCION

La variedad de berenjenas estudiada aquí posee un cáliz de tamaño importante (12 % de la superficie total del fruto) y el color de la piel debajo del mismo es púrpura-rojizo a diferencia de la zona central donde es púrpura-negro. Anteriormente se determinó que el contenido de pigmentos antociánicos de la piel debajo del cáliz o “zona superior” era menor, pero de iguales características que el de la piel de zona centro (Concellón, 2003). También se observó que la susceptibilidad al daño por frío era mayor en la zona superior que en el resto del fruto. Esta diferencia de susceptibilidad al daño por frío podría estar relacionada al contenido relativo de fenoles y antocianinas en cada zona del fruto, como halló Ju y col. (1996) trabajando en manzanas cv Deliciosas y Ralls. Es así que en este trabajo se evaluó la variación del contenido de compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y antocianinas) y sus respectivas capacidades antioxidantes durante el almacenamiento a bajas temperaturas, en la piel de ambas zonas (centro y superior).

MATERIALES Y METODOS

2.1- Material vegetal y almacenamiento: Se emplearon berenjenas cv Money Maker N° 2 (*Solanum melongena* L.) cosechadas en la zona de La Plata, Argentina. Los frutos se lavaron con agua clorada (ClO₂ 100 ppm) y ya secos se acomodaron de a 4 unidades por bandeja plástica, se las cubrió con film de polietileno perforado y se las almacenó a 0°C por 6 y 13 días. A cada día de muestreo se extrajeron 3 bandejas, se efectuó la observación visual de los síntomas de daño y se pelaron los frutos. La piel perteneciente a cada zona del fruto (centro y superior) se congeló en N₂ líquido y se guardó en freezer de -80°C en forma separada.

2.1- Porcentaje de daño: El principal síntoma de daño por frío en berenjenas es la formación de escaldaduras en la piel. Por tal razón se expresó el porcentaje de piel escaldada en relación a la superficie total de la zona considerada.

2.3- Extracción y separación de fenoles simples, flavonoides y antocianinas: Cada zona de la piel de las berenjenas se analizó en forma separada. Se efectuaron las extracciones utilizando muestras de piel perteneciente a al menos 6 frutos. Se efectuaron 3-4 extracciones con metanol-ClH 1% sobre 0,5 g de tejido triturado, se centrifugó a 10.000×g por 5 min, y al sobrenadante se lo lavó con hexano para remover lípidos, clorofilas y carotenoides. Finalmente se llevó a volumen, obteniéndose el “extracto inicial”. Se efectuaron 3 extractos de cada zona del fruto.

Posteriormente se procedió a la separación de las distintas fracciones fenólicas empleando el método de Ju y col. (1996) con algunas modificaciones. Para tal fin, al extracto inicial se lo concentró a sequedad empleando un rotavapor a 40°C y se retomó el residuo en 1 mL de H₂O bidestilada. Una alícuota de 400 µL se sembró en una columna C18 (1g, Waters). Se eluyó en primera instancia con H₂O bidestilada colectándose los fenoles simples solubles en H₂O; luego se eluyó con metanol para remover los flavonoles y proantocianidinas, en adelante “flavonoides”; y finalmente se eluyó con metanol-ClH 1% para obtener las antocianinas. Se analizó cada tubo colector mediante espectrofotometría (realizando un escaneado de longitudes de onda), de modo de identificar cada fracción.

2.4- Determinación de fenoles totales: La concentración de fenoles totales fue determinada con el reactivo de Folin & Ciocalteu (Swain y Hillis, 1959). Se midió la absorbancia a 700 nm luego de 90 min. Se empleó catequina como estándar y los resultados se expresaron como µg de catequina / g tejido fresco. Las determinaciones de cada muestra se efectuaron por triplicado.

2.5- Determinación de la capacidad antioxidante: La capacidad antioxidante fue analizada empleando el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) en metanol (Brand-Williams y col., 1995). Luego de 60 min de incubación se midió el cambio de absorbancia a 515 nm, transformando dichas medidas en % de DPPH consumido. Se empleó catequina como estándar. Las medidas se hicieron al menos por triplicado y con cuatro cantidades distintas de muestra. La capacidad antioxidante del extracto inicial se expresó como (gramos de tejido fresco)⁻¹ necesarios para decolorar 1mL de la solución de DPPH al 50%. En cambio, la capacidad antioxidante de las fracciones fenólicas se expresó como (unidades relativas a catequina)⁻¹ necesarias para decolorar 1mL de la solución de DPPH al 50%.

2.6- Análisis estadístico: Los resultados se expresaron como valores medios ± el error típico correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1- Evolución del daño por frío: Las berenjenas son susceptibles al daño por frío por su origen tropical y en particular la variedad bajo estudio (Money Maker N°2 cv Japonesa) es de alta sensibilidad al daño. Durante el almacenamiento a 0°C se observó que los frutos mostraban síntomas de daño con anterioridad y en mayor medida en la zona superior. Es así que luego de 6 días, sólo se observó desarrollo de escaldaduras en la zona superior (fig. 1). Mientras que luego de 13 días el desarrollo de escaldaduras en la zona superior fue total y sólo un 40 % de la zona central fue afectada con este síntoma. Datos similares

fueron hallados con anterioridad, empleando esta variedad de berenjenas (Concellón, 2003).

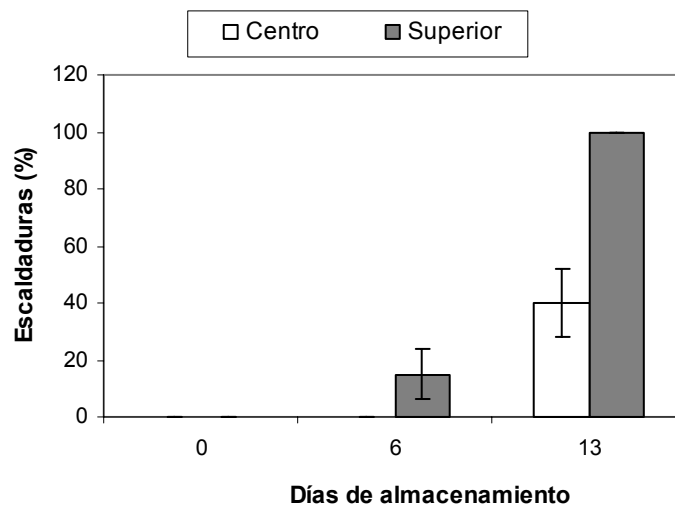


Figura 1: Porcentaje de escaldaduras en la piel de ambas zonas (centro y superior) de berenjenas Money Maker N°2 durante el almacenamiento a 0°C.

3.2- Variación de la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales:

a) En extracto inicial: El extracto inicial obtenido de la piel de berenjenas mostró grandes diferencias entre las zonas superior y centro a nivel de contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante (Tabla 1). A tiempo inicial, la zona centro poseía 3 veces más de fenoles totales y prácticamente el doble de capacidad antioxidante. Durante el almacenamiento a baja temperatura, se registró una disminución paulatina de la capacidad antioxidante de la piel de ambas zonas, aunque fue acompañada de una disminución del contenido de fenoles totales, sólo en el caso de la zona superior (Tabla 1). Estos resultados estarían sugiriendo que la aparición de escaldaduras, en primera instancia, se produciría en aquella zona de menor capacidad antioxidante. Lo cual estaría en concordancia con el hecho de que frente al estrés producido por las bajas temperaturas habría una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), dañinas para el tejido.

b) En fracciones fenólicas: Analizando el contenido de fenoles de cada fracción (fenoles simples, flavonoides, antocianinas) se observó que, en la zona centro, las fracciones de flavonoides y antocianinas siempre superaron a las respectivas fracciones de la zona superior. Mientras que, la fracción de fenoles comenzó siendo menor y terminó siendo superior en la zona centro respecto de la zona superior. La

diferencia en el color de la piel de esta variedad de berenjenas (más oscuro en zona centro) se relacionaría, entonces, con el mayor contenido de antocianinas. También debe resaltarse que, durante el almacenamiento, la fracción de flavonoides fue mayoritaria en ambas zonas, constituyendo, en casi todos los casos, más del 70% del total de fenoles totales (Tablas 2 y 3).

c)

Tabla 1: Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos iniciales pertenecientes a piel de zona centro y superior.

Zona de la piel	Tiempo	Escal	Fenoles Totales		Capacidad Antioxidante	
	(días)	(%)	(µg/g tej)		(1/mg tej)	
Centro	0	0	5363	± 333	1,85	± 0,12
	6	0	5546	± 299	1,39	± 0,08
	13	40	5127	± 289	0,94	± 0,05
Superior	0	0	1814	± 92	0,98	± 0,04
	6	15	1224	± 64	0,64	± 0,05
	13	100	843	± 52	0,42	± 0,02

^a 1/ mg tejido necesarios para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH

d) *En fracciones fenólicas:* Analizando el contenido de fenoles de cada fracción (fenoles simples, flavonoides, antocianinas) se observó que, en la zona centro, las fracciones de flavonoides y antocianinas siempre superaron a las respectivas fracciones de la zona superior. Mientras que, la fracción de fenoles comenzó siendo menor y terminó siendo superior en la zona centro respecto de la zona superior. La diferencia en el color de la piel de esta variedad de berenjenas (más oscuro en zona centro) se relacionaría, entonces, con el mayor contenido de antocianinas. También debe resaltarse que, durante el almacenamiento, la fracción de flavonoides fue mayoritaria en ambas zonas, constituyendo, en casi todos los casos, más del 70% del total de fenoles totales (Tablas 2 y 3).

En cambio la fracción de fenoles simples fue cercana al 10% en zona superior y variable, pero menor al 7%, en zona centro (Tablas 2 y 3). La fracción de antocianinas fue variable en zona superior y centro, no superando el 35 y 20% de los fenoles totales, respectivamente (Tablas 2 y 3).

Tabla 2: Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de las distintas fracciones luego del pasaje por la columna C18 y pertenecientes a la zona **Superior**.

Fracciones	Tiempo (días)	Fenoles totales			Capacidad Antioxidante	
		(□g/g tej)		% de la suma	(1/UR cateq) ^a	
<i>Fenoles Simples (F1)</i>	0	186,5	± 16,2	10,4	7,59	± 1,26
	6	126,7	± 20,9	8,1	8,77	± 0,88
	13	167,9	± 8,5	12,7	4,32	± 0,56
<i>Flavonoides (F2)</i>	0	1413,7	± 33,5	78,5	0,63	± 0,04
	6	925,1	± 58,4	58,8	0,97	± 0,03
	13	1150,3	± 44,6	87,3	3,69	± 0,37
<i>Antocianinas (F3)</i>	0	200,3	± 21,3	11,1	0,25	± 0,07
	6	520,7	± 34,9	33,1	0,57	± 0,10
	13	0,0	± 0,0	0,0	0,00	± 0,00
<i>Suma</i>	0	1800,4		100		
<i>(F1+F2+F3)</i>	6	1572,5		100		
	13	1318,2		100		

^a 1/UR cateq: 1/ unidades relativas a catequina necesarias para disminuir al 50% la concentración inicial de DPP

Tabla 3: Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de las distintas fracciones luego del pasaje por la columna C18 y pertenecientes a la zona **Centro**.

Fracciones	Tiempo (días)	Fenoles totales			Capacidad Antioxidante	
		(□g/g tej)		% de la suma	(1/UR cateq) ^a	
<i>Fenoles Simples (F1)</i>	0	23,1	± 8,0	0,4	59,18	± 7,60
	6	112,0	± 6,6	1,8	15,37	± 2,18
	13	323,2	± 24,4	7,0	2,58	± 0,34
<i>Flavonoides (F2)</i>	0	4702,3	± 93,3	90,2	1,18	± 0,01
	6	4827,8	± 149,4	78,1	0,98	± 0,05
	13	3379,6	± 225,0	72,8	1,13	± 0,09
<i>Antocianinas (F3)</i>	0	487,4	± 7,6	9,3	0,56	± 0,16
	6	1241,2	± 96,5	20,1	0,50	± 0,05
	13	940,8	± 32,6	20,3	0,37	± 0,08
<i>Suma</i>	0	5212,78		100		
<i>(F1+F2+F3)</i>	6	6180,89		100		
	13	4643,70		100		

^a 1/UR cateq: 1/ unidades relativas a catequina necesarias para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH

Capacidad antioxidante (1/UR cateq)				
Fracciones	Tiempo (días)	Zona del fruto		
		Superior		Centro
<i>Fenoles</i>	0	7,5 ± 9	1,26	59,1 ± 7,60
	<i>Simples</i>	6	8,7 ± 7	0,88
13		4,3 ± 2	0,56	2,58 ± 0,34
<i>Flavonoides</i>	0	0,6 ± 3	0,04	1,18 ± 0,01
	6	0,9 ± 7	0,03	0,98 ± 0,05
	13	3,6 ± 9	0,37	1,13 ± 0,09
<i>Antocianinas</i>	0	0,2 ± 5	0,07	0,56 ± 0,16
	6	0,5 ± 7	0,10	0,50 ± 0,05
	13	0,0 ± 0	0,00	0,37 ± 0,08

Durante el almacenamiento y en la zona superior, el contenido de fenoles totales disminuyó a lo largo del tiempo (Tabla 1). Las fracciones fenólicas que contribuyeron, en mayor medida, en dicha disminución fueron el descenso registrado en la fracción de flavonoides (Tabla 2) a los 6 días y la no detección de antocianinas (Tabla 2) al día 13. A este tiempo de almacenamiento, el porcentaje de escaldaduras era total, sugiriendo esto que las antocianinas podrían ser sustratos oxidables de enzimas responsables del pardeamiento (Zhang y col. 2001 y 2005). En cambio, en la zona centro, el contenido de fenoles totales no se vio prácticamente alterado (Tabla 1) a lo largo del almacenamiento, siendo el resultado de la no variación de la fracción mayoritaria –flavonoides- al día 6 (Tabla 3). Mientras que al día 13 (Tabla 3), si bien se registró una disminución de flavonoides y antocianinas también se observó un aumento importante de fenoles simples, por lo que tal vez dichas tendencias se vieron compensadas cuando se las analizó en conjunto.

de fenoles simples fue ampliamente superior al resto de las fracciones, a pesar del bajo contenido de la misma. Mientras que la fracción de flavonoides, en ambas zonas, superó o igualó la capacidad antioxidante de la fracción de antocianinas. Por lo tanto, a diferencia de Ju y col. (1996), los compuestos contenidos en la fracción flavonoides también debieran tenerse en cuenta al momento de postular la relación entre la evolución de

escaldaduras con el contenido relativo de compuestos fenólicos. Específicamente en este trabajo, la capacidad antioxidante de la zona superior mostró una disminución paulatina con el tiempo (Tabla 1). Sin embargo, la fracción de fenoles simples (prácticamente, la única responsable de dicha capacidad antioxidante) disminuyó recién al día 13 (Tabla 2). Por el contrario, en zona centro la disminución de dicha capacidad a lo largo del almacenamiento (Tabla 1) se vio acompañada de una disminución en la capacidad antioxidante de la fracción de fenoles simples (Tabla 3). En esta zona, el tipo de fenoles simples debe haberse modificado durante el almacenamiento ya que si bien hubo descenso de la capacidad antioxidante se registró un aumento del contenido, como se mencionara anteriormente.

Por otro lado, la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones fenólicas (analizadas comparativamente a cada día de muestreo) pertenecientes a la zona centro fue, en general, superior a su respectiva de la zona superior. En ambas zonas del fruto se observó que la capacidad antioxidante de la fracción

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados en el presente trabajo permitieron concluir que la aparición de los síntomas de daño por frío en la piel de los frutos se produce con anterioridad en la zona superior (debajo del cáliz del fruto) debido tal vez a la menor capacidad antioxidante de dicha zona. De acuerdo a la separación de compuestos fenólicos lograda aquí, el mayor contenido se registró en la fracción de flavonoides, pero fue la fracción de fenoles simples la que mostró la mayor capacidad antioxidante. También se pudo observar que tanto el tipo de compuestos y contenido relativo de las tres fracciones fenólicas (fenoles simples, flavonoides y antocianinas) podría incidir en el grado de desarrollo de las escaldaduras (síntoma de daño por frío) durante el almacenamiento a bajas temperaturas.

BIBLIOGRAFIA

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

Concellón, A.. 2003. Daño por frío en frutos no-climatéricos. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Ju, Z., Yuan, Y., Liu, Ch., Zhan, S y Wang M. 1996. Relationships among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. *Postharvest Biology and Technology* 8: 83-93.

- Swain, T. y Hillis, WE. 1959.** The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10: 63-68.
- Zhang, Z., Pang, X., Ji, Z. y Jiang, Y. 2001.** Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning . *Food Chemistry*, 75: 217-221.
- Zhang, Z., Pang, X., Xuwu, D., Ji, Z. y Jiang, Y. 2005.** Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1-2): 47-52.

TRANSICIONES TERMICAS Y MOVILIDAD MOLECULAR EN SISTEMAS CONGELADOS DE SACAROSA Y FRUCTOSA CON AGREGADO DE HIDROCOLOIDES ESTABILIZANTES

M'CANN Juan I.¹; FERRERO, Cristina¹; ZARITZKY, Noemí E.^{1,2}

¹CIDCA-Fac.Cs. Exactas Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116 (1900), La Plata.

²Departamento de Ingeniería Química, Fac. de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, 1 y 47 (1900) La Plata, Pcia. Buenos Aires. e-mail: zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Una de las aplicaciones de los hidrocoloides en alimentos es la estabilización de productos congelados. Se utilizaron sistemas modelo con 20 % de sacarosa o fructosa y 0,5% de hidrocoloide (goma xántica, garrofín o mezcla de ambas) con el objeto de determinar la temperatura de transición vítrea (T'_g), cuantificar el porcentaje de hielo formado por Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y evaluar la movilidad molecular a -15°C a través de ensayos de relajación (T_2) utilizando RMN pulsado. La temperatura de transición vítrea de la matriz de máxima concentración de solutos (T'_g) se localizó para los sistemas estudiados por debajo de -30°C . El porcentaje de hielo formado disminuyó en los sistemas conteniendo hidrocoloides. Los ensayos RMN mostraron que las mezclas con sacarosa e hidrocoloides presentaron movilidad decreciente según: sacarosa > sacarosa + garrofín > sacarosa + xántica + garrofín > sacarosa + xántica. En los sistemas con fructosa los efectos de los hidrocoloides no fueron tan marcados.

Palabras clave: transición vítrea, movilidad molecular, hidratos de carbono, NMR, DSC

ABSTRACT

Hydrocolloids can be used as stabilizers in foods, particularly in frozen systems. Model systems with 20 % of sucrose or fructose and 0.5 % of hydrocolloid (xanthan gum, locust bean gum or a mixture of both gums) were used to determine the glass transition temperatures, percentage of formed ice by differential scanning calorimetry (DSC) and to evaluate molecular mobility at -15°C using relaxation assays with pulsed RMN.

Glass transition temperatures corresponding to the matrix of maximum solute concentration (T'_g) were located below -30°C . Ice quantity was slightly decreased by the addition of hydrocolloids. Mixtures with sucrose showed a decreasing mobility in the following order: sucrose > sucrose+locust bean gum > sucrose + xanthan gum+ locust bean gum > sucrose

+xanthan gum. In systems with fructose, differences in mobility upon the type of hydrocolloid were not so marked.

INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones más interesantes de los hidrocoloides de uso alimentario es como estabilizantes en productos sometidos a congelación y almacenamiento congelado. En ciertos productos como los helados, se agregan estos hidrocoloides a la formulación para lograr un aumento de la viscosidad, ayudar a la incorporación de aire, y retardar el crecimiento de los cristales de hielo.

La cantidad de hielo existente en un sistema almacenado congelado está relacionada tanto con la temperatura alcanzada como con la composición del sistema por lo que se debe analizar el efecto del agregado de estabilizantes sobre la cantidad de hielo que puede formarse. Durante el almacenamiento se produce la recristalización del hielo es decir los cristales más grandes crecen a expensas de los más pequeños conduciendo a un sistema con mayor tamaño cristalino medio.

La velocidad de este proceso depende de la difusión del agua hacia la superficie de los cristales o de la movilidad de otros componentes, como los azúcares presentes (sacarosa, fructosa) que difunden desde el cristal en crecimiento hacia el seno de la solución. La acción de los agentes estabilizantes puede relacionarse con un aumento de la viscosidad de la solución. Por otro lado, los fenómenos de recristalización del hielo se ven afectados por la localización de la temperatura de transición vítrea del sistema. En un sistema dado el pasaje del estado amorfo vítreo, de muy alta viscosidad y baja movilidad molecular a un estado amorfo viscoso o gomoso donde la movilidad molecular aumenta y se ven favorecidos los procesos que tienen control difusional está dado por la temperatura de transición vítrea (T_g). La localización de la temperatura de transición vítrea depende tanto de la historia térmica del sistema como de su composición, sin embargo la temperatura de transición vítrea correspondiente a la matriz de máxima concentración de solutos (T_g') la misma depende únicamente de la composición del sistema.

Los objetivos del presente trabajo fueron analizar en sistemas modelo compuestos por azúcar-agua-hidrocoloide, el efecto del tipo de azúcar y de distintas gomas, en: a) localización de la temperatura de transición vítrea por Calorimetría Diferencial de Barrido, b) cantidad de hielo formado y c) movilidad del azúcar y del agua en las distintas matrices por Resonancia Magnética Nuclear.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron soluciones acuosas al 20 % de sacarosa o fructosa en agua, con agregado 0.5% de gomas (goma xántica, goma garrofín, o una mezcla al 50 % de ambas gomas). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico (Sigma-Aldrich, USA).

Las soluciones se prepararon mezclando los sólidos en primer lugar y agregando luego esta mezcla sobre agua fría lentamente y con agitación constante.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El equipo utilizado fue un calorímetro DuPont (USA) modelo de celda 910 con un dispositivo controlador de temperatura y equipo refrigerante que permite programar rampas de enfriamiento o calentamiento en amplios rangos, con una velocidad mínima de 2 °C/min. La muestra (de 10 a 20 μ l de cada solución) y la referencia (doble cápsula vacía) fueron congeladas hasta -50 °C, templadas a una temperatura cercana a la de transición vítrea (para que se forme la máxima cantidad de hielo posible). Posteriormente se enfriaron hasta -50 °C y luego se sometieron a un calentamiento desde -50 °C hasta 18 °C. En los termogramas se observó un cambio en la línea de base (cambio en el C_p) atribuible a la transición vítrea y posteriormente el pico endotérmico correspondiente a la fusión del hielo. El área del pico se relaciona con la entalpía de fusión y permite calcular la cantidad de hielo formado (Ferrero, 1992).

Fundamentos y uso del RMN

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una espectroscopía de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo (entre los que se encuentra el protón), cuyo spin está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Un espectrómetro de RMN incluye un dispositivo que suministra el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias que provee la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos, una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que incluye un sistema de amplificación y registro. Para los estudios de NMR se utilizó un Equipo Minispec Bruker (Alemania) pulsado de baja resolución operando a 20 MHz. La Serie PC/20 H-NMR opera emitiendo pulsos de radiofrecuencia dentro de una muestra y examinando la señal resultante de los protones de la misma. En la RMN pulsada los núcleos son excitados por pulsos intensos de radiación que duran unos pocos milisegundos. Cuando el pulso termina el núcleo regresa al estado original, emitiendo una señal de resonancia magnética.

Los diferentes tipos de transiciones sin radiación mediante los cuales un núcleo en un estado de spin superior vuelve al estado inferior se denominan procesos de relajación. Los procesos de relajación son fundamentales en RMN, no sólo porque son responsables del mantenimiento de las señales sino también porque controlan la duración de vida de un estado dado (Martin et al.,1999) Los ensayos de tiempo de relajación spin-spin o tiempo de relajación transversal (T2) describen procesos que son responsables de traer los spins nucleares a un estado de equilibrio después de haber sido excitados por un pulso de radiofrecuencia; la señal disminuye con un tiempo característico constante denominado T2 que es el tiempo en el que se alcanza el 63% de decaimiento de la magnetización perpendicular al campo magnético principal. Cuando se reduce la movilidad molecular también se reducen los valores de T2 es decir los tiempos de decaimiento.

En el presente trabajo se utilizó, para el ensayo T2 la secuencia de Carr-Purcel-Meiboon-Gill (CPMG). Si toda el agua está como hielo no se observa ninguna señal en este ensayo, porque todos los protones están inmovilizados. Si parte del agua no está congelada se produce una señal que decae según una función exponencial o biexponencial. Los resultados experimentales de los datos de relajación spin-spin se pueden ajustar mediante la siguiente ecuación (Kuo et.al,2001):

$$A = A_1 \exp(-t/T_{21}) + A_2 \exp(-t/T_{22}) \quad (1)$$

donde A representa la intensidad de la señal dada por los protones que es proporcional a la cantidad de agua no congelada en la muestra. El componente con el menor tiempo de relajación T_{21} corresponde a los protones en la fracción de agua menos móvil y el componente con mayor tiempo de relajación T_{22} corresponde a la fracción de agua de mayor movilidad. A_1 , A_2 son la intensidades de las señales dadas por los protones cuyos tiempos de relajación son T_{21} y T_{22} respectivamente.

Las mismas soluciones que se utilizaron en los estudios calorimétricos fueron analizadas por RMN. Las muestras (aprox. 5 ml) se cargaron en tubos de vidrio especiales que utiliza el equipo, hasta una altura de 15-20 mm. Los tubos se congelaron a -15 °C. Las medidas en el Equipo NMR se realizaron en forma rápida para evitar cambios en la temperatura del sistema.

RESULTADOS

Análisis de los resultados obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido

En la Figura 1 se observa un termograma típico de una solución de sacarosa y agua donde se señala la localización de la temperatura de inicio de la transición vítrea.

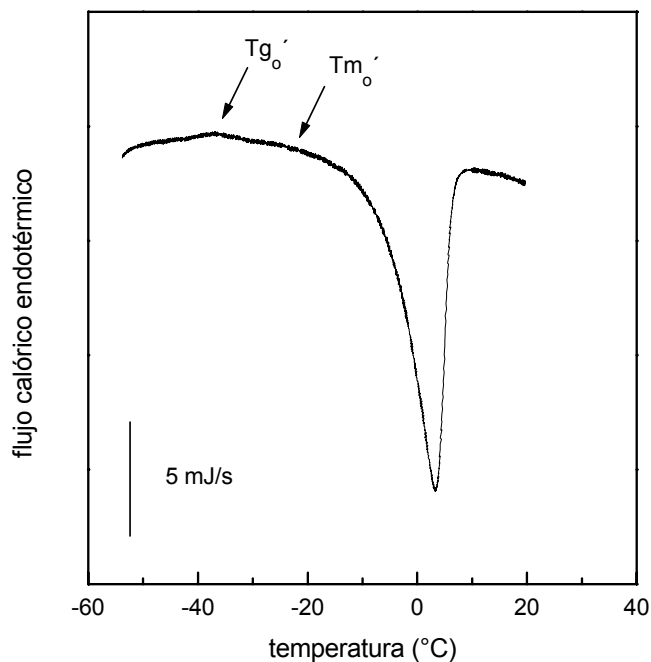


Figura 1. Termograma de solución de sacarosa-agua. Tg_o' = temperatura de transición vítrea inicial de la matriz de máxima concentración de solutos. Tm_o' = temperatura inicial de fusión del hielo en la solución de máxima concentración de solutos

La temperatura de transición vítrea media (Tg') de la matriz de máxima concentración de solutos para los sistemas sacarosa-agua se localizó en alrededor de -32°C mientras que la temperatura correspondiente a fructosa-agua resultó más baja (alrededor de -40°C).

La cantidad de hielo formado se calculó a partir del area del termograma. En la Tabla 1 se muestran los valores de cantidad de hielo formado (como porcentaje) para los distintos sistemas.

Análisis de los resultados obtenidos por RMN

Con los datos obtenidos del estudio de RMN se calcularon los tiempos de relajación como indicador de la movilidad de las moléculas de agua en la matriz a -15°C . Los resultados obtenidos pudieron ajustarse mediante un solo término exponencial decreciente utilizando el programa SYSTAT (USA) según la ecuación:

$$M = A_1 + \exp(-t / T_2) \quad (2)$$

Esto indica que en la respuesta no se observaron fracciones de agua con distinta movilidad. En las Figuras 2 y 3 se muestran las curvas de relajación para los sistemas ensayados

Tabla 1. Porcentaje de agua congelada de los sistemas azúcar-hidrocoloide-agua

Muestra	% de agua congelada total
Sacarosa 20 % (*)	83.23 (SD=0.40)
Sacarosa 20 % + xántica 0.5%	79.80 (SD=0.31)
Sacarosa 20 %+ garrofín 0.5 %	80.16 (SD=0.42)
Sacarosa 20 %+ xántica 0.25 % + garrofín 0.25%	79.50 (SD=0.71)
Fructosa 20 %	75.62 (SD=0.61)
Fructosa 20% + xántica 0.5 %	74.30 (SD=0.43)
Fructosa 20 % +garrofín 0.5 %	74.51 (SD=0.50)
Fructosa 20 %+ xántica 0.25 % + garrofín 0.25%	73.50 (SD=0.60)

(*) los porcentajes se refieren a %p/p

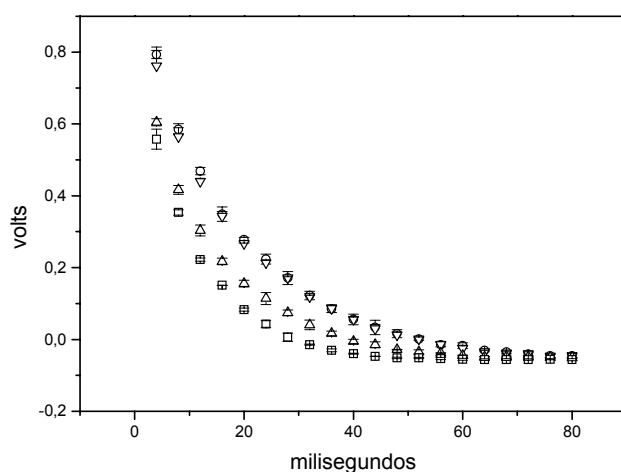


Figura 2. Ensayo de relajación T2. Decaimiento de la amplitud de la señal en RMN pulsado para sistemas con: (O) sacarosa 20% sin hidrocoloide, (∇) sacarosa 20% + garrofín 0.5%, (Δ) sacarosa 20% + garrofín 0.25%+ xántica 0.25%, (□) sacarosa 20% + xántica 0.5%

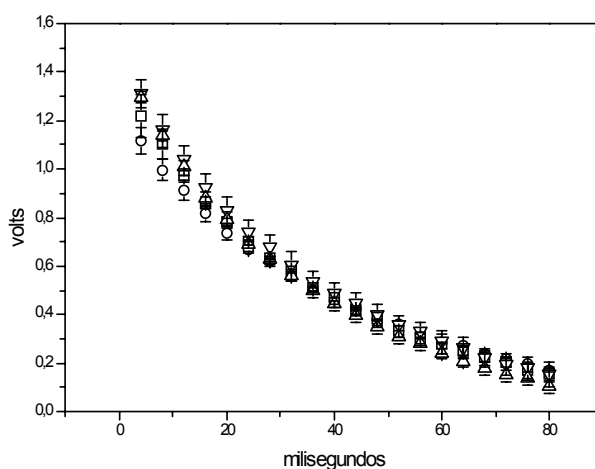


Figura 3. Ensayo de relajación T2. Decaimiento de la amplitud de la señal en RMN pulsado para sistemas con: (O) fructosa 20% sin hidrocoloide, (∇) fructosa 20% + garrofín 0.5%, (Δ) fructosa 20% + garrofín 0.25%+ xántica 0.25%, (□) fructosa 20% + xántica 0.5%

La señal correspondiente a tiempo = 0 fue mucho mayor para los sistemas conteniendo fructosa que sacarosa. Esto implica que hay mayor movilidad en las muestras con fructosa porque tienen menor porcentaje de agua congelada a -15 °C .

Los tiempos de relajación obtenidos para cada muestra se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Tiempos de relajación de los distintos sistemas azúcar-hidrocoloide- agua obtenidos por RMN pulsado

Sistema	T_2 <i>Tiempo de relajación (milisegundos)</i>	Sistema	T_2 <i>Tiempo de relajación (milisegundos)</i>
Sacarosa + agua	14.30	Fructosa + agua	41.65
Sacarosa + LBG + agua	14.34	Fructosa + LBG + agua	36.47
Sacarosa + xántica + agua	7.97	Fructosa + xántica + agua	37.42
Sacarosa + LBG + xántica + agua	10.80	Fructosa + LBG + xántica + agua	33.01

Asimismo se observa que los tiempos de relajación T_2 a -15 °C son mucho mayores en los sistemas que contienen fructosa que en las que contienen sacarosa. Esto concuerda con el hecho que a -15°C las soluciones conteniendo fructosa tienen menor porcentaje de hielo y por lo tanto mayor proporción de agua en la matriz no congelada, originando valores de T_2 más altos.

Por otra parte, tanto en las soluciones de sacarosa como en las de fructosa los tiempos de relajación disminuyeron con el agregado de gomas, siendo este efecto mas notorio en las muestras con sacarosa.

Existen evidencias experimentales que demuestran que cuanto menor es el contenido de agua de una muestra menor es el tiempo de relajación. En el caso de muestras con agregado de goma, los protones de la matriz no congelada tienen menor movilidad que los controles sin hidrocoloide y menores T_2 .

El agua libre produce tiempos de relajación T_2 mayores a 500 milisegundos. La presencia de azúcares en la matriz no congelada reduce los valores de T_2 . Por otra parte las gomas reducen aún mas esos valores.

En el caso particular de los sistemas a base de sacarosa y gomas la movilidad decreció según el orden: sacarosa > sacarosa + garrofín > sacarosa + xántica + garrofín > sacarosa + xántica. Estas diferencias podrían atribuirse a las interacciones particulares que se establecen entre los componentes del sistema.

En el caso de los sistemas con fructosa se observó una reducción de movilidad al agregar las gomas respecto a los sistemas con fructosa sola pero no se aprecian diferencias tan marcadas entre los sistemas con distintas gomas.

CONCLUSIONES

- El agregado de gomas ha disminuido las cantidades de hielo formado en los sistemas conteniendo sacarosa o fructosa.
- A $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ las soluciones que contienen sacarosa presentan una cantidad mayor de agua congelada en comparación con las soluciones de fructosa y por lo tanto menor movilidad (menor tiempo de relajación T_2) en la matriz no congelada.
- La disminución de los tiempos de relajación está asociada con una disminución en la movilidad de los protones en la matriz no congelada. La presencia de gomas disminuyó los valores de T_2 lo que conduce a una menor movilidad en la matriz sin congelar.
- Los resultados indicarían que el efecto estabilizante de las gomas en productos como los helados está relacionado con la menor movilidad molecular en esos sistemas lo que retardaría los fenómenos de deterioro con control difusional tales como la cristalización del hielo.

BIBLIOGRAFÍA

C. Ferrero. 1992. Efecto de la congelación y almacenamiento en el deterioro de suspensiones de almidón gelatinizado. Tesis Doctoral.Fac. Cs. Exactas, UNLP.

M.I. Kuo, S. Gunasecaran, M. Johnson, and C. Chen. 2001. Nuclear magnetic resonance on water movility in pasta Filata and non-pasta Filata mozzarella. American Dairy Science Association. 1950-1958.

D.R. Martín, S. Ablett, A. Darke, R. L. Sutton, and M. Sahagian. 1999. Diffusion of aqueous sugar solutions as affected by Locust Bean Gum (LBG) studied by NMR. Journal of Food Science 64(1) 46-49.

ESTUDIO COMPARATIVO DE CALIDAD INICIAL DE VEGETALES OBTENIDOS POR TÉCNICAS DE CULTIVO ORGÁNICAS Y CONVENCIONALES

MOYANO, Patricia C.¹, MASCHERONI, Rodolfo H.^{1,2}, SALVADORI, Viviana O.^{1,2}

¹CIDCA - Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - CONICET

Calle 47 y 116 (B1900AJJ) La Plata - ARGENTINA

Tel. / Fax: (0221) 4890741 / 4254853 / 4249287 - e-mail: pmoyano@exa.unrc.edu.ar

²MODIAL - Facultad de Ingeniería, UNLP

RESUMEN

Las razones por las que un consumidor elige entre un producto "Orgánico" y su contraparte "Convencional" generalmente conciernen a la salud, al cuidado del medio ambiente, al precio y a la calidad (apariencia y sanidad de producto fresco). En el presente trabajo se realizó un estudio comparativo de la calidad inicial de seis especies vegetales (alcaucil, apio, brócoli, espinaca, radicheta y zanahoria), cultivadas orgánica y convencionalmente. Se evaluaron características físicas, químicas y microbiológicas de los productos, inmediatamente después de ser adquiridos para obtener información acerca de la apariencia y sanidad que recibe el consumidor final. Los vegetales orgánicos presentaron en apariencia mayor frescura, intensidad de color y menor dureza. Esta superioridad puede deberse a que los productos orgánicos son consumidos, generalmente, en mejor estado fisiológico, ya que las técnicas de cultivo incluyen una maduración natural, y la distribución y comercialización es directa entre el productor y el consumidor.

Palabras claves: Vegetales orgánicos, Vegetales convencionales, calidad.

ABSTRACT

Consumers choose "Organic" products instead of "Conventional" counterpart because of factors related to health, environment care, price and quality (appearance and health of fresh product). In the present work a comparative study of the initial quality of six vegetable species (artichoke, celery, broccoli, spinach, chicory and carrot), organically and conventionally grown was carried out. Physical, chemical and microbiological characteristics were evaluated after soon being bought to obtain information about the appearance and health that the final consumer receives. The organic vegetables presented appearance of major freshness, color intensity and minor hardness. This

superiority could be due to the factor that organic products are consumed, generally, in better physiological state, since the culture technologies include a natural ripeness, and the direct distribution and marketing from the producer to the consumer.

Keywords: Organic vegetables, Conventional vegetables, Quality.

INTRODUCCIÓN

El término "Alimento Orgánico" identifica a productos que han sido obtenidos de acuerdo con los principios y prácticas de la agricultura orgánica, la cual tiene como objetivo conservar y promover los ciclos biológicos dentro del sistema de cultivo para mantener e incrementar la fertilidad de los suelos a largo plazo, evitando el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos utilizados comúnmente en las técnicas de cultivo convencionales.

Las razones por las que un consumidor elige entre un producto "Orgánico" y su contraparte "Convencional" generalmente conciernen a la salud, al cuidado del medio ambiente, al precio y a la calidad (1).

La apariencia de los vegetales frescos está dada principalmente por el tamaño, la forma, la textura, el color y la frescura (2). La textura de los alimentos se define como el "conjunto de características físicas percibidas por el sentido del tacto y se relaciona con la deformación, desintegración y flujo del alimento bajo la aplicación de fuerza y es medida objetivamente por funciones de fuerza, tiempo y distancia" (3). Los pigmentos, clorofilas y carotenos, junto con factores morfológicos de la superficie, reflejan y refractan la luz visible dando el color percibido por el ojo, ambos tipos de pigmentos son frágiles y pueden ser fácilmente alterados o destruidos, modificando el color, la calidad nutricional y el valor comercial de los vegetales (4). La frescura incluye condiciones físicas del producto, principalmente el contenido o porcentaje de humedad. En la mayoría de las frutas y los vegetales, una pérdida de sólo 5-10% de humedad es suficiente para hacer que el producto pierda posibilidades de comercialización (2).

Independientemente del sistema de producción todos los alimentos deben ser obtenidos de tal manera que garanticen ser seguros para el consumo, por lo que deben considerarse prácticas que reduzcan los riesgos de contaminación con patógenos (1).

El grupo de microorganismos coliformes y coliformes fecales, está constituido por organismos de múltiples orígenes, incluyendo los de origen fecal. En el ensayo de Presencia-Ausencia para estos grupos un resultado negativo indica la no contaminación fecal, mientras que para confirmar un resultado positivo deben hacerse ensayos posteriores específicos para detectar patógenos tales como *E. coli*.

El propósito del presente trabajo es realizar un estudio comparativo de la calidad inicial de seis especies vegetales (alcaucil, apio, brócoli, espinaca, radicheta y zanahoria), cultivadas bajo sistemas agrícolas orgánicos y convencionales. Para ello se evaluaron las características físicas tales como textura, color y porcentaje de humedad, además de características químicas (contenido de carotenos y clorofila) y microbiológicas (presencia- ausencia de microorganismos coliformes y coliformes fecales). Estos aspectos fueron determinados inmediatamente después de ser adquiridos los vegetales para obtener información acerca de la apariencia y sanidad del producto que recibe el consumidor final.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Vegetales

Los vegetales analizados fueron: alcaucil (*Cynara scolymus L*), apio (*Apium graveolens L*), brócoli (*Brassica oleracea L*), espinaca (*Spinacea oleracea L*), radicheta (*Cichorium. intybus*) y zanahoria (*Daucus carota L*), los mismos fueron obtenidos según su disponibilidad habitual en el mercado minorista. Los productos orgánicos, en general, son comprados directamente por el consumidor al productor, mientras que los convencionales son adquiridos frecuentemente en supermercados o verdulerías. Previo a los análisis físicos, químicos y microbiológicos se realizó una evaluación visual acerca del aspecto y tamaño de cada una de las especies vegetales.

2.2 Análisis Físicos

2.2.1 Textura

La textura de los distintos vegetales se determinó utilizando diversos ensayos con texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems y analizando los datos obtenidos mediante el software “Texture Expert Excede”. Dependiendo de las características morfológicas de cada especie vegetal se modificaron las condiciones de ensayo (Tabla 1).

Tabla 1 Características de los ensayos realizados con texturómetro para cada especie vegetal.

Vegetal	Sonda	Ensayo	Fuerza	Distancia	Parámetro analizado
Alcaucil	Cilindro P/2 (diámetro 2 mm)	Compresión	10 g	10 mm	Firmeza del tejido
Apio	Guillotina	Compresión	50 g	Hasta completar el corte	Resistencia al corte
Brócoli	Émbolo (diámetro 45 mm)	TPA2	10 g	20% de deformación	Fuerza máxima
Espinaca	Guillotina	Compresión	5 g	10 mm	Fuerza máxima
Radicheta	Guillotina	Compresión	5 g	10 mm	Fuerza máxima
Zanahoria	Cilindro P/2 (diámetro 2 mm)	Compresión	50 g	10 mm	Firmeza del tejido

2.2.2 Color

El color superficial se midió con colorímetro Minolta CR 300 Series (Japón), utilizando el sistema de color $L^*a^*b^*$. En este sistema el parámetro L^* de luminosidad se asocia al brillo de la muestra y varía entre 0 para el negro mate a 100 para el blanco. El parámetro a^* representa la variación rojo-verde, tomando valores positivos para el primero y negativos para el segundo. El parámetro b^* representa la variación amarillo-azul, siendo positivo para el primero y negativo para el segundo. Los valores a^* y b^* obtenidos en el colorímetro fueron usados para calcular el Hue (Tono) y el Chroma (Intensidad).

2.2.3 Porcentaje de Humedad

El porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia de masa entre la muestra fresca y seca a peso constante, utilizando una estufa de vacío GALLENKAMP a 80°C.

2.3 Análisis Químico

Para determinar el contenido de pigmentos los vegetales fueron congelados con N_2 líquido y triturados con molinillo, para luego extraer clorofila y carotenos con 5ml de acetona:agua (80:20) o acetona 100%, respectivamente. La concentración de pigmentos en el solvente se determinó por espectrofotometría utilizando las siguientes longitudes de onda: 646.8 y 663.2 nm para clorofila y 470, 644.8 y 661.6 nm para carotenos.

2.4 Análisis Microbiológico

Se evaluó la presencia-ausencia de microorganismos coliformes y coliformes fecales en 1 gramo de tejido vegetal mediante el crecimiento con producción de gas en 10 ml de caldo Bilis-Verde Brillante luego de 24-48 hs de cultivo a 37°C para los primeros y a 45°C para los segundos.

2.5 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un α de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis Físicos

3.1.1 Textura

Los ensayos de textura (Figura 1) mostraron diferencias en todos los vegetales, excepto en espinaca. En alcaucil, brócoli y apio convencional se encontraron valores de mayor firmeza, en los dos primeros dicho parámetro estuvo ligado al aspecto envejecido que presentaban las muestras posiblemente por períodos de almacenamiento excesivo,

mientras que en apio se debió, al igual que en radichetas y zanahorias orgánicas, a diferencias en tamaño de los productos equivalentes

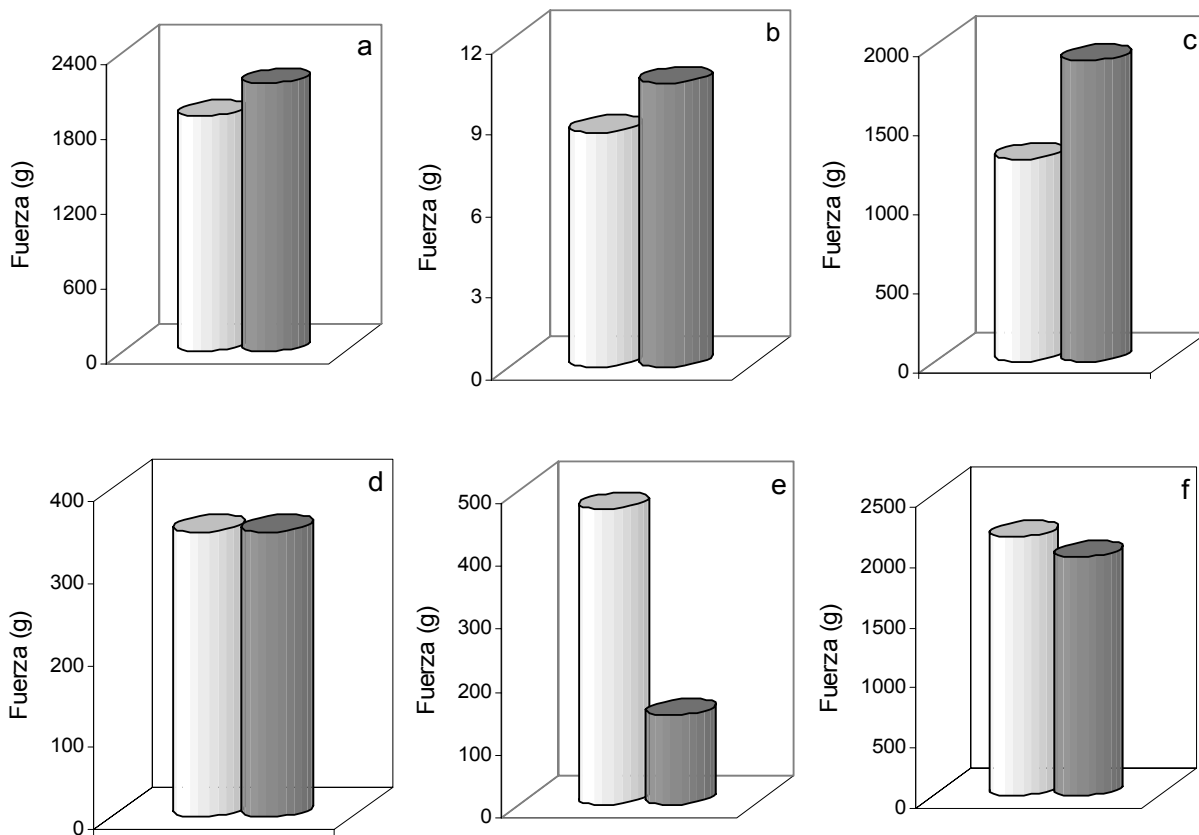


Figura 1: Textura (g) de los vegetales orgánicos (☼) y convencionales (☼). (a) alcaucil, (b) apio, (c) brócoli, (d) espinaca, (e) radicheta, (f) zanahoria

3.1.2 Color

En todos los vegetales se encontraron diferencias en los parámetros L*, Hue y Chroma, excepto en L* y Hue de alcaucil. Hue presentó mayor valor en los vegetales de origen orgánico, mientras que los vegetales convencionales mostraron mayor L*, salvo en zanahorias, y mayor Chroma en los de origen orgánico, excepto en zanahorias y espinacas (Tabla 2).

Si bien no existe una relación entre el color óptimo percibido y calidad óptima, el consumidor prefiere, generalmente, dentro de un tono (Hue) la mayor intensidad (mayor Chroma), por lo que se podría estimar que entre los vegetales evaluados serían de

preferencia alcaucil, apio, brócoli, radicheta cultivados orgánicamente y zanahoria y espinaca tradicional.

Tabla 2: Parámetros de Luminosidad (L^*), Tono (Hue) e Intensidad ($Chroma$) calculados a partir de los datos obtenidos con el sistema de medición de color $L^*a^*b^*$.

		<i>Luminosidad</i>	<i>Hue</i>	<i>Chroma</i>
ALCAUCIL	Orgánico	42.21	51.7	15.6
	Convencional	40.69	62.4	13.0
APIO	Orgánico	36.02	60.8	37.8
	Convencional	55.21	33.4	18.3
BRÓCOLI	Orgánico	23.76	74.7	19.2
	Convencional	37.72	37.6	10.6
ESPINACA	Orgánico	40.88	49.8	24.8
	Convencional	45.75	45.4	32.0
RADICHET A	Orgánico	31.18	61.5	41.5
	Convencional	50.15	45.4	34.0
ZANAHORI A	Orgánico	63.5	73.2	36.5
	Convencional	56.7	68.7	39.1

Nota: Los valores en negrita indican diferencias significativas entre vegetales orgánicos y convencionales

3.1.3 Porcentaje de Humedad

Sólo en apio y brócoli se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad, siendo mayores en los vegetales de origen convencional (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de humedad de los distintos vegetales estudiados. Para cada determinación se realizaron triplicados.

	Orgánico	Tradicional
ALCAUCIL	83.1 ± 2.1	83.1 ± 1.3
APIO	92.3 ± 0.2	95.8 ± 0.2
BRÓCOLI	86.1 ± 0.4	87.8 ± 0.1
ESPINACA	90.4 ± 2.0	90.7 ± 0.9
RADICHETA	92.5 ± 0.5	93.1 ± 0.3

ZANAHORIA	89.7 ± 0.2	88.3 ± 1.4
-----------	-------------------	-------------------

Nota: Los valores en **negrita** indican diferencias significativas entre vegetales orgánicos y convencionales

3.2 Análisis Químico

Hubo diferencias significativas en el contenido de pigmentos en brócoli, radicheta y zanahoria, siendo en el primer caso mayor en el de naturaleza orgánica, mientras que en los dos últimos fue superior en los de origen convencional, indicando una falta de relación entre el contenido de pigmentos y el tipo de cultivo (Figura 2). En el caso de las espinacas no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo mientras que en apio los niveles de clorofila fueron inferiores al límite de detección del método.

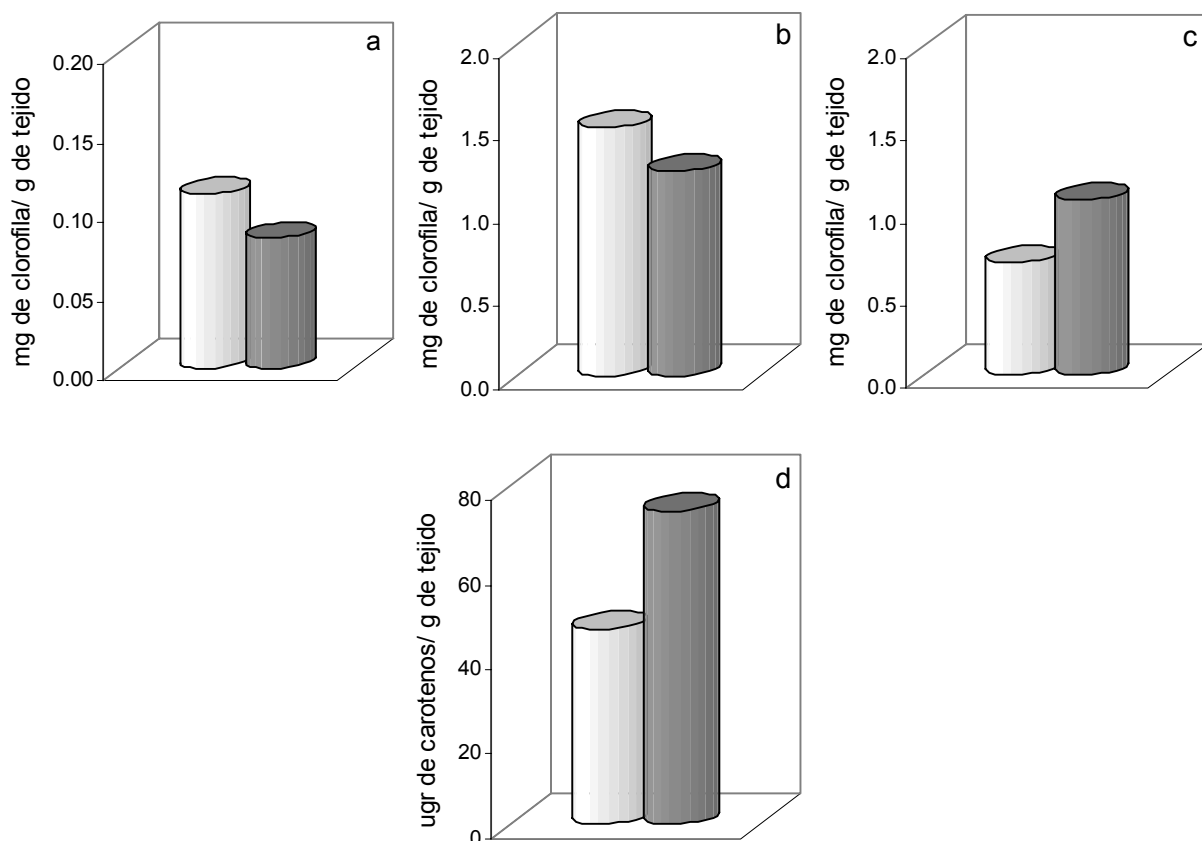


Figura 2: Concentración de clorofila en brócoli (a), espinaca (b), radicheta (c) y de carotenos en zanahoria (d) orgánicos (☉) y convencionales (⊗).

3.4 Análisis Microbiológico

Los microorganismos coliformes estuvieron presentes en todos los vegetales, salvo en alcaucil, sin diferencias por el tipo de cultivo (Tabla 4). El ensayo de coliformes fecales fue positivo en espinacas y radichetas de ambas clases, y en brócoli y apio de origen orgánico. A partir de estos resultados se debería seguir con análisis para confirmar la presencia de potenciales patógenos como *E. coli*, principalmente en radicheta y apio, ya que normalmente se consumen crudos en ensaladas.

La presencia de coliformes y coliformes fecales tanto en vegetales orgánicos como convencionales evidencia la importancia de los cuidados durante el cultivo, la manipulación, el transporte y el almacenamiento de los productos para evitar contaminaciones que puedan transportar patógenos humanos.

Tabla 4: Presencia (+) Ausencia (-) de microorganismos Coliformes y Coliformes Fecales.

		Coliformes	Coliformes Fecales
Alcaucil	Orgánica	-	-
	Tradicional	-	-
Apio	Orgánica	+	+
	Tradicional	+	-
Brocoli	Orgánica	+	+
	Tradicional	+	-
Espinaca	Orgánica	+	+
	Tradicional	+	+
Radicheta	Orgánica	+	+
	Tradicional	+	+
Zanahoria	Orgánica	+	-
	Tradicional	+	-

CONCLUSIONES

Debido a la amplia variación de resultados no podemos indicar ventajas concluyentes a favor de los productos orgánicos o convencionales, sólo podemos afirmar que en general la apariencia de los vegetales orgánicos fue de mayor frescura, terneza e intensidad de color. Esta superioridad puede deberse a que los productos orgánicos, generalmente, son consumidos en mejor estado fisiológico, ya que muchos productores distribuyen los vegetales localmente y realizan técnicas de maduración natural, antes de la cosecha (1).

La comparación de vegetales orgánicos con sus similares convencionales, disponibles en supermercados, debe considerar factores tales como los métodos de distribución y tipo o duración del almacenamiento, además de la técnica de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

Diane Bourn and John Prescott (2002). "A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1):1–34.

Stanley J. Kays (1999). "Preharvest factors affecting appearance". *Postharvest Biology and Technology*, 15: 233–247.

Carl E. Sams (1999). "Preharvest factors affecting postharvest texture". *Postharvest Biology and Technology*, 15: 249–254.

Benoît Schoefs (2002). "Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis". *Trends in Food Science & Technology*, 13: 361–371.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con fondos provenientes de CONICET, ANPCyT (PICT 99/09-7134) y Universidad Nacional de La Plata.

EFFECTO DEL USO DE PELÍCULAS COMESTIBLES Y PLÁSTICAS SOBRE LA CALIDAD COMERCIAL Y NUTRICIONAL DE REPOLLITOS DE BRUSELAS (*Brassica oleracea L., var gemmifera DC*) REFRIGERADOS

FERREYRA¹, Ricardo M.; VIÑA¹, Sonia Z.; MUGRIDGE¹, Alicia; GARCIA¹, María A.; MARTINO^{1,2}, Miriam; ZARITZKY^{1,2}, Noemí, CHAVES¹, Alicia R.

¹CIDCA, CONICET, Fac. Cs Exactas, UNLP. Calle 47 y 116, La Plata (1900), Bs As, Argentina.

²Fac. Ingeniería, UNLP. E-mail: ferreyrarm@sinectis.com.ar

RESUMEN

A fin de prolongar el período de comercialización de repollitos de Bruselas se emplearon para su envasado películas plásticas (PVC o RD106®) y recubrimientos a base de almidón adicionados con glicerol, sorbitol o aceite. Se evaluaron también las combinaciones de éstos con PVC.

Todos los tratamientos que incluían el uso de películas plásticas presentaron una calidad comercial aceptable hasta los 42 días de almacenamiento a 0°C, siendo RD-106® la que redujo más efectivamente la pérdida de peso. De los tratamientos combinados, el recubrimiento con glicerol (G-PVC) presentó la menor variación del color en las bases de los repollitos. Así, ambos tratamientos se seleccionaron para evaluar capacidad antioxidante y contenido de ácido ascórbico y flavonoides totales. La capacidad antioxidante aumentó un 56 y 31% hacia los 42 días para RD106® y G-PVC, respectivamente. Los contenidos de ácido ascórbico y flavonoides totales prácticamente no variaron durante el almacenamiento en ninguno de los tratamientos.

Palabras claves: Repollitos de Bruselas, películas plásticas, recubrimientos comestibles, calidad comercial, antioxidantes.

ABSTRACT

Plastic films (PVC or RD106®) and starch-based coatings containing glycerol, sorbitol or oil were used to extend the shelf life of Brussels sprouts. Combinations between these coatings and PVC were also evaluated.

All treatments that included the use of plastic films showed an acceptable commercial quality up to 42 days of storage at 0°C, being RD-106® the one that reduced the loss weight of Brussels sprouts more effectively. Considering combined treatments, the edible

coating formulated with glycerol (G-PVC) showed the minor variation in colour of the cut zones of the sprouts. Thus, both treatments (RD-106® and G-PVC) were selected to evaluate antioxidant capacity and ascorbic acid and total flavonoids content. The antioxidant activity increased 56 and 31% at 42 days for RD106® and G-PVC, respectively. Ascorbic acid and total flavonoids content did not vary during refrigerated storage in the assayed treatments.

Keywords: Brussels sprouts; plastic films; edible coatings; commercial quality, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas postcosecha de productos vegetales ocurren rápidamente y son especialmente debidas a amarilleamiento, deshidratación y presencia de patógenos. En el caso de los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea L.*, var *gemmifera* DC), cuya producción es principalmente estacional, estas pérdidas han sido reducidas utilizando almacenamiento a 0°C con 90-95 % de humedad que mantiene 3 a 5 semanas la calidad del producto (Ferreyra y col., 1995). La utilización de películas plásticas flexibles con diferente grado de permeabilidad gaseosa resulta un método viable para lograr modificaciones en la atmósfera que rodea al producto y combinándolo con la refrigeración permite aumentar su período de comercialización a relativamente bajo costo.

Los recubrimientos comestibles a base de almidón presentan permeabilidad diferencial a los gases aunque por sus características hidrofílicas no constituyen una barrera efectiva al vapor de agua (Nisperos Carriedo, 1994, García y col., 2001). Además, una de sus ventajas es la de ser totalmente biodegradables, considerándolos por lo tanto de bajo impacto ambiental.

El objetivo de este trabajo fue evaluar distintas películas plásticas y recubrimientos comestibles para prolongar la vida postcosecha de repollitos de Bruselas refrigerados, analizando los principales atributos de calidad y algunos aspectos nutricionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: se utilizaron Repollitos de Bruselas cv Oliver, cultivados a campo en el área del cinturón hortícola de La Plata (Buenos Aires). Los repollitos fueron seleccionados según su tamaño, se eliminaron sus hojas más externas y luego se dispusieron en bandejas de poliestireno expandido, conteniendo 200 g.

Tratamientos: se utilizaron las películas plásticas PVC (Casco, Argentina) y RD106® (GRACE, S.A.) y recubrimientos a base de almidón, con diferentes formulaciones dadas

por la adición de glicerol (G), sorbitol (S) o aceite (A). Los recubrimientos se aplicaron por inmersión como se describe en trabajos previos (García y col., 1998). Se evaluaron también las combinaciones de los recubrimientos con el envasado en PVC (G-PVC, S-PVC y A-PVC). El lote testigo (T) correspondió a repollitos sin recubrimiento ni película plástica. Las muestras, almacenadas a 0°C durante 42 días, fueron extraídas quincenalmente.

Atributos de calidad

Calidad comercial: Por inspección visual se evaluó el aspecto general del producto, grado de deshidratación (compacidad), amarilleamiento, pardeamiento de la zona de corte (base), presencia de patógenos y desarrollo de olores no característicos. La calidad comercial se cuantificó mediante el uso de una escala hedónica de 1 a 5, siendo 3 el valor tomado como límite aceptable de comercialización.

Pérdida de peso (%): se determinó semanalmente, por diferencia entre el peso inicial de la muestra y el correspondiente a los distintos períodos de almacenamiento.

Color superficial: Las medidas se realizaron sobre las cabezas de los repollitos y en las zonas de corte con un colorímetro Minolta CR 300, utilizando la escala Hunter. Se calcularon las diferencias Δa , Δb , ΔL entre el valor inicial y el correspondiente al tiempo de muestreo, así como también la diferencia de color $\Delta E = [(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2]^{1/2}$.

Textura: La firmeza se midió en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems usando una celda de carga de 25 kg y un plato cilíndrico de compresión de 75 mm de diámetro. Se registró la fuerza máxima (N) necesaria para comprimir 3 mm las cabezas.

Actividad y compuestos antioxidantes: Las determinaciones correspondientes a capacidad antioxidante, contenido de ácido ascórbico y flavonoides totales se realizaron sobre muestras iniciales y finales de aquellos tratamientos que mantuvieron mejor los atributos de calidad.

- **Contenido de ácido ascórbico:** Se cuantificó por HPLC utilizando un equipo Waters modelo 6000A equipado con un detector UV – VIS (254 nm), una columna C₁₈ y como eluyente acetonitrilo:agua (70:30), conteniendo (NH₄)H₂PO₄ 0,01M (Wimalasiri y Wills, 1983). Los resultados se expresaron en mg de ácido ascórbico / 100g de tejido fresco.

- **Capacidad antioxidante total:** Se determinó espectrofotométricamente sobre extractos etanólicos, a 515 nm, utilizando el radical cromogénico DPPH (2,2- difenil-picril-hidrácilo) (Brand-Williams y col., 1995). Los resultados se expresaron en μ moles DPPH / 100g de tejido fresco.

- **Flavonoides totales:** Se determinaron espectrofotométricamente a 510 nm, según la técnica descrita por Kim y col. (2003), con modificaciones. Las muestras fueron

extraídas, concentradas y resuspendidas en agua bidestilada. Los resultados fueron expresados como mg de catequina / 100g de tejido fresco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atributos de calidad

La disminución de la calidad comercial se debió, en orden de importancia, a la deshidratación, el amarilleamiento de las cabezas, el pardeado de las zonas de corte y el desarrollo de patógenos. Todos los repollitos, independientemente del tratamiento aplicado, mantuvieron los niveles de calidad comercial inicial hasta los 14 días a 0°C (Figura 1). Hacia el final del almacenamiento (día 42) los tratamientos combinando recubrimientos y PVC presentaron una calidad aceptable (3 en la escala hedónica); los repollitos envasados sólo con películas plásticas, mantuvieron la calidad de partida.

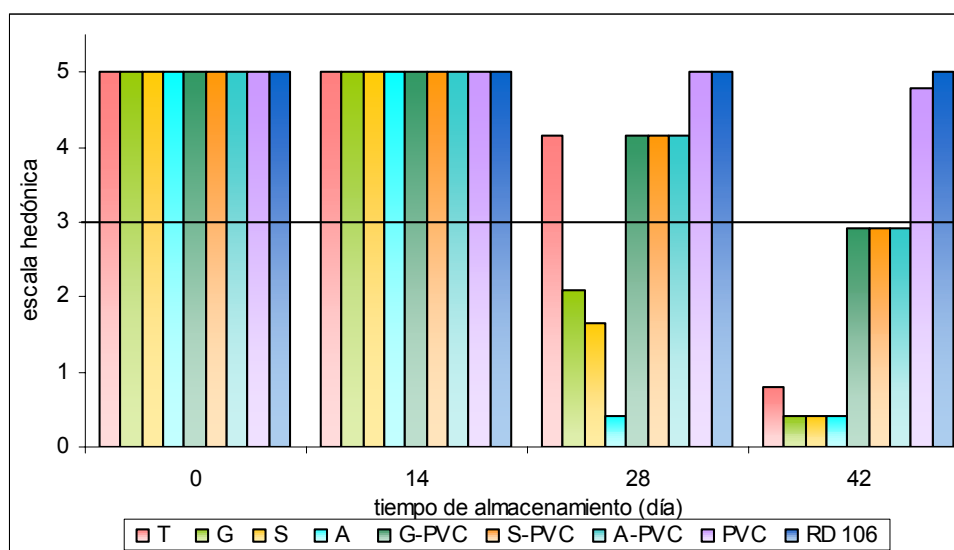


Figura 1. Calidad comercial (escala hedónica) de repollitos de Bruselas almacenados a 0°C. Efecto del tiempo de almacenamiento y de la película de empaque y/o el recubrimiento aplicado

Con respecto a la pérdida de peso, los repollitos testigo (T) y con recubrimientos (G, S y A) experimentaron pérdidas de peso, al final del almacenamiento, comprendidas entre 15 y 30% (datos no mostrados). El uso de películas plásticas permitió reducir la pérdida de peso, obteniéndose los mejores resultados con la película RD-106® (0,34 %).

En concordancia con los resultados de pérdida de peso, se observó que el empleo de películas plásticas mantuvo la firmeza en valores más cercanos a los iniciales. No se observaron diferencias entre los tratamientos combinados, el envasado con PVC y con RD106® (Figura 2).

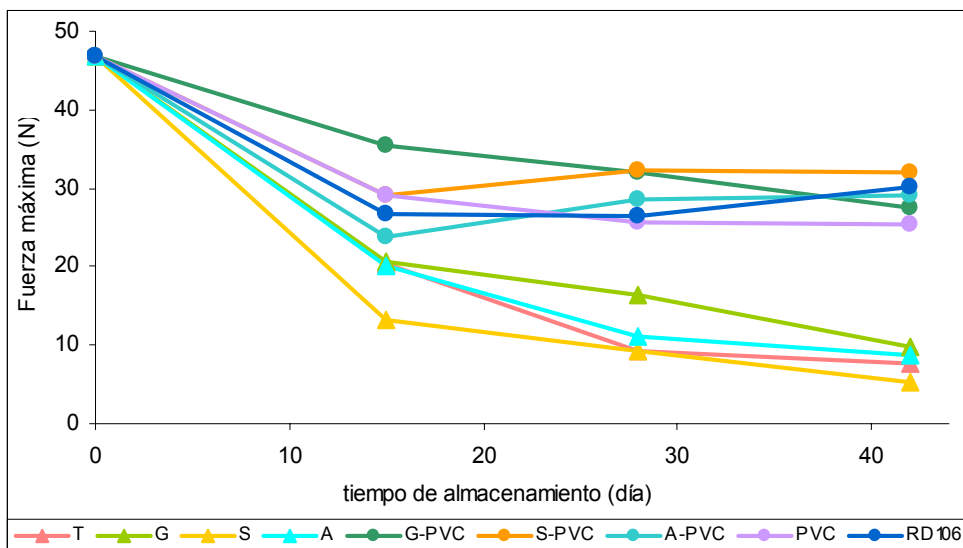


Figura 2. Firmeza (Fuerza máxima medida en compresión) de repollitos de Bruselas, almacenados a 0°C. Efecto del tiempo de almacenamiento y de la película de empaque y/o el recubrimiento aplicado

Hacia el final del almacenamiento, la variación del color (ΔE) de las bases fue mayor que la verificada en las cabezas (Figura 3). Esto se atribuyó al pardeamiento de la zona de corte, que fue uno de los factores limitantes de la aceptabilidad del producto. Dicho efecto se minimizó en los repollitos con el tratamiento combinado G-PVC, en relación al testigo y al resto de los tratamientos que incluían recubrimientos. En repollitos envasados sólo con películas plásticas (PVC y RD106®) se controló el pardeamiento de las bases más efectivamente, observándose menores valores de ΔE (Figura 3).

En base a los resultados expuestos (Figuras 1 a 3), los tratamientos seleccionados por mantener los atributos de calidad en niveles más elevados hacia el final del almacenamiento refrigerado fueron el envasado con la película plástica RD-106® y la combinación del recubrimiento plastificado con glicerol más la película PVC (G-PVC).

Capacidad antioxidante, contenido de ácido ascórbico y flavonoides totales.

Los resultados correspondientes a estas determinaciones, realizadas sobre los tratamientos seleccionados, se muestran en la Figura 4 y han sido expresados como la relación entre los valores hallados al final (C) y al inicio (C_0) del almacenamiento.

Con respecto a la capacidad antioxidante, la misma tuvo un valor de 650 $\mu\text{moles DPPH}^{\cdot}/100\text{g}$ de tejido fresco al inicio de la conservación. Hacia el final del almacenamiento refrigerado, la actividad antioxidante aumentó 56% para la película plástica RD-106® y 31% para el tratamiento G-PVC.

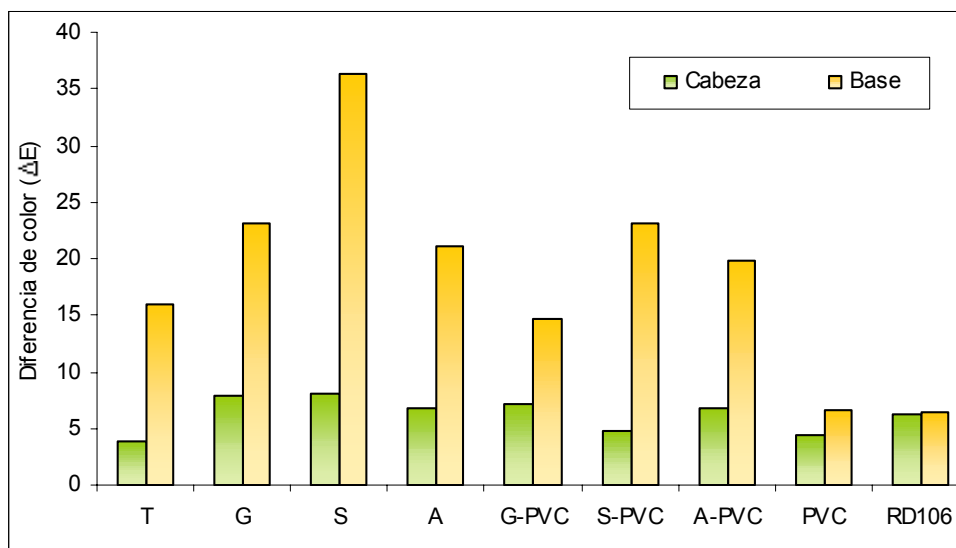


Figura 3. Diferencias de color (ΔE) de repollitos de Bruselas, almacenados 42 días a 0°C. Efecto de la película de empaque y/o el recubrimiento aplicado

El contenido de ácido ascórbico inicial fue 90 mg / 100 g de tejido fresco no variando durante el almacenamiento refrigerado en ninguno de los tratamientos analizados (Figura 4).

El nivel inicial de flavonoides totales fue 10,05 mg de catequina por cada 100 g de tejido fresco. Éste no varió aún luego de 42 días de almacenamiento refrigerado, tanto en los repollitos envasados con la película plástica RD-106® como en los que se aplicó el recubrimiento incluyendo glicerol combinado con la película PVC (G-PVC) .

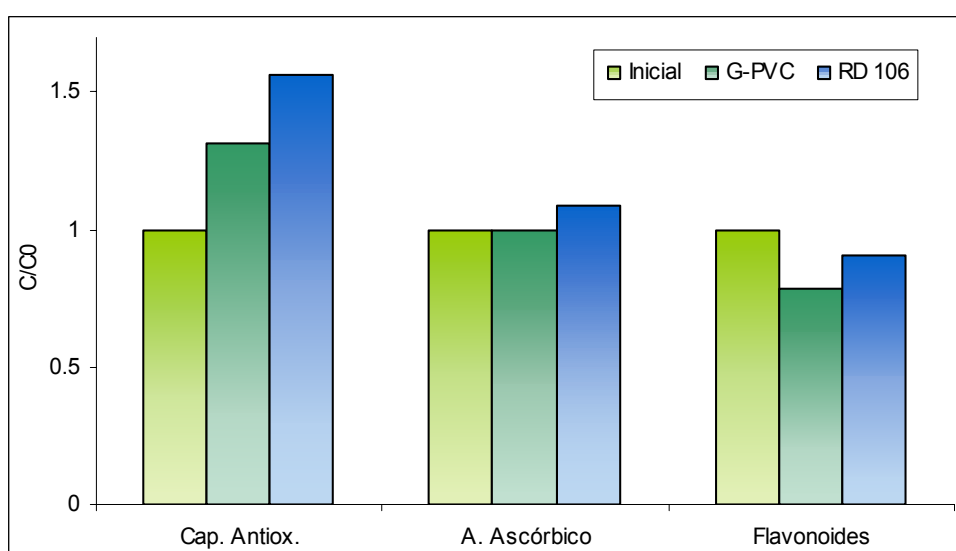


Figura 4. Capacidad antioxidante, contenido de ácido ascórbico y flavonoides totales de repollitos de Bruselas almacenados a 0°C durante 42 días

CONCLUSIONES

Todos los tratamientos que incluyeron el uso de películas plásticas presentaron una calidad comercial aceptable (igual o mayor a 3 en la escala hedónica) hasta los 42 días de almacenamiento refrigerado, manteniendo la firmeza y reduciendo la pérdida de peso y la variación de color del producto.

Los repollitos envasados con la película plástica RD-106® y la combinación G-PVC, conservaron mejor su calidad comercial, sin pérdida de su capacidad antioxidante, contenido de ácido ascórbico y flavonoides totales. Esto indicaría que, aún luego de 42 días a 0°C, no hubo un deterioro de la calidad nutricional en lo que respecta a estos parámetros.

BIBLIOGRAFÍA

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28, (1995), 25-30.

Ferreira, R., Mugridge, A., Chaves, A.R. Effects of packaging films of the qualitative characteristics of Brussels sprouts. 19th International Congress of Refrigeration. **International Institute of Refrigeration. (1995).** La Haya. Proceedings vol I 137-142.

García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. Plasticizer Effect on Starch-based Coatings Applied to Strawberries (*Fragaria × ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), 3758-3767.

Kim, D-O., Jeong, S. W., Lee, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81 (2003), 321-326.

Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible Coatings and Films Based on Polysaccharides*, in: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Eds. Krochta, J. M., Baldwin, E.A. and **Nisperos-Carriedo, M.O.** Technomic Pub. Co., Lancaster, Pa (1994), 305-330.

Wimalasiri, P., Wills, R. B. H. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 256, (1983), 368-371.

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ESCALDADO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD DE REPOLLITOS DE BRUSELAS (*Brassica oleracea* L., var. *gemmifera* DC)

OLIVERA, Daniela F., VIÑA, Sonia Z., MARANI, Claudio M., FERREYRA, Ricardo M., MUGRIDGE, Alicia, CHAVES, Alicia R., MASCHERONI, Rodolfo H.

CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), CONICET–Facultad de Ciencias Exactas UNLP, Calle 47 y 116, La Plata (1900), Bs. As., Argentina. Tel. / Fax: (0221) 424-9287 / 425-4853. E-mail: df_olivera@yahoo.com.ar

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la influencia del tiempo de escaldado y de un pre-escaldado en repollitos de Bruselas, a fin de minimizar pérdidas de calidad y pardeamiento.

Los repollitos se escaldaron por inmersión en agua (100°C) 1, 3 ó 4 minutos o se pre-escaldaron (50°C - 5 min) y escaldaron (3 minutos). Se midió color superficial, firmeza, clorofilas, actividad antioxidante, ácido ascórbico y flavonoides.

La firmeza disminuyó hasta el 40 y 14% del valor inicial para 1 y 4 minutos de escaldado, respectivamente. Todos los tratamientos produjeron disminución de la luminosidad en las cabezas y bases. Los tratamientos 1 y 3 minutos no afectaron el contenido de clorofila total; a diferencia del pre-escaldado que produjo la mayor disminución (27%). La actividad antioxidante aumentó con el tiempo de escaldado, en tanto que la concentración de flavonoides no varió con los tratamientos. El escaldado 4 minutos y el pre-escaldado redujeron los niveles de ácido ascórbico, pero previnieron el pardeamiento interno.

Palabras claves: repollitos de Bruselas; escaldado; color; textura; pardeamiento; antioxidantes

ABSTRACT

With the objective of minimising quality losses and browning in Brussels sprouts, the influence of blanching time and the implementation of a pre-blanching treatment were evaluated in this work.

The sprouts were blanched by immersion in water (100°C) for 1, 3 or 4 minutes or they were subjected to a pre-blanching treatment in warm water (50°C - 5 min) before blanching for 3 minutes. Surface colour, firmness, total chlorophyll content, antioxidant activity, ascorbic acid and flavonoids levels were determined.

Firmness diminished up to reach 40 and 14% of the initial value for 1 and 4 minutes of blanching, respectively. All treatments produced a decrease in luminosity of sprouts heads and bases. Blanching for 1 and 3 minutes did not affect total chlorophyll content, meanwhile pre-blanching treatment produced the highest decrease in chlorophyll content (27%). Antioxidant activity increased with blanching time. Flavonoids concentration did not change by effect of treatments. Ascorbic acid levels lowered when sprouts were blanched for 4 minutes or pre-blanched. The latter treatments allowed to prevent internal browning of sprouts.

Keywords: Brussels sprouts; blanching; colour; texture; browning; antioxidants

INTRODUCCIÓN

Por ser estacionales y perecederas, ciertas hortalizas requieren preservarse por congelación. Para evitar cambios en su color y sabor es necesaria una inactivación previa de los sistemas enzimáticos mediante el escaldado.

En el caso particular de repollitos de Bruselas, su forma globosa dificulta el escaldado, puesto que para poder alcanzar una temperatura adecuada para la inactivación enzimática en el centro de las cabezas se debe someter a las zonas más externas a un tratamiento prolongado a altas temperaturas. Ello ocasiona un proceso de “cocción” parcial que afecta fundamentalmente la estructura, además de provocar otros cambios físicos y químicos indeseables (Canet et al., 1991). Por ejemplo, una de las limitantes del escaldado de repollitos es lograr mantener el “flavor” sin que se produzca un deterioro perceptible en el color (Dietrich et al., 1970).

A tal efecto se han tratado de utilizar métodos de escaldado combinados que reduzcan el período de exposición a altas temperaturas. Así, un pre-escaldado a 50°C permitiría reducir los tiempos de aplicación del escaldado y/o disminuir la pérdida de calidad organoléptica del producto final (Canet et al., 1991). También se ha probado utilizar un período de escaldado en agua hirviendo -que actúa sobre las capas externas- seguido por un tratamiento con microondas, que resultaría más eficiente a nivel de las capas internas (Canet et al., 1991).

Asimismo es importante analizar la estabilidad de los antioxidantes presentes en el producto durante su procesamiento, dada la implicancia en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Ewald et al., 1999).

En el presente trabajo se evaluó la influencia del tiempo de escaldado y de la aplicación de un pre-escaldado en repollitos de Bruselas, buscando las condiciones más adecuadas para evitar el pardeamiento enzimático, minimizando simultáneamente la pérdida de factores de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron repollitos de Bruselas cv Oliver, cultivados a campo en el área del cinturón hortícola de La Plata (Buenos Aires). Los mismos fueron seleccionados según su tamaño y se eliminaron sus hojas más externas.

Tratamientos. Los tratamientos ensayados fueron:

- a) escaldado por inmersión en agua a 100°C durante 1 (E1), 3 (E3) y 4 minutos (E4).
- b) tratamiento combinado, que incluyó un calentamiento previo en agua a 50°C durante 5 minutos más un escaldado de 3 minutos (PE3).

Luego de aplicados los tratamientos, las muestras fueron enfriadas por inmersión en agua-hielo durante 3 minutos.

Determinaciones. Las mismas se realizaron sobre muestras de repollitos recién cosechados (F, frescos) y luego de aplicados los tratamientos.

- **Textura:** Se empleó un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd) equipado con un plato de compresión de 75 mm de diámetro. Los resultados finales se expresaron como el valor de la fuerza máxima (N) necesaria para comprimir 3 mm las cabezas.

- **Color superficial:** Se empleó un colorímetro Minolta CR300 calibrado con un plato estándar blanco. Se registraron los parámetros L^* , a^* y b^* de la escala CIE. Se analizaron los valores del ángulo hue, ($h^\circ = \tan^{-1} b/a$) y del Croma, ($C = [(a^2 + b^2)]^{1/2}$).

Se midió tanto el color de las zonas de corte (bases) como el de las cabezas. En este último caso se efectuaron mediciones en tres posiciones diferentes de los repollitos (una en la parte superior y dos en los laterales).

- **Contenido de clorofila:** La extracción se realizó con acetona 80% v/v, a partir de 0,6 g de tejido homogeneizado, congelado en N_2 líquido y triturado. Sobre alícuotas de los extractos obtenidos se cuantificó el contenido de clorofila total por espectrofotometría. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 646,8 y 663,2 nm. Los resultados finales se expresaron como μg de clorofila total / g de tejido fresco.

- **Actividad antioxidante:** Se realizaron extractos con etanol 96° y se determinó espectrofotométricamente a 515 nm la actividad antioxidante, utilizando el radical cromogénico DPPH^{*} (2,2 difenil-1-picrilhidracilo) (Brand-Williams et al., 1995). Los resultados corresponden a μmoles de DPPH^{*} / 100 g de tejido fresco.

- **Concentración de ácido ascórbico:** Se obtuvieron los extractos correspondientes con solución acuosa de ácido cítrico 3% p/v y se determinó el contenido de ácido ascórbico por HPLC (Wimalasiri y Wills, 1983) a 254 nm. Se utilizó una columna C18 Beckman (diámetro de partícula 5 μm ; diámetro interno 4,6 mm; largo 25 cm) y como eluyente

acetonitrilo:agua (70:30) conteniendo $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,01M. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico / 100 g de tejido fresco.

- **Flavonoides totales:** A partir de 1 g de tejido homogeneizado, congelado y triturado se efectuó la extracción con etanol 96°. Se determinó espectrofotométricamente a 510 nm el contenido de flavonoides totales, empleando NaNO_2 , AlCl_3 e NaOH (Kim et al., 2003). Se realizó una curva patrón en base a distintas concentraciones de catequina. Los resultados finales se expresaron como mg de catequina / 100 g de tejido fresco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para todas la determinaciones, en las figuras han sido representados los valores relativos de cada parámetro, como el cociente entre el valor correspondiente a cada punto de muestreo (i) y el registrado en repollitos frescos (0).

Textura: La fuerza máxima medida en compresión correspondió, en promedio, a 45,07N para repollitos recién cosechados. La firmeza disminuyó a medida que aumentó el tiempo de escaldado (Figura 1); para 1 minuto de escaldado la disminución fue del 60%, en tanto que para 4 minutos correspondió al 86%. El escaldado durante 3 minutos, con o sin pre-escaldado, produjo disminuciones de la firmeza cercanas al 80%. Canet et al. (1991), hallaron diferencias más evidentes en cuanto a que un escaldado en etapas (70°C, 10 min seguido de enfriamiento y 97°C, 2 min) fue más efectivo que el sistema convencional (97°C, 10 min) en reducir la pérdida de textura.

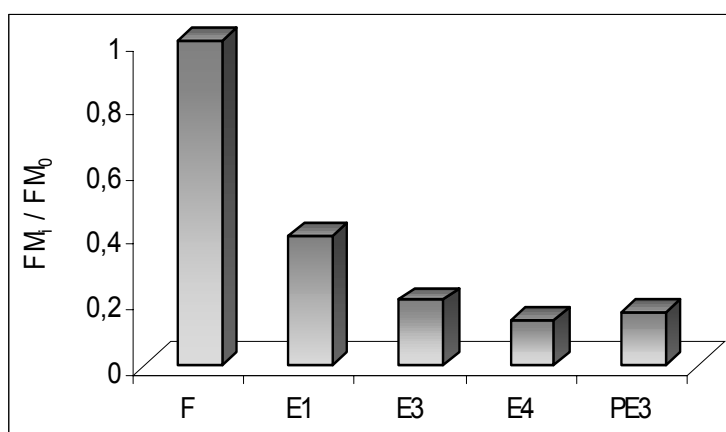


Figura 1. Variación de la firmeza (Fuerza máxima medida en compresión, FM) de repollitos de Bruselas. Efecto de los tratamientos aplicados

Color superficial: El color correspondiente a repollitos frescos (cabezas) estuvo caracterizado por un hue o tinte básico igual a 126,5°, un Croma o saturación igual a 43,1 y un valor L* (luminosidad) de 63,7. En lo que respecta a las bases el L* inicial fue 83,9.

En la Figura 2 se representa la variación de L^* por efecto de los distintos tratamientos. Se observó que L^* se redujo tanto en las cabezas como en las bases. La disminución de L^* en las zonas de corte indicaría un fenómeno de pardeamiento superficial. La mayor reducción en dicho parámetro la presentó el tratamiento E3, con valores de L^* finales equivalentes al 70 y 75% con relación al inicio, para cabezas y bases, respectivamente.

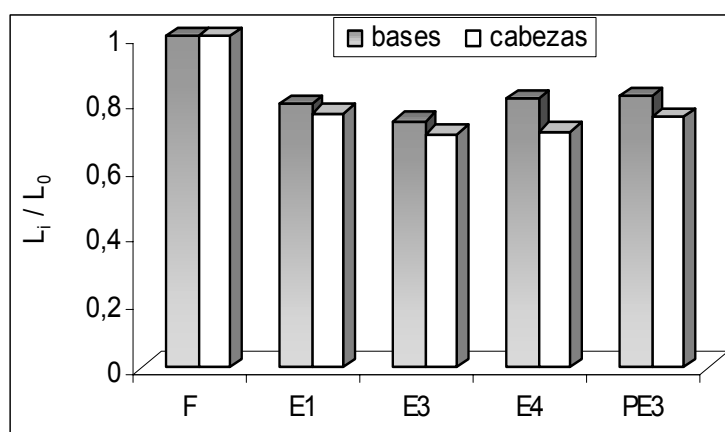


Figura 2. Variación del parámetro L^* en cabezas y zonas de corte de repollitos de Bruselas. Efecto de los tratamientos aplicados.

Adicionalmente a las determinaciones de color superficial, se inspeccionaron visualmente las muestras, efectuando cortes transversales de las mismas a fin de evaluar el estado de los tejidos internos. Así se detectó que los repollitos escaldados durante 1 minuto sufrieron pardeamiento interno. Al respecto, Canet et al. (1991) señalaron que, repollitos de Bruselas escaldados en agua a ebullición (97°C) durante 1 y 3 minutos alcanzaron temperaturas en el centro térmico insuficientes para inactivar la enzima peroxidasa.

Contenido de clorofilas: Los resultados correspondientes se muestran en la Figura 3. El contenido inicial de clorofila total fue igual a $33,3 \mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco. Los tratamientos E1 y E3 no afectaron dicho contenido. De los tratamientos ensayados, el pre-escaldado fue el que produjo la mayor disminución (27%).

Actividad antioxidante: Para repollitos frescos, la actividad antioxidante correspondió en promedio a $836,5 \mu\text{moles de DPPH}^{\bullet} / 100 \text{ g}$ de tejido fresco (Figura 4). Conforme aumentó el tiempo de escaldado, se produjo un incremento de la actividad antioxidante. El pre-escaldado indujo un incremento mayor (del orden del 20%) en relación al escaldado durante 3 minutos.

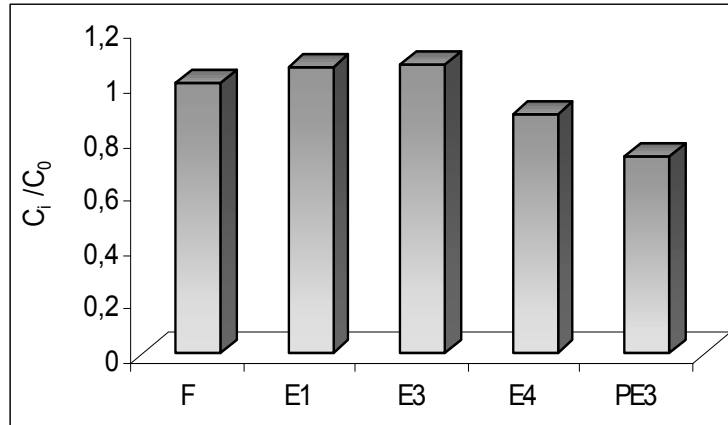


Figura 3. Contenido de clorofila total de repollitos de Bruselas. Efecto de los tratamientos aplicados.

Contenido de ácido ascórbico: El contenido de ácido ascórbico de repollitos recién cosechados fue en promedio 101,3 mg / 100 g de tejido fresco. Los escaldados durante 1 y 3 minutos no produjeron variaciones de dicho contenido (Figura 4), en tanto que se observaron disminuciones del 24 y 20% para E4 y PE3, respectivamente.

Flavonoides totales: En repollitos frescos, el nivel promedio de flavonoides totales fue 14,3 mg de catequina / 100 g de tejido fresco. Los diferentes tratamientos ensayados no indujeron variaciones en dicho contenido (Figura 4).

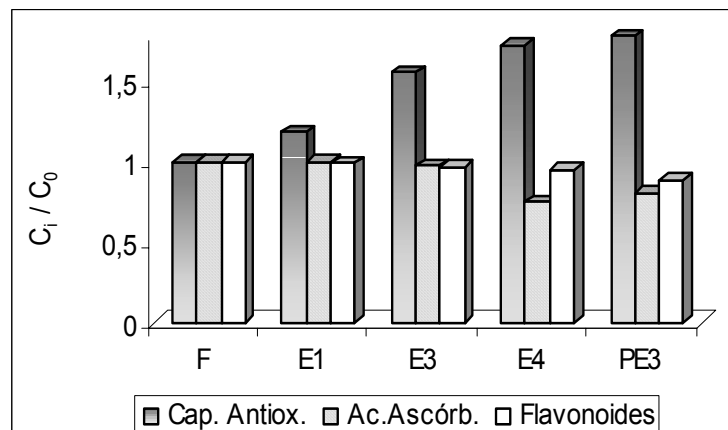


Figura 4. Actividad antioxidante, contenido de ácido ascórbico y flavonoides totales en repollitos de Bruselas. Efecto de los tratamientos aplicados.

CONCLUSIONES

- El escaldado durante 1 minuto redujo la textura en menor medida, no afectó los contenidos iniciales de clorofila, ácido ascórbico ni la actividad antioxidante. Sin embargo resultó ser insuficiente para evitar el pardeamiento interno.
- Tres minutos de escaldado fueron suficientes para evitar el pardeamiento interno y no afectaron el contenido de clorofilas.
- Los tratamientos E4 y PE3 indujeron la mayor pérdida de firmeza y del contenido de clorofilas, la menor disminución de L* en las zonas de corte y los mayores valores de actividad antioxidante.
- Independientemente del tratamiento aplicado, los niveles de ácido ascórbico permanecieron relativamente altos y no se observó pérdida de flavonoides totales.

BIBLIOGRAFÍA

- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28: 25-30.
- Canet, W.; Gil, M.; Alique, R.; Alonso, J. (1991).** Efecto de diferentes escaldados en la textura y contenido de ácido ascórbico de coles de Bruselas congeladas. *Rev. Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31: 46-55.
- Dietrich, W. C.; Huxsoll, C. C.; Guadagni, D. G. (1970).** Comparison of microwave, conventional and combination blanching of Brussels sprouts for frozen storage. *Food Technol.*, 24 (5): 105-109.
- Ewald, C.; Fjelkner-Modig, S.; Johansson, K.; Sjöholm, I.; Akesson, B. (1999).** Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chem.*, 64, 231-235.
- Kim, D-O.; Jeong, S. W.; Lee, C. Y. (2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81: 321-326.
- Wimalasiri, P.; Wills, R. B. H. (1983).** Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 256: 368-371.

EFFECTO DE POLIAMINAS SOBRE LA EVOLUCIÓN DE PIMIENTOS

FERNÁNDEZ, Lety O. y CHAVES, Alicia R.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)-Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. 47 y 116 S/N (1900) La Plata. Tél. 0221 4249287 FAX 0221 4254853. E-mail: arch@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

La velocidad de maduración de pimientos es acelerada cuando los frutos se tratan con etileno. Sin embargo cuando el contenido endógeno de poliaminas es elevado, el color de los frutos no evoluciona o lo hace ligeramente. En este trabajo se estudió la influencia de tratamientos con poliamina y etileno sobre la evolución del color y senescencia de pimientos. Para ello se trabajó con pimientos (*Capsicum annum* L.) cv Zafiro cosechados con un 25-40% de color rojo en la superficie. Los frutos se trataron con putrescina (0,5 g/l), espermidina (0,5 g/l y 1,0 g/l), espermina (0.5 g/l) y etefón (1000 ppm) por inyección de 1 ml de dichas soluciones en la cavidad interna del pimiento. Los frutos tratados y controles sin tratar fueron envasados separadamente en bolsas de polietileno perforadas y colocados a 20°C durante 5 días. Se determinó la actividad respiratoria, el color superficial, el contenido de pigmentos, la pérdida de electrolitos, el contenido de fenoles, la firmeza y las características sensoriales del fruto.

Las muestras tratadas con poliaminas y con etefón presentaron una disminución del hue durante el período a 20°C evidenciando el desarrollo del color rojo. El hue disminuye más rápidamente en los frutos tratados con etefón y más lentamente en los controles y en los tratados con poliamina. El contenido de pigmentos varió concordantemente. No se observaron diferencias significativas entre frutos controles y tratados en la evolución de la actividad respiratoria, la firmeza y el contenido de fenoles. El tratamiento con espermidina (1,0 g/l) retardó en mayor medida la evolución de los pimientos. No hubo desarrollo de daños debidos a los tratamientos.

Palabras clave: pimientos, poliaminas, etileno, color

ABSTRACT

Ethylene accelerate the ripening of sweet pepper fruits. However, if the polyamines level is high, the fruit colour practically not change. In this work we studied the influence of polyamines and ethylene on the colour evolution and senescence of bell pepper fruits.

Peppers (*Capsicum annum* L.) cv Zafiro were harvested with 25-40% of red colour and were treated with putrescine (0.5 g/l), spermine (0.5 g/l), spermidine (0.5 and 1.0 g/l) and ethephon (1000 ppm) by injection of 1 ml of solutions into the fruit with a syringe. Control (no treated) fruit and treated fruits were placed in perforated polyethylene bags and stored at 20°C for 5 days. Respiratory activity, superficial colour, pigment level, electrolyte leakage, phenols level, firmness and sensorial characteristics were determined.

Treated fruits with polyamines or with ethephon showed a diminution of hue value during the period at 20°C. Hue value changed more rapidly in ethephon treated fruits and more slowly in control and polyamine treated fruits. The pigment levels changed accordingly. Respiratory activity, firmness and phenol levels were similar in control and treated fruits. Treatment with spermidine (1 g/l) retarded the pepper evolution. Fruits were not damaged by treatments.

Keywords: sweet pepper, polyamines, ethylene, colour.

INTRODUCCIÓN

Los pimientos (*Capsicum annum* L) son frutos no climatéricos en los que el etileno tiene poco efecto sobre el proceso de maduración (Lelièvre et al., 1997; Giovannoni, 2001). Así se ha encontrado que su velocidad de maduración es acelerada cuando los frutos se tratan con etileno (Sgroppo, 1997). Sin embargo cuando el contenido endógeno de poliaminas (PAs) es elevado, el color de los frutos no evoluciona o lo hace ligeramente. Estudios recientes mostraron que las PAs reducen la síntesis de etileno inhibiendo la ACC sintasa, y que las mismas son efectivas en reducir la degradación de clorofilas en hojas. Esta relación entre PAs y etileno parecería depender de la especie vegetal y del cultivar, encontrándose resultados contradictorios (Pandey et al., 2000).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de tratamientos poscosecha con poliaminas y etileno sobre la calidad de pimientos, especialmente la senescencia y la evolución del color .

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: Se trabajó con pimientos (*Capsicum annum* L.) cv Zafiro, cultivados en Arana, y cosechados con un 25% de color rojo en la superficie .

Tratamientos: Los frutos se trataron con putrescina (0,5 g/l), espermidina (0,5 g/l), espermina (0,5 g/l) y etefón (1000 ppm, para generar etileno), por inmersión durante 1 minuto en las distintas soluciones o por inyección de 1 ml de las mismas en la cavidad

interna del pimiento. También se realizaron tratamientos con poliaminas y etefón por inyección en forma conjunta. Los frutos tratados y controles sin tratar fueron envasados separadamente en bolsas de polietileno perforadas y colocados a 20°C (para evitar el desarrollo del daño por frío y acelerar la senescencia) durante 5 días.

Determinaciones:

Actividad respiratoria: se determinó la actividad respiratoria colocando los frutos en forma individual en frascos herméticos y analizando por cromatografía gaseosa los contenidos de CO₂ y O₂ en la atmósfera desarrollada dentro del frasco al cabo de una hora. Se empleó un cromatógrafo Shimadzu, equipado con un detector de conductividad y una columna Alltech CTR I. Se utilizó helio como gas portador.

Color superficial: se evaluó empleando un colorímetro Minolta, determinando el ángulo de color (hue) y el croma (Cr) como la media se al menos cuatro determinaciones en la zona ecuatorial del fruto.

Contenido de pigmentos: los pigmentos fueron extraídos con acetona y se determinó espectrofotométricamente la concentración de clorofilas y carotenoides.

Contenido de fenoles: se determinó espectrofotométricamente utilizando el reactivo de Folin Ciocalteau a 760 nm.

Pérdida de electrolitos: se colocaron discos de pimiento en una solución 0,6M de manitol y se determinó su conductividad en forma inmediata (C₀) y luego de 2 horas de incubación (C₂). Finalmente los discos se congelaron y trituraron con manitol. Luego de centrifugar se determinó la conductividad del sobrenadante (C_F). Los resultados se expresaron como el porcentaje de pérdida de electrolitos.

Firmeza: Se evaluó con un texturómetro TA-XT2i Stable Micro Systems equipado con un punzón de 2 mm de diámetro. Se determinó la fuerza máxima de rotura en N.

Características sensoriales: se observó visualmente la evolución del color, aspecto general, presencia de daños, etc

Análisis de resultados: Las experiencias se realizaron según un diseño factorial (factores: tratamiento, tiempo) y los resultados se analizaron mediante un ANOVA. Se empleó un grado de significación igual a 0,5. Las medias se compararon empleando el test de Fisher (LSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que los frutos tratados por inmersión presentaron una evolución errática respecto a la evolución del color (figura 1), no así los

tratados por inyección. Luego se seleccionó esta última forma de tratamiento para las experiencias futuras.

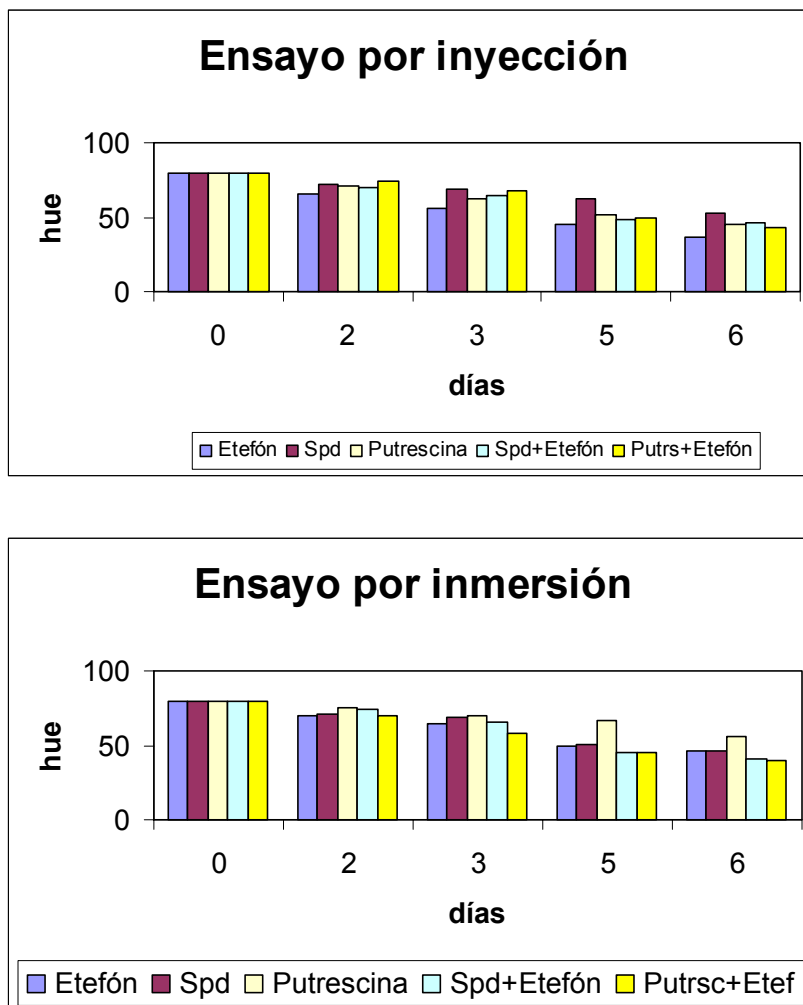


Figura1: Evolución del color en pimientos tratados por inyección o por inmersión en las soluciones indicadas.

La actividad respiratoria de los pimientos al momento de la cosecha fue igual a 12,1 ml CO₂/h kg y disminuyó aproximadamente dos veces durante el almacenamiento a 20 °C. Respecto a los tratamientos, en la tabla 1 puede verse que los tratamientos con poliaminas y etileno no afectaron la actividad respiratoria de los pimientos respecto a los controles.

Los pimientos almacenados a 20°C mostraron un descenso continuo en el valor del hue (figura 2), indicando el desarrollo del color rojo. Los frutos tratados con las distintas poliaminas y con etefón presentaron también una disminución del hue durante el período a 20°C evidenciando el desarrollo del color rojo (figura 2) pero con diferentes velocidades. Así el hue disminuyó más rápidamente en los frutos tratados con etefón y más lentamente

en los controles y en los tratados con espermidina (1g/l). El hue en los frutos tratados con poliaminas más etefón evolucionó en forma similar a los tratados con etefón solamente (figura 2). El croma aumentó durante la exposición a 20°C. pero este aumento es más lento en los frutos control y tratados con espermidina que en los tratados con etefón (figura 2)

Tabla 1: Variación de la actividad respiratoria (ml CO₂/h kg), contenido de fenoles (mg/g), pérdida de electrolitos (%) y firmeza (N) de pimientos controles o tratados con poliaminas o con etileno. almacenados a 20°C.

Tratamiento	actividad respiratoria		fenoles		pérdida de electrolitos		firmeza	
	0 día	5 días	0 día	5 días	0 día	5 días	0 día	5 días
controles	12.1	4.2	0.49	0.57	17	14.5	16.6	14.6
putrescina	--	--	0.49	0.59	17	14.0	16.6	13.6
espermidina	12.4	5.7	0.49	0.53	17	13.5	16.6	14.0
etefón	14.1	4.8	--	--	17	11.5	--	--
Espemidina+ etefón	13.4	6.1	--	--	17	11.5	--	--
LSD	2.5		0.11		4.2		3.1	

El contenido de clorofilas disminuyó continuamente durante la exposición de los frutos a 20°C (figura 2). El nivel de clorofila a siempre fue superior al de clorofila b, disminuyendo más rápidamente la clorofila a, como generalmente sucede en vegetales superiores (datos no mostrados). El tratamiento con espermidina incidió en la velocidad de degradación de las clorofilas, la cual fue más lenta. El tratamiento con etileno aceleró dicha degradación, en tanto que el tratamiento con putrescina o espermina prácticamente no la afectó.

En los pimientos controles los carotenoides aumentaron durante el período a 20°C (figura 2). Esta acumulación de carotenoides fue más lenta cuando los pimientos fueron tratados con espermidina y más acelerada cuando se los trató con etileno. Los tratamientos con putrescina y espermina tuvieron menor influencia (figura 2).

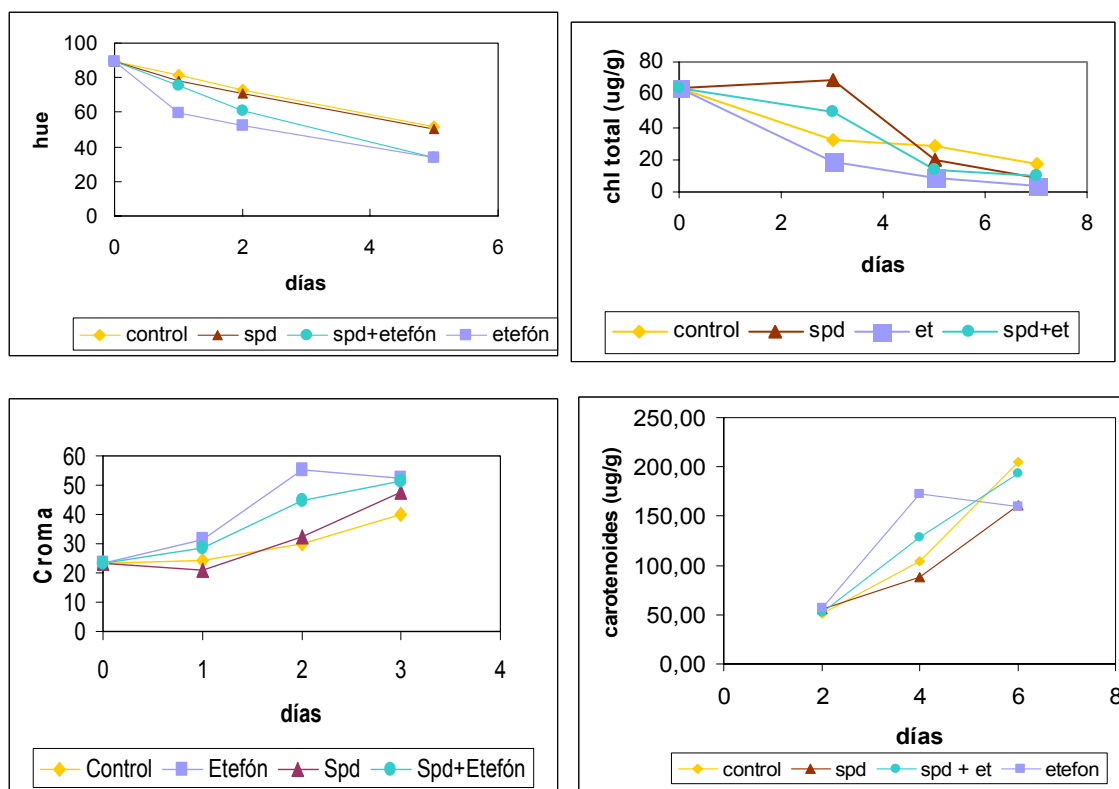


Figura 2: Cambios en hue, croma y contenido de clorofila y carotenoides en pimientos cv Zafiro controles o tratados y almacenados a 20°C .

La firmeza de los frutos, expresada como la fuerza máxima obtenida en un ensayo de penetración, inicialmente fue de 16,6 N y prácticamente no varió durante la exposición a 20°C (Tabla 1). Este comportamiento no fue alterado por los tratamientos con poliaminas o con etefón.

El contenido de fenoles, inicialmente igual a 0.5 mg/g no se vieron significativamente afectados durante la exposición a 20°C. Los tratamientos con poliaminas o etileno no tuvieron incidencia sobre la evolución de los compuestos fenólicos (Tabla 1).

La pérdida de electrolitos al momento de la cosecha fue igual a 17.0 % y disminuyó ligeramente en los cinco días a 20°C. Los tratamientos con poliaminas o etileno no afectaron su evolución respecto a los controles (Tabla 1).

La disminución en los valores de la actividad respiratoria, la constancia el contenido de fenoles y la pérdida de electrolitos indican que los tratamientos no causaron daños en el tejido vegetal. Este aspecto se comprobó con las observaciones sensoriales. Tanto los pimientos control como los tratados no mostraron daños durante el curso de la experiencia, siendo la calidad de los frutos muy buena aún al fin del almacenamiento. El

color en los frutos controles evolucionó hacia el color rojo característico de la variedad al cabo de los 5 días de iniciada la experiencia, al igual que los tratados con putrescina. Los tratados con etileno presentaron dicho color al cabo de 2-3 días en tanto que los tratados con espermidina necesitaron un tiempo superior a los 5 días para alcanzar el color rojo. Concluyendo, el etileno acelera la evolución del color en pimientos, en tanto que el tratamiento con espermidina (1,0 g/l) la retarda. No hubo desarrollo de daños en los frutos debidos a los tratamientos, como lo demostró la no variación en el contenido fenoles, la pérdida de electrolitos y la actividad respiratoria.

BIBLIOGRAFÍA

Giovannoni, J., 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 52, 725: 749.

Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J.C.,1997. Ethylene and fruit ripening. Physiol. Plant. 101, 727: 739.

Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K., Kumar, N., 2000. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. J. Biosci. 25, 291:/299.

Sgroppo Sonia, 1997. Efecto del etileno sobre la maduración poscosecha de pimientos (*Capsicum annuum* L.). Trabajo de Tesis Doctoral. FCE-UNLP

EFFECTO DEL TRATAMIENTO ÁCIDO SOBRE ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD ESPUMANTE DE PROTEÍNAS DE SOJA Y AMARANTO

VENTUREIRA, Jorge L.; APHALO, Paula; QUIROGA, Alejandra, MARTÍNEZ, E. Nora; AÑÓN, M. Cristina

CIDCA-Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata-CONICET, 47 y 116, 1900 La Plata, cidca@quimica.unlp.edu.ar, TEL-FAX (0221)-424-9287

RESUMEN

Las proteínas de soja y amaranto constituyen ingredientes de excelencia por su calidad nutricional y aceptables propiedades funcionales. En este trabajo se obtuvieron aislados proteicos de soja, amaranto y una mezcla de ambos, modificados mediante tratamiento ácido y posterior neutralización. Se estudiaron las características estructurales de los tres aislados y se analizó su solubilidad y capacidad espumante. El tratamiento produjo en los aislados, cambios conformacionales detectados mediante espectroscopía de fluorescencia y medida de hidrofobicidad superficial. Estos cambios no se vieron reflejados en la solubilidad, que fue similar para aislados nativos y modificados. Sin embargo, la actividad espumante de los aislados tratados fue superior a la de los nativos lo cual es atribuible a las modificaciones conformacionales producidas por el tratamiento. El aislado mezcla se comportó como la suma de sus proteínas constituyentes lo que permite descartar interacciones importantes entre las proteínas heterólogas.

Palabras Clave: Soja – amaranto – proteínas de reserva – propiedades funcionales – estructura proteica

ABSTRACT

Amaranth and soybean proteins constitute good food ingredients because of their high nutritional quality and their acceptable functional properties. In this work amaranth and soybean isolates and their mixture were prepared and modified by acid treatment followed with their neutralization. The isolate structural characteristics were studied and their solubility and foaming capacity were analyzed. The treated isolates presented conformational modifications as shown by fluorescence spectroscopy and surface hydrophobicity determination. Native and modified isolates showed the same solubility in a saline buffer indicating that the structural modifications did not affect that property. On the other hand the treated isolates foaming activity was higher than the native isolates activity,

which might be due to the structural modifications carried out by the treatment. The behaviour of the mixture of proteins was the same as expected by the sum of the amaranth and soybean isolates, suggesting that there were not major interactions among the heterologous proteins.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de soja poseen buenas propiedades nutricionales (1) mientras que las proteínas de amaranto, por su balanceada composición aminoacídica (2), pueden complementar a las proteínas de soja.

Los constituyentes proteicos mayoritarios del amaranto, albúminas y globulinas, poseen una diversidad de propiedades estructurales y fisicoquímicas (3, 4, 5) que las presentan como muy versátiles para desarrollar propiedades funcionales, las cuales han comenzado a estudiarse (6,7). Por otro lado, las proteínas de soja, mayoritariamente globulinas 7s y 11s, han sido muy estudiadas y, habiéndoselas caracterizado desde el punto de vista estructural y funcional, presentan muy buenas propiedades funcionales (8). A través de modificaciones estructurales por métodos físicos, químicos y enzimáticos se han logrado mejorar varias propiedades funcionales de proteínas de soja (9), así como mediante hidrólisis enzimática se aumentó la solubilidad de un aislado de amaranto (10).

Considerando que la utilización de aislados con proteínas de soja y amaranto permitiría sumar las ventajas de sus constituyentes y dado que mediante modificaciones estructurales se pueden mejorar sus características funcionales, nuestro objetivo fue estudiar las propiedades fisicoquímicas y espumantes de proteínas de soja y amaranto sometidas a tratamiento ácido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de aislados.: los aislados de soja y amaranto fueron preparados mediante extracción alcalina y precipitación isoeléctrica de acuerdo a lo descrito por petruccelli y añón (11) y martínez y añón (12) respectivamente.

Tratamiento de aislados. Los aislados se suspendieron en hcl 0.01n (concentración final de proteína 10 mg/ml) y se ajustó a ph = 2 con hcl 1n.

Se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas y luego se diluyó 10 veces con buffer a. Se ajustó al ph = 7,5 con naoh 1n esta suspensión permaneció a temperatura ambiente 2 h bajo agitación y otras 18h en reposo antes de ser utilizada para las determinaciones.

Electroforesis. Se utilizó un equipo Bio-Rad modelo Mini Protean II. Para la electroforesis desnaturizante (**SDS-PAGE**) se siguió la técnica descrita por Laemmli (1970) mientras que para la no desnaturizante (**PAGE-nativa**) se utilizó el sistema de buffers anterior pero sin el agregado de SDS. En ambos casos los análisis se realizaron sobre geles de acrilamida al 12% (p/v) con gel apilador de poliacrilamida al 4% (p/v).

Cromatografía de exclusión molecular. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente en un equipo FPLC Pharmacia LKB utilizando una columna Superose 6B HR 10/30. Se eluyó con buffer A (K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 0,4M con un flujo de 0,2 mL/minuto.

Solubilidad. Se suspendieron las muestras (1mg/mL) en buffer A y se mantuvieron por 1 hora en agitación. La concentración proteica se determinó por el método de Lowry.

Espectroscopia de fluorescencia. Se determinaron los espectros de emisión de los aislados nativos y modificados con un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 50B. La longitud de onda de excitación fue $\lambda = 290$ nm.

Hidrofobicidad superficial (Ho). Se determinó la Ho como la cantidad de la sonda fluorescente hidrofóbica ANS unida a la proteína, medida en IF (intensidad de fluorescencia) /mg de proteína en condiciones saturantes de sonda (13).

Propiedades Espumantes. La espuma fue obtenida por burbujeo de N_2 y medida por el método conductimétrico (14). Las suspensiones de proteína (1 mg/mL) en buffer A, se sometieron a burbujeo (100 mL/min) durante 1 minuto. Se determinaron la capacidad de formación de espuma como el volumen máximo de líquido incorporado a la espuma y la estabilidad, expresada como el tiempo en que drenó el 50% de la espuma al final del burbujeo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los aislados de soja y amaranto sometidos al tratamiento descrito fueron analizados mediante cromatografía de exclusión molecular (figuras 1 a y b) y electroforesis no desnaturizante (figura 2). En la figura 1a (aislados nativos disueltos en buffer a) se puede observar que el aislado de amaranto está constituido mayoritariamente por albúminas de bajo peso molecular (alb) y una muy baja proporción de globulinas (gl) mientras que al aislado de soja lo forman moléculas de alto pm correspondientes a las globulinas 11s y 7s (11s-7s) y especies de menor tamaño (mt). El aislado mezcla (50%) presenta un perfil intermedio. Los perfiles de los aislados tratados (figura 1b) muestran una disminución de las moléculas de mayor tamaño pertenecientes a las globulinas lo que concuerda con un aumento de las especies de bajo peso molecular. Estos resultados

sugieren que, luego del tratamiento ácido y posterior neutralización, gran parte de las moléculas de globulina, tanto en el amaranto como en la soja, se encuentran disociadas ó se han insolubilizado. El perfil del aislado mezcla es concordante con un aporte equivalente de ambos constituyentes. Los resultados obtenidos mediante electroforesis nativa (figura 2), se correlacionan con los cromatográficos en que, tanto en la soja como en el amaranto y la mezcla, los aislados tratados muestran una disminución de especies de baja movilidad - globulinas de mayor tamaño, indicadas con g en la figura 2 - con aparición de nuevas bandas de alta movilidad, indicativas de un menor tamaño (indicadas con flechas en la figura 2). Este resultado sugiere que el tratamiento ha producido la disociación de las moléculas más grandes.

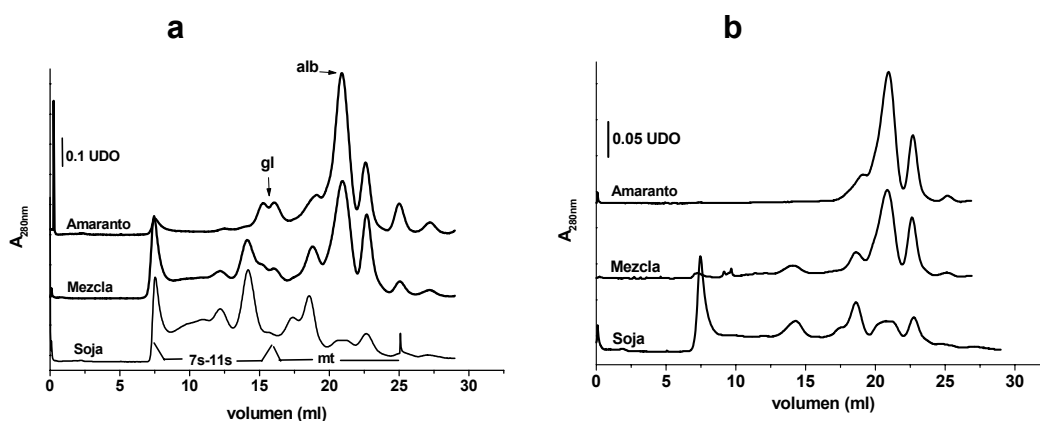


Figura 1: Perfiles de FPLC de los aislados de soja, amaranto y la mezcla. (a): aislados nativos; (b): aislados tratados con ácido. Se indican las zonas correspondientes a las albúminas (alb) y globulinas (gl) en el amaranto y globulinas 7S-11S y especies de menor tamaño (mt) en la soja.

Cuando se estudió la solubilidad en buffer A de los aislados nativos y modificados (Tabla 1) se comprobó que el aislado de soja es más soluble que el de amaranto, aproximadamente el doble, con un comportamiento intermedio del aislado mezcla. El tratamiento prácticamente no ejerce efecto sobre la solubilidad, produciendo sólo una muy leve disminución de esta propiedad en las proteínas de soja y aumento en la mezcla.

Los perfiles SDS-PAGE de las proteínas solubles e insolubles de los aislados tratados se muestran en la Figura 3, los aislados sin tratar presentaron perfiles similares (resultados no mostrados).

Tabla 1. Solubilidad en buffer a de aislados nativos y modificados

	Sin tratar			Tratado		
Aislado	Soja	Mezcla	Amaranto	Soja	Mezcla	Amaranto
Solubilidad (%)	77±2	53 ±1	38,0±0,1	70±4	60±3	39,3±0,3

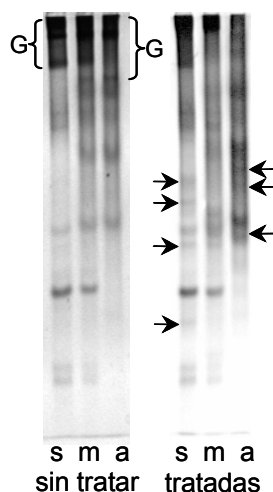


Figura 2: PAGE-nativo de aislados tratados y sin tratar. Calles (s): aislado de soja, (m): mezcla de aislados, (a): aislado de amaranto. Flechas: las nuevas bandas en las proteínas tratadas; G: globulinas de baja movilidad.

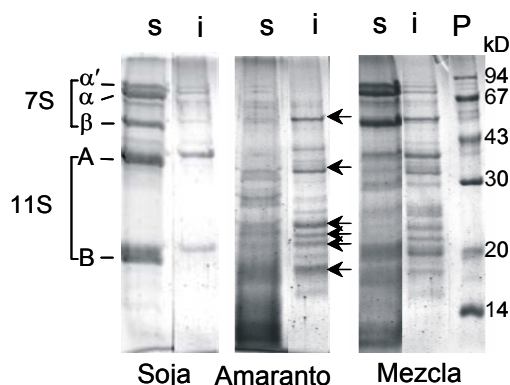


Figura 3: SDS-PAGE de aislados tratados. (s) Proteínas solubles, (i) proteínas insolubles. Están indicadas las proteínas 7S y 11S de la soja con sus fracciones y con flechas las bandas correspondientes a las globulinas de amaranto.

De acuerdo a estos resultados, la fracción soluble del aislado de soja contiene la globulina 7s y la 11s (figura 3, soja, calle s) mientras que en el insoluble (calle i) la globulina mayoritaria es la 11s. Por otro lado, el soluble de amaranto está enriquecido en albúminas, fracción a la cual pertenecen la mayoría de los polipéptidos presentes en el perfil, especialmente los de bajo peso molecular (figura 3, amaranto, calle s). Las

globulinas - indicadas con flechas en la figura - se encuentran mayoritariamente en el insoluble (figura 3, amaranto, calle i) estando en muy baja proporción en el soluble. Este conjunto de resultados en los que se muestra que el tratamiento realizado sobre los aislados no ha producido variaciones cuantitativas ni cualitativas en las proteínas que se solubilizan en buffer a, indican, en complementación con los análisis anteriores, que las proteínas de soja y amaranto tratadas se encuentran mayoritariamente disociadas sin haber sufrido agregación.

Se analizó el estado conformacional de los aislados tratados en comparación con los nativos mediante espectroscopía de fluorescencia y determinación de la hidrofobicidad superficial (h_o) de las proteínas disueltas en buffer a. En la figura 4 se muestran los respectivos espectros de emisión.

Aislado	λ_{max} (nm)	$I_{f_{max}}$
A nativo	356	$8,6 \times 10^3$
A tratado	345	$10, \times 10^3$
S nativo	344	$7,7 \times 10^3$
S tratado	344	$7,3 \times 10^3$

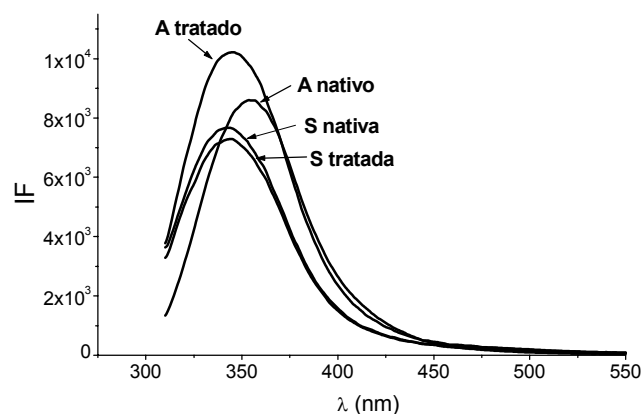


Figura 4: espectros de emisión de fluorescencia de aislados tratados y sin tratar. El inserto muestra los valores máximos de intensidad de fluorescencia y la longitud de onda que corresponde a ese máximo.

en ellos se puede observar que el aislado de amaranto tratado presenta un corrimiento de la λ_{max} así como un aumento de la intensidad de fluorescencia con respecto al nativo, lo que sugiere que en estas proteínas el tratamiento ha provocado cambios conformacionales irreversibles. No sucede lo mismo en el caso del aislado de soja en el cual, si bien se muestran diferencias entre los dos espectros, estas son de baja magnitud, indicativas de pequeños cambios conformacionales. La diferente intensidad en la fluorescencia de los aislados nativos de soja y amaranto indican diferencias conformacionales entre los aislados, ellas se deben a distinto tipo de proteína que se solubiliza en buffer a en cada aislado.

Las diferencias estructurales entre las proteínas de soja y amaranto también se ven reflejadas en su hidrofobicidad superficial (h_o). De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 5, el aislado de soja presenta mayor h_o que el aislado de amaranto. En ambos

aislados el tratamiento provoca una disminución en la ho, siendo mucho mayor la diferencia en el aislado de amaranto que en el de soja, lo que, en concordancia con los resultados de fluorescencia intrínseca, presenta a las proteínas de amaranto como más sensibles al tratamiento ácido. El aislado mezcla tratado presentó una ho intermedia entre las de sus componentes.

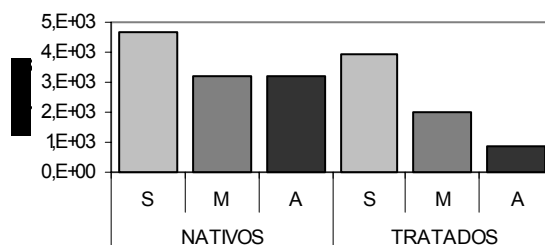


Figura 5: hidrofobicidad superficial (ho) de aislados tratados y sin tratar. S: soja, m: mezcla de aislados, a: amaranto.

Cuando se estudió el efecto del tratamiento sobre la capacidad espumante de los aislados se observó que el mismo provocaba un mejoramiento de esta propiedad funcional en las tres muestras (figura 6). La capacidad de formar espuma, reflejada en el volumen máximo de solución incorporada a la espuma (figura 6a) era superior en el aislado de amaranto y la mezcla que en el aislado de soja, mientras que luego del tratamiento los tres aislados muestran igual capacidad de formación de espuma, mayor que en los aislados sin tratar. La estabilidad de las espumas formadas por los aislados, reflejada en el tiempo de estabilidad media (figura 6b), también mejoró luego del tratamiento. Esta propiedad era superior en el aislado de soja nativo que en el de amaranto, diferencia que se mantuvo luego del tratamiento. La estabilidad de la espuma del aislado mezcla tratado fue similar a la del amaranto.

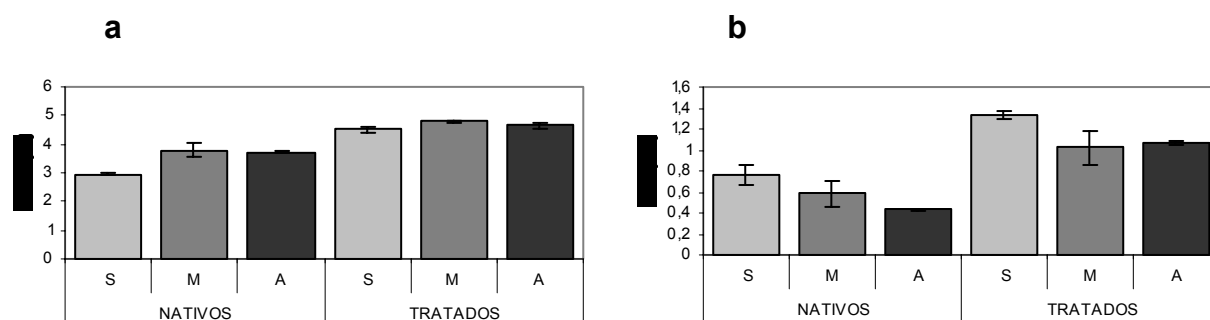


Figura 6: gráficos de capacidad de formación de espuma (a) y estabilidad de la espuma (b) de los aislados de soja (s), mezcla (m) y amaranto (a).

CONCLUSIONES

El tratamiento ácido con posterior neutralización provocó la disociación de las globulinas de amaranto y la disociación parcial de las globulinas de soja. Estos cambios estructurales se vieron reflejados en la disminución de la hidrofobicidad superficial y modificación del espectro de fluorescencia, cambios que fueron más marcados en las proteínas de amaranto que en las de soja. La presencia de las proteínas de ambas fuentes en el aislado mezcla no provocó en el aislado tratado un comportamiento muy diferente al esperado considerando la suma de los aislados constituyentes.

Si bien la solubilidad en buffer de alta fuerza iónica de estos aislados no se vio modificada por el tratamiento, sí lo hizo su capacidad espumante. Tanto la capacidad de formación como la estabilidad de las espumas de los aislados tratados fue superior a las de los nativos. Se ha informado el aumento de la funcionalidad de superficie de las proteínas con el incremento de la hidrofobicidad superficial de las mismas (15). Los resultados de este trabajo muestran una correlación negativa entre la capacidad espumante y la h₂o de estos aislados, lo que lleva a suponer que el aumento de moléculas de menor tamaño sería el cambio estructural responsable de su mejoramiento funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Liu, K. (2000).** Expanding Soybean Food Utilization. *Food Tech.*, 54, 46-.
- Bressani, R. (1989). The Proteins Of Grain Amaranth. *Food Review International*, 5, 13–38.
- Castellani O.F.; Martínez E.N.; Añón M.C. (1998).** Structural Modifications Of An Amaranth Globulin Induced By Ph And NaCl, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4846-4853
- Martínez, E.N.; Castellani, O.; Añón, M.C. 1997** Common Molecular Features Among Amaranth Storage Proteins, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3832-3839
- Segura-Nieto, M.; Barba De La Rosa, A.P.; Paredes-López, O. (1994).** Biochemistry Of Amaranth Proteins. In O. Paredes-López (Ed.), *Amaranth: Biology, Chemistry And Technology* (Pp. 75–106). Boca Raton: Crc Press
- Marccone, M.; Kakuda, Y. (1999).** A Comparative Study Of The Functional Properties Of Amaranth And Soybean Globulin Isolates. *Nahrung*, 43, 368-373
- Fidantsi, A.; Doxastakis, G. (2001).** Emulsifying And Foaming Properties Of Amaranth Seed Protein Isolates. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 119-124

- Fukushima, D. (1991).** Recent Progress Of Soybean Protein Foods: Chemistry, Technology, And Nutrition. *Food Rev. Intl.* 7, 323-351
- Schwenke, K.D. (2001).** Legume Protein Structure And Interaction. Reflections About The Functional Potential Of Legume Proteins. A Review. *Nahrung*, 45, 377-381
- Scilingo, A.A.; Molina Ortiz, S.E.; Martínez E.N.; Añón, M.C. (2002).** Amaranth Protein Isolates Modified By Hydrolytic And Thermal Treatments. Relationship Between Structure And Solubility. *Food Reas. Intl.* 35, 855-865.
- Petrucelli, S. & Añón, M.C. (1995).** Partial Reduction Of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2001-2004.
- Martinez, E. N.; Añón, M.C. (1996).** Composition And Structural Characterization Of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic And Calorimetric Study. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2523-2530,
- Cardamone, M.; Puri, N.K., (1992).** Spectrofluorimetric Assesment Of The Surface Hidrophobicity Of Proteins. *Biochem. J.* 282, 589-593
- Wagner, J. R., Sorgentini, D.A.; Añón, M. C. (1996)** Thermal And Electrophoretic Behavior, Hydrophobicity, And Some Functional Properties Of Acid-Treated Soy Isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1881.
- Kinsella, J.E.; Phillips, L. (1989).** Structure-Function Relationships In Food Proteins, Film And Foaming Behavior. En *Food Proteins*; Editado Por Kinsella, J.; Soucie, W.; Am. Oil Chem. Soc., Champaing, Il, Capítulo 4, Pp 52-77.

INFLUENCIA DEL TIPO DE ENDOSPERMO DE MAÍZ SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE PRODUCTOS EXPANDIDOS A BASE DE MAÍZ-SOJA

PEREZ Adrián A., GUTIERREZ Cristian A., DRAGO Silvina R., CARRARA Carlos R., GONZALEZ Rolando J.

Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL. Paraje El Pozo, Ciudad Universitaria, cc 266 Santa Fe. TE: 0342-4571150. Fax: 0342-4571148. E-mail: *rolgonza@fiqus.unl.edu.ar*

RESUMEN:

El uso de sémolas de maíz en la elaboración de productos expandidos está ampliamente difundido, sin embargo, existen discrepancias respecto al efecto de la dureza del endospermo sobre la calidad del producto, cuando se utilizan mezclas de maíz con oleaginosas y/o legumbres. Se analizó el efecto del agregado de soja con lipoxigenasa inactivada sobre las características de productos expandidos, elaborados con maíces de endospermos de diferente dureza.

La cocción por extrusión de las mezclas maíz-soja permitió obtener productos expandidos con buenas características sensoriales, siendo las condiciones de extrusión más adecuadas las correspondientes a temperaturas intermedias (170 °C) y humedad entre 14-16%. Por otra parte, el agregado de soja con lipoxigenasa inactivada, no solo mejoró la calidad proteica del maíz, sino que además, se pudo verificar que la soja adicionada a maíz con menor dureza de endospermo permite obtener productos de mayor expansión.

Palabras claves: maíz, dureza de endospermo, soja, extrusión.

ABSTRACT:

Corn grits are widely used to elaborate expanded products. However, some discrepancies exist related to the influence of corn endosperm hardness on the quality of product, in cases of mixture of corn with legumes or oilseed. The effect of adding soybean with inactivated lipoxigenase on expanded product characteristics produced with corn of different endosperm hardness was studied. Cooking extrusion of corn-soy mixture, allowed obtaining expanded products with good characteristics, being the best extrusion conditions those corresponding to intermediate temperature (170 °C) and moisture between 14-16%. Moreover, the addition of lipoxigenase inactivated soybean, not only improved the protein quality of corn, but also soy addition to corn having low hardness produce more expanded product.

INTRODUCCIÓN

En el grano de maíz se reconocen dos clases distintas de endospermo: el córneo (translúcido) y el farináceo (opaco) cuyas proporciones varían con el tipo de maíz y con la variedad. La dureza del endospermo otorga al grano de maíz resistencia mecánica durante los procesos de cosecha y poscosecha. Sus propiedades fisicoquímicas se atribuyen a complejas interacciones entre ciertos componentes del grano. Entre ellos se destacan las zeínas que constituyen las principales proteínas de reserva del endospermo del maíz y el almidón que representa la fuente energética primaria del grano (1).

Para estimar la dureza se han adoptado cuatro técnicas: Peso Hectolítrico, Índice de flotación, Dureza NIR (“Near Infrared”) y Relación Gruesos/Finos (RG/F) (2). Haciendo uso de las mismas, Eyhérbide y col. (1996) analizaron una extensa serie de cultivares de maíz. Los resultados, permitieron clasificarlos en tres categorías de dureza: Harinosos o Dentados, Semiduros o Semidentados y Vítreos (Duro y Pisingallo). El híbrido semidentado normalmente se obtiene por medio del agregado de material genético del maíz dentado al duro (3).

Por su parte, la molienda a escala industrial, requiere granos de dureza adecuada para obtener fracciones de tamaños deseables (con mínima formación de partículas finas) y aptas para las distintas aplicaciones (4).

En el contexto de la tecnología de extrusión, las sémolas de maíz constituyen la principal materia prima para la elaboración de “snacks”. En la producción de los mismos en gran escala, comúnmente se prefieren maíces duros, debido tanto a sus propiedades durante la molienda seca como a la mejor textura alcanzada, en comparación con maíces de endospermo más blando (5).

El grado de expansión de productos extrudidos a base de maíz depende de las condiciones de extrusión (humedad de la harina, geometría del tornillo, diámetro de boquilla, etc.) y del tipo de maíz utilizado. Si bien la expansión es una característica muy importante, no es un buen indicador del grado de cocción, ya que la misma va creciendo hasta un máximo para luego disminuir a medida que el grado de cocción crece. Así, es posible lograr la misma expansión para dos diferentes grados de cocción. Este comportamiento no se observa con otros indicadores, tales como el consumo específico de energía mecánica durante la extrusión, el volumen específico del material expandido y la solubilidad en agua de la harina precocida (6).

Por otro lado, resulta obvio que la aceptabilidad de estos productos no solo dependerá de su expansión, sino además de atributos sensoriales como el gusto, aroma, apariencia y

textura. Esta última queda determinada por la estructura del producto expandido y puede estimarse sensorialmente estableciendo una escala de dureza (5). La aceptabilidad luego se corresponde con un rango de dureza sensorial muy acotado (7).

Otra ventaja que ofrece la extrusión, es que se pueden extrudir mezclas de harinas de cereales con las de oleaginosas y/o legumbres para lograr un aumento de la calidad proteica por el conocido efecto de la complementación aminoacídica (8). En este sentido, resulta adecuada la utilización de harina de soja. Sin embargo, los efectos negativos desde el punto de vista organoléptico que produce la lipoxigenasa activa en los productos de la molienda, hacen necesaria la adecuada inactivación de los granos (9).

Los objetivos de este trabajo fueron analizar el efecto del agregado de soja sobre las características de productos expandidos, utilizando maíces con endospermos de diferente dureza y definir las condiciones óptimas de extrusión para la obtención de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un estudio previo, se verificó que la utilización de soja con lipoxigenasa inactivada y con un nivel de reemplazo del 12% permite obtener productos expandidos a base de maíz sensorialmente aceptables.

En el presente trabajo, se utilizó una sémola de soja proveniente de granos con más del 97% de lipoxigenasa inactivada y tres tipos de sémolas de maíz: una comercial (COM) y dos provenientes de la molienda de un maíz dentado (P) (Dureza RG/F: 2,6) y de otro colorado (DK) (Dureza RG/F: 4,6). Para transformar los granos de las materias primas en sémolas se utilizó un diagrama de molienda desarrollado en este instituto (4).

La extrusión se llevó a cabo con un equipo Brabender 20 DN (Alemania), RC: 4:1, boquilla 3 x 20 mm, 150 rpm. Para seleccionar el tipo de maíz se utilizó un diseño factorial 2 x 2, tomando como factores a la humedad (H) a 15 y 17 % y a la temperatura (T) a 160 y 180 °C. Los productos fueron evaluados en cuanto a su expansión, la que se calculó como:

$$E = \frac{D}{d}$$

donde D : es el diámetro promedio del material extrudido y d : es el diámetro de la boquilla del extrusor. Se observó que la sémola de maíz dentado presentó mayor grado de expansión y mayor uniformidad en el proceso, por lo que fue seleccionada para optimizar las condiciones de extrusión a través de un diseño experimental (3^2), siguiendo la metodología de superficie de respuesta para las variables H (14-16-18 %) y T (155-170-185 °C). Las muestras correspondientes a cada condición del diseño experimental fueron obtenidas luego de alcanzar el estado estacionario, momento en que también se registró

el torque, el caudal másico de salida y la longitud de producto por minuto. Con estos datos se pudo calcular el consumo específico de energía mecánica (CEEM, en J g^{-1}) según:

$$CEEM = \frac{K \times T \times N}{Q_{ss}}$$

donde K : $61,3 \cdot 10^{-3} \text{ J g}^{-1}$; T : Torque en unidades Brabender (UB); N : rpm del tornillo extrusor y Q_{ss} : caudal másico a la salida del extrusor referido a la humedad de alimentación (g min^{-1}) y el volumen específico (VE, en $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$) según la siguiente ecuación:

$$VE = \frac{\pi D^2 L}{4 Q_{s'}}$$

donde D : diámetro promedio del material extrudido (cm), $Q_{s'}$: es el caudal másico a la salida del extrusor expresado sobre base seca (g min^{-1}) y L : es la longitud del extrudido al cabo de un min (cm min^{-1}). Las respuestas analizadas fueron: E, CEEM, VE y la dureza sensorial de los extrudidos (D). Las muestras fueron secadas en estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar una humedad de 6% (condición de “snack”) y fueron fraccionadas y conservadas en envases herméticos hasta la evaluación sensorial. Esta evaluación fue realizada utilizando un panel de dos evaluadores entrenados. El puntaje de dureza asignado a cada muestra fue obtenido por consenso utilizando una escala de 1 a 10, asignando el valor 1 a la estructura más blanda y 10 a la más dura. Simultáneamente, se registraron los comentarios correspondientes a cada muestra respecto del atributo gusto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Influencia del tipo de maíz: En la Figura 1 se observa el efecto de la dureza del endospermo del grano de maíz sobre la E de los extrudidos en condiciones del diseño factorial 2×2 . Se supuso que la sémola comercial por poseer una mayor intensidad de color provenía de un maíz más duro que los otros dos utilizados en este estudio. De acuerdo a la escala de valores sugerida por Eyhérbide y col. (1996) (3), los granos de maíz del híbrido tipificado por colorado (DK) correspondieron a un maíz semidentado. Los resultados resultan en apariencia contrarios a lo esperado ya que cuando se utiliza solo sémola de maíz, la mayor E de estos productos corresponde a la de los maíces más duros (4, 7). Este diferente comportamiento de la mezcla maíz-soja puede atribuirse al hecho de que la adición de un material más blando que el maíz, como la sémola de soja, altera las condiciones de transporte dentro del extrusor, de tal manera que el fluido correspondiente a la mezcla con maíz más blando, posee en la región de la boquilla, mejores propiedades viscoelásticas para la E. Además, la materia grasa proveniente de la

soja entera puede actuar como lubricante alterando no solo las condiciones del transporte sino también las propiedades viscoelásticas de la mezcla fundida. Por lo que, para estas condiciones de extrusión, la soja resultó más compatible con el maíz de endospermo más blando.

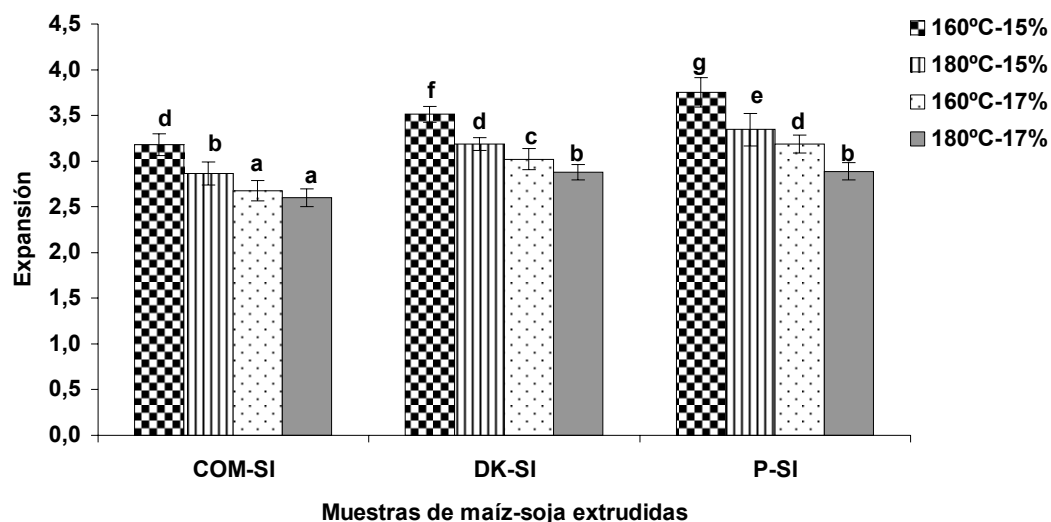


Figura 1: Efectos de la humedad (15 y 17%) y temperatura (160 y 180°C) sobre la expansión de productos extrudidos formulados con mezclas de maíz de diferente dureza y soja inactivada (SI) al 12% de reemplazo. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ($P < 0,05$).

2. Efecto de las condiciones de extrusión sobre cada una de las respuestas: La Tabla 1 muestra los valores de las respuestas para las distintas condiciones del diseño experimental (3^2) correspondiente a la mezcla de maíz dentado-soja (88:12). Se puede observar que tanto CEEM como E disminuyen con el aumento de T y H, mientras que el VE disminuye con H pero aumenta con T. Los resultados correspondientes al CEEM están directamente relacionados con la fricción interna durante la extrusión, la cual en general aumenta con la disminución tanto de H como de T. Para el caso de la E, a menor H y menor T la componente elástica del fluido aumenta, por lo tanto E aumenta. En el caso del VE, un aumento de T si bien produce una menor E, al aumentar el grado de cocción la componente viscosa del fluido es menor y se produce una estructura con paredes de poros más delgadas, resultando un producto con mayor VE. Estos resultados confirman los obtenidos en trabajos previos utilizando sémolas de maíz (6, 7) y demuestran que el VE es un muy buen indicador del grado de cocción.

La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de la variancia (ANOVA) para los efectos de H y T sobre el CEEM, E, VE, y D. Se puede observar que tanto para VE como para E,

los dos factores son significativos ($p < 0.05$), mientras que para el CEEM, solo H resulta ser significativa.

Tabla 1: Valores de las respuestas para las distintas condiciones del diseño experimental correspondientes a la extrusión de las mezclas de maíz dentado-soja (88/12). **MSI T-H:** muestras extrudidas a base de maíz-soja inactivada a distintas condiciones de T y H; **E:** expansión; **CEEM:** consumo específico de energía mecánica; **VE:** volumen específico; **D:** dureza.

Muestras	E	CEEM ($J g^{-1}$)	VE ($cm^3 g^{-1}$)	D
MSI 155-14	3.5	717.1	88.9	4
MSI 155-16	3.2	588.3	71.7	6
MSI 155-18	2.8	492.2	51.7	10
MSI 170-14	3.3	571.0	94.8	2
MSI 170-16a	3.1	556.8	86.5	4
MSI 170-16b	3.1	524.0	88.2	4
MSI 170-16c	3.1	507.0	79.8	5
MSI 170-18	2.8	498.0	70.9	6
MSI 185-14	3.1	633.6	111.1	1
MSI 185-16	2.8	524.4	87.1	2
MSI 185-18	2.5	427.9	70.5	4

Tabla 2: Niveles de significación (p) de cada uno de los términos de la función polinómica (fuente de variación) correspondientes a las respuestas analizadas para las muestras extrudidas a partir de mezclas maíz-soja (88/12 %P/P). **E:** expansión; **CEEM:** consumo específico de energía mecánica; **VE:** volumen específico; **D:** dureza.

Respuestas	Fuente de Variación					Falta de ajuste
	H	T	HH	HT	TT	
E	0,0005	0,0014	0,1117	0,0464	0,0109	0,1478
CEEM ($J g^{-1}$)	0,0148	0,0762	0,6486	0,7407	0,1970	0,2280
VE ($cm^3 g^{-1}$)	0,0114	0,0357	0,9208	0,7302	0,3098	0,4249
D	0,0116	0,0116	0,5808	0,1217	0,5808	0,5622

La Figura 2 muestra la superficie de respuesta correspondiente al VE donde se observa claramente los efectos de H y T ya mencionados.

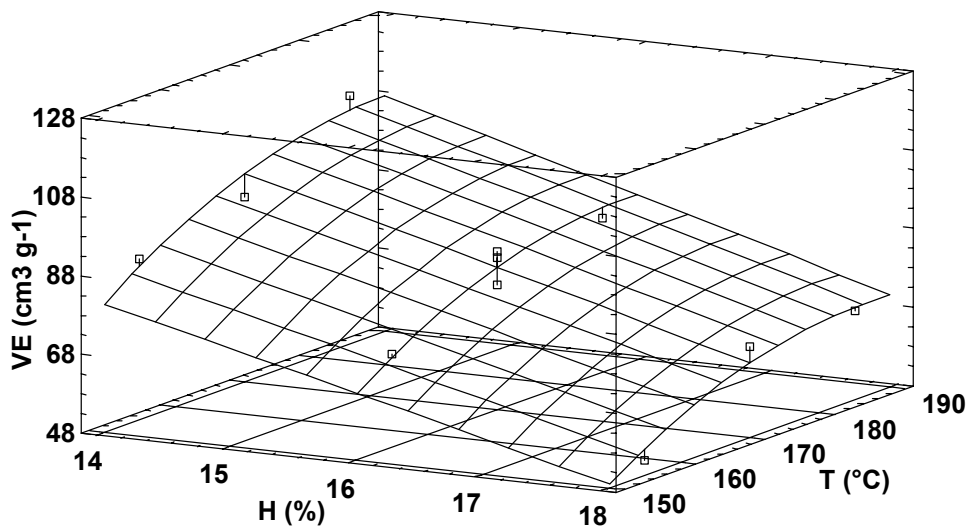


Figura 2: Superficie de respuesta correspondiente al Volumen específico (VE) de las muestras extrudidas a partir de mezclas maíz dentado-soja (88/12 %P/P).

La Figura 3 muestra la superficie de respuesta para la dureza de los productos extrudidos (D). Comparando ambas superficies surge claramente la relación inversa entre la D y el VE, es decir, cuanto más denso es el producto más duro resulta.

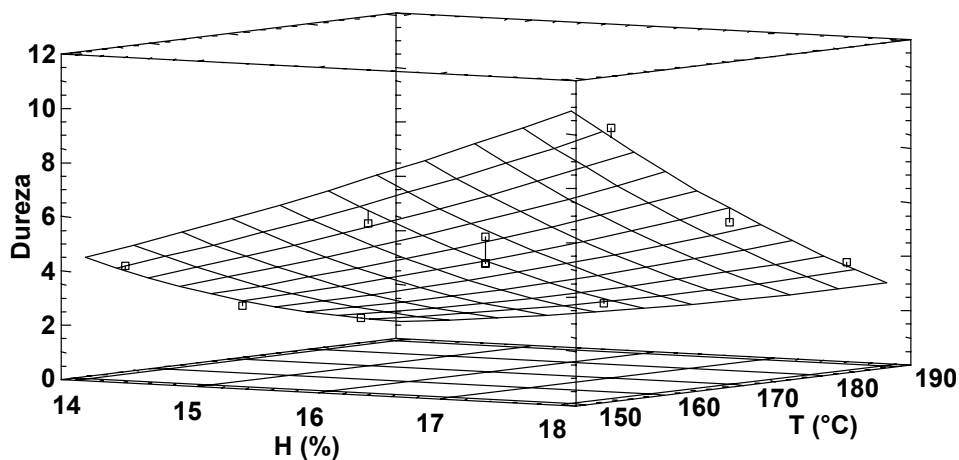


Figura 3: Superficie de respuesta para la dureza (D) de los productos extrudidos de las muestras extrudidas a partir de mezclas maíz dentado-soja (88/12 %P/P).

De las evaluaciones de productos comerciales (expandidos de maíz) surgió que el valor de D, estuvo comprendido en el rango de 3 a 5, por lo que se tomó éste como rango de aceptación para las muestras obtenidas en el diseño experimental. Además, para las muestras extrudidas a 185 °C se percibió un característico sabor a tostado, el cual fue considerado no adecuado para este tipo de productos. Surge por lo tanto, que las condiciones más adecuadas para obtener un producto expandido con buenas

características sensoriales son aquéllas correspondientes a 155°C -14 % y a 170 °C para 14 y 16 % de humedad.

CONCLUSIÓN

La cocción por extrusión de mezclas maíz-soja permitió obtener productos expandidos con buenas características sensoriales, siendo las condiciones de extrusión más adecuadas las correspondientes a temperaturas intermedias (170°C) y humedad entre 14-16%. Por otra parte, el agregado de soja con lipoxigenasa inactivada, no solo mejoró la calidad proteica del maíz, sino que además, la menor dureza de sus partículas resultó más compatible con las partículas de maíz de endospermo más blando, permitiendo que esa mezcla produzca mayor expansión que la mezcla con maíz más duro.

BIBLIOGRAFIA

- Pratt, R. C.; Paulis, J. W. ; Miller, K. ; Nelsen, T. ; Bietz, J. A. (1995).** "Association of zein classes with maize kernel hardness". *Cereal Chemistry*. 72(2): 162-167.
- Robutti, J. L. (1995).** "Maize Kernel Hardness Estimation in Breeding by Near-Infrared Transmission Analysis". *Cereal Chemistry*. 72(6):632-636.
- Eyhérabyde, G. H.; Robutti, J. L. ; Puig, R. C. ; Luqui, B. (1996).** "Caracterización de la calidad física del grano de maíz de cultivares argentinos de maíz". *INTA-Pergamino. Informe Técnico N° 313*.
- Robutti, J.L.; Borrás, F.S.; González, R.J.; Torres, R.L. and De Greef, D.M. (2002).** "Endosperm properties and Extrusion cooking behavior of maize cultivars". *Food Science and Technology /LWT*. 35: 663-669.
- González, R.J.; Robutti, J.L.; Borrás, F.S.; Torres, R.L.; De Greef, D.M. (2004).** "Effects of endosperm hardness and extrusion temperature on properties obtained with grits from commercial maize cultivars". *Food Science and Technology /LWT*. 37: 193-198.
- González, R.J.; Torres, R.L.; De Greef, D.M. (2002).** "Extrusión-Cocción de Cereales". *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 36(2): 104-115.
- Roudaut, G.; Dacremont, C.; Valles-Pamies, B. ; Colas, B. ; Le Mestre, M. (2002).** Crispness : A critical review on sensory and material science approaches. *Trends in Food Science and Technology*. 13:217-227.
- Gomez, M. H. (1985).** "Development of a food of intermediate moistness from extracts of corn and soybean". *Arch. Latin. Nutr*. 35(2):306-314.
- Fehr, W. R.; Narvel, J. M.; Weldon, L. C. (2000).** "Analysis of soybean seed lipoxigenases". *Crop Science*. 40:838-840.

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE POLIÉSTERES DE SACAROSA

BARRIONUEVO, María J.*; VALDEON, Daniel*; SAMMAN, Norma**

*Química Orgánica. Dpto Química. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Av. Roca 1800

**INSIBIO. Facultad de Bqca., Qca. y Farmacia. Chacabuco 461. UNT. S.M.Tucumán (4000) Argentina. E mail: nsamman@arnet.com.ar; mjbarrionuevo@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar las propiedades físicas y químicas de los poliésteres de sacarosa (PES) obtenidos en laboratorio. Se midió peso específico, tensión superficial, viscosidad, humedad, cenizas, índice de yodo, índice de peróxido, ácidos grasos libres, minerales (Fe, Zn, Ca, Mg, Cu), como así también la composición de ácidos grasos del producto purificado, que contenía 72% de PES. Se analizó la concentración de azúcar invertida de la fracción acuosa de la metilación de los PES. Se usó como referencia aceite de oliva (69,5% de ácido oleico).

Los análisis se realizaron de acuerdo a los métodos oficiales del AOAC. Se determinó minerales por espectrofotometría de absorción atómica después de la digestión de los PES con ácido sulfúrico/nítrico.

Se observó que los PES tienen características semejantes a los aceites comestibles, aunque la viscosidad fue mayor. Se observó que las propiedades físico químicas dependen del grado de saturación de los ácidos grasos que esterifican a la sacarosa.

Palabras claves: poliésteres – sacarosa – aceite de oliva – propiedades físico-químicas

ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the physical and chemical properties of sucrose polyesters (PES) obtained in laboratory. Was measured specific gravity, surface tension, viscosity, moisture, ash, iodine value, refractive index, free fatty acids, minerals (Fe, Zn, Ca, Mg, Cu) were determined as well as those for composition fatty acid of the purified product which contain 72% PES. The concentration invert sucrose of aqueous fraction of methylation PES was analyzed.

As a reference, olive oil was used (69.5% oleic acid).

The analyses were carried out according to AOAC official method. Minerals were determined by atomic absorption spectrophotometry after hydrolysis of PES in sulfuric/nitric acids.

It was observed that the characteristic of PES was similar to that edible oil, but the viscosity was major. The physical and chemical properties of PES depend on the saturation grade of fatty acid that esterified sucrose.

Key words: sucrose polyesters, olive oil, physical and chemical properties

INTRODUCCION

Actualmente algunos sectores de la población consumen dietas con un contenido graso superior al 30% de las calorías totales ingeridas. Éstas aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, arterosclerosis, obesidad. En el mercado actual, para disminuir la ingesta de grasas, se han introducido los sustitutos no calóricos. Se han realizado pruebas para determinar la relación entre riesgo y beneficio de la sustitución (Ziegler y Filer, 1997). Un producto usado comercialmente son los poliésteres de sacarosa, formados por un núcleo de sacarosa con seis a ocho oxhidrilos esterificados con ácidos grasos; se comercializa con el nombre de Olestra.

Allgood y col. (1996; 1998) afirman que es un compuesto seguro apto para alimentación humana. No aporta energía porque no es digerido ni absorbido en el tracto gastrointestinal y tampoco es metabolizado por la microflora colónica (Miller et al. 1995; Nuck et al. 1994). No muestra diferencias significativas en sabor ó textura con las grasas naturales (Kester et al., 1993). Daher et al. (1997) determinaron que la ingestión de 32 g de Olestra por día en humanos, produjo una disminución de la absorción de grasas en la dieta en un 1,2% y los efectos no nutricionales no fueron significativos.

Olestra fue aprobado en 1998 por la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos) como un reemplazante de grasas en snack saborizados; la condición para su uso es que en la etiqueta, los alimentos que los contengan, lleven la leyenda *“Olestra podría causar dolores abdominales y flojedad en las deposiciones. Disminuye la absorción de algunas vitaminas y otros nutrientes. Vitaminas A, D, E y K han sido añadidas”*.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Oleato de metilo se obtuvo metilando ácido oleico comercial marca RAUDO según norma española UNE 55-037.73, AENOR. Se analizó por cromatografía gaseosa por el método oficial de AOAC 963.22.

Oleato de potasio se preparó saponificando el ácido oleico comercial, con KOH por el método oficial de AOAC 920.160. Se utilizó azúcar pulverizada en un molino a fin de obtenerla en partículas más pequeñas.

Síntesis y purificación de PES

Para determinar las propiedades físico-químicas de los PES, se obtuvieron en laboratorio utilizando sacarosa, oleato de metilo y oleato de potasio con el procedimiento de Barrionuevo y Sammán (2004). El proceso para la síntesis de PES fue una modificación de Rizzi y Taylor (1978) y Shieh et al. (1996). Se hizo reaccionar 10 g de sacarosa, con 87 g de oleato de metilo y como catalizador 12,61 g de oleato de potasio y 0,485 g de carbonato de potasio, en un balón de 2 l con agitación constante, temperatura de 180°C, durante 6 h a una presión de 20 mm Hg. El producto obtenido se neutraliza con ácido acético glacial y posteriormente se purifica por partición con solventes metanol, agua (2:1). La fase insoluble se cuantificó por cromatografía en capa fina (Ríos et al., 1994). Se analizaron las placas con el programa GelPro2 para determinar la concentración obtenida en cada etapa.

Determinación de propiedades físicas

Índice de refracción: mediante refractómetro de Abbé por el método AOAC 921.08 B.

Peso específico: (aparente de aceites y grasas) mediante picnómetro, según método AOAC 920.212. *Tensión superficial*: se utilizó estalagmómetro de Traube (Unda, T., 2000)

Viscosidad: viscosímetro Brookfield (Model LV; Stoughton, MA) con Spindle N° 1 y 5 rpm.

Análisis químicos

Humedad de lípidos: método AOAC 934.01.

Acidez: por titulación de los ácidos grasos libres según el método AOCS 940.28.

Metales: por espectrofotometría de absorción atómica. Método AOAC 994.02.

Cenizas: por incineración, se determinó por el método AOAC 920.117.

Ácidos grasos: metilación según la norma española UNE 55-037.73 del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización y posterior cromatografía gaseosa. El equipo usado fue un cromatógrafo Hewelet Packard 6890N, columna HP5 30m x 0,32mm, inyector 240°, detector de ionización de llama 240° horno 160° por 3 min hasta 230° por 15 min con una velocidad 2°/min, con inyección de 0,5 µl. Para identificar los ácidos grasos se utilizaron patrones SIGMA. Método AOAC 963.22.

Índice de iodo: titulación volumétrica de acuerdo al método AOAC 920.158.

Índice de peróxido: según método AOAC 965.33.

Sacarosa invertida: por polarimetría según método AOAC 925.47.

Análisis estadístico:

los resultados fueron analizados por ANOVA, mediante el software Minitab Student.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 y figuras 1 a 3, se muestran la composición en ácidos grasos del aceite de oliva, del ácido oleico comercial utilizado para la transesterificación y los PES obtenidos.

Se observa que el ácido comercial utilizado tiene una pureza de 76,20% en ácido oleico, el cual es predominante en el aceite de oliva y en los PES.

Tabla 1. Ácidos grasos del aceite de oliva, ácido oleico comercial y PES.

Acido graso	Aceite de oliva	Acido oleico	PES
% C14:0	-	-	3,27
% C15:0	-	-	4,36
% C16:0	12,14	9,85	9,13
% C17:0	0,17	1,46	1,38
% C18:0	2,45	1,04	1,12
% C18:1	69,49	76,20	74,48
% C18:2	14,55	4,24	4,36
% C18:3	0,61	0,87	0,67
% C20:0	0,59	1,18	1,03
% saturados	15,35	13,53	20,23
% insaturados	84,65	81,31	79,77

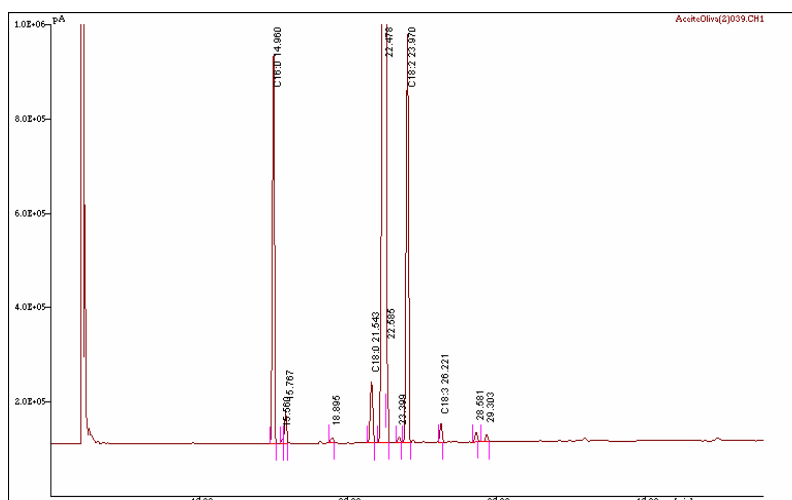


Figura 1: Cromatograma obtenido del aceite de oliva.

Se analizó el contenido de azúcares de la fase acuosa obtenida al metilar los PES. El peso promedio de PES fue $0,131 \pm 0,026$ g. Se obtuvo $0,088 \pm 0,009$ g de ésteres metílicos de los ácidos grasos y la fase acuosa se llevó a 100 mL con agua destilada. Se preparó una solución de 100 mL con las mismas cantidades de H_2SO_4 , CH_3OH y CH_3ONa que las utilizadas en la metilación de PES, para utilizarla como referencia en la medición polarimétrica del azúcar invertido.

La concentración de sacarosa invertida de esa fase acuosa fue $0,075 \pm 0,012$ g/mL; indicando que el producto analizado contiene azúcares.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos al determinar las propiedades físico-químicas del aceite de oliva y PES. Se incluyen los valores establecidos por el CCA para aceite de maíz y soja para su comparación.

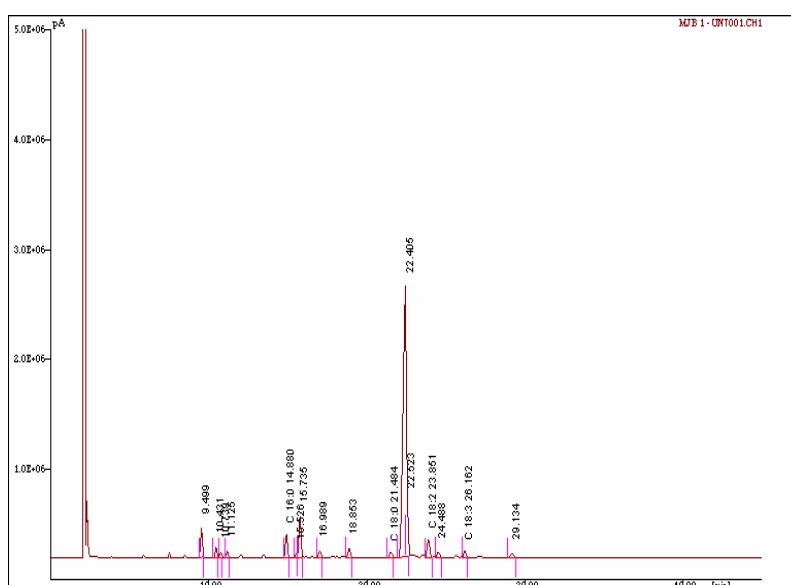


Figura 2. Cromatograma obtenido del ácido oleico metilado.

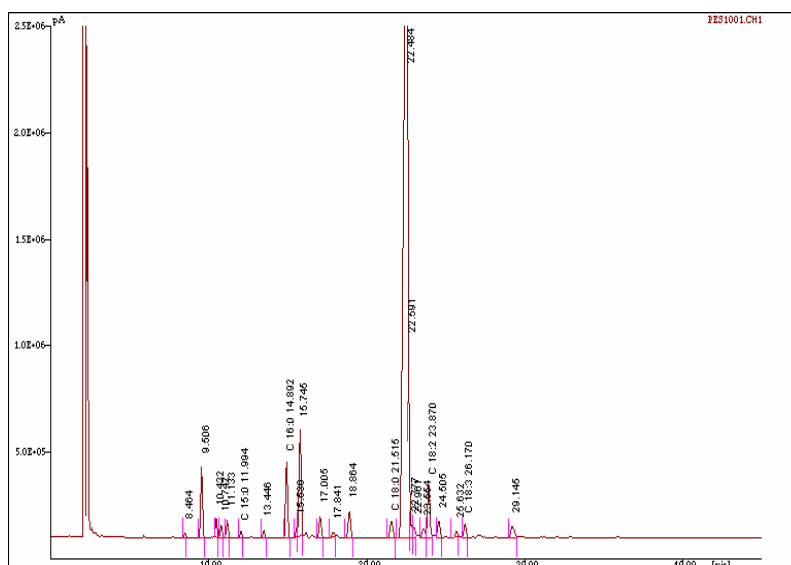


Figura 3. Cromatograma de los PES metilados.

No hay diferencias significativas en el índice de yodo, humedad, pero si para el índice de peróxido y ácidos grasos libres.

El índice de iodo indica que se mantiene la cantidad de dobles enlaces después de la reacción de obtención de PES.

El alto valor del índice de peróxido, se debe a las altas temperaturas que se utilizó para producir la reacción que se refleja también en el aumento de la acidez.

Las diferencias son notorias para viscosidad, tensión superficial y cenizas, que concuerdan con los valores obtenidos por Akoh y Swanson (1990).

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de PES y aceites comestibles.

Propiedades	PES	Aceite Oliva	Aceite Maiz*	Aceite Soja*
Densidad relativa 25 ⁴	0,895±0,101	0,923±0,002	0,9145-0,9200	0,9180-0,9225
Índice de refracción 25°C	1,4535±0,0002	1,4668±0,0003	1,4710-1,4725	1,4724-1,4740
Humedad (%)	1,69±0,06	0,87±0,08	<0,3	<0,3
Índice de iodo [g I ₂ /100g]	80,4±4,3	79,0±3,0	111-121	125-137
Índice de peróxido [meq O ₂ /Kg]	11,3±0,6	6,0±1,0	Max 10	Max 10
Ácido graso libre [% ácido oleico]	19,5± 4,2	1,0±0,2	<0,3	<0,3
Fe [mg/Kg]	0,47±0,01	-	Max 1,5	Max 1,5
Zn [mg/Kg]	0,17±0,02	-	-	-
Ca [mg/Kg]	1,09±0,49	-	-	-
Mg [mg/Kg]	1,25±0,14	-	-	-
Cu [mg/Kg]	0,13±0,03	-	Max 0,1	Max 0,1
Cenizas (%)	4,17±0,19	-	-	-
Tensión superficial [dyn/cm]	33,8±4,6	30,5±0,8	-	-
Viscosidad [cp]	130±2	84±1	-	-

Nota: * Del Código Alimentario Argentino.

CONCLUSIONES

Se observó que las propiedades físico químicas de los PES se relacionan directamente al contenido de ácido graso preponderante. Este producto es líquido similar a los aceites vegetales comestibles; tiene propiedades físico químicas similares al aceite de oliva lo que indica que podría ser un sustituto no calórico del mismo en el preparado de alimentos, usado en las concentraciones reglamentarias.

Durante el proceso de obtención se producen reacciones que llevan a que el índice de peróxidos y ácidos grasos libres superen los valores máximos establecidos por el Código Alimentario Argentino. Esto indica que deberán ajustarse las variables y mejorar la purificación para lograr condiciones que se encuentren dentro de las normas establecidas.

BIBLIOGRAFIA

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International (1995) 16th Edition.

Akoh, C. C. and Swanson, B. G. (1990). Optimized Synthesis of Sucrose Polyesters: Comparison of Physical Properties of Sucrose Polyesters, Raffinose Polyesters and Salad Oils. *J. Food Science*, 55:1, 236-243.

Allgood, G. S. (1998) The Safety of Olestra. International Life Sciences Institute of Japan. 54: 66-78.

Allgood, G. S. (1996) Research behind the U.S. FDA approval of olestra. *BNF Nutr. Bull.* 21: 174-182.

Barrionuevo, M. J. y Samman, N. (2004) Obtención y caracterización de poliésteres de sacarosa. XIII Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia & Tecnología de los Alimentos. Uruguay. p. 134.

Daher, G.C., Cooper, D. A., Zorich, N. L., King, D., Riccardi, K. A. and Peters, J. C. (1997) Olestra Ingestion and Dietary Fat Absorption in Humans. *J. Nutr. (Suppl)* 127: 1694S-1698S.

FDA Department of Health and Human Services (1998). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: Olestra. Final rule. 21 CFR Part 172.867. U.S. 62: 3118-3173.

Kester, J. J. (1993) Food product development using olestra as a fat substitute. In: 21st century. Biotechnology, supercritical fluids, membranes and other advanced technologies for low calorie, healthy food alternatives. Illinois: ATL Press, pp. 37-50.

Miller, K. W., Lawson, K., Madison, B., Tallmadge, D., Hudson, P., Okenfuss, J., Blair, M., Thorstenson, J. and Vanderploeg, P. (1995) Disposition of ingested olestra in the Fischer 344 rat. *Fund. Appl. Toxicol.* 24: 229-237.

Nuck, B. A., Schlagheck, T. G. and Federle, T. W. (1994) Inability of the human colonic microflora to metabolize olestra. *J. Industrial Microbiol.* 13: 328-334.

Shieh, C., Koehler, P. E. y Akoh, C. C. (1996). Optimization of Sucrose Polyester Synthesis using response surface methodology. *J. Food Science*, 61:1, 97-100.

Ríos, J. J., Perez Camino, M. C., Marquez Ruiz, G. and Dobagarnes, M. C. (1994) Isolation and Characterization of Sucrose Polyesters. *JAOCS*, 71: 385-390.

Rizzi, G. P. and Taylor, H. M. (1978). A Solvent-free Syntesis of Sucrose Polyesters. JAOCS, 55: 398-401.

Unda, T.M.C. (2000) Tensoactivos. Fenómeno de Superficie y Equilibrio de Interfases [online <http://depa.pquim.unam.mx/~tunda/metodosdets.htm>]

Ziegler, E. E. and Filer, L. J. (1997) Chapter 59 in Conocimientos actuales sobre nutrición 7ª edición. Inst. Intern. Ciencias de la Vida, 565. pp. Publicación Científica.

EFECTO DEL TIPO DE POLISACÁRIDO EN LA INTERACCIÓN CON LAS PROTEÍNAS DEL PESCADO BARRILETE DETERMINADO POR MICROCALORIMETRÍA

RODRÍGUEZ, Franco, VILLAGÓMEZ, Guadalupe, ZAVALA, Dora¹. y PEDROZA ISLAS, Ruth¹.

¹Depto. Ingeniería y C. Químicas, Universidad Iberoamericana. Av. Prolongación Paseo de la Reforma, Delegación Álvaro Obregón, México, D.F. ruth.pedroza@uia.mx

²División de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1^o de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 54704.

RESUMEN

Se estudiaron, por microcalorimetría diferencial de barrido, las interacciones entre las proteínas del músculo de pescado barrilete (MPB) y tres polisacáridos: Goma de mezquite (GM), κ -carragenina (C) y alginato de sodio (A) en solución, en proporción 5:1. El MPB presentó cuatro zonas de transición (ZT) a 52.57°C ($\Delta H=0.025 \text{ Jg}^{-1}$), 60.82°C ($\Delta H=0.006 \text{ Jg}^{-1}$), 70.19°C ($\Delta H=0.065 \text{ Jg}^{-1}$) y 76.3°C ($\Delta H=0.009 \text{ Jg}^{-1}$). La mezcla MPB y C, sólo tuvo dos ZT, a 39.72°C ($\Delta H=0.3598 \text{ Jg}^{-1}$) y a 67°C ($\Delta H=0.0203 \text{ Jg}^{-1}$), sin afectar la gelificación de la C. En la interacción MPB y A, se presentaron dos ZT, a 46.98°C ($\Delta H=0.2286 \text{ Jg}^{-1}$) y a 64.52°C ($\Delta H=0.0294 \text{ Jg}^{-1}$). En la interacción MPB y GM el termograma presentó tres ZT a 43.90°C ($\Delta H=0.0338 \text{ Jg}^{-1}$), a 53.58°C ($\Delta H=0.0388 \text{ Jg}^{-1}$) y a 71.02°C ($\Delta H=0.0334 \text{ Jg}^{-1}$). En las mezclas el pH varió dependiendo del polisacárido, con valores arriba del pl, favoreciendo la formación de complejos, sobre todo en presencia de C y A. Destaca que GM fue el polisacárido más eficiente en estabilizar la estructura no desdoblada de la proteína.

ABSTRACT

Thermal denaturation of proteins of *barrilete* fish muscle (MPB) in the presence of polysaccharides was studied by differential scanning microcalorimetry. *Mesquite* gum (GM), κ -carrageenan (C) and sodium alginate (A) were studied in a 5:1 ratio to the polysaccharide. MPB alone showed four transition zones (ZT) at 52.57 °C ($\Delta H=0.025 \text{ Jg}^{-1}$), 60.82°C ($\Delta H = 0.006 \text{ Jg}^{-1}$), 70.19 °C ($\Delta H = 0.065 \text{ Jg}^{-1}$) and 76.3°C ($\Delta H = 0.09 \text{ Jg}^{-1}$). The blend MPB-C, only showed two ZT's at 39.72°C ($\Delta H = 0.3598 \text{ Jg}^{-1}$) and at 67°C ($\Delta H = 0.0203 \text{ Jg}^{-1}$), not affecting the gelification of C. The interaction MPB-A presented two ZT's at 46.95°C ($\Delta H = 0.2286 \text{ Jg}^{-1}$) and at 64.52°C ($\Delta H = 0.0294 \text{ Jg}^{-1}$). The mixture MPB-GM

showed a thermogram with three ZT's at 43.9 °C ($\Delta H = 0.0338 \text{ Jg}^{-1}$), at 53.58°C ($\Delta H = 0.0388 \text{ Jg}^{-1}$) and at 71.02 °C ($\Delta H = 0.0334 \text{ Jg}^{-1}$). In the mixtures, the pH varied upon the polysaccharide, with values over the isoelectric point, favoring the complex formation especially in presence of C and A. It figures out that GM was the most efficient polysaccharide in stabilizing the unfolded structure of the protein.

Palabras clave: microcalorimetría, interacciones proteína-polisacárido, termoestabilidad

INTRODUCCION.

Las interacciones proteína-polisacárido dependen de varios parámetros fisicoquímicos como son: pH, la fuerza iónica y el tipo de solvente, entre otros, así como de las características moleculares de los biopolímeros (peso molecular, conformación, densidad de carga, etc.) y del procedimiento al que se someten (Turgeon y col., 2003). Se ha encontrado que dichas interacciones pueden ser covalentes, electrostáticas, por exclusión de volumen, por enlaces de hidrógeno, hidrofóbicas, coulombicas producidas por los iones y de Van der Waals. En general, son un promedio de las diferentes fuerzas intermoleculares que se originan entre los segmentos y los lados de las cadenas de los dos tipos de macromoléculas.

Sin embargo, hay que considerar que no solo están presentes las interacciones proteína-polisacárido, sino también las de proteína-solvente, proteína-proteína, polisacárido-polisacárido y polisacárido-solvente, las cuales serán resultado de las atracciones o de las repulsiones netas presentes en el sistema, dependiendo de las condiciones del medio acuoso (calidad de solvente, pH, cantidad de iones, etc.).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es el método más utilizado para estudiar el desdoblamiento térmico de las proteínas (Levitsky y col., 2000) y permite la adquisición de datos termodinámicos, como es la identificación de la transición térmica de sus principales estructuras y cómo éstas son afectadas por la presencia de otro tipo de moléculas, lo cual interviene en las propiedades funcionales de las proteínas (Hua y col., 2003).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la desnaturalización térmica de las proteínas del músculo de pescado Barrilete en presencia de dos polisacáridos gelificantes y uno no gelificante.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó κ -carragenina y alginato de sodio (GARDHAL, S.A.), goma de mezquite (Natural Products S.A.) y músculo de pescado Barrilete fresco sin piel y sin espinas, adquirido en un mercado local.

Los espectros calorimétricos se realizaron en un microcalorímetro CS 32 (Setaram. Scientific & Industrial Equipment, Francia).

Se preparó una dispersión de 50 g de MPB en 100 mL de agua a temperatura ambiente en un homogenizador L4R, (Silverson England). Y se determinó su pH en un potenciómetro RS. 325, (OAKTON Singapore). De esta dispersión se tomó una muestra para el análisis térmico, con un ciclo de calentamiento de 5 a 95 °C y uno de enfriamiento de 95 a 5 °C, a 1°C/min.

Para las mezclas de MPB y polisacárido, se hizo una dispersión de 3 g de polisacárido en 100 mL de agua y se mezclaron en relación 1:1 con la dispersión de MPB (Baeza y Pilosof, 2002); se determinó el pH para cada una de estas mezclas a temperatura ambiente ($19.3 \pm 1^{\circ}\text{C}$), realizando su termograma con el mismo ciclo de calentamiento. Se usó una celda vacía como referencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

Del termograma de las proteínas del MPB (figura 1), puede observarse una curva con cinco picos endotérmicos cuyas temperaturas máximas y sus entalpías asociadas, se muestran en el cuadro 1. Esos picos corresponden a zonas de transición de primer orden, que pertenecen a la desnaturalización de las principales proteínas del MPB, lo que implica pasar de una estructura ordenada, a una desordenada con un cambio en la energía libre de Gibbs (Relkin, 1994).

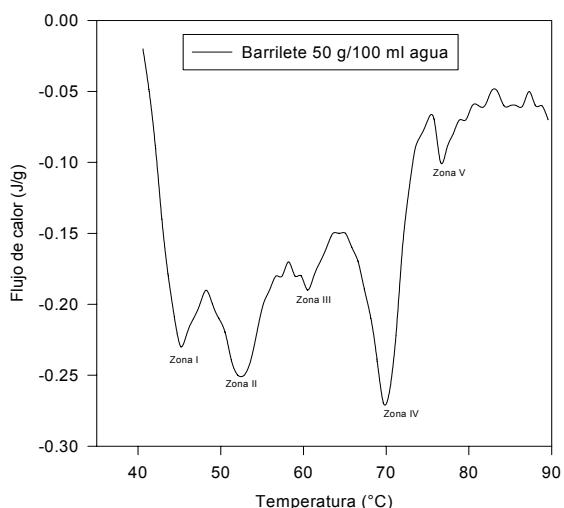


Fig.1 Transición térmica de los compuestos del músculo de Barrilete.

La composición proximal del pescado Barrilete, que pertenece a la familia del atún, es de 24% de proteína, 3.9% de grasa y 70.4% de agua, y el resto corresponde a los hidratos de carbono, vitaminas y sales minerales. Dado que la temperatura de fusión de las grasas

de pescado es de alrededor de los 40 °C (Footitt y Lewis, 1995), se cree que en la primera zona de transición estaría contribuyendo la energía de fusión.

Cuadro 1 Datos térmicos de las proteínas del músculo de Barrilete : ΔH entalpia de transición J/g, T_T °C Temperatura de pico, T_O Temperatura Onset.

Zona	Proteína	T_T	ΔH	T_O
I	grasa	44.71	0.0526	42.45
II	Miosina	52.57	0.0257	49.40
III	Sarcoplásmicas	60.82	0.0062	58.32
IV	Sarcoplásmicas	70.19	0.0659	66.40
V	Actiina	76.31	0.0092	76.67

De acuerdo con las características de las diferentes fracciones proteínicas del pescado (Hastings y col, 1985), la zona de transición I corresponde a las proteínas del estroma, la II a la miosina, las zonas III y IV a las proteínas sarcoplásmicas y por último la zona V, a la actina (Hastings y col, 1985; Findlay y Barbut, 1990).

Las proteínas de la zona I y II son las menos estables, ya que sufren un desplegamiento alrededor de 50 °C. Esto indica que predominan las interacciones entálpicas tales como las electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno (Roos, 1995; Relkin, 1994; Grinberg y Tolstoguzov, 1997). Entre las zonas II y III hay dos eventos menos definidos (57 y 59 °C) atribuibles a la desnaturalización de proteínas sarcoplásmicas. La zona III y IV, presentó picos bien definidos a 60.82 °C y 70.16 °C, respectivamente. Estas mayores temperaturas indican un incremento en los residuos hidrofóbicos (interacciones entrópicas), mas en la zona IV que en la III lo cual es función de la composición en aminoácidos de la proteína.

La ultima zona de este termograma, zona V, presentó un pico bien definido con temperatura máxima de 76.31 °C, que corresponde a la actina, indicando que las fuerzas que predominan son las interacciones entrópicas. Sin embargo aunque éstas se estabilizan a temperaturas altas, hay una ruptura gradual de la estructura molecular, cuando la temperatura sobrepasa cierto límite. La señal del termograma se extiende hasta 90 °C, observándose otra serie de eventos.

La desnaturalización de todas estas proteínas ocurrió de forma irreversible, ya que al enfriar no se tuvo ninguna lectura de reversibilidad.

Interacciones de las proteínas del músculo de pescado y κ -carragenina

Para la dispersión de C en la etapa de calentamiento no se presentó ninguna señal, pero sí en la etapa de enfriamiento (exotérmica), por la formación de un gel (Charalambous y Doxastakis, 1989), a 40.85 °C y con $\Delta H_{gel} = -0.3682$ J/g.

El termograma de la mezcla MPB–C (figura 2), muestra dos zonas de transición y no las cuatro que originalmente presentaba el músculo de pescado (figura 1). La primera ocurrió a una temperatura de 49.72 °C y $\Delta H = 0.3598$ J/g, y la segunda, a 67 °C y $\Delta H = 0.0203$ J/g, evidenciando que la presencia de C disminuyó la estabilidad térmica de las proteínas, incrementando la entalpía de desnaturalización de las proteínas de la zona I. También influyeron las características asociadas con el ambiente químico del sistema, tal como el pH, que en este caso fue de 6.2. Cuando el pH se incrementa, ocurre un desplazamiento de las transiciones térmicas hacia menores temperaturas (Paredi y col., 1994). Esto aunado a la desaparición de algunas de las zonas de transición de las proteínas, que originalmente se presentaban, corrobora la presencia de interacciones de naturaleza diferente, sugiriendo la formación de nuevos compuestos.

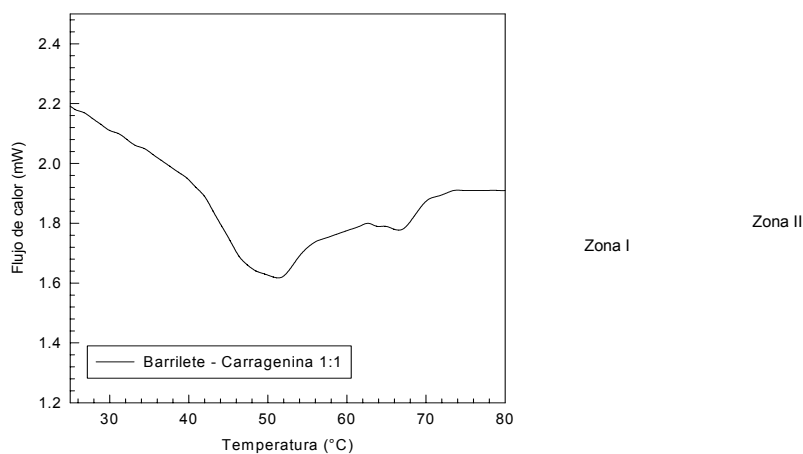


Fig.2 Transición térmica de la mezcla de MPB y C

El complejo que se forma entre las proteínas del MPB y la C es favorecido cuando el pH es mayor que el punto isoeléctrico de la proteína (Dickinson y Pawlowsky, 1997). Cuando la proteína posee una baja densidad de carga, se beneficia la agregación, sin embargo la C puede tener un efecto protector que inhibe dicha agregación, formando un complejo a través de un mecanismo asociativo (Grinberg y Tolstoguzov, 1997; Michon y col., 2002). En la zona II el complejo formado es más estable y posiblemente contribuyen más los efectos entrópicos los cuales inducen la liberación de moléculas de agua y iones contrarios, los cuales son capaces de tener un contacto más cercano con el polielectrolito y los grupos cargados de las proteínas, que el que pueden tener las cargas de la proteína y el polielectrolito (Turgeon y col, 2003).

Montero y col (2000), examinaron las características estructurales de geles de músculo de pescado adicionadas de diversos hidrocoloides. Encontraron que al adicionar C, se

inducía la formación de cavidades redondas a lo largo de la matriz proteínica, donde el hidrocoloide se encuentra gelificado, aunque también ocurre una distribución diferenciada porque la C se disuelve a 60-70 °C, temperatura en la que la miosina comienza a gelificar. La capacidad de formación de gel de las proteínas miofibrilares del pescado, se ve incrementada por la presencia de la C, por las interacciones con los grupos sulfatados del hidrocoloide.

Para la etapa de enfriamiento de la mezcla se observó que la capacidad de gelificación de la carragenina se mantuvo, sin embargo ocurrió a una temperatura y a una entalpía menor (39.87 °C, $\Delta H = -0.1148$ J/g), quizá por la acción cooperativa de las proteínas a dicho fenómeno.

Interacciones de las proteínas del músculo de pescado y alginato de sodio

Como en el caso anterior, se hizo el análisis térmico de la dispersión al 3% de alginato de sodio solo, sin obtenerse registro alguno.

En el termograma de la mezcla de MPB-A (figura 3), se observan sólo dos zonas de transición. La primera, con una temperatura máxima de 46.98 °C, $\Delta H = 0.2286$ J/g. Se sabe que la presencia del alginato, desestabiliza la miosina en 4 °C (Ensor y col., 1991). La segunda zona presenta una temperatura de transición de 64.52 °C y $\Delta H = 0.0294$ J/g, donde la actina y las proteínas sarcoplásmicas pueden estar contribuyendo. Los valores de ΔH se incrementaron con la adición del alginato, lo que indica que se requiere una mayor energía para que las transiciones ocurran (Ensor y col., 1991). Montero y col., (2000) encontraron que el A por su propiedad de formar geles, interfiere con la matriz de proteínas miofibrilares, formando cavidades en forma de grietas elongadas, relacionadas con la estructura molecular del hidrocoloide y observaron áreas donde el A se encontraba parcialmente conectado con la matriz proteínica. Las principales fuerzas involucradas en estas interacciones, son de naturaleza electrostática y es posible la formación de complejos, aún en condiciones de repulsión neta, como en este caso, donde el pH del sistema se encuentra por encima del punto isoeléctrico (Neiser y col., 1999). Esto ha sido explicado por la presencia de zonas positivamente cargadas en las moléculas de proteína, aún en valores por arriba del punto isoeléctrico, lo que permite las atracciones electrostáticas entre las proteínas y los polianiones (Park y col., 1992), pudiéndose dar entrecruzamientos.

Interacciones de las proteínas del músculo de pescado y goma de mezquite

Al igual que en los casos anteriores, se obtuvo primero el termograma de la dispersión al 3% de goma de mezquite, no presentándose señal alguna.

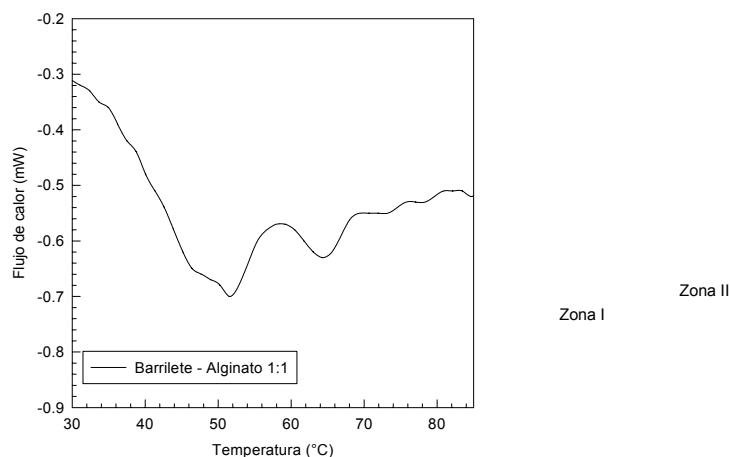


Fig.3 Transición térmica de la mezcla de MPB y A.

En el termograma de la mezcla MPB-GM (figura 4), están presentes tres zonas de transición: La primera, con una temperatura de 43.90 °C y $\Delta H = 0.0338$ J/g. La segunda zona a 53.58 °C y $\Delta H = 0.0388$ J/g y la tercera, a 71.02 °C y $\Delta H = 0.0334$ J/g.

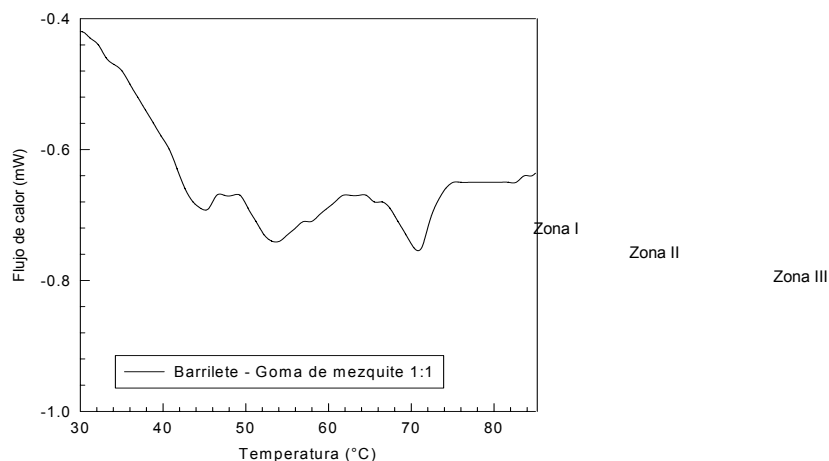


Fig.4 Transición térmica de la mezcla de MPB y GM

Estos datos sugieren también, una interacción entre las proteínas de músculo de Barrilete y la goma de mezquite, aunque de menor intensidad que en los dos casos anteriores sugiriendo que la goma de mezquite es más eficiente en estabilizar la estructura no desdoblada de las proteínas.

En este caso, el pH de la mezcla (5.52) fue muy cercano al obtenido para la dispersión del músculo de pescado. A ese valor de pH, las proteínas de pescado tienen baja densidad de carga, al igual que la goma de mezquite (Vernon-Carter y col, 2000). Es sabido que en el punto isoelectrico, las proteínas presentan su máxima estabilidad a la desnaturalización.

Cuando la interacción con las proteínas se da con un agente no gelificante, como sería el caso de la goma de mezquite, la posible distribución espacial en la proteína gelificada, corresponde a un modelo de partículas dispersas donde el hidrocoloide se asocia directamente por interacciones no específicas en lo que se denomina "llenador activo" (Montero y col, 2000).

A diferencia de los otros dos casos, la ΔH requerida para que las transiciones ocurran, es prácticamente igual en magnitud para las tres zonas. Sin embargo, destaca la zona III, con un incremento en la energía de transición (0.0334 J/g), en relación con la obtenida para la actina en el MPB solo (0.0092 J/g) o para las zonas relacionadas a la actina al ser mezclada con la C o con A.

Para las proteínas sarcoplásmicas se presenta el fenómeno de un aumento en la temperatura máxima de desnaturalización por efecto de interacción con la GM, mientras que para la zona de la transición de la actina, la temperatura máxima disminuyó en 5.29 ° C.

CONCLUSIONES

Los polisacáridos utilizados tuvieron efecto sobre el comportamiento térmico de las proteínas de pescado. Los polisacáridos gelificantes, disminuyeron la estabilidad térmica de las proteínas, mientras que el no gelificante (GM) la incrementó.

Sin embargo, la presencia de polisacáridos promovió la formación de agregados.

La GM fue el polisacárido más eficiente en estabilizar la estructura no desdoblada de la proteína.

BIBLIOGRAFIA

Charalambous G y Doxastakis G. 1989. Food Emulsifiers, Chemistry Technology Functional Properties and Application. Development in Food Science 19. Elsevier. Pp 250-266, 286-298.

Baeza R y Pilosof A M. 2002. Calorimetric studies of thermal denaturation of β -lactoglobulin in the presence of polysaccharides. Lebensm—Wiss. U.-Technol. 35, 393-399.

- Dickinson E y Pawlowsky K. 1997.** Effect of ι -carrageenan on flocculation, creaming and rheology of a protein stabilized emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3799-3806.
- Ensor S A, Sofos J N y Schmidt G R. 1991.** Differential scanning calorimetric studies of meat protein-alginate mixtures. *J. Food Science* 56(1), 175-179.
- Findlay C J y Barbut S. 1990.** Thermal analysis of meat. En: *Thermal Analysis of Foods*. V R Hanwalkar y C Y Ma (Ed.) p, 92. Elsevier Appl. Sci. Inglaterra.
- Footitt R J y Lewis A J. 1995.** Enlatado de Pescado y Carne. Ed. Acibia, S. A. España. Pp 60-70.
- Grinberg V, y Tolstoguzov V B. 1997.** Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocoll.* 11, 145-158.
- Hastings R, Rodger G W, Park R, Matthews A D y Anderson E M. 1985.** Differential scanning calorimetry of fish muscle: The effect of processing and species variation. *J. Food Sci.* 50, 503-506.
- Hua Y, Cui S W y Wang Q. 2003.** Gelling property of soy-gum mixtures. *Food Hydrocoll.* 17, 889-894.
- Levitsky D I, Rostkova E V, Orlov V N, Nikolaeva O P, Moiseeva L N, Teplova M V y Gusev N B. 2000.** Complexes of smooth muscle tropomyosin with F-actin studied by differential scanning calorimetry. *Eur. J. Biochem* 267, 1869-1877.
- Michon C, Konate K, Cuvelier G y Launay B. 2002.** Gelatin/carrageenan interactions in coil and ordered conformations followed by a methylene blue spectrophotometric method. *Food Hydrocoll.*, 16, 613-618.
- Montero P, Huratdo J L y Pérez-Mateos M. 2000.** Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocoll.* 14, 455-461.
- Neiser S, Draget K I y Smidsrod O. 1999.** Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems. *Food Hydrocolloids* 13, 445-458
- Paredi M E, Tomas M C, Crupkin M y Añon M C. 1996.** Thermal denaturation of muscle proteins from male and female squid (*Illex argentinus*) at different sexual maturation stages. A differential scanning calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3812-3816.
- Park J M, Muhoberac B B, Dubin P L y Xia J. 1992.** Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules* 25, 290-295.
- Relkin P. 1994.** Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochimica Acta* 246, 371-386.
- Roos Y. 1995.** Phase transitions in Foods. Academic Press. San Diego, Ca. Pp 11-16 y 128-142.

Turgeon S L, Beaulieu M, Schmitt C y Sanchez C. 2003. Protein – polysaccharide interactions : phase – ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8, 401-414.

Vernon- Carter E J, Beristain C I y Pedroza–Islas R. 2000. Mesquite gum (*Prosopis* gum). En: *Novel Macromolecules in Food Systems*. G. Doxaktakis y V. Kiosseoglou, eds. Elsevier. Amsterdam. Pp. 224-225.

ESTUDIO POR DIAFILTRACIÓN DE LAS PROPIEDADES COLOIDALES DE UN JUGO TURBIO (CLOUDY) DE MANZANA

BENÍTEZ Elisa I. y LOZANO Jorge E.

PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga Km.7, 8000 Bahía Blanca, Argentina. Fax: (0291) 4861600. E-mail: ebenitez@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

Se estudió en jugo turbio (cloudy) de manzana el efecto que ejercen los sólidos solubles en el tamaño de partícula, la conductividad eléctrica y el potencial Zeta (ξ) de la fase líquida. Se puso atención no sólo en los solutos que definen la viscosidad del medio líquido (glucosa, fructosa y ácido málico) sino también en aquellos que aun siendo minoritarios modifican la fuerza iónica, como los iones Ca y Mg, reduciendo su contenido por diafiltración con membranas de ultrafiltración. Los resultados muestran la variación del pH, la fuerza iónica del medio y el diámetro de partícula, con la concentración de sólidos solubles totales. La conductividad eléctrica disminuyó y el potencial Z (mV) aumentó (en valor absoluto) al disminuir la concentración de solutos. El tamaño de partícula se redujo un 20% aproximadamente, fenómeno atribuido a la erosión mecánica y a la inmovilización de las partículas de mayor tamaño sobre la membrana de ultrafiltración.

ABSTRACT

The effect of soluble solids content on the particle size, electric conductivity and Zeta potential (ξ) of a cloudy apple juice was investigated. Not only the major solutes but also cations, which modify the ionic strength, as Ca and Mg, were studied. Major solutes (glucose, fructose, sucrose and malic acid) content and ion concentration were modified by diafiltration through ultrafiltration membranes. Changes in pH, ionic strength and particle diameter with soluble solids were determined. Results shown that electrical conductivity was reduced and ξ increased, when soluble solids of serum was reduced. The reduction observed in particle size (aprox. 20%) was attributable both to mechanical attrition and the immobilization of the larger particles on the ultrafiltration membrane.

INTRODUCCIÓN

La República Argentina se encuentra entre los 10 primeros países exportadores de jugos

de fruta del mundo. Los jugos obtenidos por expresión de frutas son en general suspensiones coloidales complejas. El procesamiento de los mismos, ya sea tanto para lograr su estabilidad definitiva como un jugo turbio o “cloudy”, como para eliminar la turbidez durante la elaboración de jugos clarificados, constituyen en si operaciones poco fundamentadas.

La estabilidad de las suspensiones está fuertemente influenciada por las cargas eléctricas que existen en la interfase partícula-líquido. Las partículas coloidales están compuestas principalmente por carbohidratos y proteínas insolubles al pH del jugo (Dietrich, 1996). Estas últimas poseen grupos ácidos y básicos cuyo grado de ionización depende del pH y de la fuerza iónica del medio líquido (Magdassi y Kamyshny, 1996). Las partículas coloidales pueden estar recubiertas por una capa protectora de pectina que al pH del jugo se encuentra negativamente cargada (Yamasaki, 1964). Al actuar enzimas pectinolíticas sobre el coloide se debería producir una desestabilización de las partículas, al dejar proteínas cargadas positivamente en contacto con partículas coloidales de signo contrario (Yamasaki, 1964). Las partículas cargadas producen un potencial eléctrico relativo a la solución, que tiene un valor máximo en la superficie, medido indirectamente a través del potencial Zeta (Ottewill,1976). Si el potencial Zeta (ξ) es elevado (ya sea negativo o positivo) las partículas se repelerán y la dispersión será estable. Si ξ es bajo la dispersión será inestable. Como límite divisorio entre dispersiones estables e inestables, generalmente se toma un valor de $\xi = \pm 30$ mV (Sherman,1970).

El efecto esperado de los sólidos solubles es el de disminuir la movilidad electroforética de las partículas, provocando una reducción en ξ . Si bien la viscosidad del medio influye sobre ξ , esta influencia no es marcada debido a que en el rango de concentraciones de trabajo varia muy poco (Genovese,2000). El efecto de la fuerza iónica del medio es reducir la doble capa alrededor de las partículas y producir un mayor acercamiento entre ellas (Verwey y Overbeek, 1948). Además de las contribuciones por fuerza iónica y sólidos solubles, ξ se ve fuertemente influenciado por el pH, ya que este modificará la carga neta de las partículas.

Para evaluar los efectos enunciados se utilizó la diafiltración con membranas para modificar el contenido de solutos y determinar la influencia en el potencial Zeta, cuantificando el efecto que genera el medio sobre las partículas coloidales. Se completó el estudio con medidas de distribución de tamaños de partícula en función del contenido de sólidos solubles.

MATERIALES Y MÉTODOS

El jugo de manzana, de la variedad Granny Smith, fue obtenido en una planta industrial de Río Negro. El jugo fue depectinizado con enzimas pectinolíticas (Solvay 5XLHA; 20 mg/l, 2 h a 50° C). Se separó el sobrenadante y se lo sometió a diafiltración en un equipo de laboratorio Osmonic Sepa[®] CF (Osmonics; Minnetonka; Mn; USA) utilizando membranas de polisulfona con un poder de corte de 100 kDa. Las experiencias se realizaron por cuadruplicado. La distribución del tamaño de partículas, el potencial Z (ξ) y la conductividad eléctrica se midieron con un analizador Malvern Zetasizer 3000 (Malvern Instrument Inc., London, UK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse de las **Figs. 1 y 2** el proceso de diafiltración con membranas puede dividirse en dos etapas: una primera que corresponde al agregado de aproximadamente 2 litros de agua destilada y donde las concentraciones de sólidos solubles y sales presentan una gran variación y una segunda etapa donde, si bien existe un descenso de dichas concentraciones, es más atenuada. Sin embargo esta segunda etapa es la que provoca una influencia mayor en el potencial Zeta.

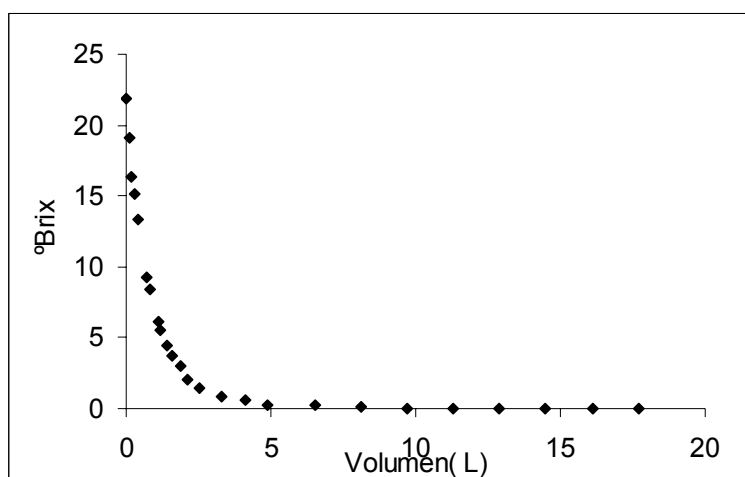


Figura 1: Variación de la concentración de sólidos solubles durante el proceso de diafiltración.

En las **Figs. 3 y 4** se observa que a medida que las concentraciones de iones y sólidos solubles disminuyen se produce un aumento del potencial Zeta (ξ), en la primera etapa casi lineal, para hacerse luego en la segunda etapa asintótico a -28 ± 0.5 mV

(Conductividad : 0.060 ± 0.001 mS/cm). Este valor es muy cercano al valor reportado para suspensiones estables (Ottewill, 1977).

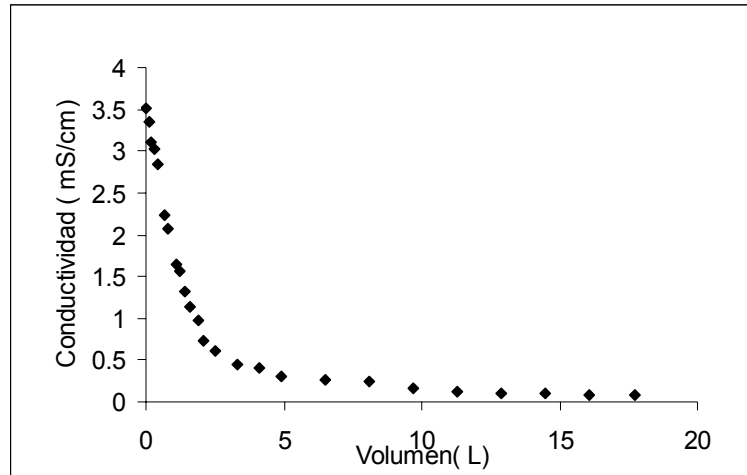


Figura 2: Variación de la conductividad durante el proceso de diafiltración.

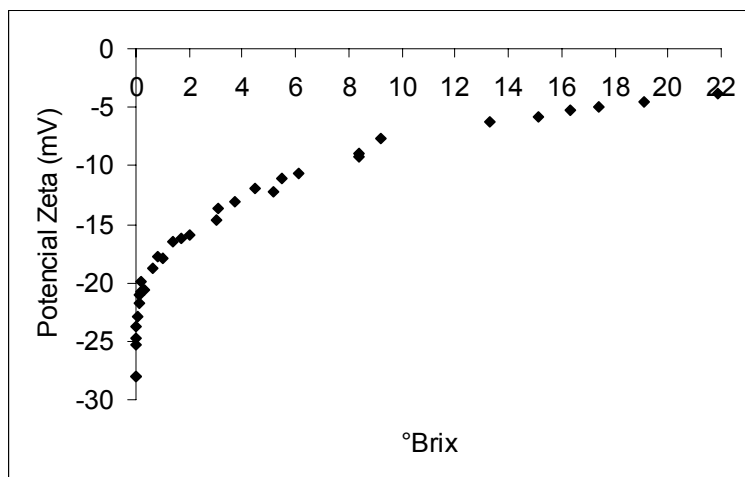


Figura 3: Variación del Potencial Zeta en función de los sólidos solubles.

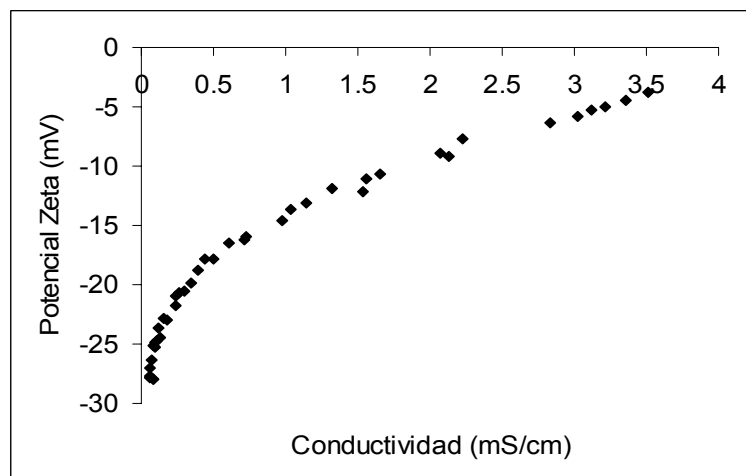


Figura 4: Variación del Potencial Zeta en función de la Conductividad.

Este aumento en valor absoluto de ξ coincide con un valor de pH casi constante de 3.71

(Fig. 5). Se puede decir que se establece un efecto *buffer* entre los componentes del jugo que perdura aún en la primera parte de lo que se denominó segunda etapa. Sin embargo, es durante la primera etapa donde se registra la mayor variación en ξ . Una vez que se pierde este efecto *buffer*, ξ varía solo levemente (en concordancia con la escasa concentración de sales). Esto revela que el modelo propuesto por Yamasaki (1964), que establece una desestabilización por aglomeración entre partículas de distinta carga, no concuerda con el sistema en estudio, ya que se debería haber verificado un aumento en valor absoluto de ξ mayor que el determinado. Se justificaría de esa manera el hecho de que las partículas positivas se volverían negativas (por superar el punto isoeléctrico de las proteínas involucradas al aumentar el pH del medio), se repelerían unas con otras y el sistema sería más estable (Tolstoguzov,2001). Esto refuerza la hipótesis de que las partículas coloidales seguirían con una capa protectora, que si bien está degradada, aun previene la floculación.

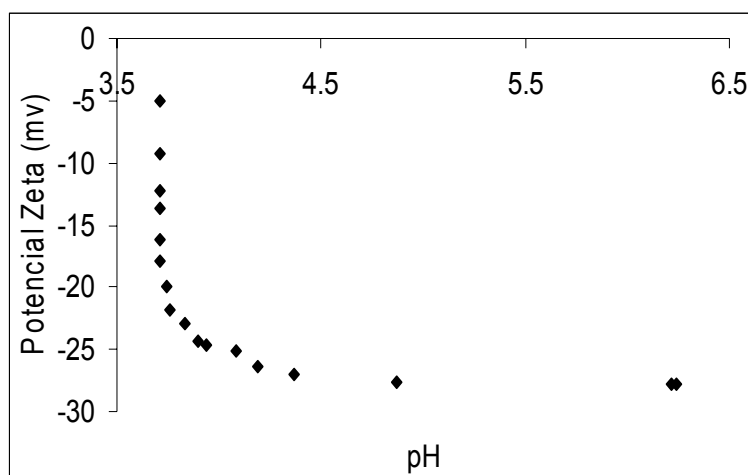


Figura 5: Variación del Potencial Zeta en función del pH

Con respecto al diámetro de partícula, se obtuvo una distribución de tamaños más homogénea, ya que durante el proceso de diafiltración las partículas más pequeñas se van aglomerando y las más grandes van quedando adheridas a la membrana, provocando que durante la primera etapa del proceso de diafiltración el tamaño de partícula disminuya hasta alcanzar, en la segunda etapa, un valor estable sin que sufran un deterioro mecánico mayor (Fig. 6). Este hecho también favorece la estabilidad de las partículas, ya que interaccionarían partículas de igual tamaño.

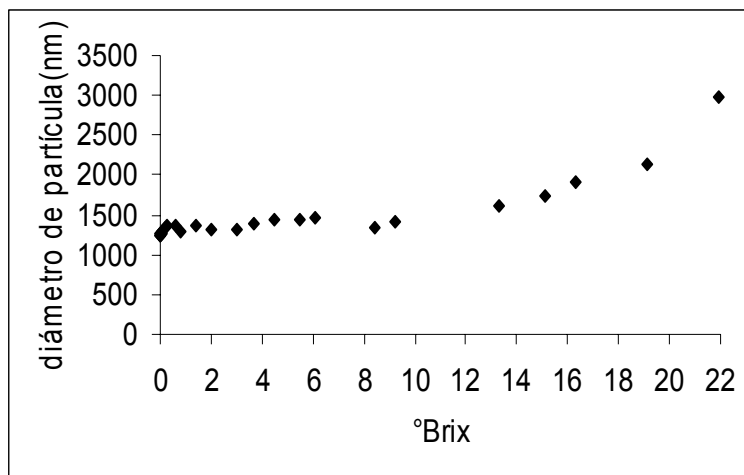


Figura 6: Variación del diámetro de partícula en función de los sólidos solubles

CONCLUSIONES

La mayor influencia sobre el potencial Zeta (ξ) la generan los iones en solución, ya que al ir eliminándose los solutos, la doble capa se hace mayor no permitiendo que entren en contacto las partículas. Si bien las partículas en solución, una vez eliminados los solutos presentan un valor de ξ suficientemente alto como para prevenir la floculación, éste no es suficiente para explicar su estabilidad, ya que la disminución del mismo por la presencia de los solutos conduciría a una solución menos estable, pero experimentalmente no es así. A pesar de haber sido tratado el jugo con enzimas pectolíticas no se ha podido desestabilizar el coloide, probablemente debido a que el tratamiento no ha podido llegar al núcleo proteico dejando sobre la superficie cadenas degradadas de pectina. Se considera que en el estudio de este tipo de interacción por cargas debería tenerse en cuenta además la hidratación de las partículas, las interacciones tipo puente de hidrógeno entre ellas y el medio que las rodea y el posible efecto estérico producido por el volumen que ocupan las cadenas degradadas de pectina que rodean a las partículas

BIBLIOGRAFIA

- Dietrich, H., Gierschner, K., Pecoroni, S., Zimmer, E. and Will, F. (1996).** New findings regarding the phenomenon of cloud stability. *Flüssiges Obst*. 63 (1), 7-10.
- Genovese, D. and Lozano, J. e. (2000).** Effect of cloud particle characteristics on the viscosity of cloudy apple juice. *J. Food Sci.* 65 (4), 641-645.
- Magdassi and A. Kamyshny. (1996).** In: S. Magdassi Editor, *Surface Activity of Proteins: Chemical and Physicochemical Modifications*, Marcel Dekker, New York
- Ottewill, R. H. (1977).** Stability and Instability in disperse systems. *J. Colloid Interf. Sci.* 58, 357-373.
- Sherman, P. (1970).** *Rheology of Dispersed Systems*. In *Industrial Rheology* London, Academic Press Inc. p 97-183.

Tolstoguzov, V. (2001). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Sci. Biotechnol.* 10 (5) , 576–582.

Verwey, E. J. W., and J. T. G. Overbeek. (1948). *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier, Amsterdam.

Yamasaki M., Yasui T. and Arima K. (1964). Pectic Enzymes in the Clarification of Apple Juice. *Agr. Biol. Chem.* 28 (11): 779- 787.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al subsidio PICT: 09-0816, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

CALIDAD DE CARNE DE POLLO EN FUNCION DE LA DIETA Y EL PROCESAMIENTO

Pezzutti, Graciela C.¹ y Crapiste, Guillermo H.²

1. Escuela de Agricultura y Ganadería, Universidad Nacional del Sur, Sarmiento 3300, Fax: 54-291-4566134, Email: agricu@uns.edu.ar

2. PLAPIQUI (UNS – CONICET), Camino La Carrindanga Km. 7, 8000 Bahía Blanca, Argentina, Fax: 54-291-4861600. E-mail: gcrapiste@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

Se analizó la calidad organoléptica y nutricional de la carne de pollos alimentados con diferentes dietas suplementadas con semilla de lino, así como su modificación durante el almacenamiento refrigerado o congelado y la cocción. El agregado de lino incrementó el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), especialmente en la forma de ácido linolénico, sin perjudicar la calidad organoléptica del producto cocido. El agregado de vitamina E a la dieta favoreció la conservación de los AGPI ω 3, tanto en el producto fresco como en el procesado. La conservación en frío y la cocción no afectaron sustancialmente la composición de los ácidos grasos de la carne.

Palabras claves: carne de pollo, calidad, semilla de lino, ácidos grasos poliinsaturados

ABSTRACT

The organoleptic and nutritional quality of meat from chicken fed with different diets supplemented with flaxseed, as well as its modification during storage and cooking was studied. Addition of flaxseed increased the content of polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially as linolenic acid, and did not affect the sensorial quality of the cooked product. Addition of vitamin E to the diet had a protecting action on the PUFA- ω 3 in both fresh and cooked products. Refrigeration, freezing and cooking did not affected significantly the acidic composition of the meat.

Key words: chicken meat, quality, flaxseed, polyunsaturated fatty acids

INTRODUCCIÓN

La carne de pollo es naturalmente baja en contenido de grasa saturada y rica en ácidos grasos poliinsaturados. Su composición ácida puede ser enriquecida en ácidos grasos ω 3 por sus efectos benéficos sobre la salud humana, especialmente mediante la utilización de dietas suplementadas con lino (López-Ferrer et al., 2001).

Los ácidos grasos ω 3 más importantes son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), y en grado menor su precursor el ácido α -linolénico. Los ácidos linoleico (ω 6) y linolénico (ω 3) son esenciales y deben ser aportados en la dieta. Para evitar un desequilibrio entre ambos ácidos grasos, involucrados en vías metabólicas competitivas, se ha recomendado la relación óptima de consumo a una razón de 5:1 o menor (Valenzuela y Uauy, 1999).

Uno de los principales problemas de la carne de pollo enriquecida con ácidos grasos ω 3 es su menor estabilidad a la oxidación, que puede ocasionar una reducción de la calidad durante el almacenamiento, y que puede ser mejorada por el agregado de vitamina E en la dieta (O'Neill et al., 1998).

El objetivo del presente trabajo fue analizar la calidad organoléptica y nutricional de la carne de pollos sometidos a distintas dietas suplementadas con semilla de lino, así como su modificación durante el almacenamiento refrigerado o congelado y la cocción.

MATERIALES Y MÉTODOS

La experiencia se llevó a cabo con 480 pollos y el tiempo de crianza fue de 51 días. Durante el primer mes se los alimentó con una dieta elaborada con maíz y harina de soja (22 % de proteínas, 4,3 % de lípidos y 3 % de fibra) y luego se los separó en cuatro grupos que fueron sometidos a distintas dietas: una testigo (I) y otras suplementadas con semilla de lino al 4% (II) y 8% (III y IV), en el último caso con el agregado de 200 mg/Kg de vitamina E como antioxidante.

Los pollos se pesaron una vez por semana con el fin de evaluar la velocidad de crecimiento, la ganancia de peso y la eficiencia de conversión alimenticia. Una vez terminado el período de crianza los animales se pesaron y sacrificaron, determinándose el porcentaje en peso de la carcaza y la proporción de grasa abdominal en la misma.

La carne de pollo, utilizando tres muestras representativas por cada dieta y procesamiento, fue analizada al sacrificio, después del almacenamiento refrigerado a 4°C durante cinco días o congelado durante treinta días, y después de cocidas en un horno industrial bajo condiciones controladas.

La extracción de los ácidos grasos se realizó por una adaptación del método de Folch et al. (1957) y la metilación con trifloruro de boro en metanol por el método de Morrison y Smith (1964). La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa utilizando un equipo Agilent HP 4890D provisto de una columna capilar Supelco SP256 (100m x 0,25mm x 0,2 μ m. Las condiciones operativas fueron las siguientes: 140°C durante 5 min. , incremento de 4°C/min hasta llegar a 240°C y 240°C

durante 15 min.; temperatura del inyector 175°C y del detector 260°C. Las muestras se analizaron por duplicado.

El contenido total de grasa se determinó por Soxhlet, utilizando un método rápido de extracción con microondas y solventes (AOAC, 1990). Para determinar el deterioro oxidativo en pollos al sacrificio y refrigerados se utilizó el método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) modificado (Du et al., 2000).

Para evaluar la calidad organoléptica de la carne cocida se utilizó el método estandarizado propuesto por World's Poultry Science Association (1987), llevándose a cabo dos pruebas de degustación con jueces no entrenados con un test triangular para analizar diferencias entre las muestras y una escala de ordenación hedónica para establecer preferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El incremento en peso y la eficiencia de conversión fue más elevada en los pollos alimentados con dietas ricas en lino, con un peso final promedio de 2,835, 2,813 y 2,883 kg/pollo para las dietas II, III y IV respectivamente contra 2,480 kg/pollo en la dieta control. Este comportamiento también ha sido reportado para dietas suplementadas con aceite de lino (López-Ferrer et al., 2001) e indica que en las cantidades usadas no se evidencian algunos efectos antinutritivos de la semilla de lino.

El rendimiento promedio de la carcaza, calculada como porcentaje del peso del pollo vivo, se incrementó con el contenido de lino pasando de 73,3% en la dieta control a 82,3% en la dieta IV, con resultados intermedios para las dietas II y III (74,4% y 78,4% respectivamente) Las dietas con lino dieron pollos con un menor porcentaje de grasa abdominal en la carcaza (1,3 a 1,8% dependiendo del tratamiento) en comparación con la dieta testigo (4%) Esto puede explicarse parcialmente por el hecho de que los ácidos grasos poliinsaturados tienen una tendencia a incorporarse a los fosfolípidos de las membranas celulares más que al tejido adiposo, por lo que estarán presentes principalmente en las partes magras comestibles del animal (Hrdinka et al., 1996).

El contenido total de lípidos en la carne fue de alrededor del 4,7%, no encontrándose diferencias muy significativas entre las distintas dietas. La composición en ácidos grasos se muestra en la Tabla I. Los niveles más elevados de ácido grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGMI) se encontraron con la dieta control. Estos se reducen, especialmente el ácido oleico, al incrementar el contenido de semilla de lino en las dietas. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la carne se incrementa en forma significativa cuando se adiciona semilla de lino a la dieta. Se observa un leve aumento de

la familia $\omega 6$, especialmente del ácido linoleico (C18:2n6) El contenido de $\omega 3$ se incrementa a cerca del triple en la dieta II y 4,2-5,5 veces más en las dietas III y IV, y este incremento es mayor para el ácido linolénico (C18:3n3) La mayor concentración de AGPI $\omega 3$ de escaso contenido en la dieta, como el eicosapentaenoico (C20:5n3), el docosapentaenoico (C22:5n3) y el docosahexaenoico (C22:6n3), indica la habilidad de los pollos para convertir el ácido linolénico en sus derivados de larga cadena cuando este precursor está presente en la dieta, probablemente por elongación y desaturación del mismo. El contenido de ácido araquidónico (C20:4n6) se mantuvo similar en todos los tratamientos considerados, evidenciando que no hubo competencia entre los precursores de ambas familias de ácidos grasos esenciales (López-Ferrer et al., 2001). La relación $\omega 6/\omega 3$ pasó de 8,3 en la carne de pollos con dieta base a 3,5 en la dieta con 4% de lino y alrededor de 2 en las dietas con 8% de lino. El agregado de α -tocoferol a la dieta con 8% de lino produjo un aumento en el contenido de AGPI en la carne, mostrando el efecto protector de la vitamina E tanto en la carne fresca como en la cocida. La refrigeración, el congelado y el cocido no afectaron sustancialmente la composición y cantidad de AGPI, con valores de $\omega 3$ y de $\omega 6$ en las dietas con 4 y 8% de lino sin diferencias significativas con los pollos al sacrificio (Figuras 1 y 2). Las TBARS en la carne de pollo aumenta con el agregado de lino a la dieta (con valores de 0,99, 1,52 y 1,25 mg/Kg en las dietas I, II y III respectivamente) y con el almacenamiento refrigerado por 5 días (con valores de 2,43, 1,67 y 1,71 mg/Kg), excepto en la dieta IV que muestra una mayor estabilidad a la oxidación (1,03 mg/Kg). Respecto al análisis sensorial, el panel de degustadores evaluó la carne de pollo cocida sobre la base del flavor, la jugosidad y la impresión general. En la primera prueba se usó el test triangular, encontrándose que las diferencias fueron significativas (0,01%) entre la dieta I y las restantes y altamente significativa (0,001%) entre las dietas III y IV. La segunda prueba, para establecer el nivel de preferencias se hizo utilizando una ordenación de acuerdo a una escala hedónica. El orden de preferencia en función de las dietas, con un nivel de significación del 0,05%, fue III, II, I y IV.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible aumentar la calidad nutricional de la carne de pollo por el agregado de semilla de lino a las dietas, debido a un incremento del contenido de los AGPI y una disminución de la relación $\omega 6/\omega 3$. Así mismo, se observa un incremento en el porcentaje de carcaza y una menor proporción de grasa abdominal, sin afectar negativamente la calidad organoléptica de la carne cocida.

La conservación en frío, refrigerado o congelado, y la cocción no afectan sustancialmente la composición de los ácidos grasos de la carne. El agregado de vitamina E favorece la conservación de los AGPI, sobre todo los ω 3, tanto en el producto fresco como en el procesado, aunque afecta desfavorablemente la aceptabilidad del producto.

Tabla 1 - Composición ácida de la carne de pollo con diferentes dietas

Ácido graso	Dieta I	Dieta II	Dieta III	Dieta IV
C12:0	0,00	0,04	0,02	0,09
C14:0	0,45	0,26	0,50	0,44
C14:1	0,17	0,08	0,13	0,16
C15:0	0,08	0,07	0,11	0,14
C16:0	21,69	18,84	20,22	18,37
C16:1	7,08	5,84	6,28	5,63
C17:0	0,20	0,23	0,18	0,24
C17:1	0,22	0,28	0,26	0,32
C18:0	6,05	5,81	5,77	5,09
C18:1	39,58	39,76	35,35	33,63
C18:2	12,86	16,11	13,95	16,47
C20:0	0,30	0,28	0,29	0,33
C18:3-N6	0,57	0,31	0,31	0,34
C20:1	0,59	0,46	0,44	0,49
C18:3-N3	1,26	3,98	6,25	8,51
C21:0	0,36	0,30	0,07	0,23
C20:2	0,60	0,47	0,57	0,60
C22:0	0,45	0,32	0,39	0,34
C20:3	0,41	0,45	0,49	0,50
C22:1	0,12	0,10	0,13	0,09
C20:3-N3	0,16	0,17	0,22	0,31
C20:4	1,55	1,61	1,33	1,34
C22:2	0,49	0,16	0,26	0,23
C24:0	0,16	0,07	0,09	0,16
C20:5-N3	0,13	0,41	0,49	0,66
C24:1	0,11	0,13	0,10	0,12
C22:5-N3	0,21	0,53	0,78	0,91
C22:6-N3	0,19	0,43	0,45	0,45

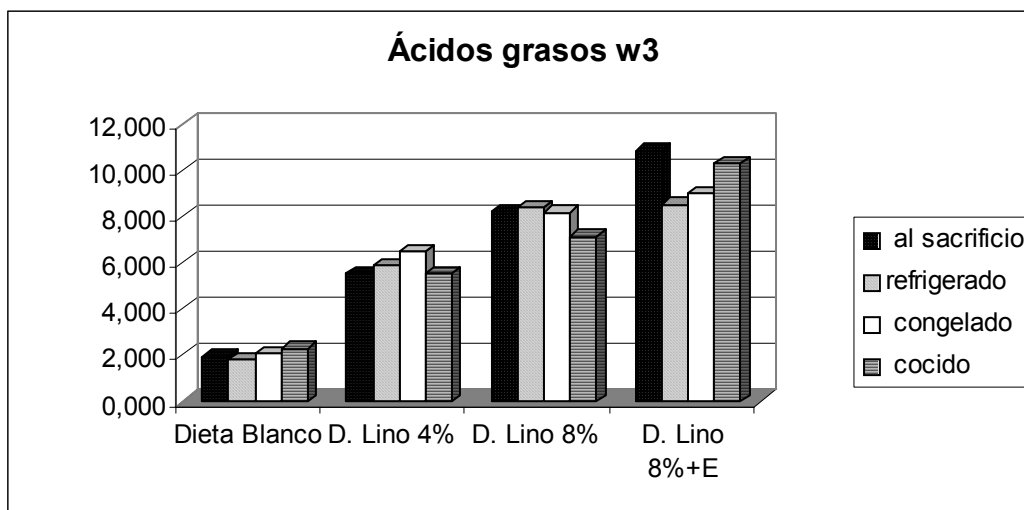


Figura 1 - Variación de los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 con el procesamiento

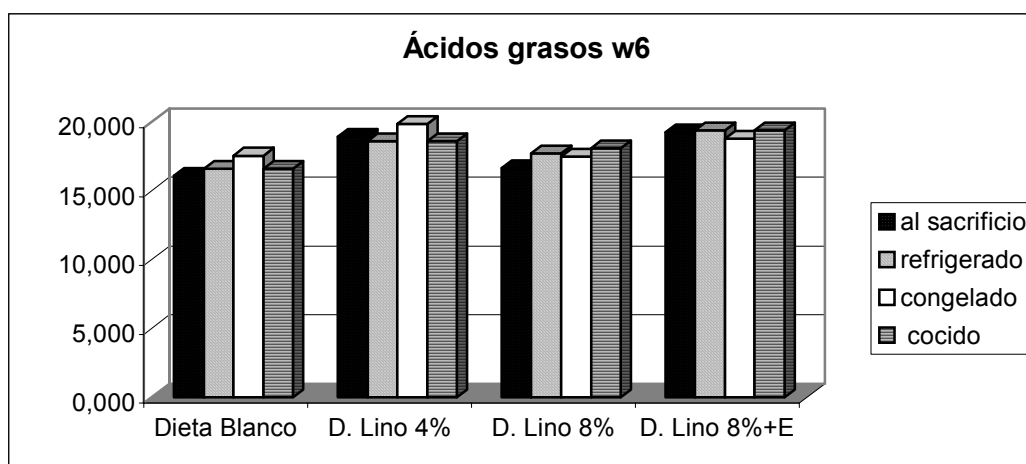


Figura 2 - Variación de los ácidos grasos poliinsaturados ω 6 con el procesamiento

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 1990. Fat (crude) in meat and poultry products. Rapid microwave-solvent extraction method. 985.15, pp. 932.

Du, M., Ahn, D.U., Nam, K.C. y Sell, J.L. 2000. Influence of dietary conjugated linoleic acid on volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. Meat Sci., 56:387-395

Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226:497-509.

- Hrdinka, C, Zollitsch, W., Knaus, W. y Lettner, F. 1996.** Effects of dietary fatty acid pattern on melting point and composition of adipose tissues and intramuscular fat of broiler carcasses. *Poultry Sci.* 75:208-215.
- López-Ferrer, S., Baucells, M.D., Barroeta, A.C., Galobaert, J. y Grashorn, M.A. 2001.** N-3 enrichment of chicken meat - Use of precursors of long-chain polyunsaturated fatty acids: Linseed oil. *Poultry Sci.*, 80:753-761.
- Morrison, W.R. y Smith, L.M. 1964.** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Research*, 5:600-608.
- O'Neill, L.M., Galvin, K., Morrissey, P.A. y Buckley, D.J. 1998.** Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat and meat products. *British Poultry Sci.*, 39:365-371.
- Valenzuela, A. y Uauy, R. 1999.** Consumption pattern of dietary fats in Chile: n-6 and n-3 fatty acids. *Int. J. Food Sci. Nutric*, 50:127-133.
- World's Poultry Science Association. 1987.** Working Group N°5. Recommendations for a standardized method of sensory analysis for broilers. *World's Poultry Sci. J.*, 43:64-68.

PROPIEDADES REOLÓGICAS DE DISPERSIONES DE HARINAS OBTENIDAS POR EXTRUSION DE MEZCLAS MAIZ-SOJA

PEREZ Adrián A., DRAGO Silvana R., CARRARA Carlos R., GONZALEZ Rolando J.

Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL. Ciudad Universitaria- Paraje El Pozo s/n
Santa Fe. TE: 0342-4571150. Fax: 0342-4571148. E-mail: rolgonza@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

Se analizaron las características reológicas de dispersiones de harinas precocidas de mezclas de sémolas de maíz dentado y de soja, obtenidas en diferentes condiciones de extrusión. Las harinas precocidas obtenidas presentaron buenas características sensoriales a distintas condiciones, siendo la muestra extrudida a 170 °C y 14,0 %, la de mayor grado de cocción y consecuentemente menor viscosidad. Con la curva sugerida por Shama y Sherman, se definió el gradiente de velocidad al que se deben comparar las viscosidades de este tipo de dispersiones. Los resultados confirmaron que la cocción por extrusión permite obtener harinas precocidas cuyas dispersiones presentan viscosidades significativamente inferiores a la de una muestra de sopa crema comercial. El agregado de soja no sólo mejora la calidad proteica del maíz, sino que además, al reducir el contenido de almidón de la mezcla, permite incrementar el contenido de sólidos de la dispersión y consecuentemente la densidad calórica.

Palabras claves: maíz, soja, extrusión, viscosidad, densidad calórica.

ABSTRACT

Rheological characteristics of precooked flours obtained from corn and soy grits mixtures, extruded at different conditions, were evaluated. Results confirm that extrusion cooking allows obtain precooked flours whose dispersions show significantly lower viscosities than a commercial cream soup preparation. Good samples were obtained at different extrusion conditions and the one corresponding to 170 °C and 14.0 % shows the lowest viscosity value. By using the curve suggested by Shama and Sherman, shear rate was selected for viscosity comparison. Soy addition to corn grits, not only improves the protein quality of the mixture, but also permits to increase their dispersion caloric density.

INTRODUCCIÓN

Las mezclas comerciales utilizadas para preparar sopas cremas instantáneas tienen como principal componente al almidón (nativo y/o modificado), el cual le otorga una textura cremosa. Estas preparaciones normalmente requieren la cocción de algunos minutos, lo que permite la hidratación y el hinchamiento de los gránulos de almidón. La viscosidad de la dispersión es la propiedad determinante de la aceptabilidad, aunque otros atributos tales como la suavidad, el aroma y el gusto, son también importantes (González y col., 1991).

En las sopas comerciales la densidad energética de la ración no es un factor relevante, correspondiéndoles una concentración de sólidos entre 5,0-8,0 %P/P_{bs}. La densidad energética de estas preparaciones puede incrementarse aumentando el contenido de lípidos, o bien provocando cambios estructurales en los gránulos de almidón de manera tal que el radio hidrodinámico de las partículas hidratadas sea menor que el correspondiente a la de los gránulos de almidón gelatinizados e hinchados (González y col., 1986). La extrusión cocción es considerada una tecnología apropiada para elaborar mezclas precocidas a base de harinas de cereales con las de oleaginosas y/o de legumbres (Gómez, 1985).

Una de las fuentes proteicas más interesante, es la harina de soja entera, que permite complementar las de cereales y además, puede ser obtenida fácilmente y su calidad controlada a partir de una adecuada selección de los granos. Sin embargo, son conocidos los efectos negativos desde el punto de vista organoléptico, que produce la presencia de la lipoxigenasa activa una vez que los granos son molidos ya que, la degradación oxidativa se hace evidente (Fehr y col., 2000).

En el presente trabajo, se analizaron las características reológicas de dispersiones de harinas precocidas obtenidas en diferentes condiciones de extrusión de mezclas de sémolas de maíz dentado y de granos de soja con lipoxigenasa inactivada. Además, se seleccionó la muestra que mostró las mejores características sensoriales y se compararon las dispersiones de ésta con la de una sopa crema comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron sémolas de maíz dentado y de soja (con lipoxigenasa inactivada), obtenidas según un diagrama de molienda experimental (Robutti y col., 2002). Las mezclas se prepararon con una proporción constante de 88:12 maíz-soja y se acondicionaron a tres niveles de humedad (14-16-18 %) para ser extrudidas a tres niveles de temperatura (155-170-185 °C) utilizando un extrusor Brabender 20 DN (Alemania). Las muestras fueron

obtenidas luego de alcanzar el estado estacionario, momento en que también se registró el torque y el caudal másico de salida. Con estos datos se pudo calcular el consumo específico de energía mecánica (CEEM, en J g^{-1}) según la siguiente ecuación:

$$CEEM = \frac{KTN}{Qs'}$$

donde K : $61,3 \cdot 10^{-3} \text{ J g}^{-1}$; T : Torque en unidades Brabender (UB); N : rpm del tornillo extrusor y Qs' : caudal másico referido a la humedad de alimentación (g min^{-1}).

Las muestras fueron secadas en estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ y molidas en un molino a martillo Retsch Muhle (Alemania) de manera de obtener una harina con tamaño de partícula inferior a $420 \mu\text{m}$. En las mismas se determinó la solubilidad en agua (S) según el método de Anderson con algunas modificaciones (Anderson y col., 1969). La S junto al CEEM han demostrado ser buenos indicadores del grado de cocción (González y col., 1986).

Para la medida de viscosidad (Pa. s) se prepararon dispersiones de harinas precocidas al 8,0-11,0-14,0 %P/P_{bs}. La determinación se efectuó a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ con un viscosímetro HAAKE RV3 (Alemania). Los reogramas para la parte ascendente se obtuvieron para un rango de gradiente de velocidad de $0\text{-}350 \text{ s}^{-1}$. De los mismos se calcularon los valores de viscosidad para los siguientes gradientes: 30, 50, 75, 100 y 150 s^{-1} y se efectuó la correlación múltiple para la viscosidad con la S y concentración de sólidos (C) para un dado gradiente. Además, y a los efectos de realizar una comparación se determinaron los reogramas correspondientes a las dispersiones obtenidas con una sopa crema de arveja comercial. Las dispersiones se prepararon de acuerdo a lo sugerido por el fabricante y en las concentraciones de 5,9-7,6-10,4 %P/P_{bs}, destacándose que la concentración sugerida para el consumidor corresponde al 5,9 %P/P_{bs}.

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para analizar el efecto de la humedad (H) y la temperatura (T) sobre las siguientes respuestas: CEEM, S y Viscosidad a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y a gradiente de velocidad de 100 s^{-1} ($\eta_{60^\circ\text{C}, 100 \text{ s}^{-1}}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis de los efectos de la Humedad y la Temperatura sobre las respuestas: En la Tabla 1 se muestran los resultados correspondientes al CEEM y a la S. Para ambos casos se observa claramente la relación inversa con la humedad, lo cual esta correspondencia con la intensidad de los esfuerzos de corte desarrollados durante la extrusión. En cambio, el efecto de la temperatura es menos significativo, para ambas respuestas. Se verifica la relación directa entre CEEM y S, confirmando que ambas magnitudes son buenos indicadores del grado de cocción.

Tabla 1: Valores de las respuestas para las distintas condiciones del diseño experimental correspondientes a la extrusión de las mezclas de maíz dentado-soja (88:12). **MSI T-H:** muestras extrudidas a base de maíz-soja inactivada a distintas condiciones de T y H. **CEEM:** Consumo específico de energía mecánica; **S:** Solubilidad en agua de harinas precocidas.

Muestras	CEEM ($J g^{-1}$)	S (%)
MSI 155-14	717,1	43,58
MSI 155-16	588,3	37,30
MSI 155-18	492,2	34,72
MSI 170-14	571,0	45,11
MSI 170-16a	556,8	44,20
MSI 170-16b	524,0	44,24
MSI 170-16c	507,0	39,18
MSI 170-18	498,0	35,93
MSI 185-14	633,6	43,16
MSI 185-16	524,4	41,49
MSI 185-18	427,9	37,37

La figura 1 muestra la superficie de respuesta obtenida para S, en la cual se observan los efectos esperados, es decir que ésta aumenta con la disminución de H y con el aumento de T, aunque para este factor la superficie muestra una disminución de S para T mayor a 170 °C.

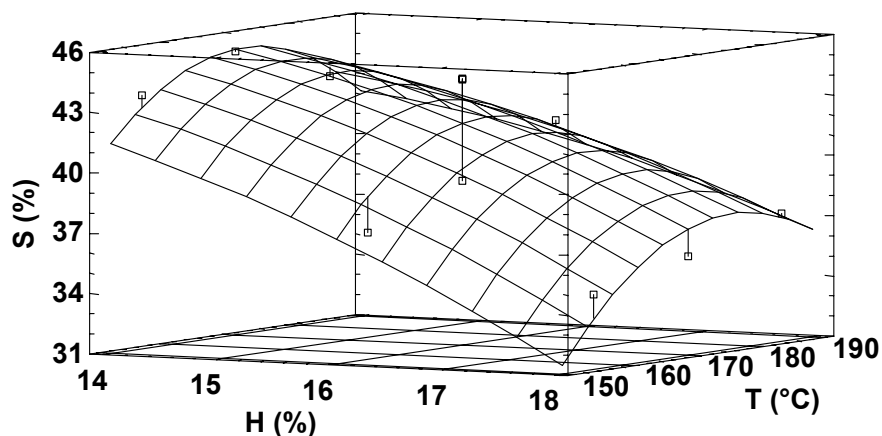


Figura 1: Superficie de respuesta correspondiente al solubilidad de las muestras extrudidas a partir de mezclas maíz-soja (88:12).

El análisis de la variancia para la $\eta_{60^{\circ}C, 100 s^{-1}}$, indica que ni para concentraciones de 8,0% ni para 11,0 %P/P_{bh}, se observan efectos significativos ($p < 0,05$). Esta falta de significación debe atribuirse al hecho que para algunas condiciones las diferencias de viscosidad son inferiores al error experimental. Esta dificultad desaparece para la concentración de 14,0 %P/P_{bh}, para la cual el efecto de H es significativo en el término lineal ($p < 0,0410$). La

Figura 2 muestra la superficie de respuesta para la $\eta_{60^{\circ}\text{C},100\text{ s}^{-1}}$ a 14,0 %P/P_{bh} de sólidos. Se puede observar, que la misma crece con el aumento de H y tiende a disminuir con el aumento de T; siendo esto último más notable a alta H. Este resultado confirma lo anteriormente mencionado respecto al efecto del grado de cocción sobre la viscosidad, es decir, a mayor grado de cocción menor viscosidad de las dispersiones.

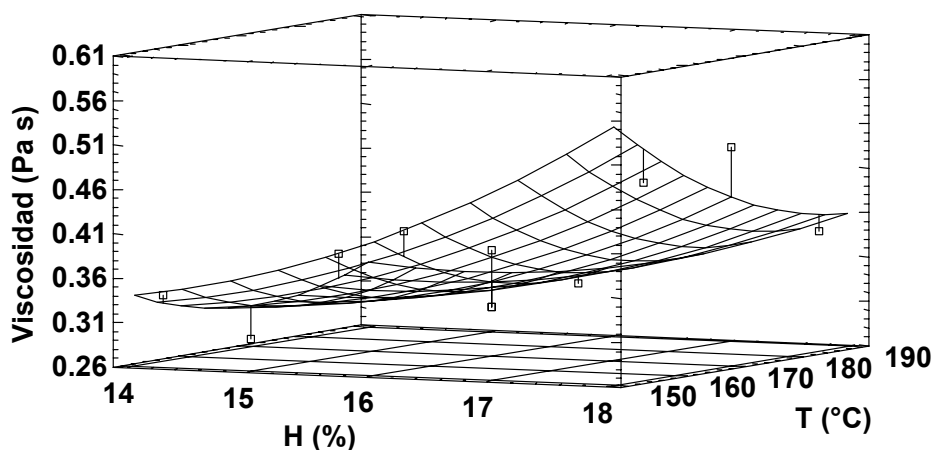


Figura 2: Superficie de respuesta correspondiente a la viscosidad (a 60 °C y 100 s⁻¹) de las dispersiones de harinas (al 14,0 %P/P_{bh}) de las muestras extrudidas a partir de mezclas maíz-soja (88:12).

2. Análisis de las características reológicas de las dispersiones de harinas obtenidas a partir de las muestras extrudidas:

En la Tabla 2, se observan los valores de $\eta_{60^{\circ}\text{C},100\text{ s}^{-1}}$ y de los coeficientes de la función de potencia obtenidos a partir de los reogramas de las dispersiones correspondientes a cada una de las muestras extrudidas a las concentraciones de sólidos analizadas. Se incluyen también los valores de las dispersiones obtenidas a partir de muestras extrudidas de sémola de maíz sin agregado de soja, a temperatura de 170 °C y a humedades de 14,0-16,0-18,0 % y los obtenidos para la muestra comercial de sopa de arvejas.

Se observa claramente que la función de potencia ajusta adecuadamente para todos los reogramas siendo los coeficientes de correlación superiores a 0.99 en todos los casos. También se puede destacar que la muestra de maíz sin agregado de soja en general presenta una mayor viscosidad, efecto que puede atribuirse en su mayor parte, al mayor contenido de almidón respecto al de las mezclas con soja.

3. Selección de la muestra más adecuada para su comparación con la muestra comercial:

Por medio de una evaluación sensorial, se pudo establecer que las dispersiones correspondientes a la muestra extrudida a 155 °C y 18 % de humedad se caracterizaron por presentar una cierta granulosis lo que afectó significativamente a la

suavidad. Por otra parte, en todas las dispersiones de las muestras extrudidas a 185 °C se percibió un claro sabor a tostado. Por lo tanto, las muestras extrudidas a 170 °C a las tres humedades y las extrudidas a 155 °C y a 14-16 % de humedad, fueron consideradas aptas para ser utilizadas en formulaciones de sopas cremas instantáneas.

Tabla 2: Valores de viscosidad a distintas concentraciones de sólidos y coeficientes de la función de potencia ($\eta_{60^{\circ}\text{C},100\text{s}^{-1}} = K100^n$) obtenidos a partir de los reogramas de las dispersiones correspondientes a: la muestra comercial de sopa de arvejas, las muestras extrudidas de maíz (M T-H) y las mezclas extrudidas de maíz-soja inactivada (MSI T-H).

Muestras	%P/P	$\eta_{60^{\circ}\text{C}, 100\text{ s}^{-1}}$	K	n	r
M 170-14	8,0	0,070	0,377	0,635	0,998
	11,0	0,140	1,209	0,533	0,996
	14,0	0,354	4,990	0,425	0,997
M 170-16	8,0	0,103	1,878	0,370	0,998
	11,0	0,219	3,713	0,386	0,999
	14,0	0,510	11,913	0,316	0,993
M 170-18	8,0	0,110	1,642	0,413	0,997
	11,0	0,250	4,591	0,368	0,993
	14,0	0,569	14,686	0,294	0,997
MSI 155-14	8,0	0,078	0,625	0,548	0,998
	11,0	0,103	0,459	0,635	0,999
	14,0	0,335	5,655	0,385	0,994
MSI 155-16	8,0	0,084	0,818	0,505	0,998
	11,0	0,123	0,651	0,639	0,994
	14,0	0,417	8,335	0,350	0,982
MSI 170-14	8,0	0,072	0,630	0,528	0,999
	11,0	0,119	1,197	0,499	0,996
	14,0	0,269	3,222	0,461	0,984
MSI 170-16	8,0	0,086	0,713	0,540	0,997
	11,0	0,119	2,117	0,466	0,997
	14,0	0,380	7,219	0,360	0,995
MSI 170-18	8,0	0,097	0,880	0,521	0,982
	11,0	0,166	1,624	0,504	0,997
	14,0	0,507	10,410	0,344	0,986
Comercial	5,9	0,074	0,97	0,441	0,999
	7,6	0,139	2,768	0,35	0,998
	10,4	0,346	7,583	0,329	0,999

A los efectos de conocer la relación entre la $\eta_{60^{\circ}\text{C},100\text{ s}^{-1}}$, S y C se realizó una correlación múltiple obteniéndose la siguiente expresión: $\eta_{60^{\circ}\text{C},100\text{ s}^{-1}} = 0,387C^{2,607}S^{-1,913}$

donde $\eta_{60^{\circ}\text{C},100\text{ s}^{-1}}$: Viscosidad (Pa s) de las dispersiones a 60 °C y para gradiente 100 s⁻¹, C: Concentración de sólidos de la dispersión (%P/P) y S: Solubilidad en agua de la harina extrudida(%). El coeficiente de correlación para esta regresión fue de 0,945. Esta

expresión permitiría seleccionar el grado de cocción (S) necesario y/o la concentración de sólidos para que la dispersión posea una determinada viscosidad. Resulta obvio, que si se desea una harina precocida para preparar una dispersión con la mayor densidad calórica posible se deberá elegir aquella con mayor S y a una C compatible con la viscosidad máxima aceptable.

Teniendo esto en cuenta, se seleccionó la muestra extrudida a 170 °C y 14 % de humedad para su comparación con la muestra de sopa crema de arveja comercial. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para la sopa crema comercial y la muestra seleccionada y se aprecia la relación existente entre la viscosidad de la dispersión (a 60 °C) para 75 s⁻¹ y 100 s⁻¹ y la concentración de sólidos. Se observó que la sopa comercial fue más viscosa que la dispersión de la muestra seleccionada en el rango de concentración evaluado.

Para poder comparar las viscosidades de las dispersiones de estas muestras, con el objeto de predecir la consistencia percibida en la boca, se tuvo en cuenta lo sugerido por Shama y Sherman (Szczecniak, 1979), quienes establecieron una región que define los gradientes de velocidad aplicados entre la lengua y el paladar para un amplio rango de viscosidades. Teniendo en cuenta que la concentración sugerida por el fabricante correspondió a 5,9 %P/P_{bs}, y que el reograma para esta concentración intercepta a la región mencionada a un gradiente de 100 s⁻¹, se tomó al mismo como base para estimar las diferencias entre las muestras. Así, la viscosidad de la sopa comercial a 100 s⁻¹ y a 5,9 %P/P_{bs} fue 0,074 Pa s. Ese mismo valor de viscosidad se obtuvo con la muestra extrudida a una concentración de aproximadamente 9,0 %P/P. Si se deseara aumentar la densidad energética de la formulación, sería posible aumentar la concentración de la muestra seleccionada hasta niveles de 11,0-12,0 %P/P. En estos casos, la viscosidad resultante de 0,150 Pa s, seguiría siendo compatible para la formulación de una sopa crema. Sin embargo, la dispersión de la sopa crema comercial a este nivel de concentración de sólidos presentaría una viscosidad superior a 0,450 Pa s, lo cual sería demasiado elevado para una sopa crema.

CONCLUSIÓN

La cocción por extrusión de mezclas maíz-soja permite obtener harinas precocidas cuyas dispersiones presentan viscosidades significativamente inferiores a la de una muestra de sopa crema comercial a similar concentración. Este efecto es atribuido a la intensa ruptura de la estructura granular del almidón durante la extrusión, confirmada por los altos valores de solubilidad en agua. Si bien se pueden obtener harinas precocidas con buenas

características sensoriales a distintas condiciones de extrusión, se debería seleccionar aquella con mayor grado de cocción, si se pretende una máxima densidad calórica, lo cual es muy importante para el diseño de alimentos de elevada densidad de nutrientes. Además, el agregado de soja con lipoxigenasa inactivada permite mejorar la calidad proteica de productos a base de maíz, sin deteriorar significativamente los atributos sensoriales.

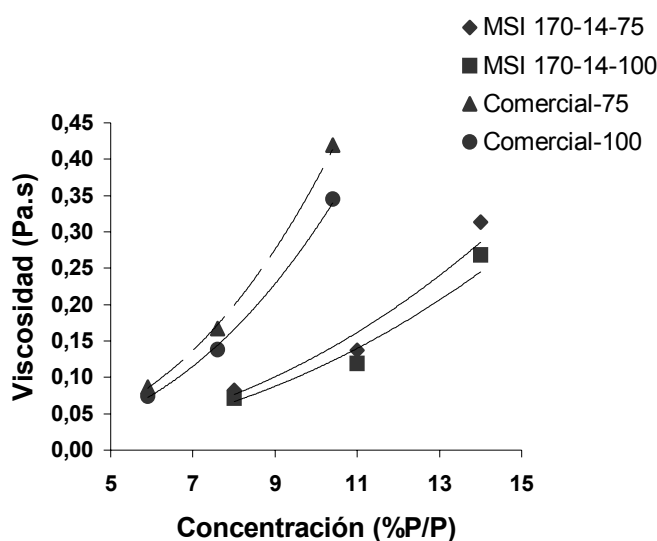


Figura 3: Relación entre la viscosidad de la dispersión (a 60 °C) con la concentración, para 75 s⁻¹ y 100 s⁻¹, correspondientes a la sopa crema comercial de arveja y la muestra de maíz-soja extrudida a 170 °C y a 14 % de humedad (MSI 170-14).

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, R. A.; Conway, H. F.; Pfeiffer, V. F.; Griffin, E. L. (1969).** “Gelatinization of corn grits by roll and extrusion-cooking”. *Cereal Science Today*. 14: 4-7.
- González, R. J.; Torres, R. L.; De Greef, D. M.; Gordo, N. A.; Velocci, M. E. (1991).** “Influencia de las condiciones de extrusión en las características de la harina de maíz para elaborar sopas instantáneas. *Rev. Agroq. y Tec. de Alim.* 31(1): 87-96.
- González, R. J.; Torres, R. L.; De Greef, D. M.; (1986).** “Evaluación de almidón de maíz precocido por extrusión-cocción”. *Rev. Agroq. y Tec. de Alim.* 26(4): 552-564.
- Gómez, M. H. (1985).** “Development of a food of intermediate moistness from extracts of corn and soybean. *Archives of Latinoamerical Nutrition.* 35(2):306-314.
- Fehr, W. R.; Narvel, J. M.; Weldon, L. C. (2000).** “Analysis of soybean seed lipoxigenases”. *Crop Science.* 40:838-840.

- Robutti, J.L.; Borrás, F.S.; González, R.J.; Torres, R.L.; De Greef, D.M. (2002).** “Endosperm properties and Extrusion cooking behaviour of maize cultivars”. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 35: 663-669.
- Szczecniak, A. S. (1979).** “Recent Developments in Solving Consumer Oriented extrusion Problems”. *Food Technology*,. 33(10): 61-66.

Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005

TRABAJOS DEL X CONGRESO CYTAL

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías

“Apertura a nuevos procesos, productos e ideas: camino al futuro”

18 al 20 de mayo de 2005

Sheraton Mar del Plata



ASOCIACION ARGENTINA de TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

Filial Mar del Plata
aatamdq@gmail.com

AATA Central
Alsina 943. 4to Piso, oficina 406 (1088) Buenos Aires
TE/FAX: 54 11 4334 0155

Asociación afiliada a:



ITF- Institute of Food Technologists



IUFoST- Institutional Union of Food Science and Technologists



ALACCTA- Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



IAEF- International Association for Engineering and Food

ISBN: 987-22165- 1- 7.
Editado: Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina.
1er Edición. Volumen 1. Marzo de 2006.

TOMO III

Tomo 3:

Biotecnología- Bioingeniería

Contaminantes y tóxicos en alimentos

Desarrollo de nuevos productos

Envases, embalaje y rotulado

Higiene y seguridad alimentaria

INDICE

BIOTECNOLOGÍA- BIOINGENIERÍA

- COMBINACIÓN DE *Streptococcus thermophilus* Y *Lactococcus lactis* EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS EXPERIMENTALES OVINOS.....806
- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE ENTEROCOCCUS..... 813
- CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE SOBRENADANTES CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA OBTENIDOS DE CULTIVOS DE CEPAS DE ENTEROCOCOS AISLADAS EN LA REGIÓN PATAGÓNICA..... 821
- CARACTERIZACIÓN DE UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR LA CEPA DE *Enterococcus faecalis* E24..... 829
- ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LIPASAS EN HIDRÓLISIS DE TRIGLICÉRIDOS Y FOSFOLÍPIDOS..... 837
- AVANCES EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN CONTINUA DE CERVEZA CON LEVADURAS INMOVILIZADAS..... 844
- ELABORACIÓN DE QUESOS DE PASTA BLANDA CON ENZIMA VEGETAL DE *SALPICHRON ORIGANIFOLIA* (HUEVITO DE GALLO)..... 851
- CULTIVO FED-BATCH DE UNA LEVADURA AUTOCTONA PARA LA VINIFICACION DE JUGO CITRICO..... 858
- PECTINESTERASA DE *ASPERGILLUS KAWACHII*: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACION PARCIAL..... 865
- MACERACION DE PAPA CON PROTOPECTINASA-SE DE *GEOTRICHUM KLEBAHNII*..... 873
- EFECTO DE ÁCIDO L-MÁLICO SOBRE *Kloeckera apiculata* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN CULTIVOS PUROS Y MIXTOS..... 881
- ANÁLISIS IMMUNOQUÍMICO DE LA VARIEDAD DE SOJA RAIDEN A LOS EFECTOS DE EVALUAR SU UTILIDAD COMO SUSTITUTO DE LECHE BOVINA PARA PACIENTES ALÉRGICOS..... 887
- ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE DE UN EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO DE FRUTOS DE *BROMELIA HIERONYMI* MEZ (*BROMELIACEAE*)..... 895

CONTAMINANTES Y TÓXICOS EN ALIMENTOS

- DETERMINACIÓN MULTIRESIDUO DE BENZIMIDAZOLES Y ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN MATRICES ACUOSAS POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE..... 904
- OCURRENCIA DE MICOTOXINAS EN TRIGO Y SOJA COSECHADOS EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS DURANTE LAS CAMPAÑAS 2.001/02 Y 2.002/03..... 913
- CONDIÇÕES MICOTOXICOLÓGICAS DO ARROZ NO SISTEMA ESTACIONÁRIO DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO..... 921
- CONTAMINACION POR FUMONISINAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA MOLIENDA HUMEDA DE MAIZ..... 929
- MICOFLORA CONTAMINANTE Y PRESENCIA DE TRICOTECENOS TIPO A Y B EN TRIGO COSECHADO EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES..... 936
- INFLUENCIA DE LA RELACION pH-CALCIO EN LA INTERACCION PROTEINAS-LECITINA DE SOJA Y LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES ACEITE EN AGUA (O/W). 943

-EVALUACIÓN REGIONAL DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS DERIVADOS DE CEREALES.....	950
-APLICACIÓN DE METODOS FISICOS Y QUIMICOS EN EL DESARROLLO DE <i>Aspergillus parasiticus</i> Y EN LA PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN MEDIOS SOLIDOS.....	956
-TRATAMIENTO DE JUGO DE NARANJA CON LUZ UV. ACCION MUTAGÉNICA.....	963
-DESARROLLO Y APLICACION DE MODELOS MATEMATICOS PARA PREDECIR RESIDUALIDAD DE PESTICIDAS EN CITRICOS	970
DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS	
-HIDROLISIS ENZIMATICA DE NARINGINA.....	979
-PRODUCCION DE NEOHESPERIDINA A PARTIR DE NARANJITAS AGRIAS.....	986
-APROVECHAMIENTO DE CÁSCARAS DE SANDÍA EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CRISTALIZADOS.....	994
-EVALUACIÓN DE FIDEOS DE MAIZ OBTENIDOS POR EXTRUSION-COCCION.....	1001
-ALIM V1.0 EN LA FORMULACION DE ALIMENTOS.....	1010
-PANIFICACIÓN CON HARINAS MEZCLAS TRIGO – POROTO.....	1018
-CARACTERISTICAS SENSORIALES DE GALLETITAS FORMULADAS CON HARINA DE ALGARROBO.....	1026
-PELICULAS COMESTIBLES COMPUESTAS DE ALMIDON Y FIBRAS NATURALES UTILIZADAS COMO RECUBRIMIENTO DE ALIMENTOS.....	1033
-DISEÑO DE PASTA DE ANCHOITA (<i>Engraulis anchoita</i>).....	1040
-DESARROLLO DE UN PRODUCTO NUTRITIVO DE BAJO COSTO COMO SUPLEMENTO DIETARIO.....	1048
-CARACTERIZACIÓN DE PANES OBTENIDOS CON MEZCLAS DE HARINA DE TRIGO Y SOJA.....	1056
-PELICULAS COMESTIBLES OBTENIDAS A PARTIR DE BIOPOLIMEROS DERIVADOS DE LAS SEMILLAS DE AMARANTO.....	1065
-FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES EMULSIONADAS A BASE DE PROTEÍNAS DE SOJA – CERA DE ABEJAS.....	1073
-DESARROLLO DE UN ALIMENTO NUTRITIVO EN VERSIÓN CROCANTE Y FLEXIBLE	1080
-CONSERVACIÓN DE LAMINADOS DESHIDRATADO Y SEMIDESHIDRATADOS DE MANZANA MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FACTORES COMBINADOS.	1088
- FORMACION DE GELES PECTICOS DE MANZANA (LAMINADOS) POR DESHIDRATAACION CON AIRE CALIENTE: PARAMETROS DE CARACTERIZACION.....	1096
-EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE PANES Y PASTAS ELABORADOS CON HARINAS DE TRIGO Y AMARANTO.....	1104
- ALIMENTOS PROBIOTICOS NOVEDOSOS UTILIZANDO CEPAS LÁCTICAS SELECCIONADAS.....	1113
-INFLUENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE UNA MEZCLA DE PLASTIFICANTES EN EL COMPORTAMIENTO MECÁNICO Y LA MICROESTRUCTURA DE PELÍCULAS EMULSIONADAS DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CERA DE CANDELILLA.....	1120

-ELABORACIÓN DE ANCHOAS DE SARDINA (*Sardinella aurita*) Y SU COMPORTAMIENTO DURANTE ALMACENAMIENTO REFRIGERADO..... 1128

ENVASES, EMBALAJE Y ROTULADO

-DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE PELICULAS DE QUITOSANO..... 1134

-PELICULAS BIODEGRADABLES COMPUESTAS DE ALMIDON Y QUITOSANO: DESARROLLO Y CARACTERIZACION..... 1142

-PELICULAS ACTIVAS DE METILCELULOSA Y QUITOSANO: CAMBIOS EN LA MICROESTRUCTURA Y EN LAS PROPIEDADES MECANICAS Y DE BARRERA INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE UN CAMPO ELECTRICO..... 1150

HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

-BIODISTRIBUCIÓN DE FITOESTRÓGENOS EN POLLOS ALIMENTADOS CON SOJA..... 1157

-EDULCORANTES NO CALÓRICOS EN BEBIDAS ANALCOHÓLICAS: ROTULADO Y ESTIMACIÓN TEÓRICA DE LA INGESTA DIARIA POTENCIAL (IDP) EN NIÑOS Y ADOLESCENTES..... 1165

-DETERMINACION DE MICROORGANISMOS INDICADORES EN ALIMENTOS DEL COMEDOR UNIVERSITARIO DE SALTA 1175

-INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIOS Y BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA EN ALIMENTOS ELABORADOS EN EL SERVICIO GASTRONÓMICO CONCESIONADOS DE UN KIOSCO UNIVERSITARIO 1181

-EVALUACIÓN DE SEGURIDAD ALIMENTARIA EN COMEDORES COMUNITARIOS DE PARANA.... 1189

-ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS EN 210 DONANTES DE SANGRE EN LA CIUDAD DE MAR DEL PLATA..... 1197

-PUNTOS CRITICOS EN LOMITOS DE CABALLA (*Scomber japonicus*) DISEÑADOS POR FACTORES COMBINADOS..... 1204

COMBINACIÓN DE *Streptococcus thermophilus* Y *Lactococcus lactis* EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS EXPERIMENTALES OVINOS

MARGUET, Emilio R¹. y VALLEJO, Marisol¹

¹Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Roca 115, (9100) Trelew. Te/Fax. 02965-421782. rmarguet@tw.unp.edu.ar

RESUMEN

La evolución del extracto soluble en agua (ESA) y el extracto soluble en ácido tricloroacético (ESTCA) de quesos ovinos elaborados con un fermento experimental fue estudiada a través de 90 días de maduración y comparada con la de quesos elaborados con tres fermentos comerciales. El fermento experimental estaba compuesto por una cepa de *Lactococcus lactis*, seleccionada por su alta actividad de proteinasa y una cepa de *Streptococcus thermophilus*, seleccionada por sus altas actividades de proteinasa y Aminopeptidasa N. Al final del período de maduración no se encontraron diferencias significativas en los valores de ESA y ESTCA entre los quesos elaborados con el fermento experimental y los fermentos comerciales. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar este tipo de fermentos en la elaboración de quesos ovinos que pueden contribuir al desarrollo de diferentes características reológicas y sensoriales.

Palabras claves: quesos ovinos, proteólisis, fermento experimental

ABSTRACT

Evolution of water soluble extract (WSE) and trichloroacetic acid soluble extract (TCASE) of sheep cheeses made with an experimental starter was studied throughout 90 days of ripening and compared with that of cheeses manufactured with three commercial starters. Experimental starter was composed of a strain of *Lactococcus lactis*, selected by its high proteinase activity, and a strain of *Streptococcus thermophilus* TW12, selected by its high proteinase and Aminopeptidase N activities. At the end of ripening no significant differences in WSE and TCASE values were found between cheeses manufactured with experimental or commercial starters. These results suggest that is possible the manufacture of sheep cheese with this type of starter that may contribute to development of different rheological and sensorial characteristics.

Key words: sheep cheeses, proteolysis, experimental starter

INTRODUCCIÓN

La maduración de quesos es un complejo proceso por el cual la cuajada obtenida por coagulación enzimática de las caseínas se transforma en un producto de características particulares (11). Los principales eventos bioquímicos que se producen durante la maduración son la glucólisis, la lipólisis y la proteólisis; considerándose a esta el evento más importante por su relación en la formación de sabores y aromas específicos (12). La actividad enzimática es llevada a cabo por la acción combinada de los sistemas proteolíticos del coagulante, la leche, las bacterias ácido lácticas (BAL) del fermento y los microorganismos adventicios.

Las BAL, debido a su alta especificidad de hidrólisis proteica, son las que más influencia ejercen sobre las características finales del producto. Sobre la base de su función, podemos separar al sistema proteolítico de las BAL en 3 componentes estructurales: a) una proteinasa asociada a la pared, responsable de la degradación inicial de las caseínas, b) un sistema de transporte que importa al citoplasma los productos de la hidrólisis proteica a través de la membrana y c) un grupo de peptidasas intracelulares (5, 12).

Los protocolos de elaboración de quesos semiduros ovinos incluyen fermentos mesófilos cuya flora dominante esta conformada por una cepa de *Lactococcus lactis* y una cepa de *Lactococcus cremoris*. Estas BAL se seleccionan de acuerdo a características bioquímicas dentro de las cuales, su sistema proteolítico ha despertado un singular interés durante los últimos años. *Streptococcus thermophilus*, una BAL que se utiliza en fermentos termófilos en combinación con cepas de *Lactobacillus*, posee una proteinasa poco activa (6) pero un sistema proteolítico intracelular con gran capacidad catalítica y amplio espectro de especificidad (9), características que lo transforman en una especie pasible de ser utilizada en combinaciones experimentales de fermentos mesófilos (7). En el presente trabajo se exhiben los resultados de la evolución de la maduración de un queso ovino elaborado con una combinación de una cepa *Lc. Lactis* seleccionada por su alta actividad de proteinasa y una cepa de *St. thermophilus* seleccionada por su altas actividades de proteinasa y Aminopeptidasa N (PepN). Los resultados se comparan con los obtenidos en quesos elaborados con fermentos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen al cepario de bacterias lácticas de la Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew).

Ensayo de actividad de proteinasa. Las cepas del género *Lactococcus* y *Streptococcus thermophilus* fueron cultivadas durante 18 hs en caldo M17 a 30-32 °C y 35-37 °C

respectivamente. Luego del período de incubación, y con el objeto de inducir la expresión de las proteinasas, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en un medio de inducción (10).

La actividad enzimática de las células inducidas se realizó utilizando como sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa y expresada en unidades arbitrarias según la técnica y sugerencias de Exterkate y col. (5).

Ensayos de actividad de Aminopeptidasa N (PepN). Las cepas en estudio fueron cultivadas según lo descrito anteriormente. Luego del período de incubación las células fueron sometidas a un tratamiento con cuentas de vidrio y vortex, con el objeto de liberar su contenido citoplasmático. La actividad enzimática de los sobrenadantes se determinó utilizando leucina-*p*-nitroanilina como sustrato (3) y la concentración de proteínas según el método de Bradford (1). La unidad enzimática se definió como la cantidad de *p*-nitroanilina liberada por minuto por miligramo de proteína.

Elaboración de quesos. Los quesos se elaboraron siguiendo un protocolo definido para una variedad semidura denominado Gorai (11).

Los fermentos fueron inoculados al 2% y la combinación de las cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* seleccionadas se ensayó con relaciones poblacionales de 80:20, 90:10 y 95:5. Cuando los quesos se elaboraron con fermentos comerciales se inocularon al 2% de concentración y se siguieron las recomendaciones sugeridas por los fabricantes. Los fermentos comerciales utilizados fueron Mix A y Mix B (Wiesby, Alemania) y R 707 (CHr Hansen, Argentina)

Toma de muestras. Las muestras de quesos se tomaron a los 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días de maduración según las recomendaciones establecidas en Standard Methods for the Examination of Dairy Products (8) conservando las mismas hasta su procesamiento a -20 °C.

Determinación de las fracciones proteicas. El extracto soluble en agua (ESA) y el extracto soluble en ácido tricloroacético al 12% (ESTCA) se obtuvieron de acuerdo a las sugerencias de Bütikofer y col. (2). La concentración de los sobrenadantes se determinó mediante la técnica del *o*-ftaldialdehído (4) y los resultados fueron expresados en miligramo de leucina/ gramo de queso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se pueden observar las actividades de proteinasa y PepN de las cepas estudiadas. *Lc. Lactis* TW7 presentó las máximas actividades de ambas enzimas, características por las cuales fue seleccionada para conformar el fermento experimental

(FE). En el caso de las cepas de *Streptococcus*, TW12 no exhibió la máxima actividad de PepN, pero esta resultó comparable con la obtenida en la cepa TW14. En cambio la actividad de su proteinasa resultó mucho más alta que la exhibida por TW14, razón por la cual fue escogida para la elaboración de los quesos experimentales en combinación con la cepa *Lc. lactis* TW7.

Tabla 1: actividad enzimática de proteinasa y aminopeptidasa N de las cepas de bacterias ácido lácticas estudiadas. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias y unidades enzimáticas respectivamente.

Cepa	Proteinasa (UA)	Aminopeptidasa N (UE)
<i>Lc. lactis</i> TW3	91.42	0.077
<i>Lc. lactis</i> TW7	288.50	0.642
<i>Lc. lactis</i> TW9	112.20	0.17
<i>St. thermophilus</i> TW1	413.00	0.676
<i>St. thermophilus</i> TW12	301.75	3.527
<i>St. thermophilus</i> TW14	70.10	4.048

Los tres fermentos comerciales utilizados en la elaboración de los quesos ovinos fueron del tipo mesófilo-homofermentativo y conformados por una cepa de *Lc. lactis* y un cepa de *Lc. cremoris*.

En el género *Lactococcus*, una vez iniciado el período de maduración en cámara comienza a manifestarse el proceso de autoproteólisis. Este fenómeno, no obstante afectar la estabilidad de las proteinasas, provoca en forma paulatina la liberación de las mismas de la pared celular, permitiendo la difusión de las moléculas en toda la masa y un libre acceso a los sustratos (5). En este género, la autoproteólisis de la proteinasa se produce en un dominio específico de la molécula (5), ausente en la especie *St. thermophilus* (6), característica estructural que impide la liberación de la enzima de su pared celular e imposibilita un fácil acceso a sustratos susceptibles a la degradación. En consecuencia la influencia que ejerce la proteinasa de *St. thermophilus* en la contribución al ESA es mucho menor que la alcanzada por las cepas de *Lc. lactis*. Como observación, podemos acotar que el mayor contribuyente al ESA lo constituye el sistema enzimático del coagulante.

El ESTCA está conformado por péptidos de 2 a 20 residuos y aminoácidos, siendo el sistema proteolítico bacteriano su principal contribuyente (13). Los oligopéptidos y aminoácidos no participan directamente en el desarrollo de aromas y sabores particulares,

pero actúan como sustratos de reacciones enzimáticas que originan compuestos sápidos (11, 12), razón por la cual el ESTCA es considerado un parámetro indicativo de la evolución de la maduración de quesos (2).

El queso llega a la cámara de maduración con el máximo de población de BAL; luego comienza a través del tiempo a declinar la viabilidad celular. La liberación del contenido citoplasmático trae como consecuencia la continuación en la masa del queso del trabajo enzimático de las peptidasas que pueden actuar, de esta manera, en forma libre sobre los sustratos originados por la acción de los distintos sistemas proteolíticos.

En el caso del FE se seleccionó la cepa de con el objeto de lograr que la actividad de su proteinasa produjera una alta concentración del ESA, y que este actuara como sustrato específico de las peptidasas intracelulares, especialmente PepN de *St. thermophilus* TW12. La importancia de esta enzima en la formación de compuestos relacionados con sabores y aromas reside en su amplio espectro de especificidad que le permite hidrolizar una gran variedad de péptidos originados por la degradación de la caseína (3).

Uno de los inconvenientes que se presentan al utilizar una cepa de *Lc. lactis* y una de *St. thermophilus* es que esta presenta menos auxotrofias y una gran capacidad acidificante en leche, lo que le permite desarrollarse a una velocidad mayor (7, 9). Por esta razón se ensayaron 3 combinaciones con distintas relaciones poblacionales, con el objeto de seleccionar aquellas que mantuvieran durante la experiencia, concentraciones celulares comparables de ambas cepas. Luego de una semana de permanencia en cámara, se seleccionó para estudiar la evolución de la maduración al queso elaborado con una relación 95:5 debido a que los recuentos en placa evidenciaron poblaciones comparables de *Lc. Lactis* y *St. thermophilus*.

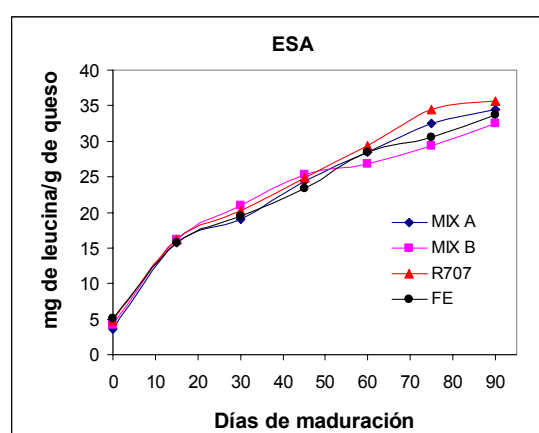


Figura 1: Evolución del extracto soluble en agua de quesos ovinos elaborados con el fermento experimental y con fermentos comerciales.

En la Figura 1 podemos observar la evolución del ESA de los quesos ovinos elaborados con los fermentos comerciales y el FE. La concentración alcanzada a los 90 días por el queso elaborado con el FE (33,7 mg de leucina/g de queso) fue inferior a la lograda por los fermentos Mix A y R 707 y superior a Mix B.

En la Figura 2 podemos observar que la concentración del ESTCA a los 90 días de maduración del queso experimental (23,2 mg de leucina/g de queso) resulta superior a la lograda por los fermentos Mix B y R 707 e inferior a Mix A. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, podemos considerar que no existen diferencias significativas en la evolución de la maduración del queso elaborado con el FE cuando lo comparamos con los fermentos comerciales.

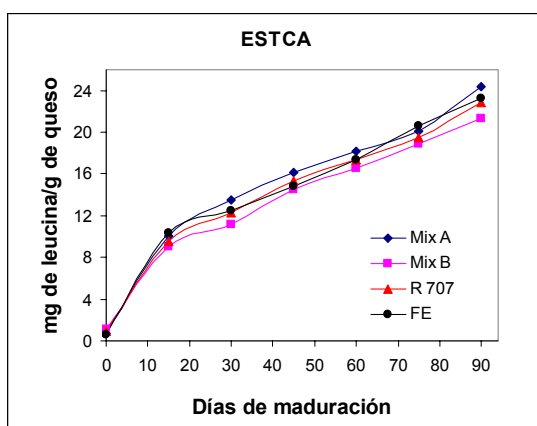


Figura 2: Evolución del extracto soluble en ácido tricloroacético de quesos ovinos elaborados con el fermento experimental y con fermentos comerciales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de utilizar, en la elaboración de quesos ovinos, fermentos compuestos por una cepa mesófila y una termófila. La complementación del sistema proteolítico de ambas especies puede contribuir a la formación de sabores y aromas específicos, evitar la formación de compuestos amargos o acelerar la maduración. Estudios posteriores deberán destinarse a lograr el máximo equilibrio poblacional con el objeto de alcanzar las mejores características reológicas y sensoriales.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado en el ámbito del Proyecto BID 1201/OC-AR PICTR2002 n° 00063, financiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Bütikofer U., M. Rüegg y Y. Ardö.** 1993. Determination of nitrogen fraction cheese: Evaluation of a collaborative study. *Leb-Wiss und Tech.* **26**:271-275.
- Chavagnat F., M. G. Casey y J. Meyer.** 1999. Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of Aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3001-3007.
- Church F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Castinagni.** 1983. Spectrophotometric assay using o-phaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sc.* **66**:1219-1227.
- Exterkate, F. A. y A. C. Alting.** 1999. Role of calcium in activity and stability of the *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1390–1396.
- Fernandez-Espla M., P. Garault, V. Monnet y F. Rul.** 2000. *Streptococcus thermophilus* cell-wall anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4772–4778
- Gomez, M. J., P. Gaya, M. Nunez y M. Medina.** 1998. *Streptococcus thermophilus* as adjunct culture for a semi-hard cows' milk cheese. *Lait* **78**:501–511.
- Grace V., G. A.Houghtby, H. Rudnick, K. Whaley y J. Lindamoon.** 1992. Sampling dairy and related products en Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16 th edition; Robert Marshall ed. American Public Health Association. Washington D.C., P. 59-83.
- Letort C, M. Nardi, P. Garault, V. Monnet y V. Juillard.** 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3162–3165.
- Marguet E. R.** 2004. Tesis Doctoral.
- Marguet E. R. y M. Vallejo.** 2001. Evolución química y bioquímica durante la maduración del queso ovino tipo Gorai. *Revista de Ciencia y Tecnología.* **4**:22-29.
- McSweeney P. y J. Sousa.** 2000. Biochemical pathway for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Lait* **80**:293-324
- Sousa M. y F. Malcata.** 1997. Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Z. Lebersm Unters Forsch.* **205**: 97-103

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *ENTEROCOCCUS*

VALLEJO, Marisol¹, MARGUET, Emilio R.¹ y SEQUEIROS, Cynthia²

1. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Roca 115, (9100) Trelew. Te / fax. 02965-421782. biomol@tw.unp.edu.ar. 2. Centro Nacional Patagónico, CONICET, Pto. Madryn

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron las características físico-químicas y bioquímicas de moléculas con actividad antilisteria, producidas por dos cepas de *Enterococcus* aisladas de leche y queso ovinos. La actividad antimicrobiana del sobrenadante de la cepa de *E. faecalis* ETW25 no fue afectada luego del tratamiento con proteasas, en cambio su actividad fue completamente suprimida por la catalasa; en consecuencia se consideró que el H₂O₂ constituía el principal principio activo. No se detectó actividad antimicrobia de la cepa *E. faecium* ETW4 luego del tratamiento con proteasas, confirmando de esta manera su naturaleza peptídica. El peso molecular del péptido producido por la cepa ETW4 fue de 5.6 KDa, estable a tratamientos térmicos (100°C durante 30 min y 121°C durante 5 min.) y en un rango de pH entre 3 y 11. En leche ovina ETW4 desarrolló una actividad antimicrobiana menor que en caldo MRS, mientras que ETW25 no presentó actividad inhibitoria.

Palabras claves: *Enterococcus*, actividad antilisteria

ABSTRACT

The biochemical and physicochemical characteristics of antilisterial agents produced by two *Enterococcus* strains isolated from sheep milk and cheese were studied. The antimicrobial activity of the culture supernatant of *E. faecalis* ETW25 was not inhibited by proteases but was completely abolished by catalase, therefore H₂O₂ was considered the main responsible of antilisterial effect. In the case of *E. faecium* ETW4 the sensitivity to proteases demonstrated that the antimicrobial agent had proteinaseus nature. The bacteriocin produced by ETW4 had a molecular mass of 5.6 KDa, was resistant to heat treatments (100 °C for 30 min, 121 °C for 5 min) and remained active between pH 3 and 11. In sheep milk, ETW4 produced lower levels of bacteriocin than in MRS broth, whereas ETW25 did not display antimicrobial activity.

Key words: *Enterococcus*, antilisterial activity

INTRODUCCIÓN

Los efectos antimicrobianos de las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron apreciados por el hombre hace más de 10.000 años y le proporcionaron una manera sencilla y económica de prolongar la vida útil de los alimentos a través de los procesos de fermentación. El mayor metabolito producido por las BAL es el ácido láctico, el cual es el responsable del cambio del pH en el medio, ejerciendo una actividad antagónica suficiente como para inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Las BAL producen y secretan otros metabolitos que también tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de otras bacterias, dentro de los cuales podemos citar el ácido acético, el ácido propiónico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estas últimas constituyen un grupo heterogéneo de moléculas proteicas o polipéptidos, de síntesis ribosomal, capaces de inhibir el desarrollo de bacterias taxonómicamente próximas a la célula productora (Jack, 1995).

En los últimos años ha cobrado importancia el estudio de las bacteriocinas producidas por las BAL debido a sus posibles aplicaciones industriales como biopreservantes de alimentos, evitando la inclusión de conservantes químicos.

Los *Enterococcus* son BAL que se aíslan frecuentemente de vegetales fermentados y de la mayoría de los quesos, no solo de fabricación artesanal sino también de los elaborados con leche pasteurizada (Caro, 2000; Centeno, 1996). Su presente uso en la elaboración de alimentos es hoy en día fuertemente debatido desde el punto de vista clínico debido a que *E. faecium* y *E. faecalis* han sido asociados e identificados como agentes patógenos de enfermedades humanas y animales (Chenoweth, 1990).

Sin embargo, la utilización de dichas cepas en la industria alimentaria no constituye ningún riesgo particular a la salud, ya que de hecho no existen registros de infecciones que estén relacionadas con este origen (Giraffa, 1997).

La producción de bacteriocinas y ciertas características metabólicas de muchas cepas de *Enterococcus* han comenzado a estudiarse con más profundidad debido a su potencial uso como probióticos y/o componentes del cultivo iniciador en la elaboración de quesos. En el presente trabajo se estudiaron las características físicas, químicas y biológicas de los principios activos producidos por las cepas *E. faecium* TW4 y *E. faecalis* TW25, aisladas de leche y queso ovinos provenientes del Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) y seleccionadas por su alta actividad contra *Listeria monocytogenes*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento. Las muestras de leche y queso ovinos fueron sembradas en caldo púrpura de bromocresol-azida con una concentración de NaCl de 6,5%. Luego de 48 hs de

incubación a 35 °C los cultivos se repicaron a agar MRS suplementado con NaCl (6,5 %), ácido nalidíxico (40 µg/ml) y cicloheximide (10 µg/ml).

Identificación. Las colonias sospechosas fueron sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas: coloración de Gram, prueba de la catalasa, crecimiento a 45 °C, en NaCl al 6,5%, en bilis al 40%, hidrólisis de la esculina y actividad de pirrolidonil aminopeptidasa (PYR). Las colonias pertenecientes al género *Enterococcus* se identificaron a nivel de especie según el esquema de Manero y Col. (Manero, 1999).

Ensayos antimicrobianos. Las cepas de *Enterococcus* se cultivaron en caldo MRS a 35 °C hasta alcanzar la fase logarítmica. Luego del período de incubación los medios fueron centrifugados a 3000 r.p.m. durante 15 min., ajustados a pH 7 con NaOH 0,5 M y sometidos a un calentamiento de 100 °C durante 5 min. El ensayo antimicrobiano se realizó contra *Listeria monocytogenes* y/o *L. innocua* por el método de difusión en placa según lo descrito por Floriano y col (Floriano, 1998). El efecto antimicrobiano fue expresado en mm, midiendo el halo de inhibición de crecimiento. La actividad antimicrobiana se expresó como mm²/ml de sobrenadante (Cintas, 1997).

Determinación de características fisicoquímicas. Sensibilidad a la catalasa. La prueba se realizó adicionando un volumen igual de solución de catalasa (2 mg/ml en buffer fosfato, pH 7.2) a los sobrenadantes de las cepas de *E. faecium* ETW4 y *E. faecalis* ETW25. Se incubaron a 37°C durante una hora y a continuación se determinó la actividad residual mediante la técnica de los pocillos.

Estabilidad térmica. Los sobrenadantes alcalinizados de las cepas ETW4 y ETW25 fueron sometidas a temperaturas de 100 °C y 121°C durante 5, 15 y 30 min. La actividad residual se determinó mediante el método de difusión en placa.

Influencia del pH. Se determinó la estabilidad de la actividad de los sobrenadantes de las cepas ETW 4 y ETW25 desde pH 3 hasta pH 12, mediante la adición de soluciones buffer esterilizadas preparadas a una concentración 0.2 M. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 35°C y la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito.

Sensibilidad a proteasas y sensibilidad a enzimas degradativas. La sensibilidad a enzimas proteolíticas se llevo a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los sobrenadantes con pepsina, tripsina, bromelina y pronasa (1mg/ml), en las condiciones óptimas de temperatura y pH de cada enzima.

La sensibilidad a la lisozima y lipasa (enzimas degradativas) se realizó en las condiciones descritas para enzimas proteolíticas.

Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad inhibitoria. Se incubaron en caldo MRS las cepas ETW4 y ETW25 a 30, 35 y 45 °C durante 48 - 72 hs, determinándose la actividad inhibitoria y crecimiento poblacional mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro a distintos intervalos de tiempo.

Velocidad de acidificación y actividad inhibitoria en leche ovina. Las cepas de ETW4 y ETW25 fueron sembradas en leche ovina estéril al 4% e incubadas a 35 °C durante 24 horas tomándose muestras a distintos intervalos de tiempo y determinándose el pH de cada una de ellas. La actividad inhibitoria fue determinada en los sobrenadantes obtenidos por centrifugación luego de acidificar hasta pH 4,6 para precipitar las proteínas. Los sobrenadantes recibieron los tratamientos térmicos y de alcalinización ya descritos.

Prepurificación. Precipitación y cromatografía de intercambio iónico. Se empleó el sobrenadante de la cepa ETW4, sometiéndolo a precipitación diferencial con alcohol absoluto en dos etapas (50% y 80%). Luego de la precipitación se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico en QAE-Celulosa según el esquema propuesto por K. F. NG-Kwai-Hang y col. (NG-Kwai-Hang, 1989). Las lecturas de absorbancia de los eluidos fueron determinadas a 280 nm y su actividad se determinó mediante el método de difusión en placa. El peso molecular de la fracción activa se determinó mediante una electroforesis desnaturizante (Tricina SDS-PAGE) descrita por Pardo y Natalucci (Pardo, 2002) y el zimograma o "revelado" de acuerdo a la técnica sugerida por Foulquié Moreno y col (Foulquié, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e Identificación. En total, se aislaron 27 cepas pertenecientes al género *Enterococcus* (18 de leche y 9 de queso), las cuales presentaron los rasgos fenotípicos que son utilizados para distinguir dicho género de otros cocos Gram +, catalasa negativos y anaerobios facultativos. La identificación a nivel de especie se realizó por medio de los patrones de fermentación de azúcares, por los cuales 22 cepas fueron clasificadas como *E. faecium* y 5 como *E. faecalis*.

Ensayos Antimicrobianos. Todas las cepas de *E. faecium* y una cepa de *E. faecalis* presentaron actividad contra *L. innocua* y *L. monocytogenes* ATCC 7644 (halo de inhibición \geq 9 mm); una cepa de *E. faecalis* presentó actividad sólo contra *L. innocua*.

Determinación de características fisicoquímicas. El tratamiento con catalasa realizado sobre la cepa de *E. faecium* ETW4 no afectó su actividad inhibitoria, mientras que no se

detectó halo de actividad cuando se realizó la experiencia con la cepa de *E. faecalis* ETW 25, confirmando que el peróxido de hidrógeno constituye en este caso el principio activo.

La actividad inhibitoria de la cepa ETW4 se mantuvo estable en el rango de temperaturas ensayadas, excepto cuando se la sometió a 121 °C durante 15 minutos o más; mientras que la cepa ETW25 sólo resultó estable a 100 °C durante 5 minutos, perdiendo en forma total su capacidad inhibitoria cuando se la sometió al resto de los tratamientos térmicos.

La actividad inhibitoria de los sobrenadantes de ambas cepas resultó estable en un rango de pH de 3 hasta 11, no se detectaron halos de inhibición en la prueba de difusión en placa cuando los sobrenadantes fueron tratados a pH 12 durante 24 horas.

No se detectó acción antibiótica de los sobrenadantes de la cepa ETW4 luego del tratamiento enzimático con bromelina y tripsina, confirmando de esta manera la estructura peptídica de las moléculas involucradas. Sin embargo el tratamiento con pepsina sólo produjo una reducción de la actividad y ningún efecto cuando el ensayo se realizó con pronasa. Ninguno de los tratamientos enzimáticos llevado a cabo con las 4 proteinasas afectó la actividad antibiótica de los sobrenadantes de la cepa ETW25, datos que permiten especular con la ausencia de un principio activo de estructura peptídica. Ninguna de las cepas se vio afectada por el tratamiento con lipasa o lisozima, desestimando la influencia de lípidos o polisacáridos en la actividad antilisteria.

Los sobrenadantes exhibieron la máxima actividad inhibitoria en la fase exponencial tardía del crecimiento cuando los cultivos se realizaron a 30°C y 35°C, alcanzando valores de 5780 mm²/ml para EWTW4 y 2880 mm²/ml para ETW25 (Figura 1). Las cepas no presentaron actividad inhibitoria cuando la experiencia se realizó a 45°C.

Velocidad de acidificación y actividad inhibitoria en leche ovina. Luego de 24 hs de incubación en leche ovina ETW4 y ETW25 alcanzaron valores de pH de 5.66 y 5,51 respectivamente. La máxima actividad inhibitoria de ETW4 fue 2880 mm²/ml, mientras que ETW25 no desarrolló actividad (Figura 2).

Purificación parcial. Luego de la precipitación diferencial del sobrenadante de ETW4, se ensayó la actividad inhibitoria de las diferentes fracciones recogidas en la cromatografía de intercambio iónico mediante la técnica de difusión en placa, detectándose actividad en una sola fracción durante la elusión a 0.1 M de NaCl. En las condiciones de la cromatografía (pH 8), la bacteriocina exhibe carga positiva y en consecuencia no interactúa con la matriz de QAE-Celulosa utilizada. La fracción activa presentó una sola banda de 5.6 KDa cuando la misma fue sometida a electroforesis en poliacrilamida (Foulquié, 2003).

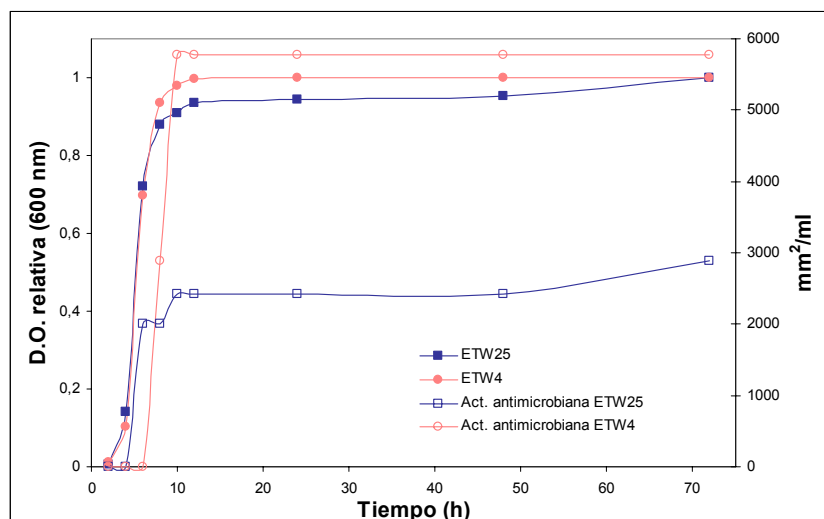


Figura 1. Curvas de crecimiento y actividad antimicrobiana de *E. faecium* ETW4 y *E. faecalis* ETW25 en caldo MRS a 35°C.

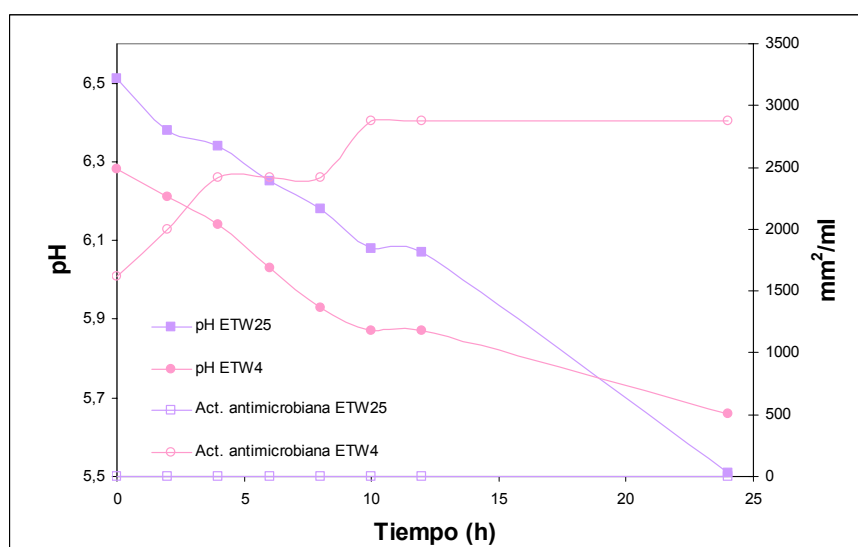


Figura 2. Curvas de acidificación y actividad antimicrobiana de *E. faecium* ETW4 y *E. faecalis* ETW25 en leche ovina a 35°C.

CONCLUSIONES

Se aislaron de leche y quesos ovinos 27 cepas de *Enterococcus* con actividad antilisteria, de las cuales se seleccionó una cepa de *E. faecium* (ETW4) y una cepa de *E. faecalis* (ETW25) para su posterior estudio. En el caso de ETW25 se determinó que el peróxido de hidrógeno constituía el principio activo, mientras que en el caso de ETW4 la actividad antimicrobiana resultó ser un compuesto de naturaleza proteica. El peso molecular del péptido fue 5.6 KDa, estable a temperaturas de 100°C (30 min.) y 121°C (5 min.) y en un rango de pH entre 3 y 11. La alta actividad exhibida por ETW4 comparada con previos

trabajos y la capacidad de producir el principio activo durante su desarrollo en leche ovina hacen factible la utilización de esta cepa en la conformación de fermentos destinados a la elaboración de subproductos lácteos con el propósito de inhibir a *L. monocytogenes*.

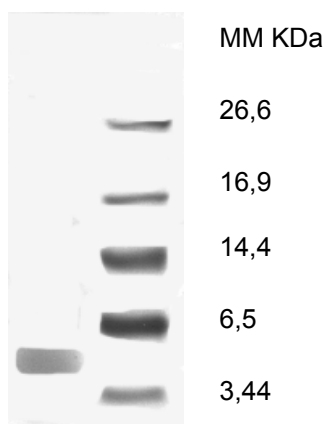


Figura 3. Gel de tricina-SDS-PAGE de la fracción purificada en la cromatografía de intercambio iónico.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado en el ámbito del Proyecto BID 1201/OC-AR PICTR 00063, financiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

Caro, J., A. Alonso-Lamazares, C. Alonso-Callejas, J. Mateo y M. R. García Armesto.

2000. Caracterización taxonómica y tecnológica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso tipo Castellano. XII Congreso de Microbiología de los Alimentos, realizado en España del 18 al 20 de Septiembre de 2000.

Centeno, J. A., S. Menéndez, and J. L. Rodríguez-Otero. 1996. Main microbial flora present as natural starter in Cebreiro raw cow' milk cheese (Northwest Spain). International Journal of Food Microbiology. **33**:307-313.

Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernández and I. F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of Enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Applied and Environmental Microbiology. **63**:4321-4330.

Chenoweth, C., and D. Schaberg. 1990. The epidemiology of enterococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9**:80-89.

- Floriano B., J. L. Ruiz Barba and R Jiménez Díaz.** 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *A. and Environment Microbiology*. **64**:4883-4890.
- Foulquié Moreno M. R., R. Callewaert, B. Devreese, J. Van Beeumen and L. de Vuyst.** 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. of Applied Microbiology*. **94**:214-229.
- Giraffa, G., D. Carminatti and E. Neviani.** 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*. **60**:732-738.
- Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. **59**:171-200.
- Manero, A. and A. R. Blanch.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:4425-4430.
- NG-Kwai-Hang K. F. and J. P. Pélissier.** 1989. Rapad Separation of Bovine Caseins by Mass Ion Exchange Chromatography. *Journal of Dairy Research*. **56**: 391-397.
- Pardo M. F. and Natalucci C. L.** 2002. Electrophoretic Analysis (Tricine SDS-PAGE) of Bovine Caseins. *Acta Farm. Bonaerense* **21** (1): 57-60.

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE SOBRENADANTES CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA OBTENIDOS DE CULTIVOS DE CEPAS DE ENTEROCOCOS AISLADAS EN LA REGIÓN PATAGÓNICA.

CARRASCO Marta S., SIMONETTA Arturo C.

Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. Ing. en Alimentos, Fac. de Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral. Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe. Tel/Fax:0342-4571164 (Int. 2541)/4571162 e-mail:carrasco@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

Se evaluó y caracterizó en forma preliminar la actividad antibacteriana de 8 cepas de *Enterococcus* aisladas de leche de oveja y quesos producidos en la región patagónica. Se estudió la actividad antagonística de sus sobrenadantes frente a 4 cepas sensibles. Mediante ensayos enzimáticos y fisicoquímicos se logró su caracterización preliminar. Todas las cepas mostraron capacidad inhibitoria frente a *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. La caracterización fisicoquímica demostró que todos los sobrenadantes son resistentes a elevadas temperaturas. El pH óptimo de actividad estuvo comprendido entre 5,0 y 6,5. Los ensayos enzimáticos y con etanol demostraron la naturaleza proteica de los componentes activos de los sobrenadantes, aunque no es posible descartar la presencia de otras moléculas no proteicas, con alguna participación en el proceso inhibitorio.

Se concluye que todas las cepas de enterococos estudiadas producen sustancias inhibitorias de naturaleza proteica y termorresistentes. Estas características permiten inferir "a priori" que las cepas ensayadas son productoras de bacteriocinas.

Palabras Claves: enterococos / actividad antibacteriana / caracterización

ABSTRACT

It was evaluated and characterized the antibacterial activity of 8 strains of *Enterococcus* isolated from sheep milk and cheeses produced in the Patagonia region. The antagonistic activity of its cell free supernatants against 4 sensitive strains was studied. Their preliminary characterization was achieved by means of enzymatic and physico-chemicals assays. All the strains showed inhibitory capacity against *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. The physico-chemical characterization demonstrated that all the supernatants are resistant to high temperatures. The best pH of activity was understood between 5,0 and 6,5. The enzymatic assays and the experience with ethanol demonstrated the presence of proteins between the active components of the

supernatants, although it is not possible to discard the presence of other non proteic molecules, with some participation in the inhibitory process.

It is possible to conclude that all the studied enterococci strains produce antibacterial substances of proteic nature and resistant to high temperatures. These characteristics allow to inferring “a priori” that the strains are bacteriocins producers.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas han sido tradicionalmente usadas para optimizar el aroma y la textura y para prevenir contaminaciones microbianas indeseables, tanto en productos lácteos y cárnicos como en vegetales fermentados y en ensilados. La disminución del pH y la remoción de importantes cantidades de carbohidratos por fermentación, constituyen las acciones preservadoras primarias desarrolladas por estas bacterias en los alimentos fermentados antes mencionados. La actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas ha sido atribuida a los productos finales de su metabolismo fermentativo, así como también a la producción de bacteriocinas (Piard and Desmazeaud, 1992).

Los compuestos antimicrobianos producidos por estas bacterias juegan un papel fundamental en el aseguramiento de la calidad y en la extensión de la vida útil de los alimentos fermentados obtenidos a partir de su acción metabólica (De Vuyst and Vandamme, 1994; Piard and Desmazeaud, 1992).

Por otra parte, el incremento en la demanda de alimentos “naturales” y “libres de aditivos químicos” por parte de los consumidores de todo el mundo, ha hecho que se dedique especial interés a la aplicación de “inhibidores naturales” en la preservación de alimentos, los cuales podrían reemplazar o reducir el uso de aditivos químicos.

Las bacteriocinas son moléculas de proteínas o polipéptidos con actividad antimicrobiana, generalmente más activas frente a microorganismos pertenecientes a especies taxonómicamente próximas a la de la bacteria productora. Estudios más recientes han demostrado que algunas poseen un amplio espectro de actividad contra géneros bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos, incluyendo en el mismo a géneros y especies alteradoras o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (De Vuyst and Vandamme, 1994; Jack et al., 1995; Klaenhammer, 1988; Malik et al., 1994). Esto, unido al hecho de que las mencionadas sustancias generalmente son inocuas para el consumidor, y teniendo en cuenta también que las bacterias del ácido láctico son consideradas por la Organización Mundial de la Salud como GRAS, hace que las mismas presenten un gran interés para su utilización como “biopreservadores naturales” en la industria alimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: Se estudiaron 8 cepas de *Enterococcus faecalis* y *faecium*, identificadas con la sigla ETWSV y los números 3, 12, 16, 17, 18, 21, 27 y 29, integrantes de la colección de la Fac. de Cs. Naturales (Sede Trelew) de la Univ. Nac. de la Patagonia y aisladas de leche de oveja y de quesos elaborados a partir de esta materia prima en la región patagónica.

Como bacterias sensibles para ensayar la capacidad antagonística, se emplearon: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, provenientes de colecciones internacionales y de la colección propia.

Conservación de las cepas: Todas las cepas bacterianas detalladas fueron conservadas por liofilización. También se las conservó por congelamiento a -20 °C en caldos de cultivo apropiados para cada especie, con el agregado de un 15% de glicerol.

Obtención de los sobrenadantes libres de células: Las cepas de enterococos se activaron mediante tres siembras sucesivas en Caldo M17 (Merck), que se incubaron a 37°C durante 24 h. El cultivo final se obtuvo sembrando 5 mL del último precultivo en 100 mL del mismo medio, incubándolos 24h a 37°C. Las concentraciones de las poblaciones celulares logradas en estos cultivos estuvieron comprendidas entre $1,1 \cdot 10^9$ y $1,8 \cdot 10^9$ ufc/mL. El sobrenadante libre de células se obtuvo por centrifugación a 7000 r.p.m durante 15 minutos, con temperatura regulada a 5°C. Luego se lo concentró 10 veces por evaporación a 70°C y se lo esterilizó por filtración (membranas de 0.45 µm, Sartorius) (Tagg and Mc Given, 1971; Yang et al., 1992).

Determinación de la actividad antagonística: Se utilizó el método de difusión en agar, para lo cual 80 µL de cada uno de los sobrenadantes concentrados se colocaron en orificios de 7 mm de diámetro practicados en placas de Agar Nutritivo ya inoculadas con el microorganismo cuya sensibilidad se pretende determinar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, y posteriormente se midieron los diámetros de los halos claros o translúcidos. En cada placa se utilizó como control Caldo M17 cuyo pH se ajustó – por adición de ácido láctico – a un valor igual al del pH de los extractos en estudio (Tagg and Mc Given, 1971).

Caracterización de los sobrenadantes libres de células (Daba et al., 1994; Tagg and Mc Given, 1971; Thompson et al., 1996; Yang et al., 1992):

Caracterización enzimática: A cada sobrenadante se le adicionaron soluciones de diferentes enzimas (papaína, catalasa, tripsina, lisozima y pepsina.-Sigma-) en una

concentración final de 0,5 mg/mL de medio de reacción, incubando durante 4 horas a 37 °C. Luego se evaluó la persistencia de la capacidad inhibitoria.

Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos:

1) Tratamientos térmicos: Los sobrenadantes se calentaron a 100 °C durante 30 minutos y a 121 °C durante 15 minutos, ensayándose luego la actividad inhibitoria remanente.

2) Sensibilidad frente al pH: Se trabajó a distintos valores de pH comprendidos entre 5,0 y 8,0. Se usó como testigo el medio de cultivo (Caldo M17) concentrado y llevado al mismo valor de pH. Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria.

3) Sensibilidad frente a un solvente orgánico: Se usó etanol al 10%, adicionando 0,5 mL a igual volumen de cada sobrenadante; se dejó actuar durante 2 horas a 37 °C y luego se ensayó la actividad inhibitoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La gran mayoría de las cepas de enterococos no mostraron actividad inhibitoria frente a la cepa de *S. aureus*, con excepción de los sobrenadantes de las cepas E17 y E29, que formaron pequeños halos a un valor de pH de 5,0 (Figura 1).

Todas las cepas ensayadas presentaron antagonismo frente a *Pseudomonas* sp., *B. cereus* y *B. subtilis* (Figura 1). Las cepas E3, E12 y E16 mostraron halos de inhibición en todo el rango de valores de pH ensayado (5,0 a 8,0) frente a *Pseudomonas* sp., aunque los halos mayores se detectaron a pH 5,0 y 5,5; en cambio, frente a *B. cereus* y *B. subtilis*, sólo mostraron actividad en estos últimos valores de pH. El resto de los enterococos (E17, E18, E21, E27 y E29), resultaron activos entre pH 5,0 y 6,5 frente a *Pseudomonas* sp., y entre pH 5,0 y 6,0 frente a *B. cereus* y *B. subtilis*.

Los sobrenadantes de todas las cepas estudiadas mostraron termorresistencia. Todos mantuvieron su actividad frente a las tres cepas sensibles luego de un tratamiento a 100°C durante 30 minutos, aunque en general los halos resultaron algo menores. Cuando se los sometió a un tratamiento a 121°C durante 15 minutos, la actividad antagonística no desapareció totalmente en la mayoría de los casos, pero se vio sensiblemente afectada, especialmente frente a *B. cereus* y *B. subtilis*.

En los ensayos enzimáticos (Tabla 1) se observaron las siguientes respuestas:

El tratamiento con tripsina provocó la desaparición total de la actividad inhibitoria de todos los sobrenadantes frente a las bacterias sensibles ensayadas.; los tratamientos con pepsina y papaína eliminaron totalmente la actividad inhibitoria de todos los sobrenadantes frente a *B. cereus* y *B. subtilis*, y parcialmente (sensible disminución del

tamaño del halo) frente a *Pseudomonas* sp. Para algunos sobrenadantes (E16, E17 y E27), el tratamiento con papaína también provocó la desaparición total de los halos frente a *Pseudomonas* sp.; el tratamiento con catalasa no modificó en ningún caso la actividad de los sobrenadantes estudiados ; El tratamiento con lisozima produjo sólo disminuciones parciales en el tamaño de los halos de todos los sobrenadantes, variables frente a cada una de las cepas sensibles.

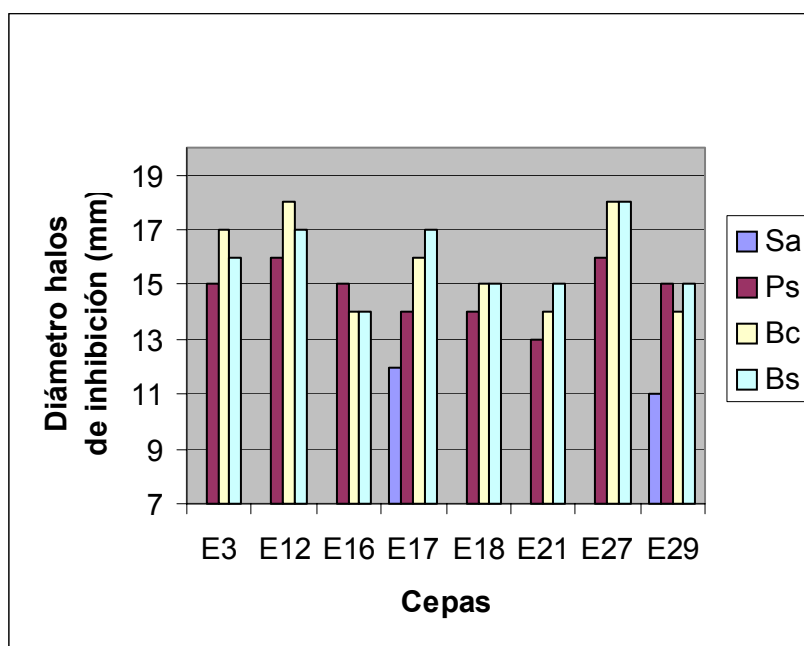


Figura 1: Actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cepas de enterococos a pH 5

Los ensayos de sensibilidad frente a etanol mostraron desaparición total o una importante disminución de la actividad antagonística de los sobrenadantes de todas las cepas de enterococos.

Los resultados obtenidos son coincidentes con los de otros investigadores y con los logrados por este mismo Grupo de Trabajo para otras cepas de enterococos aisladas de la región santafesina (De Vuyst and Vandamme, 1994; Jack et al., 1995; Klaenhammer, 1988; Malik et al, 1994; Piard and Desmazeaud, 1992).

Todas las cepas estudiadas mostraron poseer una buena capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram (+) (excepto frente a la cepa de *S. aureus*) y Gram (-).

La caracterización fisicoquímica demostró que todos los sobrenadantes son termorresistentes, y sólo se vieron afectados de modo importante en su actividad cuando se los sometió a 121°C durante 15 minutos. En general, el pH óptimo de actividad se

registró en el rango de valores comprendido entre 5,0 y 6,5 , aunque para algunos ese rango fue menor (5,0 – 5,5) y para otros resultó más amplio (5,0 – 8,0).

Tabla N°1: Actividad antibacteriana de los sobrenadantes luego de diversos tratamientos enzimáticos (diámetros en mm de los halos de inhibición)

Cepas	Tratamientos	Cepas sensibles			
		S.a.	P.sp	B.c.	B.s.
E3	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	10	--	--
	Papaína	--	11	--	--
	Lisozima	--	11	9	--
E12	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	10	--	--
	Papaína	--	10	--	--
	Lisozima	--	10	15	11
E16	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	9	--	--
	Papaína	--	--	--	--
	Lisozima	--	10	11	--
E17	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	9	--	--
	Papaína	--	--	--	--
	Lisozima	--	10	10	--
E18	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	8	--	--
	Papaína	--	8	--	--
	Lisozima	--	--	--	--
E21	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	11	--	--
	Papaína	--	10	--	--
	Lisozima	--	10	10	--
E27	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	10	--	--
	Papaína	--	--	--	--
	Lisozima	--	11	--	--
E29	Tripsina	--	--	--	--
	Pepsina	--	10	--	--
	Papaína	--	11	--	--
	Lisozima	--	11	11	--

(--) No se observó inhibición

Blancos de enzimas: Negativos

S.a.: *Staphylococcus aureus* - **P.sp.:** *Pseudomonas sp.* - **B.c.:** *Bacillus cereus* –

B.s.: *Bacillus subtilis*

Los ensayos enzimáticos y con etanol demostraron la naturaleza proteica de los componentes activos de los sobrenadantes, aunque en función de los resultados no es

posible descartar la presencia de otras moléculas no proteicas unidas a los péptidos o proteínas, con alguna participación en el proceso antimicrobiano. Por otra parte y como era de prever tratándose de cepas de enterococos, no se ha detectado la presencia de peróxido de hidrógeno en los sobrenadantes.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, si bien constituyen sólo una caracterización preliminar que necesita de posteriores estudios confirmatorios, permiten concluir que todas las cepas de enterococos estudiadas producen sustancias inhibitorias de naturaleza proteica, termorresistentes y con un rango de valores de pH óptimo para su actividad, variable para cada caso en particular. Estas características permiten inferir “*a priori*” que las cepas ensayadas son productoras de bacteriocinas.

La prosecución de los estudios de este aspecto de las cepas seleccionadas de enterococos permitirá desarrollar compuestos naturales para ser utilizados como biopreservadores alimentarios, como así también formular fermentos que desempeñen mejor su papel tecnológico en el proceso de maduración de diversos alimentos fermentados, contribuyendo al control o a la eliminación total de microorganismos alteradores o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con subsidios provenientes de la ANPCyT, Argentina (Proyecto PICT Redes n° 00063 – Convocatoria 2002), y del Programa C.A.I.+D. 2000 (Sec. de Ciencia y Técnica, Univ. Nac. del Litoral).

BIBLIOGRAFÍA

Daba H., Lacroix C., Huang J., Simard R. and Lemieux L.. 1994 *Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici UL5.* J. App. Bact., 77: 682-688.

De Vuyst L. and Vandamme E.(eds.). 1994. *Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications.* Blackie Academic & Professional, London,

Jack R., Tagg J. and Ray B. 1995. *Bacteriocins of Gram-positive bacteria.* Microbiol. Rev., 50, 2: 171-200.

Klaenhammer T. 1988. *Bacteriocins of lactic acid bacteria.* Biochemie, 70: 337-349.

Malik R., Kumar N., Nageswara Rao K. and Mathur D. 1994. *Bacteriocins. Antibacterial proteins of lactic acid bacteria: a review.* Microbiologie-Aliments-Nutrition, 12: 117 – 132.

- Piard J. and Desmazeaud M.:1992.** *Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances.* Lait, 72: 113-142.
- Tagg J. and Mc Given A. 1971.** *Assay systems for bacteriocins.* App. Env. Microbiol., 21: 943-947.
- Thompson J.,Collins M. and Mercer W. 1996.** *Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by Lactobacillus helveticus CNRZ 450.* J. App. Bacteriol., 80: 338-348.
- Yang R., Johnson M. and Ray B. 1992.** *Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria.*App. Environ. Microbiol., 58:3355-3359.

CARACTERIZACIÓN DE UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR LA CEPA DE *Enterococcus faecalis* E24.

CARDOSO María M¹., TONARELLI Georgina G.¹, SIMONETTA Arturo C.²

¹Dto de Qca. Orgánica, Fac. de Bioq. y Cs. Biológicas, Univ. Nac. del Litoral. Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina. e-mail:crsforza@arnet.com.ar ²Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. Ing. en Alimentos, Fac. de Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral. Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe. Tel/Fax:0342-4571164(Int. 2541)/ 4571162 e-mail: asimonet@fiquis.unl.edu.ar

RESUMEN

Debido a su importancia en tecnologías alimentarias, se procedió a caracterizar una potencial bacteriocina producida por una cepa de *Enterococcus faecalis* identificada como E24. La cepa se cultivó en caldo M17. El sobrenadante libre de células se obtuvo por centrifugación, se lo concentró 10 veces por evaporación, y se lo esterilizó por filtración. La actividad inhibitoria del mismo se ensayó contra cepas de bacterias Gram (+) y Gram (-) mediante el método de difusión en agar. La caracterización enzimática se realizó frente a soluciones de distintas enzimas y también se determinaron algunos parámetros fisicoquímicos. El sobrenadante mostró un efecto inhibitorio de amplio espectro, que no se modificó significativamente con los tratamientos térmicos. Las enzimas proteolíticas inactivaron total o parcialmente la capacidad inhibitoria, lo que junto al bajo PM determinado (< 3000 Da) indicaría que la sustancia activa es un péptido. A pH 7 la capacidad antagonística resultó máxima. Todas estas características hacen que este compuesto presente interés potencial como biopreservador alimentario.

Palabras Claves: bacteriocina / cepa enterococo / caracterización

ABSTRACT

Due to its importance in alimentary technologies, a potential bacteriocin produced by an *Enterococcus faecalis* strain, identified as E24, was characterized. The strain was cultivated in M17 broth. The cell-free supernatant was achieved through centrifugation, it was concentrated ten-fold by evaporation and sterilized by filtration. Its inhibitory activity was rehearsed against strains of Gram (+) and Gram (-) bacteria by well-diffusion assay. The enzymatic characterization was reached based on solutions from different enzymes. Some physicochemical parameters were determined as well. The supernatant showed a wide spectrum inhibitory effect, which was not meaningfully modified by thermal treatment.

The proteolytic enzymes completely or partially inactivated the inhibitory capacity; and the molecular weight was smaller than 3000 Da, thus indicating that the substance is composed of peptides. The antagonistic capacity proved maximum at pH 7. All these characteristics present this compound as having potential interest as a food biopreserver.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas gozan de gran importancia económica ya que, bien de forma natural o agregadas intencionadamente, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos (Aymerich y Hugas, 1998; De Vuyst and Vandamme, 1994; Frazier and Westhoff, 1978; Gasser, 1994; Montville and Winkowski, 1997). En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben a las bacterias lácticas como algo “natural” y “beneficioso para la salud”, por lo que su empleo en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad (Benkerroum et al., 1993; Frazier and Westhoff, 1978; Montville and Winkowski, 1997).

En años recientes se ha demostrado la capacidad de estas bacterias para producir, además de los productos finales de fermentación (ácido láctico y acético, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etc.), otras sustancias inhibitorias del desarrollo microbiano: las bacteriocinas. Estas son proteínas o polipéptidos capaces de inhibir el desarrollo de otras bacterias. Las denominadas sustancias tipo bacteriocinas son consideradas actualmente como bacteriocinas que se caracterizan por tener un espectro de acción antibacteriano mucho más amplio, que alcanza a especies bacterianas Gram (-), incluyendo en el mismo a géneros y especies alteradoras o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs). Esto, unido a sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas y a que las bacterias del ácido láctico son consideradas por la Organización Mundial de la salud como GRAS, hace que las mismas presenten un gran interés para su utilización como “biopreservadores naturales” en la industria alimentaria (De Vuyst and Vandamme, 1994; Frazier and Westhoff, 1978; Vaughan et al., 1994). El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar el sobrenadante con actividad antibacteriana obtenido de la cepa de *Enterococcus faecalis* E24, aislada de leche cruda producida en la región Santa Fe (Argentina), estudiándose también su modo de acción frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) contaminantes de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: se ensayó una cepa de *Enterococcus faecalis* de colección propia, identificada con la sigla E24, que ha sido aislada a partir de leche cruda producida en la región Santa Fe (Argentina).

Como microorganismos sensibles para determinar la actividad inhibitoria se utilizaron cepas de: *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae* 01, todas pertenecientes a la colección de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología de la Fac. de Ing. Química (UNL).

Todas las cepas se conservaron en los medios de cultivos más adecuados para cada una de ellas (caldo M17 para *E. faecalis* y caldo nutritivo para las cepas sensibles), con el agregado de un 15% de glicerol y a una temperatura de -20°C .

Obtención del sobrenadante libre de células: la cepa de *E. faecalis* E24 se activó mediante tres siembras sucesivas en Caldo M17 (Biokar), incubando a 37°C durante 24 h. El cultivo final se obtuvo sembrando 3 mL del último precultivo en 100 mL de caldo M17, e incubándolo a 37°C durante 24 h. Las concentraciones de las poblaciones celulares logradas en estos cultivos estuvieron comprendidas entre $1,0 \cdot 10^9$ y $7,4 \cdot 10^9$ ufc/mL. El sobrenadante libre de células se obtuvo centrifugando el cultivo final a 6000 rpm durante 15 minutos a 5°C . Luego se lo concentró 10 veces por evaporación a 70°C y se lo esterilizó por filtración (Tagg and Mc Given, 1971).

Determinación de la actividad antagonística: para determinar la capacidad inhibitoria se utilizó el método de difusión en agar. 60 μL del extracto a ensayar se colocaron en cada uno de los orificios de 7 mm de diámetro, practicados en placas de agar nutritivo ya inoculada con el microorganismo cuya sensibilidad se pretende determinar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición. En todos los casos se utilizó como control Caldo M17 concentrado diez veces y acidificado con ácido láctico hasta un valor de pH coincidente con el del sobrenadante (Benkerroum et al., 1993; Tagg and Mc Given, 1971; Vignolo et al., 1993).

Caracterización del extracto libre de células (Strasser de Saad and Manca de Nadra, 1993; Tagg and Mc Given, 1971; Vignolo et al., 1993)

a) Caracterización enzimática: se tomó 1 mL del sobrenadante concentrado libre de células y se determinó su sensibilidad frente a soluciones de diferentes enzimas, en una concentración final de 0,5 mg/mL en el medio de reacción. La mezcla reaccionante se incubó durante 4 h a 37°C . Posteriormente se evaluó la persistencia de la capacidad inhibitoria por el método de difusión en agar. Las enzimas usadas (Sigma) fueron las siguientes: catalasa, pepsina, tripsina y lisozima.

Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos:

Tratamientos térmicos: el sobrenadante concentrado libre de células se calentó a 100°C durante 10 y 30 minutos; también fue tratado en autoclave a 121°C durante 15 minutos, ensayándose luego la actividad inhibitoria.

Sensibilidad frente al pH: se trabajó a distintos valores de pH comprendidos entre 4,5 y 9,0. Se usó como testigo el medio de cultivo (Caldo M17) concentrado y llevado al mismo pH. Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria.

Determinación del PM aparente: se utilizó Centriprep 3 (Amicon) con cut-off de membrana de PM 3000. Se colocaron 2 mL del sobrenadante concentrado al cual se le agregaron 8 mL de agua Milli Q. Se centrifugó a 3000 x g a 25°C durante 65 minutos. Luego se evaluó la actividad en el filtrado y en el retenido.

Determinación del modo de acción (Benkerroum et al., 1993; Strasser de Saad and Manca de Nadra, 1993; Tagg and Mc Given, 1971; Vignolo et al., 1993): como confirmación de la actividad antagonística del sobrenadante libre de células, se determinó el efecto de la misma sobre la evolución de poblaciones celulares proliferantes de cepas sensibles. Para ello se agregaron 2 mL del sobrenadante concentrado a 18 mL de cultivos en fase logarítmica de *E. coli* y *B. cereus*, desarrollados en caldo nutritivo. A intervalos apropiados se determinó el número de células viables, comparándolos con los correspondientes a la evolución normal durante 24 horas del mismo microorganismo en el medio sin agregado de sobrenadante activo.

Determinación del título del extracto (Benkerroum et al., 1993; Strasser de Saad and Manca de Nadra, 1993; Vignolo et al., 1993): la actividad del sobrenadante fue titulada midiéndola en distintas diluciones y el título fue expresado como AU/mL.

Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la actividad inhibitoria del extracto (Benkerroum et al., 1993; Tagg and Mc Given, 1971): una alícuota del sobrenadante libre de células fue almacenado a distintas temperaturas: 4, 25, 37 y -20°C durante cinco meses. Mes a mes se determinó la actividad inhibitoria remanente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los ensayos de caracterización preliminar del sobrenadante de *Enterococcus faecalis* E24 se resumen en la Tabla 1. Las enzimas proteolíticas inactivaron total o parcialmente su capacidad inhibitoria frente a todas las cepas estudiadas. Con lisozima se observó solamente inactivación parcial. No se observaron significativas modificaciones en la actividad luego de los diferentes tratamientos térmicos, apreciándose sólo una leve disminución de la misma. Los ensayos a distintos pH mostraron que en el rango comprendido entre 4,5 y 5 la actividad inhibitoria se ve

incrementada por efecto de la acidez láctica. A pH 7 la capacidad antagonística es máxima, y disminuye levemente entre pH 8 y 9 (excepto para *Bacillus cereus*).

La determinación del PM aparente permitió establecer para el mismo un valor menor a 3000 Da, ya que la mayor actividad inhibitoria se presentó en el filtrado.

Tratamiento	<i>P. sp.</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.m.</i>	<i>B.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.sp.</i>	<i>V.ch.</i>
Sobrenadante a pH 7	15	---	10	16	15	16	16	23
Blancos de enzimas	---	---	---	---	---	---	---	---
Catalasa	15	---	9	16	15	16	16	23
Pepsina	---	---	9	11	10	16	12	15
Tripsina	---	---	---	---	---	14	---	---
Lisozima	14	---	8	16	12	15	11	18
10 min 100°C	13	---	9	12	14	14	16	20
30 min. 100°C	11	---	8	11	12	12	13	19
Autoclave 121°C 15 min	11	---	8	10	12	12	12	18
pH 4,5	18	14	15	25	19	25	25	25
pH 5	13	---	9	20	16	25	20	25
pH 6	14	---	9	18	14	20	19	23
pH 7	15	---	10	16	15	16	16	23
pH 8	13	---	8	14	13	14	14	21
pH 9	13	---	8	14	13	14	14	21
M17 pH 4,5 (blanco)	14	14	10	15	14	16	16	21
M17 pH 5 (blanco)	11	12	8	11	12	12	14	17
M17 pH 6 a 9 (blanco)	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 1: Caracterización preliminar del sobrenadante de *Enterococcus faecalis* E 24 (diámetro de halos de inhibición medidos en mm).

E| *P.sp.:* *Pseudomonas sp.*- *S.a.:* *Staphylococcus aureus.*- *L.m.:* *Listeria monocytogenes.*-*B.c.:*
 Ct *Bacillus cereus.*- *B.s.:* *Bacillus subtilis.*- *E.c.:* *Escherichia coli.*- *S.sp.:* *Salmonella sp.*-
V.ch.: *Vibrio cholerae* 01.

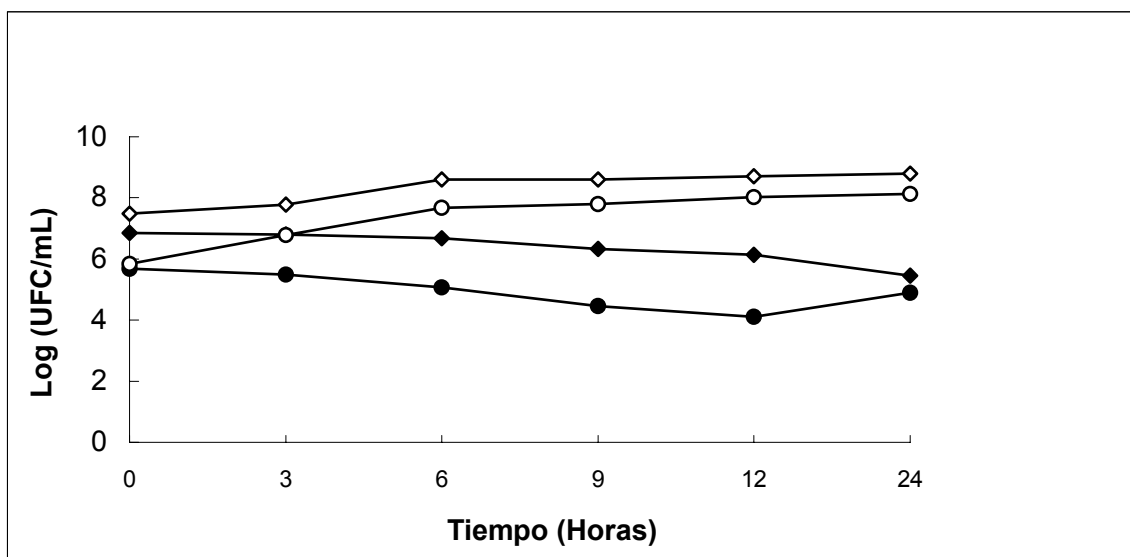


Figura 1: Modo de acción del sobrenadante E24 en las evoluciones poblacionales de cultivos de *E. coli* y de *B. cereus* .

- ◇- *E. coli* en caldo nutritivo sin el agregado del sobrenadante (control)
- ◆- *E. coli* en caldo nutritivo con adición del sobrenadante E24
- *B. cereus* en caldo nutritivo sin el agregado del sobrenadante (control)
- *B. cereus* en caldo nutritivo con adición del sobrenadante E24

Para la cepa Gram (-) se manifestó un crecimiento sostenido de la población celular hasta las 24 h, en ausencia del sobrenadante. En presencia del sobrenadante E24, se observó un importante descenso en los niveles poblacionales, llegando a disminuir tres órdenes al cabo de 24 horas. Para la cepa Gram (+) desarrollada en ausencia del sobrenadante, se manifestó un crecimiento sostenido de la población celular hasta las 9 horas de incubación, estabilizándose en el nivel poblacional alcanzado a este tiempo hasta las 24 h. En presencia del sobrenadante E24, se observó un importante descenso hasta las 9 horas de incubación, estabilizándose en este nivel poblacional hasta las 24 h, llegando a disminuir cuatro órdenes al cabo de 24 horas.

El título del compuesto inhibitorio resultó ser de 133 AU/mL, frente a *Pseudomonas* sp, *B. cereus*, *B. subtilis* y *E. coli*.

Se determinó también que el sobrenadante E24 puede ser almacenado a 4°C, 25°C ó – 20°C al menos durante 1 mes sin perder actividad, así como durante 3 a 5 meses a 4 y 25°C.

CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Los tratamientos enzimáticos indican que la sustancia inhibitoria está integrada por proteínas o péptidos; podrían también estar presentes otras sustancias, tales como lípidos y carbohidratos. Se trata de un compuesto de bajo peso molecular, inferior a 3000 Da.
- El sobrenadante E24 resultó térmicamente estable y mostró una actividad óptima a pH 7, disminuyendo muy poco entre pH 8 y 9.
- El sobrenadante estudiado contiene una bacteriocina de amplio espectro de acción antagonística frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), causantes de diversas patologías de origen alimentario. Por lo tanto, su utilización como biopreservador alimentario “natural” muestra un futuro promisorio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con subsidios provenientes de la ANPCyT, Argentina (Proyecto PICT Redes n° 00063 – Convocatoria 2002), y del Programa C.A.I.+D. 2000 (Sec. de Ciencia y Técnica, Univ. Nac. del Litoral)

BIBLIOGRAFÍA

- Aymerich. M. T. y Hugas. M. (1998):** “Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos”. *Eurocarne*. 72, 39-49.
- Benkerroum N., Ghouati Y., Sandine W., Tantaoui-Elaraki A.(1993):**“Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins”. *Letters App. Microbiol.*,17, 78-81.
- De Vuyst L. and Vandamme E. (1994):** “Atimicrobial potential of lactic acid bacteria”, in L. De Vuyst and E.J. Vandamme (eds), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Application*, 1st edn., Blackie Academic & Professional (London), 91-142.
- Frazier W. C. and Westhoff D. C. (1978).** *Food Microbiology*. 3rd edn., Mc Graw Hill Book (New York), 333-371.
- Gasser F. (1994):** “Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections”. *Bull. Inst. Pasteur*. 92, 45-67.
- Montville T. J. and Winkowski K. (1997):** “Biologically based preservation systems and probiotic bacteria”, en M. P. Doyle; L. R. Beuchat. Y T. J. Montville (eds). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press (Washington D. C.), 557-576.
- Strasser de Saad A. and Manca de Nadra M. (1993):** “Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine”. *J.App.Bacteriol.*,74, 406-410.
- Tagg J. R. and Mc Given A. R. (1971):** “Assay systems for bacteriocins”. *App. Environ. Microbiol.*, 21, 943-947.

Vaughan E. E., Caplice E., Looney R., O'Rourke N., Coveney H., Daly C., Fitzgerald G. F. (1994): " Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials". *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 118-123.

Vignolo G.M., Suriani F., Ruiz Holgado A.A.P., Oliver G. (1993): "Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages". *J. App.Bacteriol.*, 75, 344-349.

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LIPASAS EN HIDRÓLISIS DE TRIGLICÉRIDOS Y FOSFOLÍPIDOS

GUTIÉRREZ AYESTA, Cecilia; CARELLI, Amalia A.; FERREIRA, María L.

PLAPIQUI-UNS-CONICET, La Carrindanga Km 7, CC 717, 8000-Bahía Blanca, Argentina, Tel y Fax: (54-291) 4861700, e-mail: mlferreira@plapiqui.edu.ar.

RESUMEN

Se estudió teóricamente la adsorción de sustratos en lipasas usando trioleína y fosfatidilcolina como sistemas modelos de triglicéridos y fosfolípidos. Adicionalmente, se evaluó en forma experimental la hidrólisis en heptano de aceite de girasol y lecitina de soja a 60 °C, pH 7 y 6 horas de reacción. Resultados obtenidos por titulación de los ácidos grasos libres fueron confirmados por cromatografía gaseosa. Las conversiones dependieron fuertemente de la lipasa seleccionada. *Lipolase 100T* presentó la mayor conversión a ácidos grasos cuando se usó aceite como sustrato, mientras que la lipasa de *Rhizomucor miehei* fue la más efectiva con lecitina de soja. Los resultados experimentales se justificaron teóricamente. Aquellas lipasas con sitio de coordinación del sustrato superficial o en forma de embudo proporcionaron mayor actividad.

Palabras clave: hidrólisis enzimática, lipasas, triglicéridos, fosfolípidos, cromatografía.

ABSTRACT

The substrate adsorption mechanism in lipases was studied theoretically by using triolein and phosphatidylcholine as system models of triacylglycerols and phospholipids, respectively. Hydrolysis reactions of sunflower-oil and soybean-lecithin in heptane were performed experimentally at 60°C, pH7 for six hours. Results obtained by titration of free fatty acids were confirmed by gas chromatography. Conversions were highly depended on the selected lipase. The *Lipolase 100 T* enzyme presented the higher conversion to fatty acids when oil was the substrate, while the lipase obtained from *Rhizomucor miehei* had the highest activity with lecithin. Theoretical studies supported the experimental results. Those lipases with a coordination-substrate site on the surface or with a funnel form showed the most activity.

Key words: enzymatic hydrolysis, lipases, triacylglycerols, phospholipids, chromatography.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas presentan enormes potenciales para la síntesis e hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, hidrólisis de grasas saturadas y aceites, producción de emulsificantes y tratamiento de desechos de aceites usados. Dicho potencial radica en la alta especificidad de las mismas y en la relativa pureza de los productos (Gandhi, 1997).

Existen tres tipos de fuentes de lipasas: familia *Rhizomucor* (que incluye la *Humicola lanuginosa*), con el sitio activo y su tapa en la superficie de la enzima; familia *Pseudomonas* con el sitio activo y su tapa en forma de embudo y familia *Candida rugosa* con el sitio activo al final de un túnel que incluye la tapa en su parte externa. La lipasa de *Candida antarctica B* no presenta activación interfacial (Schmidt y col., 1998) Estudios previos demostraron que los triglicéridos se posicionan en el túnel de la lipasa de *Cándida rugosa* de forma tal que todas las posiciones (1=3 y 2) son atacables por la serina, parte de la triada catalítica de la lipasa (Foresti y Ferreira, 2004). En el caso de la lipasa de *Rhizomucor meihei*, no existe restricción a la coordinación y siempre la reacción en posición 1 ó 3 se encuentra favorecida frente a la reacción en posición 2.

El objetivo de este trabajo es el estudio teórico/experimental de la relación estructura-actividad de lipasas en la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Todos los reactivos fueron grado analítico. Los siguientes estándares para cromatografía gaseosa con una pureza mayor de 98% fueron provistos por Sigma[®]: 1-monopalmitoil-rac-glicerol, 1,3-dipalmitina, trimiristina, tripalmitina, trioleína, ácido oleico (cis-9-ácido octadenoico), n-tetradecano y glicerol. Los mismos fueron usados para preparar soluciones de referencia en piridina J. T. Baker[®]. Como agente silanizante se usó MSTFA N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida con una pureza de 98% provisto por Avocado[®].

Se prepararon dos soluciones de referencia para el análisis cualitativo y determinación de factores de respuesta utilizando como estándares internos tetradecano y tripalmitina. La solución de referencia 1 consistió en una mezcla de ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos y n-tetradecano disueltos en piridina a una concentración de 0.06mg/mL.

La solución de referencia 2 fue preparada con los estándares de triglicéridos y tetradecano a una concentración de 0.6 mg/mL Adicionalmente, se adquirieron las siguientes enzimas: Lipase AY "AMANO" 30 (30.000 U/g), Lipolase 100T, Lipase PS "AMANO" (30.000 U/g), Lipase AK "AMANO" 20 (20.000 U/g); *Rhizomucor miehei* (5.000 U/mL) y CAB (5.000 U/mL) de Novozymes; Lecitase 10 L (10.580 U/mL), NOVOZYM 435,

Lipasa de pancreas porcinos (3000 U/g) de Calbiochem, LIPOZYME RM IM y LECITASE 10 L de NovoNordisk. En el comercio local se adquirieron aceite de girasol y lecitina de soja granulada (pura 98%).

Reacciones de hidrólisis: Se llevaron a cabo en frascos de vidrio transparente de 10 mL con tapas a rosca y septum. En los ensayos con aceite de girasol se mezclaron 1g de aceite, 2.5 g de buffer pH=7, 1.4 mL de heptano y 50 mg (0.3 mL) de enzima. En los ensayos con lecitina de soja se mezclaron 200 mg de lecitina, 2.5 g de buffer pH=7, 1.4 mL de heptano y 5 mg (0.1mL) de enzima. La reacción se llevó a cabo por duplicado con agitación magnética y control de temperatura a 60 °C por un tiempo de 6 horas.

Toma de muestra: Para la determinación de acidez se tomaron con aguja de punción lumbar aproximadamente 0.2 mL de emulsión sin cesar la agitación del reactor. Los mismos fueron transvasados a otro frasco y determinado su peso. De cada ensayo se analizaron 2 muestras. Para los ensayos cromatográficos se refrigeró a - 5 °C el tubo de reacción separándose la emulsión original en tres fases: inferior acuosa, media hidrocarbonada y superior concentrada en ácidos grasos y aceite remanente. La muestra a analizar en el cromatógrafo consistió de 5 µL (4 mg) de la fase superior a la que se le añadió cantidades conocidas de los estándares internos.

Determinación de la Acidez: Se basó en la norma IUPAC 2.201 (IUPAC, 1992). Brevemente a cada frasco conteniendo la muestra se le agregó 10 mL de una mezcla de éter etílico : etanol (1:1) y se tituló con una solución de hidróxido de potasio 0,02 N en presencia de fenolftaleína.

Cromatografía Gaseosa: Se realizó por CC-CGC según norma AOCS Cd 11b-91 (AOCS, 2001). Los análisis de CG fueron llevados a cabo en un cromatógrafo gaseoso VARIAN 3700 equipado con un inyector "split-splitless", un detector de ionización en llama, un sistema de adquisición de datos RIAC-PROCESAR V 2.0 y una columna DB-5HT 15 m x 0.32 mm(0.1 µm). La programación de temperatura del horno de la columna fue: 80°C – 10°C/min–370°C (15 min); la temperatura del detector 370°C; temperatura del inyector 320°C. Se usó hidrógeno como gas portador con un flujo de 3 mL/min. El volumen de inyección fue 1 µL en modo split-off (1min). Las muestras a inyectar fueron disueltas en piridina y silanizadas con MSTFA (Pank y Lorbeer, 1995) .

Ensayos teóricos: Se realizó empleando el programa Chem 3D 5.0 Ultra, método MM2 (Cambridge Soft) y usando trioleína y fosfatidilcolina como sistemas modelos de triglicéridos y fosfolípidos. El método PM3 se aplicó para evaluar los cambios electrónicos locales durante la reacción utilizando triacetina como modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los datos estructurales sobre las triadas catalíticas de las lipasas indicando la posición en la estructura primaria de los distintos aminoácidos. Adicionalmente se indica la estructura del sitio de coordinación del aceite/lecitina (Foresti y Ferreira, 2004).

Tabla 1- Estructura lipasas seleccionadas-Tipo de triada catalítica

LIPASA	Posición de la triada catalítica				Tipo de sitio de coordinación del sustrato
	Serina	Histidina	Ac. Aspártico	Ac. Glutámico	
<i>C. rugosa</i>	209	449	---	341	Con túnel de acceso
<i>R. miehei</i>	144	257	203	---	Superficial
<i>P. cepacia</i>	87	286	264	---	En forma de embudo
<i>C. antarctica</i>	105	224	187	---	En forma de embudo
<i>H. lanuginosa</i>	146	258	201	---	Superficial
<i>P. fluorescens</i>	114	199	168	---	En forma de embudo

En la Tabla 2 se muestra los resultados de conversión obtenidos midiendo la acidez. Con Lipolase 100T (*Humicola Lanuginosa*) se observó la conversión mas alta por el método titulométrico (85%). Esta enzima posee un sitio de coordinación ubicado en la superficie de la enzima. Valores intermedios de conversión se lograron con enzimas conteniendo sitios catalíticos de tipo embudo (*Pseudomonas*: 69-55%). Evidentemente existen diferencias entre la lipasa de *Humicola lanuginosa* y la de *Rhizomucor meihei* ya que la de *Rhizomucor meihei* presenta una conversión del orden del 12%. La lipasa de *Candida Antarctica B* sufre efectos de desactivación por coordinación del triglicérido. Efectos asociados a la distribución entre formas abierta y cerrada de la lipasa debido a la composición del medio y a la respuesta de la enzima a éste según su estructura pueden contribuir a la baja actividad en los últimos casos. Respecto a la hidrólisis de lecitinas la mayor actividad la presentan lipasas con estructura del sitio activo en la superficie de la enzima de la familia *Rhizomucor*, mientras que lipasas con estructura de sitio de coordinación superficial de otras familias (de *Humicola lanuginosa*) o tipo embudo presentan menor actividad (de *Lipasa pancreática*). Por otra parte, las lipasas con estructura tipo túnel (de *Candida rugosa*) o sin activación interfacial (de *Candida antarctica B*) ó soportadas (como *Lipozyme RM*) presentan nula o escasa actividad en la hidrólisis de lecitina (Mustranta y col., 1995). A modo comparativo, se hidrolizó con igual procedimiento la lecitina en presencia de fosfolipasa A2 y iones Ca a pH 7 y 8. Esto

permitió verificar la alta eficiencia de esta enzima con lecitina. La coordinación de lecitina en la fosfolipasa se relaciona a la presencia de Ca^{+2} como un sitio de adsorción para el fosfato, siendo la posición 2 de la lecitina la posición atacable por la serina de la triada catalítica. En el caso de las lipasas, sólo la posición 1 de la lecitina es accesible a la hidrólisis, ya que no existe la misma distribución espacial y/o ubicación del sitio activo. Hara y col. al estudiar la acción de distintas lipasas en fosfatidilcolina encontraron altas conversiones con las provenientes de especies *Mucor*, bajas con aquellas originarias de *Humicola* y nula con las del género *Candida* (Hara y col., 1997).

Tabla 2-Resultados hidrólisis de aceite de girasol y lecitina de soja

ENZIMAS	Aceite de girasol	Lecitina de soja
<i>Humicola lanuginosa</i> (Lipolase 100 T)	85.2	19.5
<i>Pseudomona cepacia</i> (Lipase PS)	69.0	11.9
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Lipase AK)	55.1	21.2
LIPOZYME RM IM (RM soportada)	47.6	6.1
<i>Cándida rugosa</i> (Lipase AY "AMANO" 30)	14.4	----*
<i>Rhizomucor miehei</i> (NS-40008 LUN 00020)	11.9	35.6
<i>Cándida antártica</i> (CAB)	5.8	----*
NOVOZYM 435 (CALB soportada)	2.5	----*
LIPASE (grado B de páncreas porcino)	----	19.7
LECITASE 10 L pH 7.0 (Fosfolipase A2)	----	85.4
LECITASE 10 L pH 8.0	----	56.7

Los valores son promedios de cuatro determinaciones.

* Estas lipasas se han reportado no activas en la hidrólisis de lecitina

En forma paralela, se implementó la técnica cromatográfica a fin de analizar los productos de reacción. Para ello se determinaron los factores de respuesta de los distintos grupos de compuestos que podrían encontrarse durante la reacción. El factor de respuesta de los triglicéridos con respecto a la tripalmitina fue de 0.62 y el de los dipalmitina, monopalmitina y ácido oleico con respecto al tetradecano fueron de 1.31, 1.67 y 1.23, respectivamente. Estos valores son promedio de ocho determinaciones. Todos los factores de respuestas fueron superiores a 0.5 indicando que no existe una descomposición o pérdida excesiva de componentes en el sistema cromatográfico.

En la Figura 1 se muestra un cromatograma de un aceite de girasol sin reaccionar y uno de aceite de girasol hidrolizado con *Lipolase 100 T*. Los estudios cromatograficos en

aceite indicaron conversión del 83% con *Lipolase 100T* siendo los productos de reacción preferentemente ácidos grasos. La correspondencia entre los resultados obtenidos con ambos métodos fue muy buena. Luego de la hidrólisis se observó una evidente disminución de triglicéridos y un aumento en productos de hidrólisis. En el caso de la Figura 1 no se observaron mono y diglicéridos indicando una casi completa conversión a ácidos grasos.

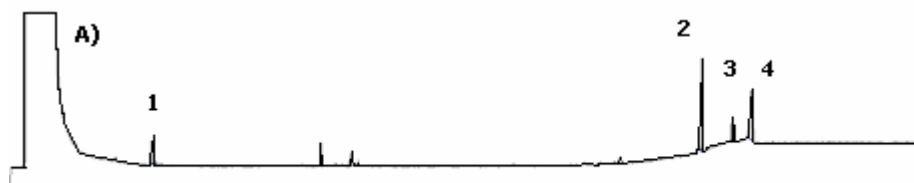


Figura 1 – A) Cromatograma de Aceite de Girasol sin hidrolizar. B) Cromatograma de aceite de girasol hidrolizado con *Lipolase 100 T* . Identificación de picos: estándar interno de tetradecano (pico1, t_R :7min), estándar interno de tripalmitina (pico 2, t_R :34.2 min), triglicéridos de 52 átomos de carbono (pico 3, t_R :35.7min), triglicéridos de 54 átomos de carbono (pico 4, t_R : 36.7min), ácido oleico y linoleico (pico 5, t_R :16.8 min).

CONCLUSIONES

El grado de hidrólisis obtenido depende fuertemente de la lipasa seleccionada. Las mejores conversiones se obtuvieron con *Lipolase 100T* en hidrólisis de aceite de girasol y con lipasa de *Rhizomucor miehei* en lecitina de soja. La estructura del sitio de coordinación se correlaciona con los resultados obtenidos en hidrólisis tanto de lecitinas como de aceites. Lipasas con sitios de coordinación del sustrato (aceite de girasol o lecitina de soja) en forma de embudo o superficiales son más activas en las reacciones de hidrólisis. Finalmente, la técnica cromatográfica implementada permitirá en estudios subsiguientes verificar la composición de los productos de reacción obtenidos al hidrolizar borras y deshechos de la industria aceitera permitiendo establecer aquellas enzimas o mezclas de ellas que proporcionen productos de mayor valor agregado e interés industrial por sus características emulsificantes y/o reológicas.

BIBLIOGRAFÍA

AOCS,2001. *Oficial Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemisr's Society*, 5th. Ed., D. Firestone (ed.)American Oil Chemists'Society (AOCS), Champaign, IL, 2001.

Foresti M. L., Ferreira M. L. (2004). A Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate using *Candida rugosa* and *Candida antarctica B* Lipases- Interfacial

Activation and Substrate -Ethanol, Oleic Acid- Adsorption. *Biomacromolecules* (5) 2366 – 2375.

Gandhi N. (1997). Applications of Lipase. *JAOCS* (74) 621-633.

Hara F., Nakashima T. , Fukuda H. (1997). Comparative Study of Commercially Available Lipases in Hydrolysis Reaction of Phosphatidylcholine. *JAOCS* (74) 1129-1132.

IUPAC, 1992. ***Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th.*** Ed., **C. Paquot and A. Hautgenne (ed.), International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford,**

Comparison of Lipases and Phospholipases in the Hydrolysis of Phospholipids. *Process Biochemistry* (30) 393-401.

Plank C., E. Lorbeer E (1995). Simultaneous determination of glicerol, and mono-, di-, and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* (697) 461-468.

Schmidt C., Pleiss J., Schmidt R.D. (1998). A Toolbox of Recombinant Lipases for Industrial Applications. *Ann. New York Acad. Sci. Enz. Eng. (XIV)* 14-22.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al soporte financiero del CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y la Universidad Nacional del Sur. Así mismo se agradece al grupo de investigación del INIBIBB por facilitarnos la Lipasa de páncreas porcino.

AVANCES EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN CONTINUA DE CERVEZA CON LEVADURAS INMOVILIZADAS

DRAGONE, Giuliano *; MUSSATTO, Solange I.; ALMEIDA E SILVA, João B.

Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena
Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5, CEP: 12600-970, Lorena / SP, Brasil
Tel: 0055 12 31595107; Fax: 0055 12 31533165; * E-mail: gdragone@debiq.fauenquil.br

RESUMEN

Este trabajo estudió la inmovilización de levaduras cerveceras en un soporte natural obtenido a partir del bagazo de malta (principal subproducto de las cervecerías) durante la fermentación continua de cerveza, utilizando un reactor airlift. A través del análisis por microscopía electrónica de barrido fueron discutidos 3 mecanismos de inmovilización de las células en el bagazo de malta: adhesión células-soporte, atracción células-células y adsorción de células dentro de protecciones naturales (asperezas de la superficie del soporte). La productividad volumétrica del sistema continuo, expresada como velocidad de consumo de azúcares, fue aproximadamente 4,4 mayor que la calculada para una fermentación discontinua tradicional.

Palabras claves: Bagazo de malta, Cerveza, Inmovilización, Fermentación, Levaduras.

ABSTRACT

This work studied the immobilization of brewing yeast onto a natural carrier obtained from spent grains (main brewery's by-product) during continuous beer fermentation, using an airlift reactor. Three mechanisms of cell immobilization onto spent grains were discussed through the analyses by scanning electron microscopy: cell-carrier adhesion, cell-cell attachment and cell adsorption inside natural shelters (carrier's surface roughness). The volumetric productivity of the continuous system expressed as the rate of sugar consumption was approximately 4.4 times higher than the calculated for a traditional batch fermentation.

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de cerveza constituye un ejemplo típico de biotecnología tradicional o antigua debido a su larga historia (LINKO y colaboradores, 1998). Sin embargo, debido a que las cervecerías modernas precisan ser cada vez mas eficientes

para sobrevivir en un mundo competitivo y globalizado, se ha generado un gran interés por el desarrollo de procesos innovadores que puedan ser realizados con un menor costo, sin afectar la calidad del producto final. Entre las diversas innovaciones propuestas por las industrias cerveceras en las últimas décadas, se destaca la posibilidad de producir cervezas por un proceso continuo con levaduras inmovilizadas.

De acuerdo con VIRKAJÄRVI y colaboradores (2002), la fermentación continua de cerveza utilizando células inmovilizadas, presenta ventajas frente al tradicional proceso discontinuo, tales como: reducción en el tamaño de los equipos y de la planta, menores costos por mano de obra, limpieza y mantenimiento, la obtención de un producto con características uniformes y principalmente, una significativa reducción en el tiempo de fermentación. Por otro lado, según LINKO y colaboradores (1998), el costo del soporte de inmovilización de las levaduras es el factor que ejerce la limitación económica mas importante para la implantación del proceso continuo en escala industrial. Por ese motivo, una alternativa que debe ser considerada, es la utilización de soportes de bajos costos basados en subproductos industriales.

El bagazo de malta representa cerca del 85% de los subproductos totales de una cervecería. Por cada 100 L de cerveza producida, son generados aproximadamente 20 kg de bagazo (REINOLD, 1997). En el año 2002, las cervecerías brasileñas generaron cerca de 1,7 millones de toneladas de bagazo de malta, siendo su principal uso como ración animal (MUSSATTO, DRAGONE & ROBERTO, 2005)

De acuerdo con BRÁNYIK y colaboradores (2002), el bagazo de malta constituye un material promisorio como soporte de inmovilización cuando comparado con otros materiales utilizados en la fermentación continua de cerveza, ya que además de tener un bajo costo (por ser un subproducto), presenta grado alimenticio, es estable y permite ser regenerado, esterilizado y preparado de manera simple. Según HERNÁNDEZ y colaboradores (1999), ese subproducto es rico en proteínas y fibras, que representan cerca del 20% y 70% de su composición, respectivamente.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la posibilidad de aprovechar el principal subproducto de las cervecerías (bagazo de malta) como soporte natural de inmovilización de levaduras, durante la producción continua de cerveza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del mosto cervecero: El mosto cervecero original con una concentración de extracto igual a 11,3°P utilizado durante la fermentación continua, fue preparado de acuerdo con DRAGONE (2002) en la Microcervecería del Departamento de Biotecnología

de la Facultad de Ingeniería Química de Lorena (San Pablo / Brasil). Mosto diluido con concentración de extracto igual a 7,5°P fue preparado diluyendo el mosto original con agua destilada. La unidad grado Plato (°P) comúnmente utilizada en las cervecerías, es definida como los gramos de extracto por cada 100 gramos de mosto a 20°C.

Microorganismo y cultivo del inóculo: La levadura cervecera *Saccharomyces cerevisiae* tipo *lager* fue cultivada en 500 mL de medio sintético y condiciones aeróbicas, en un agitador de movimiento rotacional a 200 rpm, 30°C durante 30 h. El medio presentó la siguiente composición (en g/L): KH_2PO_4 , 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4; extracto de levadura, 1,0; adjunto con alta concentración de maltosa (MOR-REX 1557), 80. De acuerdo con el fabricante, el adjunto MOR-REX 1557 posee los azúcares: dextrosas, máx 12%, maltosa, mín 42%, maltotriosa, mín 10% y dextrinas, máx 28%. Medio sintético con la misma composición fue utilizado en el comienzo del proceso fermentativo.

Preparación del soporte: El bagazo de malta seco (90 g, 10% de humedad) fue tratado con 1,5 L de solución de NaOH 2% (p/v), manteniéndolo en agitación (120 rpm) a 30°C por 24 h. Posteriormente, fue lavado con agua hasta pH neutro, secado en estufa a 50°C, molido y tamizado. Fueron seleccionadas las partículas que pasaron en el tamiz de 16 mesh (abertura de 1,0 mm) y que quedaron retenidas en el tamiz de 28 mesh (abertura de 0,6 mm).

Condiciones de la fermentación continua: Los ensayos fueron realizados en un reactor airlift cilíndrico de tubos concéntricos con un volumen de trabajo de 3,7 L (volumen total: 7 L). La aeración fue efectuada con aire filtrado (0,8 – 1,0 L/min) a través de un tubo de 1 mm de diámetro. La temperatura del medio de fermentación fue mantenida constante a 15°C, colocando el reactor dentro de una incubadora refrigerada.

Métodos analíticos: La concentración de células inmovilizadas en el soporte fue determinada de acuerdo con BRÁNYIK y colaboradores (2002). Las células libres en suspensión (no inmovilizadas) fueron determinadas por peso seco a 105°C. Las concentraciones de extracto en el mosto (°P) y de etanol (% v/v) fueron medidas en un equipo específico para análisis de cervezas (Beer Analyser 2, ANTON-PAAR, Austria). Fotomicrografías de las partículas de bagazo de malta con las levaduras inmovilizadas fueron realizadas en microscopio electrónico de barrido (LEO 1450VP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con TATA y colaboradores (1999), una variable importante en cualquier sistema de reactores con células inmovilizadas, es la concentración de células que colonizan el soporte de inmovilización. En el presente estudio, fue evaluada la

concentración de células inmovilizadas y su relación con las células libres en suspensión para diferentes condiciones de operación del reactor. El comienzo del proceso fermentativo fue conducido en forma discontinua y utilizando medio sintético para facilitar el crecimiento de las levaduras.

A partir de las 74 h de fermentación, el reactor fue alimentado continuamente con mosto cervecero diluido (7,5°P) y una tasa de dilución [D, definida como la relación entre el caudal de alimentación de mosto (en L/h) y el volumen de líquido en el reactor (en L)] igual a 0,14 h⁻¹ (Figura 1). Fue posible observar un aumento en la concentración de las células inmovilizadas a medida que D fue disminuida de 0,14 h⁻¹ para 0,10 h⁻¹ y posteriormente de 0,10 h⁻¹ para 0,04 h⁻¹. Utilizando la tasa de dilución de 0,04 h⁻¹ se obtuvo una concentración máxima de células inmovilizadas igual a 0,31 g cel inmov/g sop, con 290 h de fermentación. Según BRÁNYIK y colaboradores (2002), una carga de biomasa inmovilizada de aproximadamente 0,3 g cel/g sop, puede ser considerada como suficiente para alimentar continuamente un reactor con mosto cervecero.

Durante el período de alimentación del reactor con el mosto diluido (t = 74 a 290 h), la relación entre las células inmovilizadas y las células libres en suspensión se mantuvo entre 0,6 y 2,2. Esos valores fueron similares a los relatados por TATA y colaboradores (1999), durante la fermentación continua de cerveza con levaduras inmovilizadas en soportes porosos como esferas de vidrio y carburo de silicio.

A partir del tiempo de 290 h, el mosto diluido que alimentaba continuamente el reactor fue sustituido por mosto con una concentración de extracto de 11,3°P, manteniéndose la tasa de dilución en 0,04 h⁻¹. Para esas nuevas condiciones, la concentración de levaduras inmovilizadas alcanzó un máximo de 0,37 g cel inmov/g sop, con 362 h de fermentación. La cerveza producida presentó un pH de 4,15 y concentraciones de extracto y etanol de 2,56°P y 4,62% v/v, respectivamente. Con los valores conocidos del extracto inicial del mosto (11,3°P), del extracto final de la cerveza (2,56°P) y de la tasa de dilución (D = 0,04 h⁻¹), fue calculada la productividad volumétrica que expresa la velocidad de consumo de azúcares (R_S) por unidad de volumen del reactor. El valor de R_S (aproximadamente 3,5 g/L.h) para el sistema continuo con levaduras inmovilizadas en el bagazo de malta, resultó significativamente mayor que el promedio de R_S (aproximadamente 0,8 g/L.h) calculado para una fermentación discontinua tradicional, cuando se considera una atenuación de mosto de 14°P para 4°P en 5 días.

Los análisis realizados en microscopio electrónico de barrido (MEB), mostraron que las levaduras cerveceras fueron retenidas dentro de zonas de protección, como fisuras, poros y fibras entrelazadas, en la superficie de las partículas del bagazo de malta (Figura 2). La

aspereza del soporte protegió a las células contra las fuerzas de fricción ejercidas por las corrientes del líquido, permitiendo aumentar el área total de la superficie disponible para la colonización.

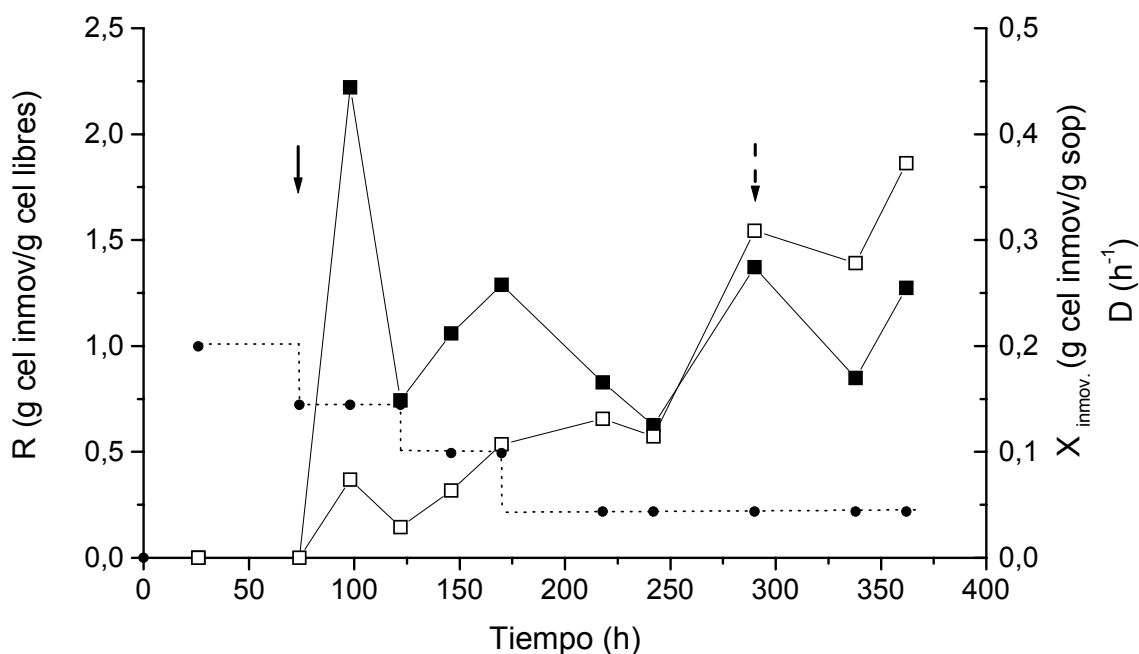


Figura 1. Fermentación continua de cerveza en reactor airlift. R = Relación entre células inmovilizadas y células libres (-■-); X_{inmov} = biomasa inmovilizada (-□-); D = tasa de dilución (●...); = cambio de medio sintético para mosto diluido; = cambio de mosto diluido para mosto original.

Levaduras cerveceras inmovilizadas también fueron encontradas en zonas abiertas y planas de las partículas de bagazo, donde no reciben resguardo contra el flujo de líquido como en las zonas de protección. Según MOZES y colaboradores (1987), el fenómeno de la adhesión de microorganismos a superficies sólidas es el resultado entre interacciones electrostáticas y no-electrostáticas. En diferentes regiones del bagazo fueron observadas capas múltiples de levaduras, formadas por la interacción entre células ya adheridas o adsorbidas al soporte, con otras células que se encontraban libres. De acuerdo con BRÁNYIK y colaboradores (2004), ese tipo de atracción entre células puede ser considerada como una forma de floculación.

CONCLUSIONES

Este trabajo demostró la posibilidad de aprovechar el principal subproducto de las cervecerías como soporte de inmovilización de levaduras, para la producción continua de

cerveza, utilizando un reactor airlift. A través del análisis por microscopía electrónica de barrido, fue posible determinar 3 mecanismos de inmovilización de las levaduras cerveceras en el bagazo de malta: adhesión células-soporte, atracción célula-célula y adsorción de las células dentro de protecciones naturales en la superficie del soporte.

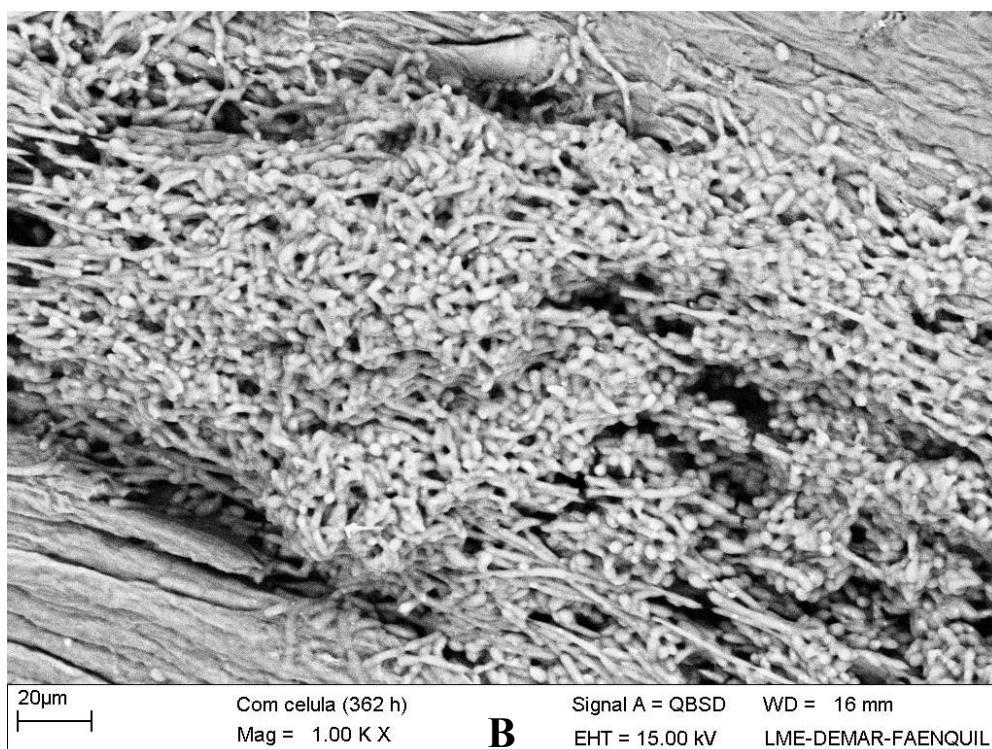
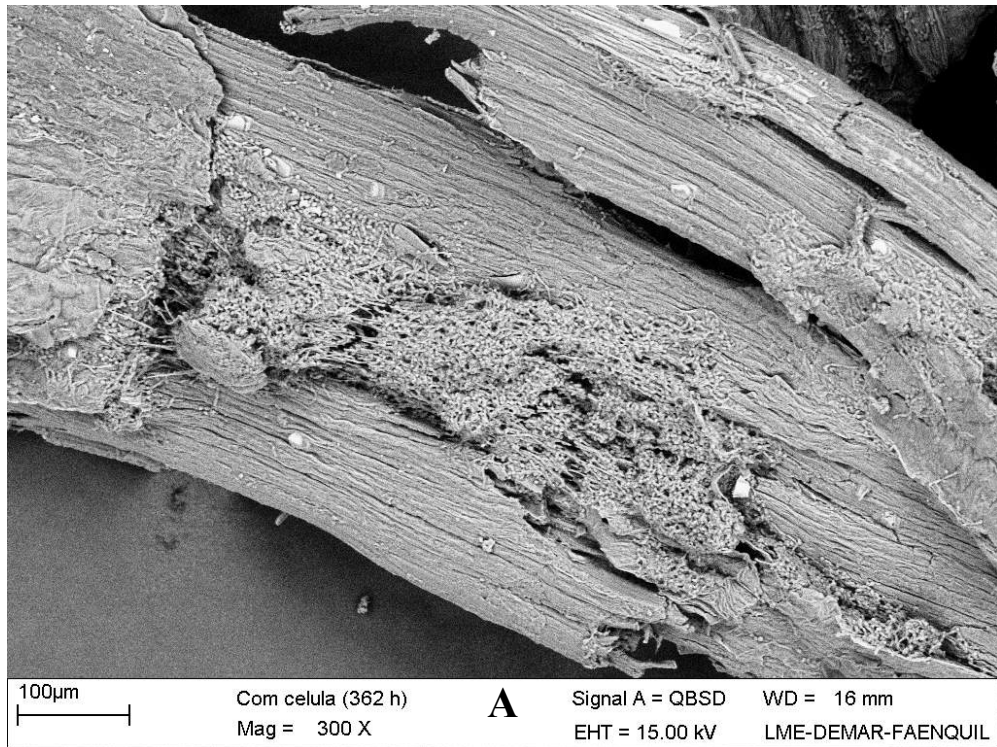


Figura 2. Fotomicrografías (MEB) de partículas del bagazo de malta con $X_{inmov}=0,37$ g cel inmov/g sop. **A)** Aumento 300x, **B)** Aumento 1000x

BIBLIOGRAFÍA

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., MACHADO CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J.A. 2002. Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains. *Journal of the Institute of Brewing*, v.108, p.410-415.

BRÁNYIK, T., VICENTE, A.A., OLIVEIRA, R., TEIXEIRA, J.A. 2004. Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, p.84-93.

DRAGONE, G. 2002. *Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL, 111p.

HERNÁNDEZ, A.M., RODRÍGUEZ, J.L., LÓPEZ, B., ZERQUERA, O.L. 1999. Caracterización química y funcional del afrecho de malta. *Alimentaria*, may, p.105-107.

LINKO, M., HAIKARA, A., RITALA, A., PENTTILÄ, M. 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, v.65, p.85-98.

MOZES, N., MARCHAL, F., HERMESSE, M.P., VAN HAECHT, J.L., REULIAUX, L., LEONARD, A.J., ROUXHET, P.G. 1987. Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, p.439-450.

MUSSATTO, S.I., DRAGONE, G., ROBERTO, I.C. 2005. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, in press.

REINOLD, M.R. A 1997. Cervejaria e o meio ambiente. In: *Manual prático de cervejaria*, 1ª. edição. São Paulo: ADEN – Editora e Comunicações Ltda.. p.163-197.

TATA, M., BOWER, P., BROMBERG, S., DUNCOMBE, D., FEHRING, J., LAU, V., RYDER, D., STASSI, P. 1999. Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. *Biotechnology Progress*, v.15, p.105-113,

VIRKAJÄRVI, I., VAINIKKA, M., VIRTANEN, H., HOME, S. 2002. Productivity of immobilized yeast reactors with very-high-gravity worts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v.60, p.188-197.

AGRADECIMIENTOS:

Capes, Malteria do Vale, Wallerstein Industrial & Comercial, Corn Products Brasil y Departamento de Ingeniería de Materiales (DEMAR / FAENQUIL).

ELABORACIÓN DE QUESOS DE PASTA BLANDA CON ENZIMA VEGETAL DE *SALPICHROA ORIGANIFOLIA* (HUEVITO DE GALLO)

ROCHA, Gabriela F¹.; LÓPEZ, Oscar²; FERNÁNDEZ, Graciela¹.

Universidad Nacional de Luján. Rutas 5 y 7, C.C. 221, Luján, Buenos Aires.
Teléfono (02323) 420380. Fax (02323) 425795. E-mail: ferngra@unlu.edu.ar

¹ Laboratorio de Química Biológica. Departamento de Ciencias Básicas. ² Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Departamento de Tecnología

RESUMEN

El uso de enzimas proteolíticas es una operación importante en la tecnología láctea, especialmente en la preparación de quesos. La renina, enzima coagulante de la leche, es utilizada a nivel mundial pero su corta vida útil y los altos precios han estimulado la búsqueda de sustitutos de diferentes orígenes como microorganismos, plantas, etc.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la enzima obtenida de los frutos maduros de *Salpichroa origanifolia* para ser usada como alternativa y/o en adición a la renina.

El extracto crudo de los frutos muestra una buena estabilidad térmica a 37°C y la actividad caseinolítica se determinó a 37°C y pH 6,0. Se elaboraron quesos blandos a escala laboratorio usando diferentes proporciones de quimosina recombinante de *Aspergillus niger* (FPC) y extracto crudo. Luego de la elaboración de los quesos se determinaron durante 10 días varios parámetros. Los valores de pH y humedad fueron similares en el queso testigo y en el elaborado con extracto crudo, sin embargo los valores de nitrógeno soluble en agua / nitrógeno total fueron diferentes.

Palabras claves: proteasa, *Salpichroa origanifolia*, renina, actividad caseinolítica.

ABSTRACT

The use of proteolytic enzymes is an important operation in the dairy technology, especially in cheese making. Calf rennet, the conventional milk clotting enzyme is widely used around the world, but the short life and the high price have encouraged the search for substitutes from sources such as microorganisms, fish and plants.

The aim of this work is to study the proteolytic enzyme obtained from *Salpichroa origanifolia* to be used as an alternative substitute of calf rennet.

Crude extract (CE) of mature fruits shows a good stability at 37°C and its caseinolytic activity was determined at pH 6 and 37°C. Soft cheeses were made at laboratory scale

with different percentages of FPC (recombinant chimosin obtained from *Aspergillus niger*) and CE.

Several parameters were determined for 10 days after its elaboration. Cheese elaborated with FPC was used as a test pattern. pH and humidity values were similar in both cheeses, but the relation between WSN/TN was different

INTRODUCCIÓN

La especie *Salpichroa organifolia* es una especie autóctona de la Argentina, Brasil y Uruguay. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que el fruto maduro presenta actividad proteolítica relevante.

Las actividades proteolíticas y coagulante son dos parámetros fundamentales en la evaluación de cuajos en producción de quesos

Se han buscado sustitutos para la renina y se han utilizado reemplazantes de diversos orígenes (microorganismos, vegetales etc), aunque no se ha encontrado alguno que satisfaga completamente los requerimientos. Dentro de este campo se ha estudiado el fruto de *Salpichroa organifolia* con el objetivo de estudiar la posibilidad de utilizar la enzima obtenida como una alternativa o en una mezcla con la renina

MATERIALES Y MÉTODOS:

Material vegetal: Se recolectó durante los meses de Marzo y Abril el fruto maduro de la planta *Salpichroa Organifolia* en terrenos de la ciudad de Luján .

Preparación del polvo acetónico: para la extracción de la enzima se mezcló una parte (p/v) del fruto y dos partes de acetona a -10°C . Se licuo, se filtró al vacío y se lavó con acetona a -10°C . El precipitado obtenido es el denominado polvo acetónico. Se conservó a -18°C .

Preparación de extracto crudo: (EC) Se realizó una mezcla al 20 %(p/v) de polvo acetónico y buffer fosfato 50 mM (pH 7), EDTA 5 mM se agitó y luego se centrifugo 20000 rpm. Se utilizó el sobrenadante denominado extracto crudo(EC).

Determinación de proteínas: La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Actividad proteolítica: se determinó utilizando hemoglobina como sustrato por el método de Anson (1937). Una unidad de actividad proteolítica se define como la cantidad de enzima que produce una variación de la absorbancia en una unidad por minuto a 750 nm. Esta determinación se utilizó para ensayar pH, temperatura óptima y estabilidad térmica.

Ensayos de inhibición enzimática. Este ensayo es para determinar el grupo catalítico al que pertenece la enzima. Se incubaron 200 μ l de extracto crudo (parcialmente purificado), con pepstatina (1 μ M), O-fenantrolina (10 mM), PMSF (1 mM) y E64 (10 μ M) por 1 hora a 37°C. y se midió la actividad proteolítica residual según el método mencionado anteriormente.

Actividad coagulante de leche: Se utilizó leche en polvo descremada reconstituida en una solución 10 mM de cloruro de calcio (pH 6.5) hasta una concentración de 0.12 Kg/l. Las enzimas utilizadas como coagulantes fueron FPC (quimosina recombinante producida por fermentación de *Aspergillus niger*) en una concentración 1: 2000 y el extracto crudo. Los coagulantes fueron agregados en una proporción de 0.1 ml por ml de leche reconstituida. Se determinó el punto de coagulación en un baño de agua a 35°C siguiendo el procedimiento descrito por la International Dairy Federation (IDF157 A, 1997). Este ensayo se realizó utilizando FPC, extracto crudo y diferentes proporciones de ambos.

Elaboración de quesos de pasta blanda: Se elaboraron quesos de pasta blanda tipo cuartirolo a escala laboratorio, utilizando leche bovina y como coagulante combinaciones de extracto crudo y FPC (60:40 y 40:60 de FPC:EC), y sólo FPC para los quesos control. Se realizó una evaluación preliminar organoléptica de los productos con nueve participantes semientrenados, para elegir una de las proporciones. En la misma se analizó la textura (firmeza, cremosidad y pegajosidad), aspecto físico (color y presencia de aberturas) y gustos (ácido, amargo y salado) de los quesos al final de la maduración. Se repitió la elaboración del queso con la proporción elegida: 40% EC/60% FPC (queso muestra), junto a un control (queso testigo) y luego se les determinó humedad, pH, nitrógeno soluble en agua y nitrógeno total cada cinco días durante veinte días.

Análisis fisicoquímicos de los quesos: El contenido de humedad se determinó por secado de la muestra a 105°C en estufa hasta peso constante de acuerdo a la IDF (estándar 4A, 1982). El pH fue medido en forma directa con un electrodo de vidrio punzante. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

Índice de maduración: El índice de maduración se define como la relación nitrógeno soluble en agua respecto a nitrógeno total (NS/NT). El nitrógeno total y nitrógeno soluble en agua fueron determinados por el micro-método de Kjeldhal (IDF, estándar 20B, 1993).

Actividad caseinolítica: Se utilizó como sustrato caseína bovina al 1% (P/V) en 10 mM de buffer citrato pH 6.2 con azida sódica al 0.03% (p/v). La hidrólisis fue iniciada por el agregado de 120 μ l de solución de enzima (FPC, Extracto crudo y distintas combinaciones de ambos coagulantes) a 3 ml de solución de sustrato, en un baño termostático a 37°C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se detuvo la reacción calentando a 100°C

durante 5 min. Se agregó ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Se centrifugo. Se midió la absorbancia a 280 nm en el sobrenadante. Para simular las condiciones de maduración en los quesos se procedió de igual manera, utilizando buffer citrato de pH 5.2,. La incubación del sustrato y las enzimas se realizó a 10°C. Se tomaron alícuotas a las 4 y 24 horas de incubación. (Silva y Malcata, 2005).

RESULTADOS

En trabajos previos en nuestro laboratorio se encontró que los frutos de *Salpichroa origanifolia* (huevititos de gallo) poseían actividad proteolítica. Por lo tanto se realizaron estudios de los parámetros bioquímicos para determinar las condiciones óptimas para la expresión de su actividad. El pH y la temperatura de máxima actividad fueron 3,5 y 55°C respectivamente. Se determino la estabilidad térmica a distintas temperaturas, y se observo que mantenía el 100% de su actividad durante dos horas a 40°C. (Figura 1). Así también, se probó la incidencia del agregado de calcio, encontrándose que en una concentración 20 mM producía un incremento de la actividad en un 235 %.

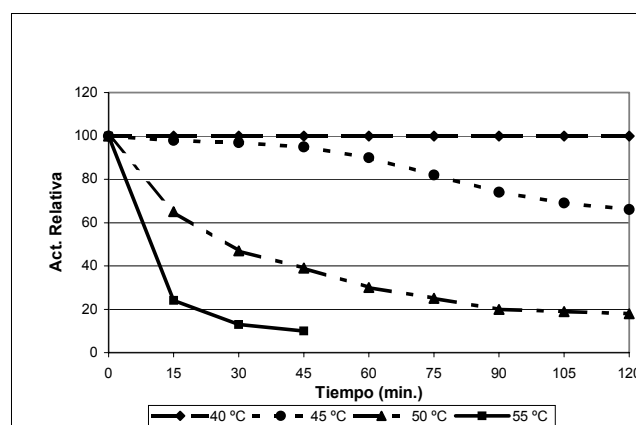


Fig. 1 Estabilidad térmica de la enzima

Se realizó el estudio con inhibidores específicos para determinar a que grupo de endopeptidasas pertenecía la enzima presente en el fruto de esta especie y se observó que pertenecía al grupo de las aspartil endopeptidasas al igual que las enzimas del cardo de Castilla (*Cynara cardunculus*) y las del alcaucil (*Cynara scolymus*), empleadas como cuajo vegetal. (Tabla 1)

Tabla N° 1: Efecto de diferentes inhibidores de la actividad proteolítica sobre los extractos crudos de *Salpichroa organifolia*.

Inhibidores	Concentración	Actividad residual(%)
Control		100
Pepstatina	1uM	7
O-fenantrolina	10 mM	90
PMSF	1mM	84
E-64	10uM	95

Se determinó luego el tiempo de coagulación utilizando distintas proporciones del FPC y EC (Tabla2).

Tabla N° 2: Tiempo de coagulación (según normas FIL) de leche bovina con diferentes proporciones de extracto crudo de *Salpichroa organifolia* y quimosina bovina.

Denominación	Quimosina(%)	Extracto Crudo	T de coag.(min.)
FPC	100	0	3'15''
EC1	80	20	4'00''
EC2	60	40	5'00''
-	50	50	5'25''
EC3	40	60	6'42''
EC4	20	80	11'08''
EC	0	100	40'00''

La hidrólisis de la caseína producida por el FPC, EC puro y diferentes proporciones de los mismos durante el proceso de coagulación puede observarse en la Figura 2 y durante la maduración de los quesos en la Tabla 3.

Tabla N° 3: Actividad caseinolítica durante la maduración (AE)

T/horas	FPC	EC	EC1	EC2	EC3	EC4
4	0	553	219	329	399	462
27	118	1000	596	718	858	926

Los resultados obtenidos durante el proceso de elaboración de los quesos en lo referente a la variación de pH, humedad e índice de maduración total se muestran en las Tablas 4 y 5 y en la Figura 3.

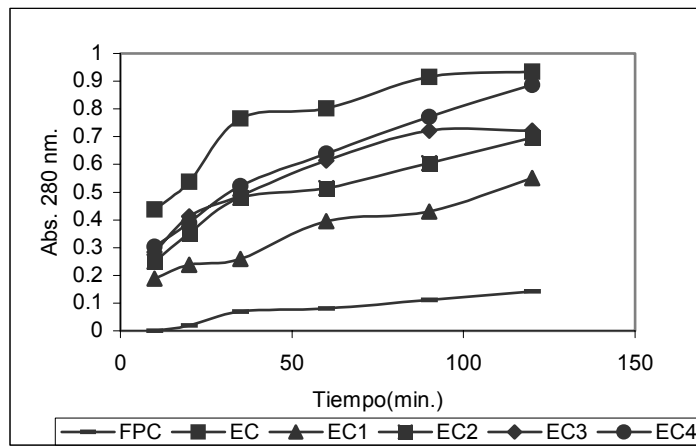


Fig. 2- Actividad caseinolítica en la coagulación

Tabla Nº 4: Evolución del pH durante la maduración

Días de maduración	Queso muestra	Queso testigo
0	5.36	5.25
6	5.12	5.08
13	5.10	5.00
20	5.07	5.00

Tabla Nº 5: Evolución de la humedad durante la maduración (%)

Días de maduración	Queso muestra	Queso testigo
0	58.310 ± 0.034	58.035 ± 0.017
6	57.030 ± 0.024	57.780 ± 0.048
13	56.940 ± 0.001	56.630 ± 0.673
20	56.900 ± 0.003	55.400 ± 0.320

En relación con su textura y aspecto el queso elaborado con el porcentaje del 40% de Extracto Crudo como coagulante resultó similar al testigo. Con respecto a su sabor, la mayoría de los evaluadores consideró que tenía un sabor ligeramente amargo. Esto se puede correlacionar con el índice de maduración ya que a los veinte días el mismo en el queso elaborado con EC es cinco veces superior al del queso testigo (Figura 3). Este comportamiento es similar a otros cuajos de origen vegetal. Por esta razón en la elaboración artesanal de quesos utilizando la enzima del cardo (*Cynara cardunculus*) como coagulante se emplean leche ovina y caprina, lo cual disminuye la percepción del gusto amargo. (Tavaria y col., 2001)

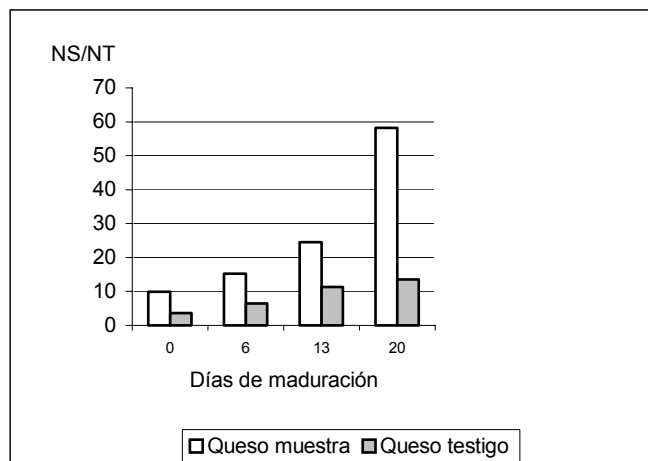


Fig. 3- Índice de maduración (NS/NT)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de la utilización de esta enzima en la elaboración de quesos con distintos tipos de leche y/o en quesos de pasta cocida.

BIBLIOGRAFIA

Anson, L. 1938. The estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22:79-89:

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 :248-254

IDF Standard 4A:1982 – Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content (reference method).

IDF Standard 20B:1993 – Milk. Determination of nitrogen content. Annex to part 3: modified procedure for milk products.

IDF Standard 157A:1997 – Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity.

Silva, S.; Malcata, X. 2005. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. Food Chem. 89:19-26

Tavaria, F.; Sousa, M.; Malcata, X. 2001. Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. Food Chemistry. 72: 79-88.

CULTIVO FED-BATCH DE UNA LEVADURA AUTOCTONA PARA LA VINIFICACION DE JUGO CITRICO

FERREYRA, María M.; SCHVAB, Maria del C.; VAZQUEZ, Maria C.; GERARD; Liliana M.; HOURS, Roque A.

Fac. de Cs. de la Alimentación, UNER. Tavella 1450, (3200) Concordia, Entre Ríos. Argentina
Tel.: (345) 423-1458. Fax: (345) 423-1442. E-mail: ferreyram@fcal.uner.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar parámetros de crecimiento de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, aislada de la flora nativa de jugos cítricos, para usarla en la producción de "vino de naranja". Se realizó cultivo batch y batch alimentado. Se diseñaron los caldos para ambos sistemas de cultivo, las condiciones de trabajo y en el caso del batch alimentado se calculó el caudal de alimentación, fijando el mismo en 2,97 ml/min. Se evaluaron peso seco (MS), sustrato consumido (S_R), producción de etanol, O_2 consumido, CO_2 producido y cociente respiratorio (CR) y en el caso del batch alimentado se evaluó la biomasa total (XV) en función del tiempo de alimentación. Se determinaron los rendimientos ($Y_{X/S}$) para los sistemas batch y batch alimentado, siendo los resultados 0,0594 g X/g glucosa, y 0,561 g X/g glucosa, respectivamente. Como era de esperar en el primer caso, *S. cerevisiae* produjo etanol por efecto Crabtree.

Palabras Claves: *Saccharomyces cerevisiae*- fed-batch- vinificación

ABSTRACT

The objective of this work was to determine growth parameters of a *Saccharomyces cerevisiae* strain, isolated from citrus juice native flora, to be used in the production of "orange juice". Batch and fed-batch culture operations were carried out. Broths for both cultivation systems as well as working conditions were designed, and in the case of fed-batch culture the feeding rate was calculated (2.97 ml/min). Dry weight (MS), substrate uptake (S_R), ethanol and CO_2 production, O_2 consumption and respiratory quotient (CR) were evaluated. In the case of fed-batch, total biomass (XV) as a function of feeding time was estimated

Yields for batch and fed-batch systems were determined, results were 0.0594 g X/g glucose and 0,561 g X/g glucose, respectively. In the first case, as expected, *S. cerevisiae* produced ethanol due to the Crabtree effect.

INTRODUCCIÓN

Para obtener biomasa para uso industrial, se debe optimizar el rendimiento de células viables. Las mismas deben tener actividad biológica y características de supervivencia aceptables.

Para ello es esencial diseñar el caldo de cultivo, conocer el metabolismo y elegir los sistemas de cultivos. *S. cerevisiae* cuando crece en condiciones aeróbicas con glucosa limitante, responde a concentraciones de azúcar por encima de un cierto umbral (> 0.16 g/L), activando el mecanismo de fermentación alcohólica lo que se conoce como efecto Crabtree positivo. (Petrik *et al*, 1983; Van Urk, *et al* 1988; Postma, *et al* 1989) Por lo tanto el rendimiento de la biomasa será menor.

El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones óptimas de cultivo para aumentar el rendimiento de producción de una *S. cerevisiae*, aislada de jugo de naranja, (minimizando el efecto Crabtree). Para esto se usó sistema fed-batch, con baja velocidad de dilución, así la levadura utiliza glucosa sólo oxidativamente produciendo biomasa + CO₂, (Ejiofor, *et al* 1994). Para comparar rendimientos se realizó además un cultivo en batch.

MATERIALES Y METODOS

1.- Sistema discontinuo (Batch)

- Preparación del medio de cultivo base:

Glucosa (10,00 g/L), Urea (2,50 g/L), K₂HPO₄ (1,00 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,60 g/L), CaCl₂·2H₂O (0,10 g/L), Ác. cítrico (0,45 g/L), Sol. de cationes (1 mL), Sol. de aniones (1 mL), Sol. de vitaminas (1 mL), Antiespumante (3 gotas), pH: 5,50 (ajustado con HCl 1 N).
Volumen de cultivo: 3,0 L.

Solución de cationes en g/L: Ác. cítrico (4,5), CuSO₄ (0,10), FeCl₃ (0,10).

Solución de aniones en g/L: H₃BO₃ (0,10), KI (0,10), Na₂MoO₄ (0,10)

Solución de vitaminas: Inositol (6,00 mg/L), Biotina (6,00 mg/L), Ac. fólico (6,00 mg/L), Pantotenato de calcio (0,80 g/L), Tiamina (0,80 g/L), Ac. Nicotínico (0,80 g/L), Ac. .p-amino benzoico (0,40 g/L), Riboflavina (0,40 g/L), Piridoxina (1,60 g/L)

Los fosfatos se prepararon disolviendo la cantidad necesaria para 2,7 L de medio de cultivo, en 500 mL de H₂O ajustando el pH a 5,50 y se esterilizó a 121 °C/15 min. El resto de los componentes (excepto la urea y la solución de vitaminas) se disolvieron en 2,2 L. de H₂O, los microelementos se agregaron en solución concentrada 1000 veces a razón de 1 mL/L, se ajustó el pH a 5,5 y se esterizaron a 121 °C/15 min., en el biorreactor.

Se preparó una solución de urea con 500 g/L y se esterilizó por membrana absoluta. Se adicionó en proporción de 6,0 mL/ L de medio de cultivo.

Las vitaminas se prepararon en solución concentrada 1000 veces, se esterilizaron por filtración y se adicionaron a razón de 1 mL/L de medio.

- **Preparación del inóculo:**

Tres erlenmeyers de 1000 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo completo (excepto urea y vitaminas que se adicionaron en proporción de 0,6 mL y 0,1 mL de las soluciones madres), diluido 2,5 veces se esterilizaron a 121 °C/ 10 min. Los erlenmeyers fueron sembrados el día anterior con levaduras provenientes de un cultivo en agar inclinado. La temperatura de incubación fue en todos los casos de 30°C.

Procedimiento de crecimiento

- Se adicionaron asépticamente las soluciones de fosfatos, urea y vitaminas al resto del medio de cultivo contenido en el biorreactor, se inoculó y luego de 15 min .se comenzó con el muestreo tomando 15 mL de muestra cada hora.

- Se midió el porcentaje de O₂ y CO₂ en lo gases de salida del biorreactor.

Análisis de las muestras

- 10 ml se centrifugaron 15 min/ 10.000 rpm en un equipo Sorvall RCF CHART. En el sobrenadante se determinó la concentración de glucosa, método colorimétrico de glucosa-oxidasa (Wiener Argentina) .y la concentración de etanol, Kit enzimático de BOEHRINGER MANNHEIN / R- BIOPHARMS.

- El pellet de levaduras fue lavado y centrifugado y se resuspendieron las células en agua destilada para determinar peso seco a 105 ° C.

- Se midió pH y DO_{λ620} (peachímetro BOECO BT 500 y espectrofotómetro BECKMAN DH 600). Se controló la contaminación por observación microscópica.

2.- Sistema fed-Batch

Para el diseño de la alimentación se tomó: $\mu_{max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$ y $\mu < 0,3$.a fin de evitar la producción de etanol. Se asume que $Y_{x/s} = 0,45 \text{ g X/g S}$.

Condiciones del cultivo: Volumen inicial: $V_o = 2,7 \text{ L}$. Volumen final: $V_f = 3,9 \text{ L}$., $F = 2,97 \text{ mL/min}$.; Sustrato inicial batch, $S_o = 14,71 \text{ g/L}$. Caudal de aire = 1.820 mL/min. S_o del inóculo = 10 g/L. Peso seco final del batch, $X = 6,81 \text{ g/L}$., Sustrato total consumido, $SR = 63,5 \text{ g/L}$. Tiempo de alimentación, $t_f = 7 \text{ h}$.

Medios de cultivo para la alimentación:

Para 500 mL: Glucosa (63,5 g), Urea (2,2 ml del stock 40 %), K₂HPO₄ (6 g), MgSO₄.7H₂O (3,6 g), CaCl₂.2H₂O (0,6 g), Ác. Cítrico (2,7 g), Sol. de cationes (6 mL), Sol. de aniones (6

mL), Sol. de vitaminas (6 mL), Antiespumante (3 gotas). pH: 5,50 (ajustado con HCl o H₂SO₄ 1 N). Volumen de cultivo: 3,0 L.

El cultivo se inició a partir del cultivo en batch utilizando como sustrato limitante la glucosa, se calculó la evolución de la biomasa, la velocidad específica de crecimiento y la productividad.

RESULTADOS Y DISCUSION

Sistema Batch

S. cerevisiae (Crabtree +) exhibe una cinética de crecimiento de dos fases (diauxia). Durante la primera fase metaboliza la glucosa con producción de etanol, Los datos de rendimientos ($Y_{X/S}$) reportados en esta fase no sobrepasan los 0,1 a 0,15 g X/g glucosa. Debido a la oxidación incompleta de la glucosa, el cociente respiratorio (r_{CO_2}/r_{O_2}) es mayor a 1 (Rose y Harrison, 1987).

En la segunda fase, el etanol formado, sirve de sustrato. El coeficiente respiratorio descende, aproximándose a un valor de 0,66 (teórico). $Y_{X/S}$ alcanza valores de 0,35 g X/g glucosa (Rose y Harrison, 1987).

El seguimiento del cultivo se realizó durante un período de 7,5 h al cabo del cual se pudo apreciar que la levadura utilizó rápidamente la FCE, produciendo etanol (Figura 1).

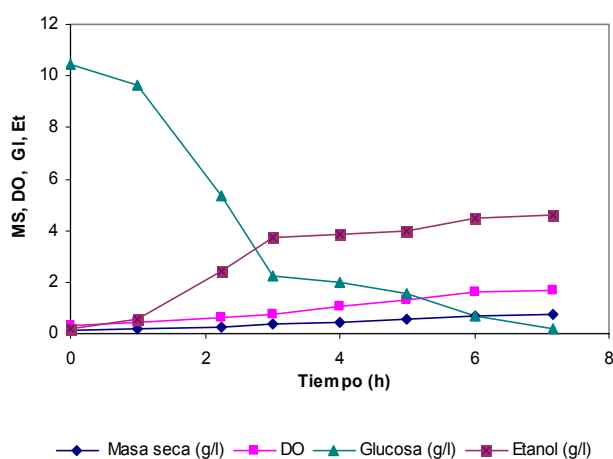


Figura 1: Evolución del cultivo batch de *S. cerevisiae*.

La producción de biomasa fue muy baja, con un leve aumento luego de 3 h de cultivo. La determinación del cociente respiratorio (CR) mediante el análisis de los gases de salida del biorreactor reafirma el mencionado comportamiento de *S. cerevisiae* en cultivo batch (Figura 2).

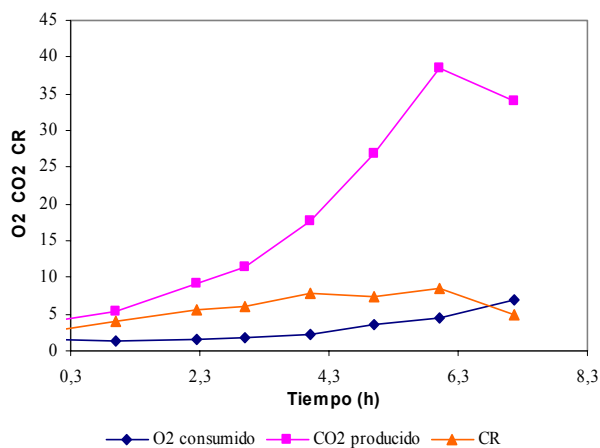


Figura 2: Evolución de los gases de salida y del cociente respiratorio (CR) en cultivo batch de *S. cerevisiae*.

Con los datos de peso seco se determinó que la velocidad específica de crecimiento de la levadura, fue de $0,27 \text{ h}^{-1}$. El rendimiento, determinado como $Y_{x/s} = - \Delta X / \Delta S$ fue de $0,0594 \text{ g X/g glucosa}$.

Para realizar los balances se considera: $\sigma_x = 0,446$ y $\gamma_x = 4,2$, siendo σ_x y γ_x la fracción de carbono del sustrato transferido a la biomasa y el grado de reducción de la biomasa, respectivamente.

Experimentalmente: $y_{x/s} = 0,0691 \text{ cmol/cmol}$; $y_{p/s} = 0,562 \text{ cmol/cmol}$ y $y_{CO_2/s} = 0,389 \text{ mol/cmol}$. Los balances correspondientes para la FCE son:

Balance de Carbono:

$$0,0691 \text{ cmol/cmol} + 0,562 \text{ cmol/cmol} + 0,389 \text{ cmol/cmol} = \mathbf{1,020}$$

Balance de Energía

$$0,0691 \text{ cmol/cmol} \times 4,2/4,0 + 0,562 \text{ cmol/cmol} \times 6,0/4,0 + 0,0596 \text{ cmol/cmol} \times 4,0/4,0 = \mathbf{0,975}$$

Estos valores se encuentran dentro de los límites de aceptabilidad determinados estadísticamente, evidenciando la ausencia de errores experimentales en las determinaciones (Ertola, R. *et al.*, 2001).

Sistema fed-batch

Considerando una biomasa inicial y final de 7 g/L y 15 g/L respectivamente, un volumen inicial y final de $2,5 \text{ L}$ y $4,0 \text{ L}$ respectivamente y un rendimiento de $0,5 \text{ g/g}$, se determina un caudal de $2,97 \text{ mL/min}$ a una concentración de glucosa de $63,5 \text{ g/L}$.

Se inició la alimentación a partir de un batch con una concentración de glucosa de 14,71 g/L y una biomasa de 6,81 g/L.

El crecimiento de biomasa (X_V) en función del tiempo es lineal, lo que es coherente con el diseño de alimentación a caudal constante.

Debido al ingreso de sustrato a velocidad constante, las velocidades de consumo de O_2 y producción de CO_2 mantuvieron valores estables durante todo el cultivo. El CR fue cercano a 1, sin producción de etanol siendo el rendimiento celular mayor que el correspondiente a la fase de consumo de glucosa del batch.

Los balances de Carbono y Energía dieron 1,02 y 1,051 respectivamente, lo que indica que el modelo utilizado respondió muy bien a la realidad del cultivo.

El continuo incremento de biomasa (X_V), y el constante crecimiento de la velocidad volumétrica de (r_{XV}), hicieron que μ disminuyera continuamente durante el cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 1

CONCLUSIONES

De los datos obtenidos puede concluirse que el cultivo batch no es adecuado si el objetivo es producir biomasa ya que el rendimiento obtenido es muy bajo debido al efecto Crabtree positivo. Cabe destacar que la masa celular obtenida para esta cepa, aproximadamente 0,06 g X/g de glucosa, fue marcadamente inferior al promedio encontrado en bibliografía para esta cepa que es de entre 0,1 y 0,15 g X/g de glucosa (Rose and Harrison, 1987) El rendimiento celular (0,561g X/g) se incrementó en batch alimentado.

S. cerevisiae es una de las especies de levaduras Crabtree positivas. Por lo tanto, y en base a los análisis bioquímicos y fisiológicos, como así también del examen de las características enológicas realizados en estudios previos afirmarían que se trata de esta especie.

BIBLIOGRAFIA

Ertola, R. Yantorno, O. y Mignone, C., (1994). Microbiología Industrial. OEA. Washington, D.C.

Petrik, M.; Käpeli, O. and Fiechter, A. (1983). An expanded concept for the glucose effect in the yeast *S. uvarum*: involvement of short and long term regulation. J. Gen Microbiol 129: 43-49.

Postma, E.; Verduyn, C.; Scheffers, W. A. and Van Dijken, J.P. (1989) Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Culture of *Saccharomyces*

cerevisia Rose, A.H.; Harrison, J.S. (1987). The Yeast. Vol 2. Yeast and the Environment Academic Press. London

Van Urk, H.; Voll; W. S.; Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P.(1990) Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeast. Applied and Environmental Microbiology, p 281-287

Volumen final = 3.900 mL Caudal de alimentación = 2,97 ml/min o 178 mL/h So batch = 14,717 g/L Caudal de aire = 1.820 mL/min						So del inóculo = 10 g/L Peso seco final del batch = 6,81 g/L SR = 63,5 g/L								
Alimentación.														
Muestra	Tiempo (h)	Vol. alic. (mL)	Volumen (mL)	PS (g/L)	X.V. (g)	%O2	%CO2	rO2 (mmol/l.h)	rCO2 (mmol/l.h)	CR	rO2 . V (mmol/h)	rCO2 . V (mmol/h)	μ	μ teórico
1	0	30	2698	6,81	18,37	18,08	2,43	51	40,7	0,8	137,7	109,7	0,345	0,345
2	1	32	2844	7,46	21,22	17,89	3,45	48,4	55,3	1,14	137,75	157,38	0,299	0,257
3	2,5	30	3081	10,36	31,92	17,01	3,6	60,1	52,8	0,88	185,03	162,72	0,199	0,185
4	4	65	3283	13,13	43,11	18,75	2,3	31	31,8	1,03	101,66	104,54	0,147	0,145
5	5,5	35	3515	14,14	49,7	18,32	2,9	34	37,6	1,11	119,41	132,09	0,128	0,119
6	7	30	3752	16,33	61,27	17,87	3,2	37,7	38,8	1,03	141,45	145,48	0,103	0,101
7	8	30	3900	17,72	69,11	17,6	3,37	39,7	39,2	0,99	154,74	153,02	0,092	0,092

CO2 total producido = 1108,96 mmoles
O2 total consumido = 1104,4 mmoles
SR . (Vf-Vi) (Sustrato total consumido) = 90,42 g
Yx/s = 0,561 g/g
yx/s = 0,652 cmol/cmol
y co2/s = 0,36794
b = 0,36642
Balance de C = 1,02
Balance de Grado de Reducción = 1,051

Biomasa total en función del tiempo de alimentación

$y = 6,4178x + 16,428$
 $R^2 = 0,984$

Tabla 1: Resultados cultivo fed batch *S. cerevisiae*

PECTINESTERASA DE *ASPERGILLUS KAWACHII*: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACION PARCIAL.

VITA, Carolina E., CONTRERAS-ESQUIVEL, Juan C., VOGET, Claudio E. y HOURS, Roque A.

CINDEFI (CONICET – UNLP), Fac. de Cs. Exactas, UNLP. 47 y 115. (1900) La Plata, Argentina. Tel./fax: (221) 483-3794. E-mail:<hours@biotec.org.ar>

RESUMEN

Se purificó la pectinesterasa (PE) de *Aspergillus kawachii* (IFO 4308) a partir de un medio de cultivo líquido con pectina como fuente de carbono y energía e inductor. El sobrenadante concentrado y desalinizado se purificó mediante cromatografías de intercambio catiónico, aniónico y catiónico con gradiente expandido. Se obtuvo un único pico de actividad PE de 39,5 kDa (SDS-PAGE). El zimograma reveló que la banda posee actividad de PE. El M_w de PE (filtración por gel, columna S-100) fue de 59 kDa.

La enzima probablemente no está glicosilada (no se retiene en Concavalina A). Su pH óptimo es 4,5. Posee un 25% de su actividad máxima a pH: 2, propiedad inusual para las PE y que la diferencia de la de *A. niger*, dándole potencial uso en la clarificación de jugo de limón. La PE mantuvo el 70% de actividad residual luego de 1 h a 50°C, siendo inactivada a 70°C.

ABSTRACT

Pectinesterase (PE) from *Aspergillus kawachii* (IFO 4308) was purified from a liquid culture with pectin as carbon and energy source and inducer. The concentrated and desalted supernatant was purified using different cationic, anionic and cationic with expanded gradient chromatographies. A single peak of 39.5 kDa (SDS-PAGE) with PE activity was obtained. The zimogram revealed that the band shows PE activity. The M_w of PE (gel filtration, S-100 column) was 59 kDa.

The enzyme is probably not glycosilated (it is not retained by Concavalin A). Its optimal pH is 4.5. It shows a 25% of the optimal activity at pH: 2, an unusual characteristic for the PEs, which make it different from *A. niger* PE, and which gives it a potential use for the clarification of lemon juice. PE retained 70% of residual activity alter 1 h at 50°C, being inactivated at 70°C.

Palabras claves: pectina, pectinesterasa, purificación, *A. kawachii*

INTRODUCCIÓN

Las pectinesterasas (PE, EC 3.1.1.11) pertenecen al grupo de las enzimas desesterificantes producidas por plantas, algunas bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Las PE juegan un rol importante en tecnología de alimentos debido a su actividad sobre diversas materias primas vegetales.

Se utilizan en combinación con otras pectinasas (poligalacturonasas y/o pectato liasas) para depolimerizar pectina tanto en procesos de clarificación de jugos de fruta como en la reducción de viscosidad de algunos productos alimenticios.

También hay casos en los cuales las PE se utilizan solas (elaboración de pectinas de bajo metoxilo) (Fogarty and Ward, 1972, 1974; Ishii *et al.*, 1979; Neubeck, 1975) o clarificación de jugos cítricos particularmente de limón (Neubeck, 1975; Pilnik and Rombouts, 1981). En cambio, los jugos de manzana y de uva pueden ser clarificados por las acciones complementarias de PE con otras pectinasas (Baumann, 1981). El mecanismo de clarificación enzimática de jugos cítricos ocurre espontáneamente en algunos casos debido a la presencia de PE endógena. Sin embargo, el proceso es lento, por lo cual se hace necesario agregar cantidades suplementarias de enzimas comerciales que deben ser activas al pH del jugo a clarificar.

La actividad óptima de las PE comerciales se encuentra generalmente en el rango de pH de 4 a 7 (Nyiri, 1968), por lo que se hace necesario utilizar productos especiales que presenten actividades y estabilidades enzimáticas significativas en bajos valores de pH. Información obtenida de empresas nacionales elaboradoras de jugos cítricos revela que actualmente el proceso de clarificación de jugo de limón presenta serios inconvenientes debido a la escasa actividad y estabilidad de los preparados comerciales actualmente en el mercado. Por ello, la posibilidad de utilizar una PE con altas actividades y estabilidades en rangos de pH bajos resulta sumamente atractiva, no sólo desde el punto de vista académico sino también considerando su potencial aplicación industrial.

Aspergillus kawachii es un hongo filamentosos que produce diferentes enzimas extracelulares ácido-estables, con rangos de actividad a pHs muy bajos. Así parecería interesante aislar, purificar y caracterizar la PE producida por este hongo. La misma podría presentar propiedades adecuadas para su aplicación en procesos de clarificación de jugos cítricos, particularmente de limón, donde se requiere el uso de enzimas con altos valores de actividad y estabilidad a pHs muy bajos (alrededor de 2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un cultivo líquido de *A. kawachii* (IFO 4308), de 42 h, para la purificación de la PE. El medio de cultivo contenía pectina (5 g/l) como fuente de carbono y energía (FCE) e inductor, triptona (2 g/l) y sales (Mikami *et al.*, 1987). El pH inicial fue ajustado a pH: 4.

La cepa stock se repicó en agar papa glucosado para obtener esporos en cantidad y condición adecuada (7 d, 30°C). Los esporos se resuspendieron en solución estéril de Tween 80 al 0,05 % y se utilizaron para inocular frascos de 1000 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo en una concentración de 10^6 esporos/ml. Los frascos se incubaron a 30°C, en shaker rotatorio a 200 rpm, durante 42 h. Transcurrido dicho tiempo, los medios fueron filtrados por tela de nylon para separar el micelio. El filtrado se centrifugó a $6000 \times g$, 10 min, para eliminar los sólidos residuales. El sobrenadante (2,750 l) se llevó a pH: 5,0 y se concentró por rotavapor a 30°C (27.5 x). Luego se realizó una precipitación con 2,5 vols. de acetona a 4°C durante 6 h. El precipitado se separó por centrifugación ($6000 \times g$, 20 min) se descartó el sobrenadante y se resuspendió durante 12 h con 15 ml buffer acetato de Na, pH: 5. Este concentrado se filtró por una membrana de fibra de vidrio (0,45 μ m de diámetro de poro). Luego se desalinizó a través de una columna G-25 previamente equilibrada con buffer citrato de Na (20 mM, pH: 3). Este extracto se inyectó en una columna SP (2,6 x 15 cm) equilibrada con buffer citrato de Na (20 mM, pH: 3). Se realizó un gradiente de 2 volúmenes de columna con buffer citrato de Na (20 mM, pH: 3, 0,5 M ClNa). El eluato se desalinizó (G-25) con buffer acetato de Na, pH: 5. El eluato con actividad PE se inyectó en una columna Q (2,6 x 10 cm) equilibrada con buffer acetato de Na (20 mM, pH: 5). Se eluyó con un gradiente de 0 a 0,5 M de ClNa en buffer acetato de Na, pH: 5. Luego de desalinizar, se inyectaron 25ml de eluato a la columna SP (2,6 x 15 cm) con un nuevo gradiente de ClNa, pero ahora expandido de 0,1 a 0,25 M en buffer citrato, 20 mM pH 3 (3 volúmenes de columna). Se dializó en buffer acetato de Na, 5 mM (volumen post diálisis: 30,7 ml). El PM de PE se determinó en una columna S-100 de exclusión molecular. Todas las cromatografías se realizaron en sistema AKTA-FPLC.

El seguimiento de la purificación se realizó por SDS-PAGE en unidad Mighty Small II (Hofer SE 260) de acuerdo a Smith (1984). También se realizó una electroforesis nativa y su correspondiente zimograma (superposición del gel nativo con gel de pectina en agarosa al 0,1%, a 37°C, durante 1 h y luego revelado con rojo de rutenio al 0,01 %). La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry *et al.* (1951).

Inicialmente, la actividad de PE de los extractos de cultivo se determinó espectrofotométricamente a 614 nm, utilizando una solución de pectina al 0,5%, pH 5,1 y

verde de bromocresol como indicador del cambio de pH (Vilariño *et al.*, 1993). También esta medición se utilizó para la realización del screening de las corridas cromatográficas durante la purificación de la PE. Para medidas confirmatorias se utilizó la medición del metanol liberado por la PE según Wood and Siddiqui (1971). Como se observó que esta técnica tiene problemas de reproducibilidad se utilizó una técnica enzimática (Klavons and Bennet, 1986) para determinar el metanol liberado. Estas dos últimas técnicas utilizan pectina cítrica (solución al 0,5% pH: 5 en buffer citrato de Na, 20 mM). Una unidad de actividad PE se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un μmol de metanol por min en las condiciones de reacción establecidas.

La influencia del pH sobre la actividad de la PE se determinó utilizando buffer citrato de Na, 20 mM, desde pH: 2 hasta 6.

La termoestabilidad de la PE se determinó en buffer citrato de Na (20 mM, pH: 5) durante 1 h, para temperaturas desde 0 hasta 80°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se seleccionó un medio con pectina como FCE para la obtención y posterior purificación de la PE. Este medio presentó menor variedad de sustancias contaminantes (restos de componentes y a su vez menor actividad de otra enzimas) que cuando se utilizó cáscara de limón como FCE, a pesar de que los niveles de PE eran similares en ambos medios.

La PE se purificó a partir de 2,75 l de filtrado. Las diferentes corridas cromatográficas se muestran de las Figs. 1, 2 y 3, donde se indican los picos correspondientes a la actividad PE.

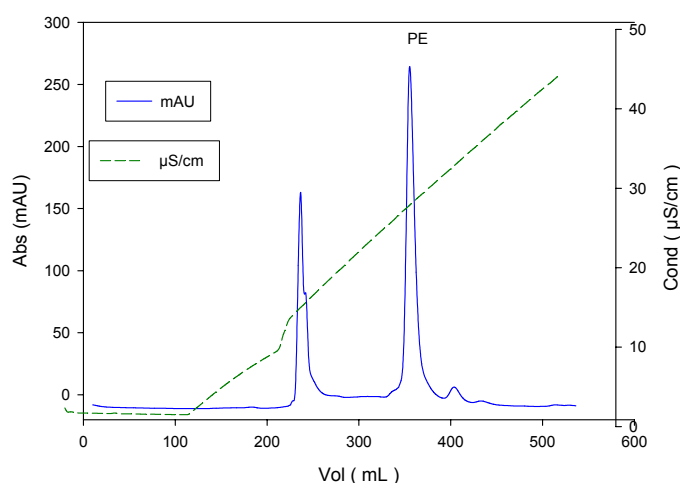


Figura 1. Cromatografía en SP-Sepharosa.

De la purificación cromatográfica se obtuvo un único pico de actividad PE, que se corresponde a una banda como se observa en la Fig. 4 (izquierda: corrida electroforética nativa, derecha: zimograma). En SDS-PAGE la proteína presentó un PM de 39,5 kDa.

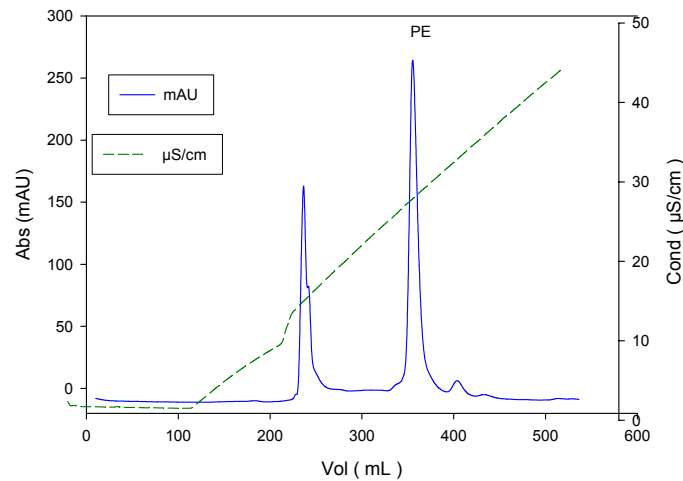


Figura 2. Cromatografía en Q-Sepharosa.

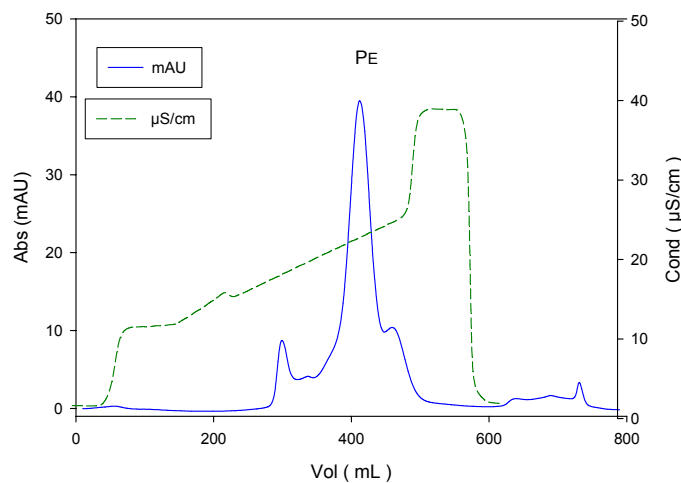


Figura 3 Cromatografía en SP-Sepharosa con gradiente expandido.

Por otra parte, se determinó el PM utilizando la columna S-100, que resultó de 59 kDa. Se desconoce la causa de la diferencia entre los PM obtenido por los 2 métodos descritos. El PM obtenido por SDS-PAGE es similar a otras PE tanto de origen fúngico como de plantas.

También se trató de determinar si la PE se encontraba glicosilada mediante una columna de Concanalina-A, hallándose que la misma no se retiene. Esto sugeriría que la PE de *A. kawachii* no estaría glicosilada.

El efecto del pH se muestra en la Fig. 5. Los ensayos se llevaron a cabo a partir de la muestra obtenida del protocolo de purificación, luego de ser dializada en buffer acetato de

Na (5 mM, pH: 5). Como se puede observar, el pH óptimo es de 4,5. Cabe destacar que se encontró una actividad relativa del 25% a pH: 2,0, característica que reviste importancia para el potencial uso de la enzima en la clarificación de jugo de limón (con pH cercano a 2). Esta característica la distingue de la PE de *A. niger* (comercial) ya que la actividad relativa de esta enzima es mucho menor que la PE de *A. kawachii*. Adicionalmente, la enzima mostró una termostabilidad moderada adecuada para su uso en la clarificación industrial de jugo de limón (Fig. 6).

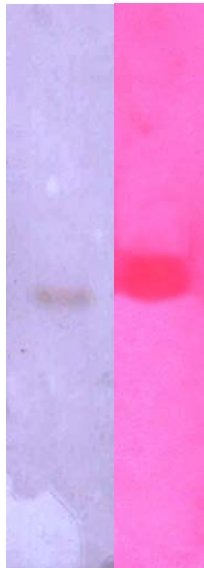


Figura 4: Análisis de PE de *A. kawachii*. Izquierda: electroforesis nativa en PAGE. Derecha: Zimograma en gel de agarosa con pectina al 1%. Revelado con Rojo de Rutenio.

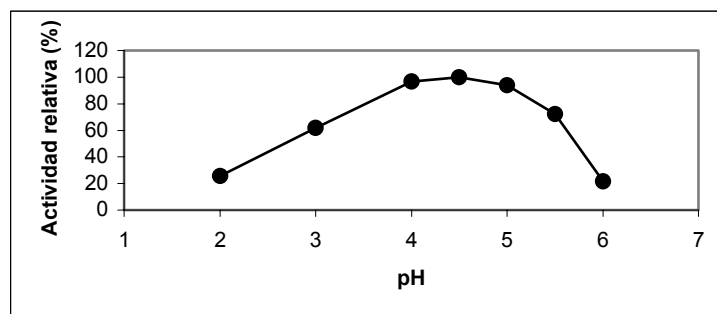


Figura 5: Efecto del pH sobre de la actividad de PE de *A. kawachii*.

CONCLUSIONES

Se logró la purificación de la PE de *A. kawachii* a partir de un cultivo líquido con pectina como FCE e inductor. El pH óptimo de PE es 4,5 y su PM es de 39,5 kDa (SDS-PAGE) y de 59 kDa (S-100). Esta PE posee una actividad relativa del 25% a pH: 2, la cual es una característica importante como para considerarla para su uso potencial en la clarificación

de jugo de limón, cuyo pH es cercano a 2. Se realizarán estudios posteriores para una mejor caracterización de la enzima, además de ensayos de clarificación de jugo de limón.

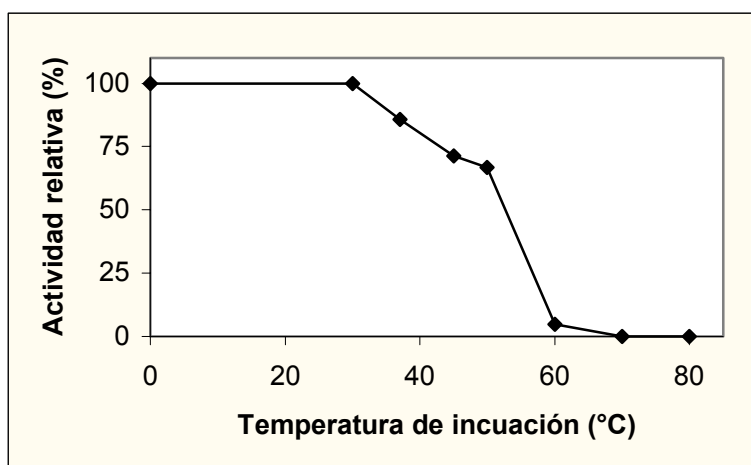


Figura 6: Efecto de la temperatura sobre la actividad remanente de PE luego de 1 h de incubación.

BIBLIOGRAFÍA

Baumann, JW (1981). Application of enzymes in fruit juice technology. In: Birch, GG; Blakebrough, N and Parker, KJ (Eds.). Enzymes and Food Processing. London: Applied Science Publishers Ltd., pp. 129-47.

Fogarty, WM and Ward, OP (1972). Pectic substances and pectinolytic enzymes. Process Biochem. 7, 8, 13-7.

Fogarty, WM and Ward, OP (1974). Pectinase and pectic polysaccharides. In: Hockewhull, DJD (Ed.). Progress in Industrial Microbiology, Vol. 13. Edinburgh: Churchill Livingstone Press, pp. 59-119.

Ishii, S; Kiho, K; Sugiyama, S and Sugimoto, H (1979). Low methoxyl pectin prepared by pectinesterase form *Aspergillus japonicus*. J. Food Sci. 44, 2, 611-4.

Klavons, JA and Bennet, RD (1986). Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. J. Agric. Food Chem. 34, 597-599.

Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Mikami, S; Iwano, K; Shinoki, S and Shimada, T (1987). Purification and some properties of acid-stable α -amylases from shoshu koji (*Aspergillus kawachii*). Agric. Biol. Chem. 51, 2495-2501.

Neubeck, CE (1975). Fruits, fruits products, and wines. In: Reed, G (Ed.). Enzymes in Food Processing (2nd edn). New York: Academic Press, pp. 397-442.

Nyiri, L (1968). Manufacture of pectinases. Process Biochem. 3, 27-30.

Pilnik, W and Rombouts, FM (1981). Pectic enzymes. In: Birch, GG; Blakebrough, N and Parker, KJ (Eds.). Enzymes and Food Processing. London: Applied Science Publishers Ltd., pp. 105-28.

Smith, BJ (1984). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker JM (Ed.). Methods in Molecular Biology, Vol.1: Proteins. The Humana Press Inc., Clifton, NJ, p. 41-56.

Vilariño, C, Hours, RA and Cascone, O (1993) Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. Food Sci. Technol. 26, 107-110.

Wood, PJ and Siddiqui, IR (1971). Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. Anal. Biochem. 39, 418-428.

MACERACION DE PAPA CON PROTOPECTINASA-SE DE *GEOTRICHUM KLEBAHNII*

CARNÉ, Martín; CAVALITTO, Sebastián F. y HOURS, Roque A.

CINDEFI (CONICET – UNLP). Fac. de Cs. Exactas, UNLP. 47 y 115. (1900) La Plata, Argentina. Tel./fax: (221) 483-3794. E-mail: <hours@biotec.org.ar>

RESUMEN:

Se estudió la maceración de papa con protopectinasa-SE de *G. klebahnii*, una endopoligalacturonasa que libera pectina soluble a partir de protopectina de la laminilla media de los tejidos vegetales.

Los ensayos se hicieron con cilindros de papa, en baño de movimiento alternativo. El máximo de macerado se obtuvo a pH: 3,5. La cinética de maceración fue rápida hasta los 30 min con un máximo de macerado a los 120 min. Con 100 golpes/min casi no hubo maceración, con 125 golpes/min comienza la maceración, y entre 150 a 240 golpes/min se logran valores máximos. La concentración de enzima influyó no linealmente en la velocidad de maceración y en los valores finales. A 37°C se obtuvieron los mejores resultados. La observación microscópica mostró acúmulos de 2-4 células y células libres sin mayores daños. La maceración a bajo pH previene la contaminación microbiana e inhibe la acción nociva de la polifenoloxidasa nativa.

Palabras claves: *Geotrichum klebahnii*, protopectinasa, maceración, papa.

ABSTRACT:

Maceration of potato with protopectinase-SE from *G. klebahnii*, an endo-polygalacturonase able to release soluble pectin from the middle lamella protopectin in plant tissues was studied.

Assays were carried out with potato cylinders, in a reciprocating shaker. Maximal macerating activity was found at pH: 3.5. Maceration kinetics was fast up to 30 min, with a maximum of maceration at 120 min. There was not maceration with 100 strokes/min, but it starts at 125 strokes/min with maximal values between 150 to 240 strokes/min. Enzyme concentration affected not linearly maceration rate and final values of macerate. The best results were obtained at 37°C. Microscopic observation showed small aggregates of 2-4 cells and free cells without significant damages. Maceration at low pH values prevents microbial contamination and inhibits the negative action of native polyphenoloxydase.

INTRODUCCIÓN

La industria procesadora de alimentos vegetales utiliza preparados enzimáticos para desintegrar tejidos. Dichos preparados pueden clasificarse en dos tipos: a) los que degradan totalmente el material vegetal (mezclas de celulasas, hemicelulasas y pectinasas) y b) los que actúan preferentemente sobre la laminilla media. Los preparados del tipo a) se utilizan para la elaboración de purés (tomate, por ej.) y para mejorar el rendimiento en la obtención de jugos, en tanto que los del tipo b) producen una mezcla de células libres y/o pequeños acúmulos celulares de aplicación en la producción de bases para néctares y alimentos para bebés y gerontes (Rombouts and Pilnik, 1978).

La degradación específica de la laminilla media de los tejidos vegetales es llevada a cabo por un grupo particular de enzimas pécticas llamada protopectinasas. La protopectina es la sustancia péctica insoluble presente en los tejidos vegetales que por degradación restringida origina pectina soluble. El término protopectinasa (PPasa) se adjudicó originalmente al grupo de enzimas capaces de hidrolizar o disolver protopectina, liberando pectina soluble con la resultante separación de las células del tejido vegetal (Brinton *et al.*, 1927). De este modo, las PPasas constituyen un grupo heterogéneo de enzimas con diferentes actividades catalíticas. Dentro de ellas, las enzimas pécticas y las glican hidrolasas ocupan los roles más importantes (Sakai, 1992). Las PPasas poseen una característica en común. Todas ellas presentan una mucha mayor afinidad sobre sustratos insolubles que sobre sus equivalente solubles, propiedad que es muy deseable en preparaciones para la maceración de tejidos vegetales.

G. klebahnii es un hongo levaduriforme productor de PPasa-SE, una endopoligalacuronasa con actividad solubilizadora de pectina sin que simultáneamente se produzca la degradación de la pectina solubilizada. Esta propiedad es importante en la maceración de ciertos vegetales utilizados en la elaboración de algunos purés (papa) ya que el producto presenta mejores propiedades reológicas por la presencia de células enteras y pectina residual.

En este trabajo se estudió la maceración de papa con extractos crudos de cultivos de *G. klebahnii* bajo diferentes condiciones de proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo, medios, inóculos y condiciones de cultivo. Se utilizaron los métodos descritos previamente por Cavalitto *et al.* (2000) para el cultivo *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397 y producción de la enzima.

Medida de la actividad enzimática. La actividad poligalacturonásica (PGasa) de PPasa-SE se ensayó de acuerdo a la técnica reportada por Cavalitto *et al.* (1999). Una unidad PGasa se definió como la actividad que libera un poder reductor equivalente a 1 μmol de ácido galacturónico a 37°C por minuto.

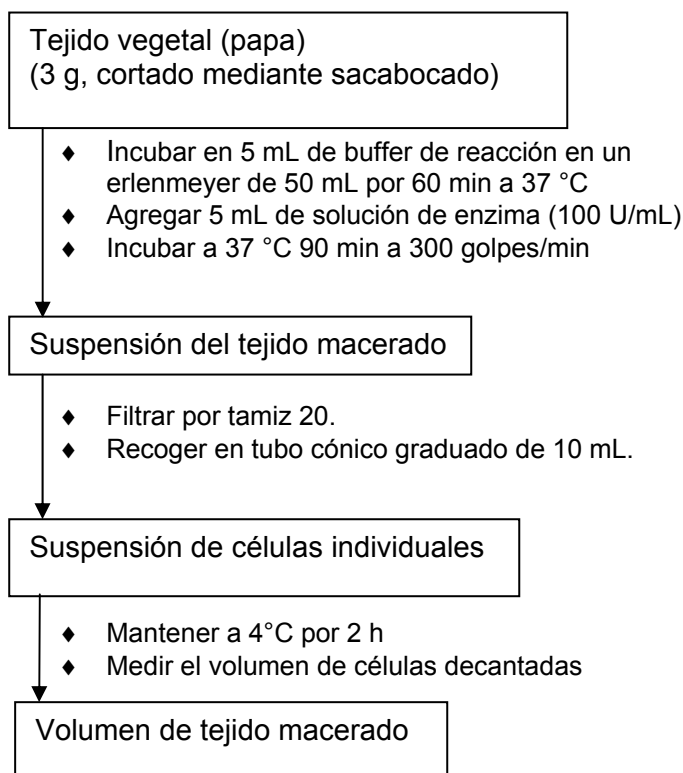


Figura 1: Esquema del proceso de maceración de tejido de papa.

Ensayos de maceración. Los ensayos se hicieron sobre cilindros de papa ($\phi = 4 \text{ mm}$). En la Fig. 1 se muestra el diagrama básico del proceso de maceración de papa con PPasa-SE. En todos los casos, se efectuaron blancos de reacción con enzima inactivada por calor. El efecto del pH del buffer de reacción se estudió en el rango de pH: 2 a 6, en buffer citrato / fosfato (BCP) a diferentes concentraciones de buffer. Además, se estudió el efecto de la velocidad de agitación del shaker (modelo Dubnoff, Vicking, de tipo vaivén, con 2,5 cm de amplitud) en el rango desde 100 hasta 240 golpes por minuto. El efecto de la concentración de enzima se estudió en el rango de 20 a 160 unidades/mL. Finalmente, se estudió el efecto de la temperatura de incubación (30, 37 y 45 °C). En todos los casos, el resultado de la maceración se cuantificó por medida del volumen de tejido macerado que pasa un filtro de 20 mesh luego de una decantación de 2 h a 4°C, conforme a lo reportado por Nakamura *et al.* (1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 2 se muestran los resultados obtenidos a diferentes pHs del medio de reacción en BCP (25 mM citrato, 12,5 mM en fosfato) en 60 min de reacción. Los mayores valores de tejido macerado se obtienen en el rango de pH: 3,5 - 3,9, valores estos en los cuales no se observó pardeamiento del tejido por efecto de la polifenoloxidasas nativa de la papa. Resulta interesante resaltar que PPasa-SE posee diferentes pHs óptimos de acuerdo al sustrato sobre el que actúe: 5,5 sobre ácido poligalacturónico y 5 sobre protopectina de limón. Las características del sustrato condicionarían el mecanismo de reacción de PPasa-SE que de este modo es afectado por el pH del medio. No existen estudios detallados que expliquen en más profundidad este fenómeno.

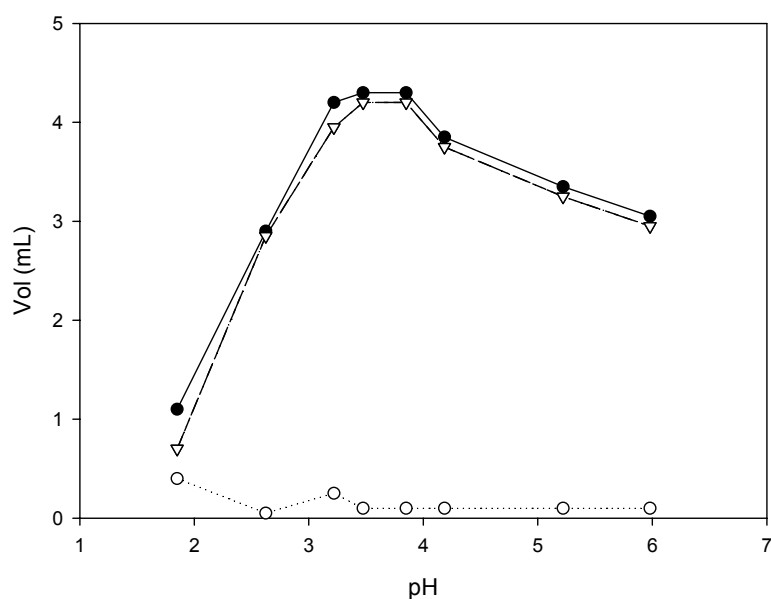


Figura 2: Efecto del pH sobre la maceración de papa con protopectinasa-SE. En todos los casos, el tiempo de reacción fue de 60 min, la agitación 200 golpes/min, 37°C, en buffer citrato-fosfato (25 mM y 12,5 mM, respectivamente).

Se estudió el efecto de la concentración del BCP (BCP original, uno 2 × y otro 4 ×). El aumento en la concentración de buffer resultó en valores algo menores de volúmenes de tejido macerado. Es muy probable que al tratarse de una reacción enzimática en sistema heterogéneo, la adsorción de la enzima sobre el sustrato insoluble esté afectada por la fuerza iónica del medio, cuyo aumento disminuya la fracción de enzima adsorbida sobre la papa.

La cinética de maceración al pH óptimo y con el BCP original se muestra en la Fig. 3. La velocidad de maceración decrece con el tiempo de reacción, alcanzándose un máximo de tejido macerado a los 120 min de proceso. Sin embargo, entre los 60 y los 120 min el aumento del volumen de tejido macerado es del orden del 13 % del valor final, por lo que no resultaría conveniente en un proceso industrial considerando la productividad global del mismo. Por lo tanto, se decidió fijar el tiempo de reacción en 60 min para los siguientes experimentos.

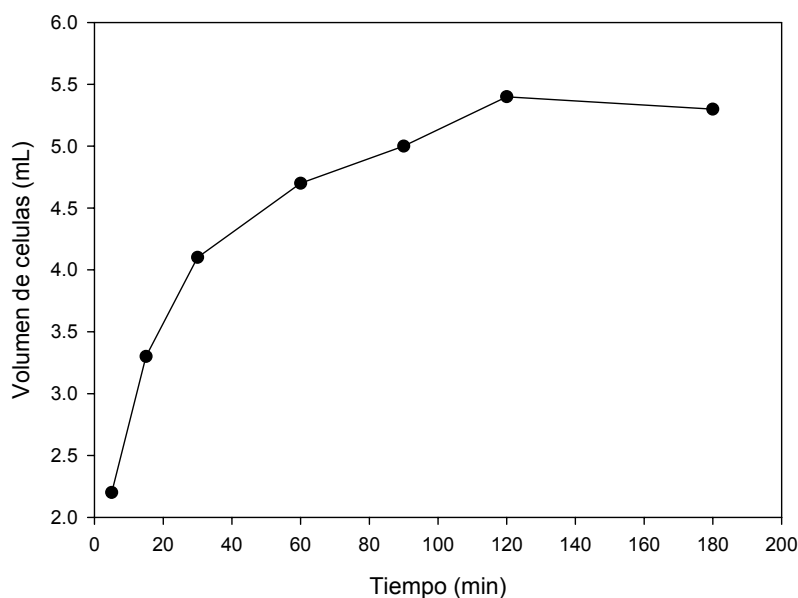


Figura 3: Cinética de maceración de papa con protopectinasa-SE, a 240 golpes/min, a 37°C, en buffer citrato-fosfato (25 mM y 12,5 mM, respectivamente).

En la Fig. 4 se muestran las cinéticas de maceración a diferentes velocidades de agitación. Con 100 golpes/min casi no hubo maceración. Con 125 golpes/min la maceración se hace evidente, y en el rango de 150 a 240 golpes/min se logran los valores máximos y muy similares en cada caso. Resulta evidente que hace falta un esfuerzo de corte mínimo para que el tejido sometido al tratamiento enzimático se macere como lo menciona Biekman (1992) y este esfuerzo estaría dado en nuestro caso entre los 100 y 125 golpes/min.

El efecto de la concentración de enzima se estudió en el rango desde 20 hasta 160 unidades/mL (Fig. 5). La concentración de enzima influyó tanto en la velocidad de maceración como en los valores finales, pero no linealmente. Este fenómeno podría estar relacionado con el proceso de difusión de la enzima dentro del tejido vegetal, factor que podría limitar la velocidad de maceración del mismo.

Finalmente, se estudió el efecto de la temperatura sobre la maceración (Fig. 6). A 37°C se obtuvieron los mejores resultados; a temperaturas mayores (45°C) se obtiene una mayor velocidad de maceración a tiempos cortos (hasta 30 min) pero luego ocurre una pérdida

de actividad probablemente por inactivación de la enzima. A 30°C se observa una menor velocidad de maceración, con valores finales que a tiempos mayores se asemejan a los alcanzados a 37°C.

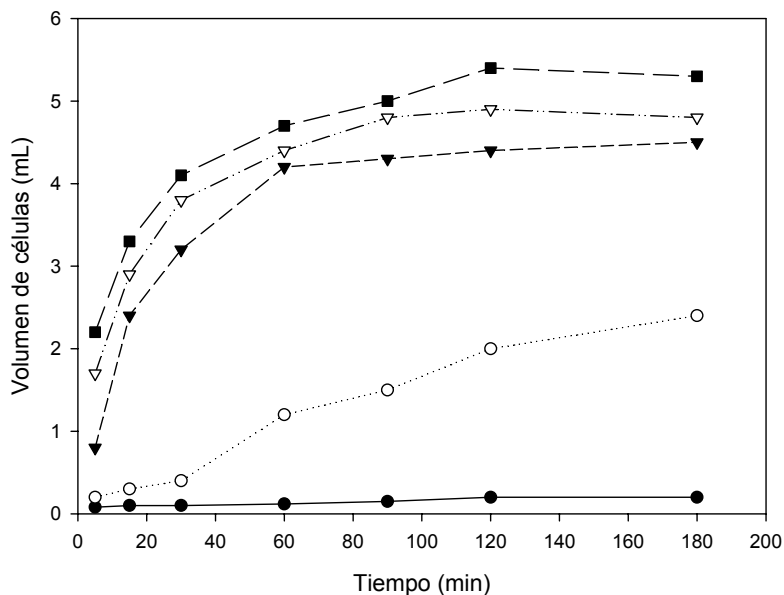


Figura 4: Efecto de la agitación sobre la maceración de papa con protopectinasa-SE, a 37°C, en buffer citrato-fosfato (25 mM y 12,5 mM, respectivamente). ● 100, ○ 125, ▼ 150, △ 200 y ■ 240 golpes/min.

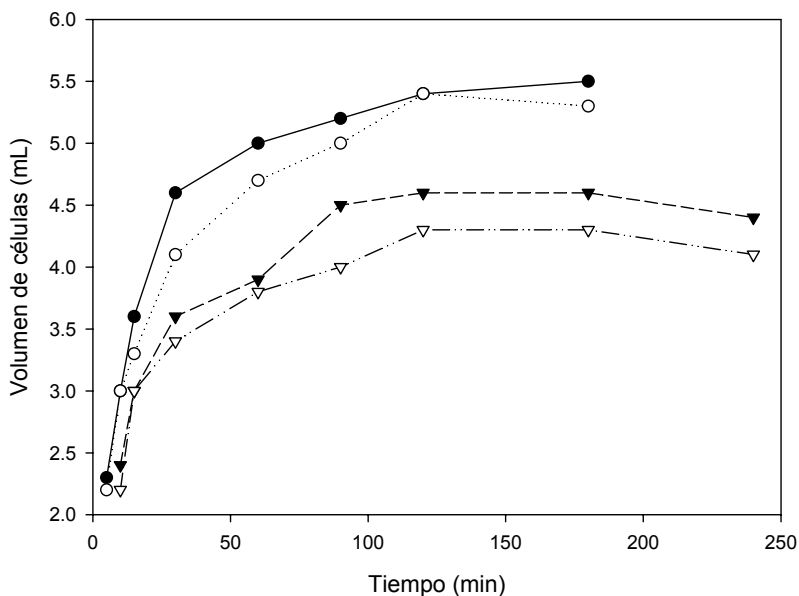


Figura 5: Efecto de la concentración de protopectinasa-SE sobre la maceración de papa, a 37°C, en buffer citrato-fosfato (25 mM y 12,5 mM, respectivamente). △ 20, ▼ 40, ○ 80, y ● 160 UE.

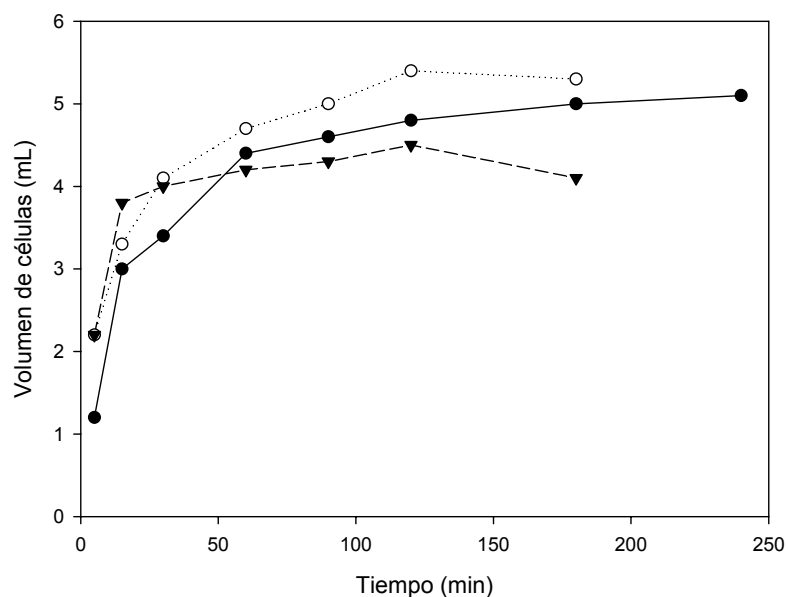


Figura 6: Efecto de la temperatura sobre la maceración de papa con protopectinasa-SE, a 240 golpes/min, en buffer citrato-fosfato (25 mM y 12,5 mM, respectivamente). ● 30°C, ○ 37°C y ▼ 45°C.

CONCLUSIONES

PPasa-SE macera tejidos de papa de modo rápido, obteniéndose una mezcla de células libres y pequeños acúmulos celulares con casi nula ruptura de células. Esto se debe a que su actividad se centra particularmente en la laminilla media (protopectina) que cementa el tejido. Además, el pH óptimo de reacción impide que la polifenoloxidasas nativa del tejido actúe originando productos oscuros. Se estima que esta enzima puede ser de utilidad en la elaboración de macerados de papa con potencial utilización en tecnología de alimentos.

BIBLIOGRAFIA

- Biekman, ESA. 1992.** Enzymatic maceration of potatoes for the production of instant dried mashed potato. Modeling of the disintegration process. *Food Biotech.* 6, 19-33.
- Brinton, CS; Wichmann, HJ; Willaman, JJ; Wilson, CP and Dore, WH. 1927.** Definitions written by the Committee on Nomenclature of pectin of the Agriculture-food Division. *J. Am. Chem. Soc.* 49, 37-39.
- Cavalitto SF, RA Hours and CF Mignone. 1999.** Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotech. Tech.* 13: 385-390.
- Cavalitto, SF; Hours, RA and Mignone, CF. 2000.** Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *J. Indust. Microb. Biotech.* 25, 260-265.

Nakamura, T; Hours, RA and Sakai, T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. J. Food Sci. 60, 3, 468-472.

Sakai, T. 1992. Degradation of pectins. In: Microbial degradation of natural products. G. Winkelmann (Ed.), p 57-81. VCH, Weinheim.

Rombouts, FM and Pilnik, W. 1978. Enzymes in fruit and vegetable technology. Process Biochem. 13, 9-13.

EFECTO DE ÁCIDO L-MÁLICO SOBRE *Kloeckera apiculata* Y *Saccharomyces cerevisiae* EN CULTIVOS PUROS Y MIXTOS

FARÍAS Marta E^{1,2}, MENDOZA Lucía M¹ y MANCA DE NADRA María C^{1,2}.

¹CERELA-CONICET y ² Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-UNT. Tucumán. Argentina.
E-mail: mmanca@cerela.org.ar

RESUMEN

Cultivos puros de *S. cerevisiae* incrementan la velocidad de crecimiento, densidad celular y velocidad de consumo de glucosa en presencia 2g/l de ácido L-málico. Estos efectos no se observan en presencia de 4g/l del ácido orgánico y mayores concentraciones (6 g/l) resultan inhibitorias. *Kloeckera apiculata* no modifica la cinética de crecimiento y consumo de glucosa en presencia de la menor concentración del ácido orgánico. A concentraciones más elevadas se observa inhibición. En cultivos mixtos, los perfiles de crecimiento son similares a los observados en los respectivos cultivos puros. La utilización de glucosa es similar al cultivo puro de la levadura elíptica. El incremento de biomasa de la levadura *Saccharomyces* observada a bajas concentraciones de ácido málico, estaría relacionado a la utilización del ácido orgánico. La inhibición del crecimiento en ambos microorganismos a elevadas concentraciones del ácido dicarboxílico se correspondería con la acidificación del citoplasma por la ionización del ácido en el interior celular.

Palabras claves: *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, ácido L-málico

ABSTRACT

In presence of 2 g/l L-malic acid, pure cultures of *S. cerevisiae* increases the growth rate, cell density and rate of glucose consumption. When 4 g/l of organic acid is added to the culture medium no effect is observed and higher concentration (6 g/l) results inhibitory. *Kloeckera apiculata* does not modify the kinetic of growth and glucose consumption in presence of low dicarboxylic acid concentration. At higher concentrations an inhibitory effect is observed. In mixed cultures, the profiles of growth are similar to those of respective pure cultures and glucose utilization is correlated to the pure culture of the elliptic yeast. The higher biomass reached by *S.cerevisiae* at low L-malic acid concentration suggest the dicarboxylic acid utilization as carbon source. The growth inhibition observed in both microorganisms at high organic acid concentrations would be consequence of the cytoplasm acidification by the ionization of the acid inside the cell.

Key words: *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, L-malic acid

INTRODUCCIÓN

La concentración de ácidos orgánicos en el vino depende de diversos factores como el tipo de mosto y la actividad microbiana de la cepa de levadura. Estos ácidos al ser responsables de la acidez total del vino contribuyen en sus características organolépticas (Ribéreau-Gayon y col., 2000). Los ácidos orgánicos mayoritarios del vino son el ácido L-tartárico y el L-málico, los cuales representan el 70-90% de la acidez total de la uva. La concentración de ácido L-málico en las uvas varía de 1 a 10 g/l dependiendo de diferentes factores, de los cuales el más importante es el clima. El ácido málico además de contribuir al sabor del vino, sirve como sustrato para bacterias lácticas contaminantes por lo que es esencial remover el exceso de este ácido orgánico (Pretorius, 2000). La eliminación del ácido L-málico presente en las uvas es de considerable valor tecnológico en vino porque produce la desacidificación y estabilización del vino. La desacidificación microbiológica de los vinos puede incluir el uso de levaduras capaces de degradar el ácido en condiciones similares a las empleadas durante la vinificación. La posibilidad de las levaduras de degradar ácido málico extracelular depende de la capacidad del microorganismo de transportar el ácido dicarboxílico y de la eficiencia de la enzima málica intracelular (Redzepovic y col., 2003). Cepas de levaduras *Saccharomyces* son consideradas como ineficientes en el metabolismo de ácido málico, probablemente debido a la baja afinidad de la enzima málica por su sustrato (Taillandier and Strehaiano, 1991).

Los estudios sobre enología estuvieron centrados en las levaduras del género *Saccharomyces*, responsables de la fermentación alcohólica. Sin embargo, las diferentes levaduras, especialmente las no-*Saccharomyces* presentes en los primeros estadios del proceso de fermentación pueden tener influencia en las propiedades organolépticas finales del vino (Pretorius y col., 1999). Los principales géneros son *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Hansenula* (Ciani and Maccarelli, 1998; Querol y col., 1990). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del ácido L-málico sobre el comportamiento cinético y metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kloeckera apiculata* en cultivos puros y mixtos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Kloeckera apiculata mc1 y *Saccharomyces cerevisiae* mc2, levaduras aisladas de vinos argentinos.

Medio de cultivo

Las levaduras se cultivan en medio basal jugo de uva natural (20 g/l extracto de levadura, 1ml/l tween 80 y 170 ml/l jugo de uva). El efecto del ácido L-málico se determina por adición al medio basal de: 2, 4 y 6 g/l del ácido orgánico. El pH se ajusta a 5,5 con NaOH 1M y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

Condiciones de cultivo

El medio se inocula con 10^6 células/ml a partir de un precultivo de 14 h. Las células se cultivan a 30°C durante 10 días.

Determinación del crecimiento microbiano

El crecimiento de las levaduras se monitorea mediante lecturas de la absorbancia de alícuotas de los cultivos a 540 nm en espectrofotómetro Spectronic. El recuento diferencial de las levaduras en cultivos mixtos se realiza por diseminación en superficie de la dilución correspondiente en el medio malta agar modificado (20 g/l glucosa, 20g/l extracto de levadura, 1 g/l peptona, 3 g/l extracto de malta, 40 mg/l azul de bromo fenol y 20 g/l agar; pH 4,6). Las placas se incuban 48 h a 30°C. Las levaduras *Saccharomyces* forman colonias amarillas y las no-*Saccharomyces* se evidencian como colonias azules.

Determinación de la concentración de glucosa

La concentración de glucosa residual se determina por el método de la glucosa oxidasa.

Cálculos estadísticos

Los resultados son el promedio de tres ensayos realizados independientemente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes concentraciones de ácido L-málico sobre el crecimiento de *K. apiculata* y *S. cerevisiae* en cultivos puros y mixtos

En presencia de 2 g/l de ácido L-málico, cultivos puros de *S. cerevisiae* incrementan la biomasa final de $1,57 \times 10^8$ a $2,95 \times 10^8$ y la velocidad de crecimiento de 0,21a 0,26 h^{-1} y los cultivos puros de *K. apiculata* no modifican la cinética de crecimiento. En cultivos puros de *S. cerevisiae*, en presencia de 4 g/l no se observa modificación en el crecimiento y con 6g/l el efecto es inhibitorio. Estas concentraciones de ácido L-málico son inhibitorias del crecimiento de la levadura apiculada. En cultivos mixtos el perfil de crecimiento de las levaduras es similar a los respectivos cultivos puros. (Figura 1 y Tabla 1).

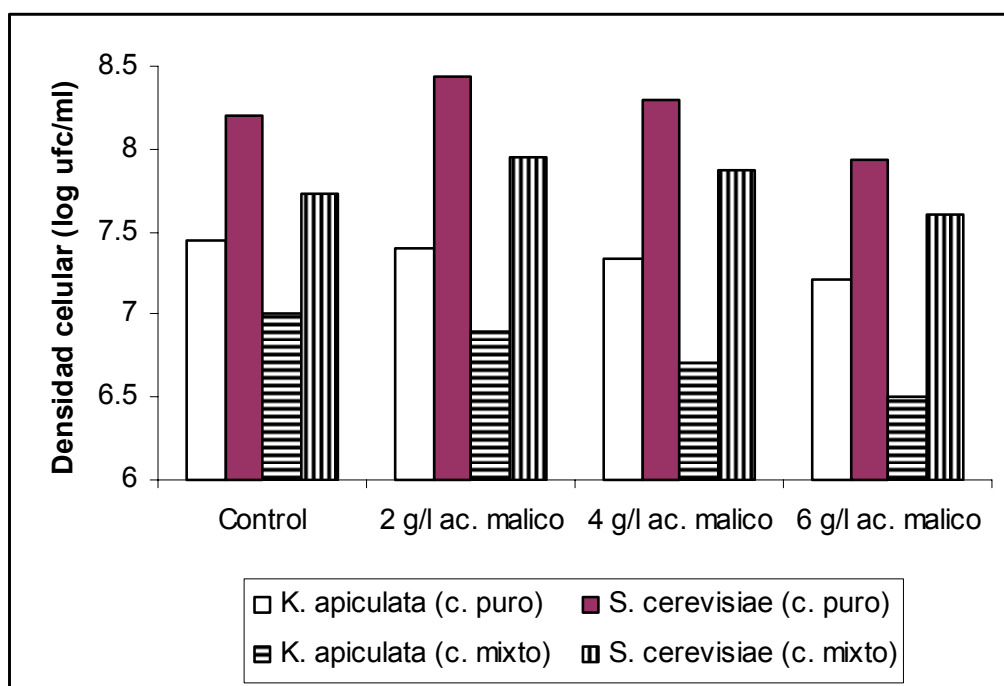


Figura 1. Efecto del ácido L-málico sobre la densidad celular de *K. apiculata* y *S. cerevisiae* cultivos puros y mixtos.

Tabla 1. Efecto del ácido L-málico sobre la cinética de crecimiento de *K. apiculata* y *S. cerevisiae* en cultivos puros y mixtos.

Velocidad de crecimiento (h^{-1})				
Microorganismos	Control	+ 2g/l	+ 4g/l	+ 6g/l
K (puro)	0,20	0,20	0,18	0,15
S (puro)	0,21	0,26	0,24	0,21
K (mixto)	0,14	0,14	0,12	0,10
S (mixto)	0,15	0,22	0,21	0,17

K: *K. Apiculata*, **S:** *S. cerevisiae*

Cinética del consumo de glucosa de *K. apiculata* y *S. cerevisiae* en presencia de ácido L-málico

La Tabla 2 muestra que en presencia de 2 g/l de ácido málico, cultivos puros de *K. apiculata* no evidencian cambios en el consumo de glucosa con respecto al control y los de *S. cerevisiae* incrementan la cinética de consumo del azúcar, de 0,50 a 0,64 $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$. A mayores concentraciones del ácido orgánico la velocidad de consumo es menor para ambas levaduras. En cultivos mixtos, independientemente de la concentración del ácido dicarboxílico, la utilización de glucosa se correlaciona con el comportamiento observado para los respectivos cultivos puros de la levadura elíptica.

Tabla 2. Cinética de utilización de glucosa por cultivos puros y mixtos de *K. apiculata* y *S. cerevisiae* en presencia de ácido L-málico.

Velocidad de consumo de glucosa (g. l⁻¹.h⁻¹)				
Microorganismos	Control	+ 2g/l	+ 4g/l	+ 6g/l
K	0,47	0,46	0,42	0,40
S	0,50	0,64	0,57	0,56
K + S	0,52	0,63	0,52	0,58

K: *K. apiculata* en cultivo puro, **S:** *S. cerevisiae* en cultivo puro

K + S: *K. apiculata* y *S. cerevisiae* en cultivo mixto

La mayor biomasa final alcanzada por la levadura *Saccharomyces* a baja concentración de ácido L-málico, puede ser consecuencia de la utilización del ácido L-málico como fuente de carbono. Ramón Portugal y col. (1999), reportan que algunas cepas *Saccharomyces* pueden consumir el ácido málico presente en el mosto de uva.

El comportamiento observado en ambas levaduras a mayores concentraciones de ácido L-málico, sería consecuencia de la acidificación del citoplasma por ionización del ácido orgánico en el interior celular. Salmon (1987), indica que levaduras *Saccharomyces* pueden incorporar el ácido dicarboxílico por difusión simple de la forma no disociada.

Saccharomyces cerevisiae y *Kloeckera apiculata*, son levaduras que cohabitan durante las primeras etapas de transformación de la uva en vino. El hecho que en cultivo mixto, la especie dominante (apiculada), no modifique el comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* mc2 con respecto a la utilización del ácido L-málico, puede tener importancia tecnológica en el proceso de vinificación. La remoción del ácido orgánico contribuye a la estabilidad del producto final.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT).

BIBLIOGRAFÍA

Ciani M and Maccarelli F (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 199-203.

- Pretorius I, van der Westhuizen T and Augustyn O (1999)** Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 20: 61-74.
- Pretorius IS (2000)** Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Querol A, Jimenez M and Huerta T (1990)** Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grapes-harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*, 55: 1603-1606.
- Ramon-Portugal F, Seiller I, Taillandier P, Favarel JL, Nepveu F and Strehaiano P (1999)** Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *S. cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology* 37: 235-240.
- Redzepovic S, Orlic, S, Majdak A, Kozina B, Volschenk H, Viljoen-Bloom M (2003)** Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 83: 49-61.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B and Lonvaud A (2000)** Handbook of Enology, vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England.
- Salmon JM, (1987)** L-Malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 901:30-34
- Taillandier P, Strehaiano P (1991)** The role of L-malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe* substrate consumption and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 541-543.

ANÁLISIS IMMUNOQUÍMICO DE LA VARIEDAD DE SOJA RAIDEN A LOS EFECTOS DE EVALUAR SU UTILIDAD COMO SUSTITUTO DE LECHE BOVINA PARA PACIENTES ALÉRGICOS

LAREU, J. Fabricio¹; CURCIARELLO, Renata ^{1,2} ; DOCENA, Guillermo H.^{2*}; PETRUCCELLI, Silvana ¹

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA) ² Cátedra de Inmunología. Fac. Ciencias Exactas, UNLP-CONICET, 47 y 116, 1900. La Plata, Pcia de Buenos Aires- Argentina. Tel/Fax: (0221)424-9287

*e-mail: guidoc@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

Las formulaciones a base **de** soja constituyen los sustitutos más frecuentemente empleados en nuestro país durante el tratamiento a alergia a leche de vaca (ALV). Sin embargo aproximadamente el 10%-35% de los lactantes con ALV desarrollan intolerancia a los mismos. Se ha descrito que la glicinina A₄A₅B₃ sería responsable de la reactividad cruzada entre proteínas de LV y soja. El objetivo de este trabajo fue analizar la reactividad cruzada de la variedad de soja Raiden, que naturalmente no posee A₄A₅B₃, como posible sustituto lácteo para pacientes con ALV. Mediante ELISA e inmunoblotting se detectaron cuatro componentes reactivos en la soja convencional y un único componente en la Raiden. El componente común es la subunidad α -7S y los otros tres componentes de la soja convencional serían los polipéptidos A₄, B₃, y A₅B₃. La soja Raiden podría ser empleada como un sustituto válido si se lograra disminuir la reactividad de la subunidad α .

Palabras claves: alergia, soja, leche bovina, glicinina, caseínas, reactividad cruzada

ABSTRACT

Soy-based formulas are the most employed cow's milk substitutes in the treatment of cow's milk allergy (CMA) in Argentina. Nevertheless intolerance to soy has been reported to occur in 10% to 35% of infants with CMA. We have identified the glycinin A₄A₅B₃ as one of the soy proteins that cross-react with cow milk proteins (CMP). The aim of this work was to analyze the cross- reactivity of the soybean cultivar Raiden, that naturally lacks A₄A₅B₃ subunit, to evaluate its use as a milk substitute for CMA patients. By Western blot and ELISA we showed that conventional soybean has four components that cross react with CMP while Raiden has only one. The last component was identified as α -subunit 7S. The

cross-reactive components in conventional soybean are A₄, B₃, y A₅B₃. These results confirm the cross reactivity of A₄A₅B₃ and indicate that α -subunit reactivity should be decreased in Raiden to allow its use as cow milk substitute.

Keywords: soy allergy, cow milk, glycinin, caseins, cross-reactivity.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas son las patologías inmunológicas que con mayor prevalencia se presentan en la población mundial. Su incidencia se ha incrementado en las últimas décadas de manera notable, como así también la forma en que se manifiesta (1). Entre ellas las reacciones adversas a alimentos se han transformado en un importante problema sanitario a resolver durante la primera infancia (2). Dado que el único tratamiento consiste en evitar el contacto con el alérgeno es importante conocer qué alimentos contienen al agente nocivo para eliminarlo de la dieta. El masivo consumo de proteínas de soja bajo distintas formas las ha convertido en uno de los principales alérgenos alimentarios a nivel mundial. Las fórmulas basadas en soja son utilizadas como un sustituto de leche en lactantes con alergia a leche bovina (ALV), ya que son más económicas y de mejor sabor que las fórmulas a base de hidrolizados de PLV. Se ha descrito que entre un 10% y 35% de los lactantes con ALV, manifiestan una intolerancia clínica a las proteínas de soja durante el tratamiento sustitutivo (3).

La identificación de las proteínas alérgicas es de suma importancia para el tratamiento y la prevención de las alergias alimentarias. El principal alérgeno de la leche bovina son las caseínas (4) mientras que en el caso de soja se han descrito más de 10 alérgenos siendo los principales las proteínas P34 (Gly m Bd 30K), Gly m Bd 68K y la subunidad α de β -conglucina 7S de soja (5) en poblaciones americanas y japonesas. Nuestro grupo ha identificado a la glicinina A₄A₅B₃ como una de las proteínas de soja que presenta una reactividad alérgica *in vivo* e *in vitro* con las proteínas de leche bovina (6). El objetivo de este trabajo fue analizar la reactividad cruzada *in vitro* de la variedad de soja Raiden, que naturalmente no posee A₄A₅B₃ (7), a fin de evaluar la posibilidad de utilizar esta variedad en la preparación de leche de soja para pacientes ALV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos proteicos: Para la preparación de los extractos proteicos acuosos a emplear en los distintos inmunoensayos se emplearon semillas maduras de *Glycine max* (L.) Merr., cvs Asgrow (denominada en este estudio convencional) y Raiden, como ha sido descrito previamente (6).

Anticuerpos específicos: Se emplearon para el revelado de los inmunoensayos un antisuero policlonal obtenido en conejos y anticuerpos monoclonales. Brevemente, se administró un extracto proteico acuoso de PLV (150 μ g/conejo) y adyuvante de Freund completo e incompleto a conejos New Zealand y el título del suero se siguió por ELISA indirecto. Para la obtención de los anticuerpos monoclonales (mAb) se emplearon ratones BALB/c y se siguió la técnica de Galfré y Milstein. La especificidad de los anticuerpos obtenidos se determinó por ELISA e inmunoblotting. Se seleccionaron los clones productores de anticuerpos específicos a α - (1D5), β - (2A1) y κ -caseínas (3B5) (6). También se utilizaron sueros de ratón preparados por inmunización de las subunidades α y α' purificadas a partir de semillas maduras de soja (8)

Construcciones: Se partió de una biblioteca de semillas inmaduras de *Glycine max L.* Merr. (8) que fue utilizada como molde para la amplificación de las glicininas $A_4A_5B_3$ y A_2B_{1a} y la subunidad alfa de la beta-conglicinina (números de accesos en el Gen-Bank, X86970, E02462 y X17698, respectivamente) con primers específicos. Estos primers permitieron la amplificación de la secuencia codificante para las subunidades maduras: $A_4A_5B_3$ (aminoácidos 27-562), A_2B_{1a} (aa 16-486) y α - β conglicinina (aa 67-605). Estas subunidades fueron subclonadas en el plásmido pET28a (Novagen, CA). Además se utilizó un mutante de la subunidad alfa, denominado α -CTD (aa 305-539) (8).

Producción de $A_4A_5B_3$, A_2B_{1a} , alfa y α -CTD recombinantes: Los plásmidos con los genes codificantes para $A_4A_5B_3$, A_2B_{1a} , alfa y α CTD se introdujeron en *E. coli BL21* (Novagen, USA). La producción y purificación de estas proteínas, empleando una resina de níquel, se realizó siguiendo las instrucciones del manual pET (Novagen, USA).

Electroforesis e inmunoblotting: se realizaron SDS-PAGE 12.5% con urea 5M. Después de la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con suero equino 5% en 50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; Tween 0.1% pH 7.4 (TBST). Posteriormente se incubó con los anticuerpos monoclonales o policlonales. El revelado se realizó empleando un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa revelándose por quimioluminiscencia o bien empleando un segundo anticuerpo biotinilado, seguido de amplificación con avidina conjugada a fosfatasa alcalina y desarrollo con el reactivo NBT-BCIP (Biorad).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto: Microplacas para ELISA fueron sensibilizadas con distintos extractos proteicos (leche bovina, soja, Raiden, 7S de soja) o proteínas purificadas ($A_5A_4B_3$ nativa y recombinante, subunidad α 7S, alfa-CTD, A_2B_{1a}) (1 μ g/100 μ l) y bloqueadas con suero equino 5% en TBS durante 1 hora a 37 °C.

Posteriormente se incubó durante 1 hora a 37 °C con distintas diluciones del antisuero específico de PLV seguido de incubación con un anticuerpo de conejo conjugado a HRP (SIGMA). Luego se reveló con o-fenilendiamina y se leyó densidad óptica a 490 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de caracterizar los componentes proteicos presentes en la variedad de soja Raiden se realizaron electroforesis en presencia de urea 5M, ya que en estas condiciones los polipéptidos ácidos (A_1 - A_4) presentan distinta movilidad electroforética (7). Como se observa en la Figura 1, la soja convencional en condiciones no reductoras presenta el polipéptido A_4 y A_5B_3 que la distingue de la Raiden y en condiciones reductoras presenta además del polipéptido A_4 , el polipéptido B_3 . A fin de evaluar la reactividad inmunoquímica cruzada, de las proteínas aisladas a partir de ambas variedades, con sueros específicos de componentes bovinos se realizaron inmunoblots empleando como primer anticuerpo los mAbs antes mencionados.

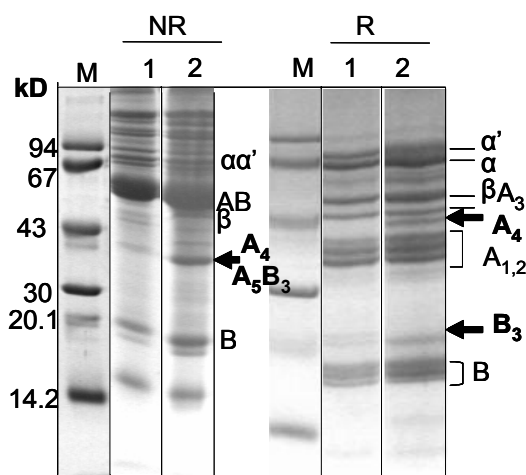


Figura 1

Figura 1: SDS-PAGE en presencia de urea 5M de proteínas de soja preparados a partir de la variedad Raiden (calles 1) y convencional (calles 2). NR indica condiciones no reductoras y R indica muestras reducidas con 2- mercaptoetanol 5%.

Como se observa en la Figura 2 dos de los mAbs: 2A1 (específico de β -caseína) (B) y 1D5 (específico de α -caseína) (C) presentan reactividad con 4 proteínas, tres de las cuales están ausentes en la variedad Raiden; correspondiendo dos de ellas a la subunidad $A_4A_5B_3$: el polipéptido A_4 y la subunidad madura A_5B_3 . La identidad de la proteína de 23 kDa presente en la soja convencional podría ser B_3 . A fin de determinar la identidad de la banda que posee reactividad con estos anticuerpos monoclonales y que se encuentra en ambas variedades se realizó un Western Blot empleando un suero anti $\alpha\alpha'$.

Como se observa en la Figura 2D este suero reconoce dos bandas α y α' , siendo la subunidad α del mismo tamaño que la proteína reconocida por los mAbs 2A1 y 1D5. Cuando la reactividad de ambas variedades de soja se analizó con el antisuero específico de leche bovina sólo se observó reactividad cruzada con la proteína de 23kD (Figura 2E).

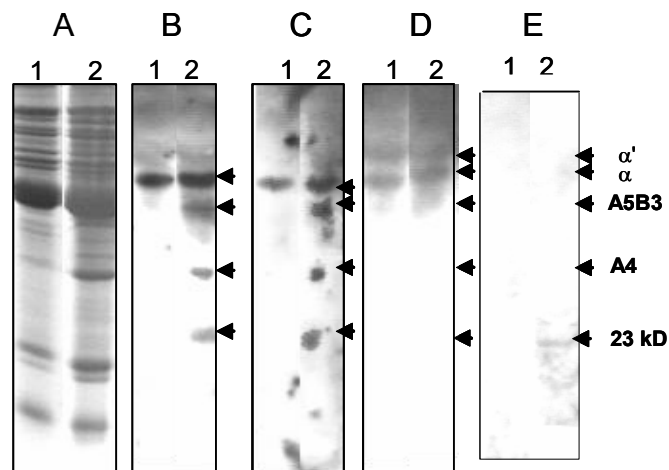


Figura 2

Figura 2: SDS-PAGE (A) e immunoblots (B-E) de proteínas de soja preparados a partir de soja variedad raiden (calles 1) y convencional (calles 2) en condiciones no reductoras revelados con los anticuerpos monoclonales 2A1 (B), 1D5 (C) y con un suero anti α y α' (D) y antisuero específico de PLV. (E). Las proteínas que presentan reactividad con los sueros se indican con las flechas.

A fin de identificar a las proteínas de soja que por immunoblotting mostraron reactividad cruzada con las PLV se utilizaron las proteínas recombinantes para lo cual se clonaron y expresaron en *E. coli* dos glicininas: $A_4A_5B_3$ y A_2B_{1a} y la subunidad α de la β -conglucina, y un mutante de esta última proteína (α -CTD). En la Figura 3 A se muestra una representación esquemática de estas construcciones y se señalan las zonas que son estructuralmente equivalentes entre globulinas 7S y 11S. En particular la zona correspondiente al polipéptido ácido de las glicininas (ubicada en el extremo N terminal) es evolutivamente más cercano al dominio C-terminal de las 7S. Las zonas expuestas en estas globulinas se muestran en negro (Fig 3 A y B). La diferencia entre la subunidad α y α' son dos zonas pequeñas de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos (8) y probablemente la ausencia de estas secuencias sea uno de los componentes responsables de la reactividad cruzada de las subunidades α con proteínas de leche.

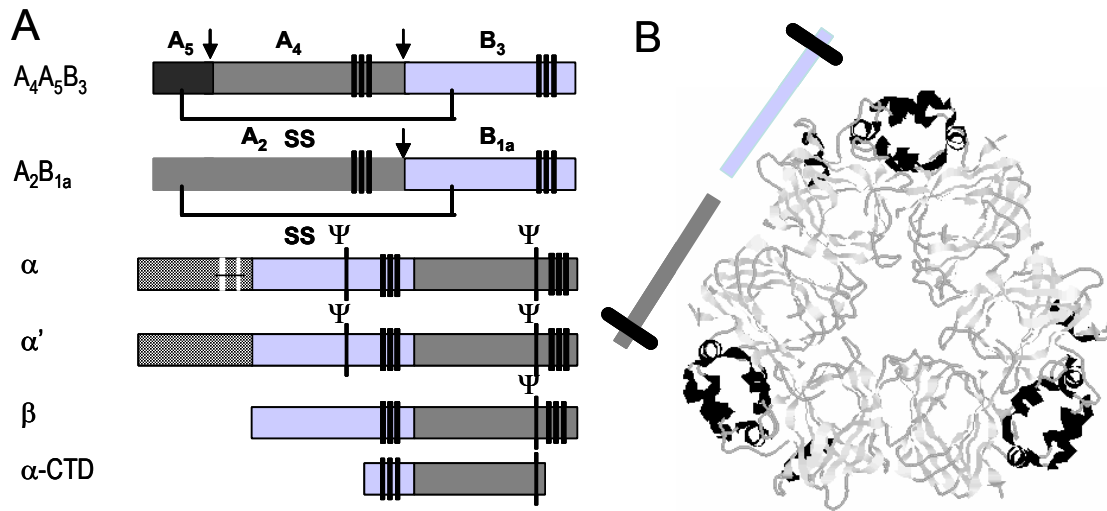


Figura 3

Figura 3: Parte A: representación esquemática de las subunidades de las globulinas 11S y 7S. Parte B: estructura tridimensional de las globulinas 7S y 11S. Cada globulina tiene dos dominios (N y C terminal) estructuralmente similares formados por un barril de hojas beta y una zona de alfa hélices (representadas en negro) importantes para la formación de trímeros. Las subunidades α y α' poseen además una zona muy polar de 150 residuos de aminoácidos (rectángulo cuadriculado). Las subunidades 11S sufren un clivaje en el sitio de unión de ambos dominios quedando unidos los polipéptidos por una unión disulfuro. La subunidad $A_4A_5B_3$ sufre además un clivaje del polipéptido ácido en dos dando origen a los polipéptidos A_4A_5 . La flecha indica los sitios de clivaje y Ψ representa los sitios de glicosilación.

En la figura 4, parte A se muestran las proteínas recombinantes obtenidas y en la B se muestra la reactividad de la subunidad $A_4A_5B_3$ con los tres mAbs específicos contra caseínas, lo que confirma que la diferencia de reactividad observada en la variedad de soja convencional se debe a la presencia de esta subunidad.

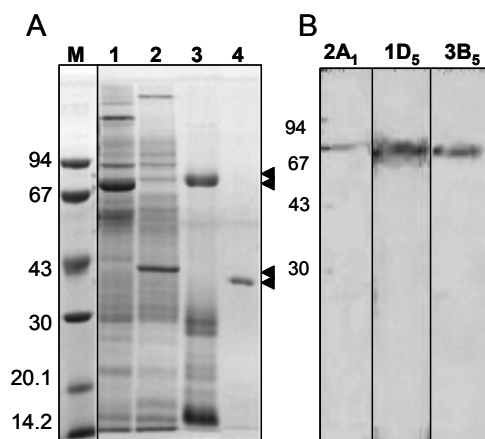


Figura 4

Figura 4: Parte A- SDS-PAGE de las fracciones recombinantes; calle 1; $A_4A_5B_3$; calle 2; A_2B_{1a} ; calle 3; α ; calle 4; α -CTD. Parte B: Immunoblot de la fracción $A_4A_5B_3$ recombinante con los anticuerpos monoclonales 2A1, 1D5 y 3B5.

Para analizar la reactividad de las otras fracciones recombinantes y tratar de identificar las zonas responsables de la reactividad cruzada se realizó un ELISA indirecto empleando el antisuero específico de PLV como primer anticuerpo. Como se muestra en la figura 5 las fracciones proteicas que mostraron mayor reactividad específica son leche bovina (antígeno de identidad), $A_5A_4B_3$ purificado a partir de soja, subunidad α y Raiden (antígenos de reactividad cruzada). No se observa una reactividad específica con alfa-CTD. La menor reactividad observada con $A_5A_4B_3$ recombinante puede deberse a problemas de solubilidad de la proteína recombinante, y por lo tanto de sensibilización de la fase sólida.

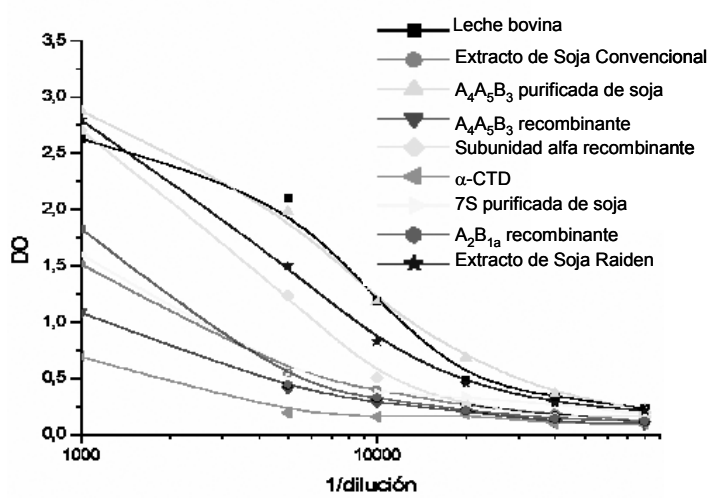


Figura 5: ELISA indirecto realizado antisuero específico de PLV.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que existen diversos componentes proteicos de soja que presentan reactividad cruzada con componentes de la LV (caseínas), confirmando por un lado la reactividad cruzada alérgica de $A_5A_4B_3$ y la alergenidad de la subunidad α 7S descritos en la bibliografía (5). Estos resultados podrían ser la base para explicar la intolerancia observada en pacientes alérgicos a LV que son tratados con proteínas de soja, y que no fueron expuestos previamente a éstas proteínas. Por lo tanto la posibilidad de emplear la variedad Raiden como un sustituto lácteo efectivo debe contemplar la disminución de la alergenidad de la subunidad α mediante un tratamiento adecuado.

BIBLIOGRAFÍA

International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. *Lancet* 1998; 351:1225-32.

Working group Sardinia. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 484-92.

Hill DJ, Hosking CS. *Clin. Exp. Allergy* 1996; 26(3):243-6.

Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA. *Allergy*. 1996; 51: 412-6.

Tsuji, H.; Kimoto, M.; Natori, Y. *Nutrition Research* 2001, 21, 925-934.

Rozenfeld P, Docena GH, Añón MC, Fossati CA. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 130 (1): 49-58.

Zhang, GY; Hayashi, Y; Matsumoto, S; Matsumura, M, Mori, T. *Phytochem.* 2002 (60) 675–681.

Petruccelli, S; Chirido, FG; Añón, MC. *Food Agric. Immun.* 2005; en prensa.

AGRADECIMIENTOS

GHD y SP son miembros de la carrera de investigador de CONICET. F.J. L es becario ANPCyT. Este trabajo fue financiado con subsidios de CONICET, ANPCyT e IFS.

ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE DE UN EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO DE FRUTOS DE *BROMELIA HIERONYMI* MEZ (*BROMELIACEAE*).

BRUNO, Mariela A.; GONZALEZ, Marisa R.; CAFFINI, Néstor O. y LÓPEZ, Laura M.I.

LIPROVE, Depto. de Cs. Biológicas, Fac. de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. C.C. 711, B1900AVW, Tel. 0221 423 0121 int. 57. Fax: 0221 422 6947. E-mail: brunomariela@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se ha obtenido un extracto enzimático con actividad proteolítica a partir de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez. Este extracto presenta por isoelectroenfoque-zimograma seis bandas proteicas, de las cuales tres son activas. Por SDS-PAGE se observa una banda mayoritaria de 25 kDa. La preparación muestra una actividad óptima a pH 7,3–10,7 y es muy termoestable, siendo activada por cisteína e inhibida por E-64 y ácido iodoacético. El extracto conserva 70% de la actividad enzimática en presencia de NaCl 1 M. Dos de las endopeptidasas presentes fueron purificadas por cromatografía de intercambio iónico y caracterizadas. Se realizaron ensayos de coagulación de la leche a distintas temperaturas y la fuerza coagulante fue determinada y comparada con la del cuajo bovino comercial. Se obtuvieron hidrolizados de caseínas y se analizaron sus patrones electroforéticos. El empleo de fitoproteasas es una interesante alternativa al uso del cuajo bovino, porque permitiría obtener quesos con nuevos sabores y aromas.

Palabras Clave: fitoproteasa, hidrolizado de caseínas, quesos, *Bromelia hieronymi*.

ABSTRACT

An enzymatic extract with proteolytic activity from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez was obtained. This extract showed six proteic bands (IEF-zymogram), three of them actives. For SDS-PAGE only one band (25 kDa) was observed. The preparation presented maximum proteolytic activity at pH 7,3–10,7, exhibited high thermal stability, was activated by the addition of cysteine and was completely inhibited with E-64 and iodoacetic acid. The extract maintained 70% of enzymatic activity in the presence of NaCl 1 M. Two endopeptidases were purified by ionic exchange chromatography and characterized. Later, clotting assays were made on skim milk to different temperatures. Clotting strength was determined and compared with that of commercial rennet. Casein hydrolisates were obtained and its electrophoretical patterns were analyzed. The employment of plant

peptidases is an interesting alternative to the bovine rennet, as it would allow the elaboration of cheeses with new flavours and smells.

INTRODUCCIÓN

La notable evolución de las ventas al exterior apuntalada por un tipo de cambio favorable y una firme demanda mundial, empieza a consolidar el perfil lácteo de los próximos años. En la actualidad los lácteos argentinos se venden en los cinco continentes; anteriormente la leche en polvo superaba el 80% del total del volumen exportado y hoy se encuentra levemente por encima del 70%, dando lugar a productos con mayor valor agregado como los quesos, proteínas y otros lácteos. Por ejemplo, durante 2004, las ventas de queso al exterior habrían crecido cerca del 60%, especialmente de quesos semiduros (La Nación, 2005).

La denominación de queso se aplica al producto fresco o madurado que se obtiene por separación del suero de la leche o de la leche reconstituida -entera, parcial o totalmente descremada-, coagulada por acción del cuajo y/o enzimas específicas. Se puede complementar con bacterias o ácidos orgánicos y agregar sustancias colorantes, especias o condimentos (Código Alimentario Argentino, 1976).

La renina o cuajo, conjunto de endopeptidasas que integran los fermentos gástricos de los mamíferos lactantes, ha sido tradicionalmente usada para producir la coagulación de la leche. Si bien la obtención biotecnológica de renina recombinante ha disminuido el costo de este producto, existen sectores de la población interesados en una alternativa natural, por lo cual se ha intensificado la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche de origen vegetal. Varias fitopeptidasas son capaces de coagular la leche; algunas de ellas son inapropiadas para la producción de quesos, debido a que su alta actividad proteolítica produce la degradación del coágulo. Sin embargo algunas fitopeptidasas aisladas en nuestro laboratorio han dado buenos resultados en la elaboración de quesos semiduros (Brutti *et al.*, 2004).

Bromeliaceae es una familia de plantas cuyos integrantes usualmente producen grandes cantidades de proteinasas que aparentemente no poseen función en el crecimiento y desarrollo (Boller, 1986). En el presente trabajo se utilizó una preparación enzimática parcialmente purificada obtenida a partir de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae) en ensayos de actividad coagulante de la leche en diferentes condiciones, realizando hidrolizados de caseína y analizando sus patrones electroforéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal.

Se utilizaron frutos verdes de *Bromelia hieronymi* Mez ("cháguar") procedentes de Santiago del Estero (Argentina). La especie se extiende desde Paraguay, por Bolivia, hasta el NE de Argentina, en los campos de vegetación xerófila.

2. Preparación del extracto crudo.

Se pesaron aproximadamente 50 g de frutos y se trituraron en presencia de 250 ml de buffer fosfatos 0,1 M con EDTA y cisteína 5 mM como protectores. La preparación se filtró y centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 16000 g. El sobrenadante se fraccionó y almacenó a -20°C (López *et al.* 2000).

3. Purificación preliminar por precipitación etanólica.

Un volumen de extracto crudo se precipitó con cuatro volúmenes de etanol en baño de hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 16000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con buffer fosfatos 0,1M de pH 6 (Scopes, 1984). A esta preparación se la denominó precipitado etanólico redissuelto (PER).

4. Contenido de proteínas y actividad caseinolítica.

Se determinó el contenido de proteínas (Bradford, 1976), y la actividad caseinolítica (Natalucci *et al.*, 1996) a las preparaciones crudas, parcial y totalmente purificadas.

5. Actividad caseinolítica en presencia de activadores e inhibidores.

Se determinó la actividad caseinolítica (Natalucci *et al.*, 1996) en presencia de cisteína 20 mM como activador y E-64 0,1 mM y ácido iodoacético 0,1 mM como inhibidores (Salvesen & Nagase, 2001).

6. Estabilidad térmica.

Se preincubaron alícuotas de PER a distintas temperaturas: 37, 55, 60, 65 y 75 °C y se determinó la actividad caseinolítica a los 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 minutos. Posteriormente se confeccionó un gráfico de % de actividad residual en función del tiempo para cada temperatura.

7. Perfil de pH óptimo.

Se utilizó caseína como sustrato en el rango de pH 6,0 - 12,0. En las determinaciones se emplearon soluciones 25 mM de los siguientes buffers: Mes, Mops, Taps, Ampso y Caps (Good & Izawa, 1972) a 37°C.

8. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad caseinolítica.

Las determinaciones de actividad proteolítica se llevaron a cabo a 37°C utilizando el sustrato (caseína al 1%) disuelto en soluciones de cloruro de sodio de distintas concentraciones (0 a 2,5 M).

9. Isoelectroenfoque (IEF) y zimograma.

Se realizó el IEF en una Mini IEF Cell Bio-Rad, Mod. 111 (Bruno *et al.*, 2003). Se usó un gel de poliacrilamida al 5% conteniendo anfolitos de amplio rango (Pharmalyte 3-10, Pharmacia). El gel fue fijado y luego teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. El zimograma se efectuó incubando el gel sobre una placa de agarosa embebida en caseína al 1% durante 15 minutos a 55°C (PER), las zonas degradadas (color blanco) indican la presencia de proteasas en el gel (Westergaar *et al.*, 1980).

10. SDS-PAGE.

Se llevó a cabo en un equipo Miniprotean II (Bio-Rad) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). La corriente se mantuvo constante a 40 mA durante el apilamiento ("stacking") y luego se llevó a 60 mA durante 40 minutos. El gel (poliacrilamida al 12,5 %) fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los valores de las masas moleculares fueron determinados utilizando una curva de calibración realizada con patrones proteicos (LMW markers, Bio-Rad).

11. Purificación del PER.

Hieronymaína I se obtuvo por cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharose FF, Amersham) a pH 8,5 (buffer Tris-HCl 0,05 M) y aplicación de un gradiente salino (0-0,15 M NaCl) seguida de una recromatografía utilizando la misma columna a pH 7,5 (buffer Tris-HCl 0,05 M) con un gradiente salino diferente (0-0,3 M NaCl). Para obtener hieronymaína II se usó un intercambiador aniónico (Q-Sepharose HP) equilibrado con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) y un gradiente lineal de cloruro de sodio (0,0-0,20 M); la primera fracción activa obtenida fue recromatografiada con un intercambiador catiónico (SP-Sepharose HP), utilizando buffer ácido cítrico-citrato de sodio 20 mM (pH 5,6) y eluida con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0,0-0,4 M).

12. Espectrometría de masas.

Se utilizó un equipo MALDI-TOF-TOF para determinar el grado de pureza y la masa molecular de las endopeptidasas purificadas. El espectro de masas fue obtenido con un espectrómetro Bruker Biflex equipado con láser de nitrógeno (337 nm), utilizando tripsinógeno bovino para su calibración interna.

13. Actividad coagulante de la leche a distintas temperaturas.

Se preparó una solución de leche descremada al 12% (Sam Regim) en CaCl₂ 10 mM. El ensayo de coagulación se llevó a cabo mezclando 100 µl de enzima (PER sin diluir o diluido 1/2 a 1/20) con 1 ml de leche, registrando el tiempo necesario para la formación del coágulo firme a 25, 35 y 45 °C.

14. Fuerza coagulante.

Se determinó la relación entre el volumen de leche y el volumen de PER necesarios para lograr la formación del coágulo en 40 minutos a 35°C. A partir de este dato se calculó la fuerza coagulante, mediante el uso de la fórmula $F = 2400 \times V / (t \times v)$, donde **V** es el volumen de leche, **v** es el volumen de agente coagulante y **t** es el tiempo de coagulación (Alais, 1984).

15. Hidrólisis de caseínas, obtención y análisis electroforético.

En cada ensayo se utilizaron 45 µl de enzima y 450 µl de sustrato (caseína al 1,25% en buffer Tris HCl 0,1 M de pH 8 con Cys 20 mM), la reacción se llevó a cabo a 45°C durante 5, 10, 30, 60, 90 y 180 minutos y se detuvo por el agregado de 500 µl de TCA al 5%. La mezcla resultante se centrifugó durante 15 minutos a 13600 g y los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 450 µl de buffer de muestra para electroforesis desnaturizante. Los hidrolizados fueron sometidos a electroforesis desnaturizante en geles de tricina con un gel de stacking (4%T, 3%C), un gel separador (10%T, 3 %C) y un gel de resolución (16,5%T, 3%C). De esta manera se resuelve adecuadamente la mezcla de péptidos obtenidos. Los perfiles electroforéticos fueron analizados por densitografía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por precipitación de un extracto crudo de *Bromelia hieronymi* Mez con cuatro volúmenes de etanol a 0°C se obtuvo una preparación parcialmente purificada denominada PER (precipitado etanólico redisuelto). El extracto obtenido recupera un 79% de actividad caseinolítica y un 75% de las proteínas presentes en el extracto original. La preparación muestra un óptimo de actividad (> 80%) a pH 7,3-10,7 (Fig. 1) y es muy termoestable (80% de actividad residual luego de 30 minutos a 60°C, Fig. 2), siendo activada por cisteína e inhibida por E-64 y ácido iodoacético. El extracto conserva 70% de la actividad proteolítica en presencia de NaCl 1M (Fig. 3).

Por isoelectroenfoque-zimograma se observan seis bandas proteicas, de las cuales tres (pI >9,3, 8,3 y 6,4) son proteolíticamente activas. Por SDS-PAGE se encontró una banda mayoritaria de 25 kDa.

A partir del PER, se realizaron dos esquemas de purificación diferentes por cromatografía de intercambio iónico (FPLC), obteniéndose dos endopeptidasas puras denominadas hieronymaína I y II, cuyas masas moleculares son 24066 y 23411 Da respectivamente (MALDI-TOF-TOF).

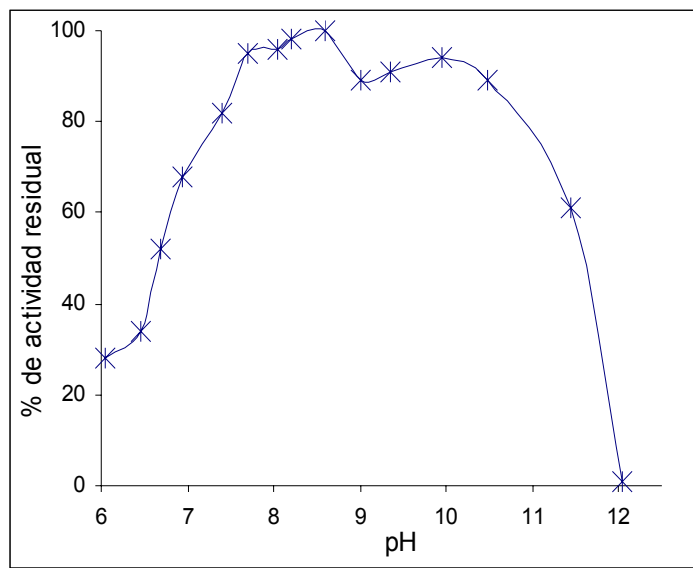


Figura 1: Perfil de pH del PER

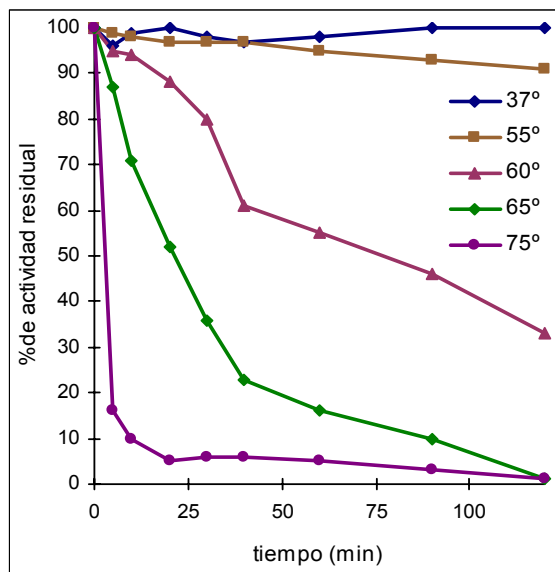


Figura 2: estabilidad térmica

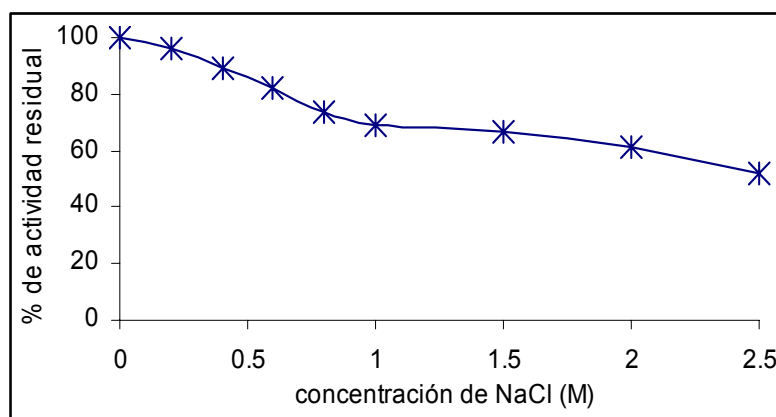


Figura 3: Actividad caseinolítica en presencia de NaCl

Los ensayos de coagulación utilizando leche bovina muestran que los tiempos de coagulación se elevan linealmente con el aumento de la dilución del PER (Fig. 4); se observó un incremento considerablemente mayor a 25°C con respecto a lo que sucede a

35 y 45°C, deduciendo que para utilizar este extracto en la elaboración de quesos no deberían emplearse temperaturas inferiores a 35°C.

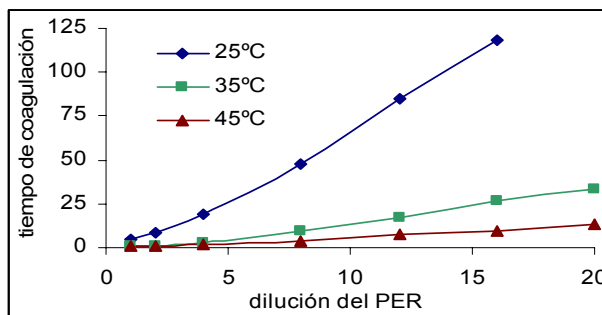


Figura 4: tiempos de coagulación

Se determinó el tiempo de coagulación de mezclas conteniendo diferentes cantidades de PER y leche; se obtuvo la relación de volúmenes que coagula en 40 minutos a 35°C (0,02 ml de PER con 2 ml de leche). Con este dato se calculó la fuerza coagulante que resultó ser 100 U (U: unidad arbitraria que expresa el volumen de leche coagulada por ml de agente coagulante, a 40°C), valor menor que el del cuajo líquido comercial (Alais, 1984). La acción del PER sobre caseína permitió obtener patrones de hidrólisis característicos de sus principales fracciones (α_{S1} , α_{S2} , β y κ caseínas) como se muestra en la figura 5.

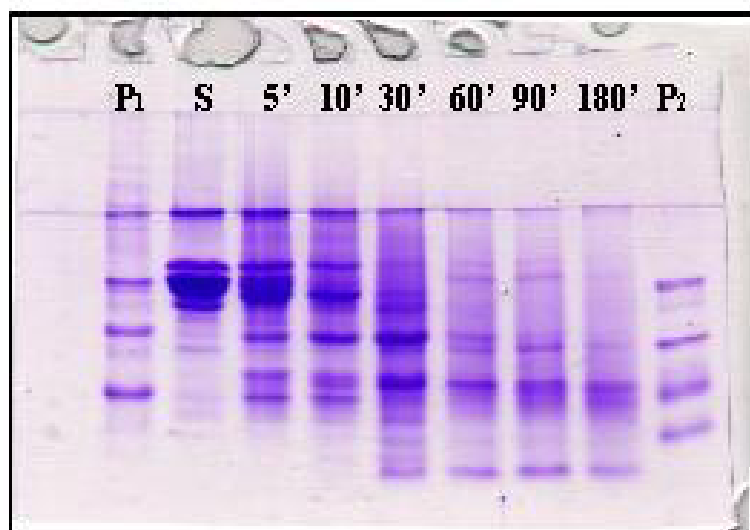


Figura 5: SDS-PAGE de los hidrolizados de caseínas. P1 y P2, patrones de masa molecular; S, blanco de caseína; 5', 10', 30', 60', 90' y 120': tiempos de hidrólisis

El análisis de los correspondientes densitogramas permite visualizar que la cinética de degradación es distinta para las cuatro fracciones: κ desaparece a los 5 minutos, α_{S1} a los 10 minutos, α_{S2} a los 30 minutos y β a los 60 minutos (Fig. 6).

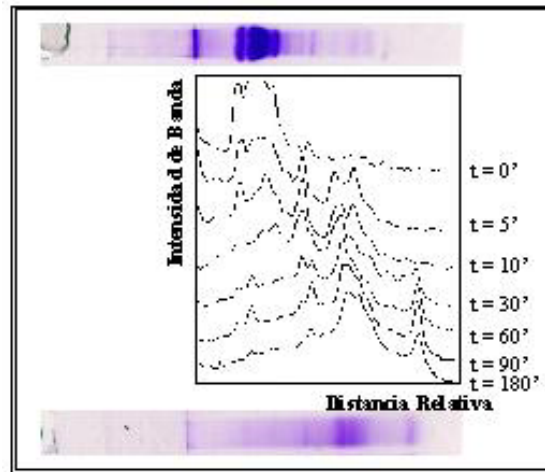


Figura 6: Densitogramas de la SDS-PAGE de los hidrolizados de caseínas.

CONCLUSIONES

El extracto con actividad proteolítica parcialmente purificado obtenido a partir de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez, podría ser utilizado en la manufactura de quesos. La preparación enzimática muestra un amplio rango de pH óptimo y es muy termoestable. El extracto conserva más del 50% de su actividad proteolítica en presencia de NaCl 2,5 M, por lo cual la hidrólisis proteica ocurriría, aunque en forma gradual y limitada, durante el período de maduración de un queso y podría minimizar la formación de péptidos pequeños amargos. Los tiempos de coagulación son breves probablemente a causa de la degradación temprana de la κ -caseína y la fuerza coagulante es de 100 U. Esto convierte al PER en un material promisorio para su uso en la industria quesera, constituyendo una posible alternativa vegetal al cuajo bovino, que además permitiría obtener quesos con nuevos sabores y aromas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alais, C. 1984** Science du lait, principes des techniques laitières [milk technology, the principles of dairying methods], 4th Ed. SELAIC, Paris
- Boller, T. (1986).** Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms. En "Plant proteolytic enzymes" (Dalling, M.J., Ed.), Vol. II, pp. 67-96, CRC Press, Florida.
- Bradford, M.B. (1976)** Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Bruno, M., Pardo, M., Caffini, N. and López, L. 2003.** "Hieronymain I, A New Cysteine Peptidase Isolated from Unripe Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)". J. Prot. Chem. 22, N° 2, 127-134.

Brutti, C., M. F. Pardo, J. Abreu Payrol, C. L. Natalucci y N. O. Caffini. 2004. “Actividad Coagulante en Extractos de Flores de Onopordon acanthium L. (Asteraceae)”. VII Iberoamerican Meeting on Pharmacy and Foods Sciences. La Habana, Cuba, 21 al 23 de junio.

Código Alimentario Argentino (Decreto N° 111, 12.1.76 art. 605).

Good, N. E. and Izawa, S. (1972) Meth. Enzymol. 24, 53-68

Laemmli, U. K. (1970). Nature 227, 680-685

La Nación, 2005. Suplemento “El Campo”, 5 de febrero

López, L. M. I., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B. Barra, D., and Caffini, N. (2000). Protein Express. Purif. 18, 133-140.

Natalucci, C.L., Brullo, A., López, L.M.I., Hilal, R.M., and Caffini, N.O. (1996). J. Food Biochem. 19, 443-454

Salvesen, G.S., and Nagase, H. (2001) “Inhibition of proteolytic enzymes”, in “Proteolytic Enzymes” (Beynon, R. and Bond, J.S. eds.), 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford, pp. 105-128.

Scopes, R.K. (1984) "Protein purification. Principles and practice", Springer-Verlag, N.Y., p. 219.

Westergaar, J. L., Hackbarth, C., Treuhaf, M. W., and Roberts, R .C. (1980). J. Immunol. Meth. 34, 167-175.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Lucas Roic (Fac. Agronomía y Agroindustrias, UNSE), por la recolección de los fruto. El presente trabajo ha sido subsidiado por CONICET (PIP 2813), ANPCyT (PICT 9-9916) y CYTED (Proyecto IV.22).

DETERMINACIÓN MULTIRESIDUO DE BENZIMIDAZOLES Y ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN MATRICES ACUOSAS POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

MONTTI, María I.T.; CHAULET, María R.; VISCIGLIO, Silvia B.; GERARD, Jorge A.; MARTÍNEZ, Horacio J.; NUÑEZ CROATTINI, María P.; RAVIOL, Fabricio E.; SUBOVICH, Gladys.

Universidad Nacional de Entre Ríos. Facultad de Ciencias de la Alimentación. Laboratorio de Investigación de Residuos en Alimentos. Monseñor Tavella 1450. Concordia. Entre Ríos. TE/Fax: 0345-4231450. E-mail: monttim@fcal.uner.edu.ar

RESUMEN

Los fungicidas benzimidazólicos, carbendazim, metiltiofanato, tiofanato y thiabendazol, y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético; son de uso corriente en cultivos cítricos en pre y post-cosecha. La detección de los residuos de estos plaguicidas es relevante en frutos y recursos hídricos como contaminantes. Se plantea como objetivo la optimización de la metodología para la determinación multiresidual en matrices acuosas; para su factible aplicación a muestras de cauces naturales, efluentes y frutas cítricas. Se optimizó el proceso extractivo en fase sólida, adsorbente octadesilsilano, eluyente fase móvil A-B (50:50) y determinación cromatográfica a 230 nm - 1 ml/min de flujo de fase móvil A-B (55:45). Se determinó linealidad del método, la recuperación media (%): carbendazim (94.8), metiltiofanato (96.7), tiofanato (93.1) y thiabendazol (94.9), y 2,4-diclorofenoxiacético (96.3), para $\alpha = 0.05$; desviaciones estándar, coeficiente de variación y sensibilidad del método adecuadas; con límites de detección y de cuantificación comprendidos entre 8 y 36 ppb respectivamente.

Palabras claves: Benzimidazoles – 2,4-diclorofenoxiacético

ABSTRACT

Carbendazym, thiophanate, methyl thiophanate, and thiabendazole are fungicides of current use in citrus fruit in either preharvest or postharvest treatment. Residue detection in fruits and hydric resources is important because they can be contaminants. The main objective of this work is to develop a method for multiresidual determination in aqueous matrixes to be applied in natural courses of water, effluents and citrus fruit. The extraction process in solid phase, C₁₈ adsorbent, A-B mobile phase eluent (50:50) and

chromatographic determination at 230nm-flow rate in mobile phase A-B (55:45) were considered the best conditions for the determination of analytes. Linearity, mean recovery (%): carbendazim (94.8), metiltiofanato (96.7), tiofanato (93.1) y thiabendazol (94.9), y 2,4-diclorofenoxiacético (96.3) were determined for $\alpha=0.05$; standard deviations, variation coefficient and sensitivity of the method were adequate, with detection and quantification limits between 8 and 36 ppb respectively.

Key words: Benzimidazoles – 2,4-diclorofenoxiacético.

INTRODUCCIÓN

Los fungicidas benzimidazólicos tales como carbendazim, metiltiofanato, tiofanato y thiabendazol, y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético; por su acción sistémica preventiva y curativa sobre numerosas enfermedades o plagas, son de uso corriente en cultivos regionales de pre y post-cosecha, fundamentalmente en cítricos (Barberá, 1989; Di Muccio, 1999; Sannino, 1994).

La apertura hacia nuevos mercados internacionales, exige en la actualidad una adecuación a las normas de calidad, especialmente en cuanto a manejo de agroquímicos se refiere. Las mayores exigencias en cuanto a límites de tolerancia de residuos de estos agroquímicos, hacen necesario el desarrollo de metodologías analíticas tendientes a la determinación de contenidos residuales a niveles traza con adecuado rigor científico (Pawlowski, 1998).

La detección de los residuos de plaguicidas mencionados es de particular interés en los frutos cítricos, aunque también en diversos recursos hídricos, ya que pueden encontrarse como contaminantes dada su capacidad de drenar a través de diferentes tipos de suelos o ser movilizados por las corrientes superficiales (Fernández et. al, 2001).

Experiencias previas en la determinación de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) en muestras acuosas por extracción en fase sólida y cromatografía líquida, gestó la inquietud de extender la aplicación de esta metodología a la determinación multiresiduo de otros plaguicidas de relevancia en la región.

En el presente trabajo, por tanto, se plantea como objetivo en una primera etapa, la optimización de una metodología tendiente a la determinación multiresidual en matrices acuosas; con vistas a su posterior aplicación a muestras de cauces naturales y/o efluentes, como así también a matrices complejas tales como frutas cítricas.

El desarrollo metodológico involucra la optimización del proceso extractivo de los benzimidazoles y el 2,4-D en matrices acuosas y su determinación cuantitativa por Cromatografía Líquida de Alta Performance.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el siguiente equipamiento: Cromatógrafo Hewlett Packard Modelo 1050 para Cromatografía Líquida de Alta Performance, detector de longitud de onda variable Modelo 79856AX y columna cromatográfica HP C₁₈ fase reversa, de acero inoxidable de 200 mm x 4,6 mm con Hipersil ODS tamaño de partícula 5 μ . Inyector Rheodyne Mod. 7125, loop de 100 μ l conectado a la columna. Método de inyección: llenado total del loop. Chem Station HP 3365 Series II.

Distribuidor de vacío para extracción en fase sólida (SPE), control de flujo para cada tubo de extracción. Columnas de SPE: cartuchos de polipropileno de 25 ml. Frit y relleno con 500 mg de adsorbente C₁₈ (Alltech) (Di Muccio et. al, 1999).

Se utilizaron los siguientes reactivos: Acetonitrilo grado HPLC (Sintorgan), Metanol grado HPLC (Sintorgan). Acido Fosfórico grado HPLC (Anedra). Fosfato diácido de potasio (Biopack). Acido acético glacial (Biopack). Agua grado 1.

Solución estándar certificado Thiabendazol, Tiofanato, Metiltiofanato, Carbendazim y Ácido 2,4- diclorofenoxiacético (ACCU STANDARD INC).

Las soluciones de estándar a diferentes concentraciones, preparadas a partir de una solución stock de multiresiduo de 1000 mg/l en metanol, se conservaron bajo refrigeración.

Plan de muestreo y preparación de las muestras

Dado que se trata del desarrollo de una metodología analítica el plan de muestreo se limita al tratamiento de muestras acuosas adicionadas.

El número de muestras a analizar se estableció en función de la variabilidad y el grado de confiabilidad esperado ($\alpha = 0,05$) (Quattrocchi, 1992). Las muestras fueron fortificadas a diversas concentraciones de los analitos.

Las muestras acuosas (agua grado 1) se adicionaron a diferentes concentraciones con estándares de los analitos evaluados, por triplicado para cada concentración.

En función de las propiedades fisicoquímicas de los analitos, las muestras se acidificaron con ácido fosfórico hasta pH 2.

Metodología

Dado que se trata de la determinación multiresidual de varios plaguicidas, fue necesario establecer y optimizar las condiciones cromatográficas tales como: fase móvil, velocidad de flujo, temperatura de columna, longitud de onda, etc.

Las etapas siguientes consistieron en la preparación y tratamiento previo de la muestra, método de extracción en fase sólida: selección del adsorbente, eluyente y volumen de eluato.

Los estándares de los analitos evaluados fueron preparados por triplicado en soluciones, de igual composición que el eluyente, a diferentes concentraciones.

Se efectuaron tres lecturas cromatográficas por cada triplicado, obteniéndose un total de nueve resultados por muestra.

Los resultados se analizaron estadísticamente a fin de determinar: desviación estándar, coeficiente de variación, porcentaje de recuperación, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación (Quattrocchi, 1992).

- *Condiciones Cromatográficas:*

en virtud de que se pretende determinar en forma simultánea los diferentes analitos, la longitud de onda óptima de trabajo se estableció en función de las respuestas cromatográficas.

- *Tratamiento previo de la muestra:*

tal como se indicó anteriormente las muestras acuosas adicionadas se acidificaron con ácido fosfórico hasta pH 2 (Fernández, 1993).

- *Selección de la Fase Móvil:*

se realizaron ensayos con diferentes proporciones de la fase acuosa y orgánica, a fin de optimizar el proceso cromatográfico. La composición de las mismas se detalla a continuación (Tharsis, 1997; Di Muccio, 1995):

- Fase Móvil A: KH_2PO_4 0,005M - Ácido acético 0,01% (Fernández, 1993).

- Fase Móvil B: Acetonitrilo-Metanol (1:1) v/v - Ácido acético 0,01%.

A fin de lograr una proporción óptima de volúmenes de las fases móviles A y B, se efectuaron diferentes gradientes de ambas soluciones mediante el uso de la bomba cuaternaria del equipo.

- *Selección del adsorbente, clean up y concentración en fase sólida:*

en función de experiencias previas y considerando la polaridad de los analitos y características de los adsorbentes, se seleccionó el Octadecilsilano (C_{18}) (Fernández, 1993; Fernández, 2001; Veneziano, 2004; Tharsis, 1997).

Para la extracción del analito de las muestras acuosas se emplearon cartuchos o columnas rellenas con 0.5 g de C_{18} . La activación del adsorbente se llevó a cabo con 2 ml de metanol y 2 ml de agua acidulada con ácido fosfórico a pH 2.

- *Selección del eluyente:*

la fuerza elutora del eluyente debe ser máxima a fin de lograr una adecuada desorción de los analitos del adsorbente, por lo que se utilizaron como eluyentes soluciones de diversa composición, tales como:

Fase Móvil: (A:B) 35 /65 v/v

Fase Móvil: (A:B) 45/55 v/v

Fase Móvil: (A:B) 55/45 v/v

Fase Móvil: (A:B) 50/50 v/v

Fase Móvil: (A:B) 70/30 v/v

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones Cromatográficas

La longitud de onda de mejor respuesta para todos los analitos correspondió a 230 nm. Se estableció una temperatura de columna de 40°C y velocidad de Flujo de la fase móvil por columna en 1 ml/min.

Selección de la Fase Móvil

Tal como se indicó anteriormente las fases móviles utilizadas fueron:

- Fase Móvil A: KH_2PO_4 0,005M - Ácido acético 0,01%.

- Fase Móvil B: Acetonitrilo-Metanol (1:1) v/v - Ácido acético 0,01%.

La relación óptima correspondió a una relación de las fases A y B de 55:45 v/v respectivamente.

Selección del adsorbente, clean up y concentración en fase sólida

Tal como se explicitó anteriormente se adoptó el C_{18} como adsorbente presentando una adecuada capacidad de retención y concentración del analito en la fase sólida.

Selección del eluyente

Los rangos de porcentajes medios de recuperación obtenidos para cada uno de los eluatos permiten establecer el eluyente más adecuado para el proceso.

En virtud de los porcentajes medios de recuperación obtenidos para las diferentes composiciones de los eluyentes, la solución con mayor poder elutrópico corresponde a la solución de Fase Móvil (A:B) en una proporción 50/50 v/v a pH 2 - 2,5.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente (Quattrocchi, 1992), determinándose:

- Linealidad: inyecciones por triplicado de muestras acuosas adicionadas con estándar de carbendazim, metiltiofanato, tiofanato, thiabendazol y 2,4-D a 0.1, 0.3, 0.5, 1 y 2 ppm.
- Sensibilidad: inyección por triplicado de tres muestras de baja concentración (0.05, 0.1 y 0.3 ppm) de solución multiresiduo de carbendazim, metiltiofanato, tiofanato, thiabendazol y 2,4-D. Determinación de límites de detección y cuantificación.
- Precisión: del sistema y el método, determinada para tres concentraciones (2, 0.5 y 0.1 ppm) de solución multiresiduo por triplicado de muestras adicionadas.
- Exactitud: procesamiento por triplicado de muestras adicionadas con carbendazim, metiltiofanato, tiofanato, thiabendazol y 2,4-D a 2, 1 y 0.5 ppm; para determinar % de recuperación del método.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos del tratamiento estadístico.

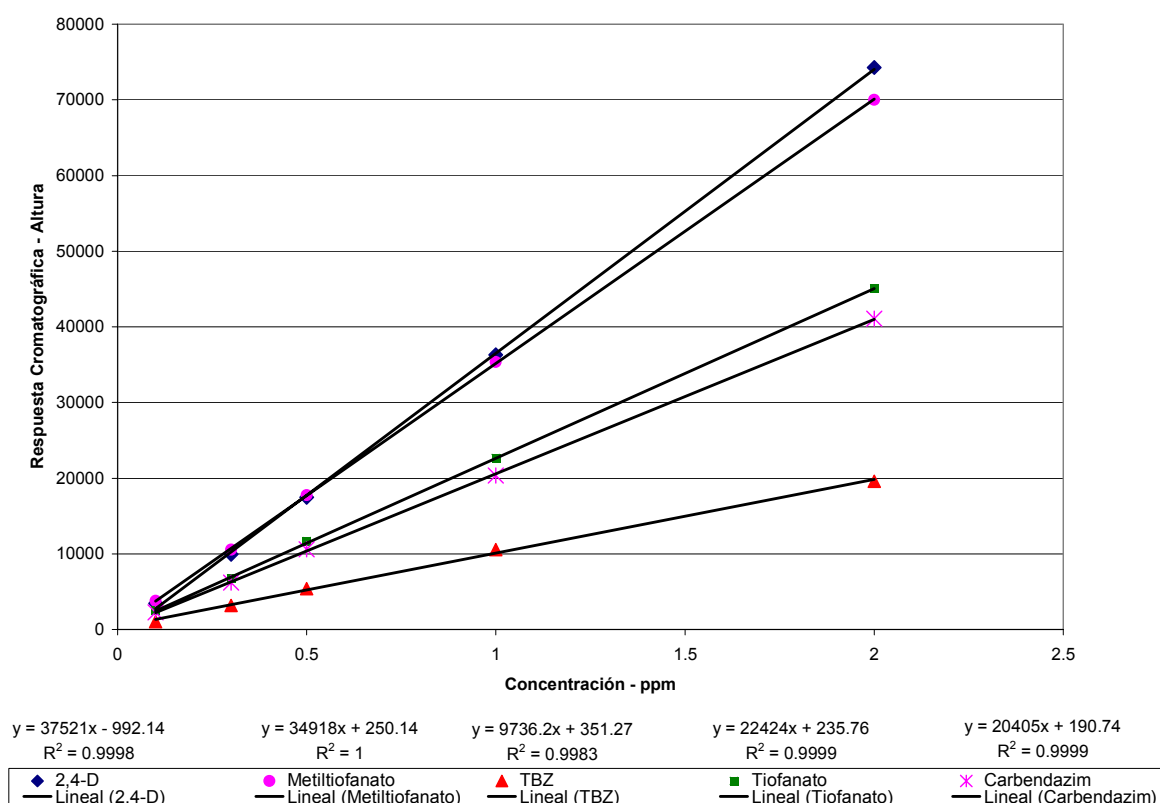


Figura 1: Linealidad

Los resultados obtenidos correspondientes a la precisión del método, límites de detección y cuantificación, por ejemplo para los diferentes analitos en soluciones multiresiduos de a 0.1 ppm, se muestran en la tabla 1.

Los resultados obtenidos en la determinación de exactitud del método, correspondiente al procesamiento por triplicado de muestras adicionadas con carbendazim, metiltiofanato, tiofanato, thiabendazol y 2,4-D a 2, 1 y 0.5 ppm, de indican en la tabla 2; para $n = 9$, recuperación media, desviación standard, RSD. Siendo el $t_{\text{observado}}$, en todos los casos, menor al t_{tabla} para $\alpha = 0.05$ y $n-1$, lo que permite establecer que no existen diferencias significativas entre recuperación media y 100 %.

Tabla 1: Precisión, límites de detección y cuantificación

Analitos	Media	Desv. Std.	RSD %	Intervalo de confianza	Límite de detección (ppb)	Límite de cuantificación (ppb)
2,4-D	0.097	0.0054	5.57	± 0.010	8	26
Carbendazim	0.095	0.006	6.20	± 0.015	8.5	27
Metiltiofanato	0.108	0.0033	3.08	± 0.0063	11	36
TBZ	0.101	0.011	11.03	± 0.021	10	35
Tiofanato	0.110	0.0045	4.11	± 0.0086	8	27

Tabla 2: Exactitud

Analitos	Valores medios de recuperación (%)	Desv. Std.	RSD %
2,4-D	96.3	2.18	2.27
Carbendazim	94.8	1.85	1.97
Metiltiofanato	96.7	3.49	3.42
TBZ	94.9	3.75	3.56
Tiofanato	93.1	2.08	2.03

CONCLUSIONES

La determinación multiresiduo de carbendazim, metiltiofanato, tiofanato, thiabendazol y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético a partir de muestras acuosas por extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta performance, empleando octadecilsilano (C_{18}) como adsorbente y fase móvil (A:B) en relación v/v 50:50 como eluyente; a una longitud de onda de 230 nm, temperatura de columna de 40°C y velocidad de flujo de 1 ml/min como condiciones cromatográficas; permitió la cuantificación de los analitos con porcentajes de recuperación relevantes.

Las condiciones óptimas de extracción se establecieron para una composición de la fase móvil correspondiente a la resultante de la mezcla de las siguientes soluciones: H₂KPO₄ 0,005 M - Ácido acético 0,01% y Acetonitrilo-Metanol (1:1) v/v - Ácido acético 0,01%; en una relación de volúmenes 55:45.

El método optimizado es lineal en todo el rango de concentración previsto, con un porcentaje de recuperación medio comprendido entre el 90 y 100 % para todos los analitos a un nivel de confianza del 95%. La sensibilidad del método es adecuada, con límites de detección y de cuantificación entre 8 y 36 ppb.

BIBLIOGRAFIA

Barberá, C. Pesticidas Agrícolas. 4º Edic. Ed. Omega. Barcelona. 1989.

Di Muccio, A.; Camoni, I.; Ventriglia, M.; Barbini Attard, D.; Mauro, M.; Pelosi, P.; Generali, T.; Ausili, A.; Girolimetti, S. Simplified clean-up for the determination of benzimidazolic fungicides by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of chromatography A*, **697** 145-152. 1995

Di Muccio, Alfonso; Girolimetti, Silvana; Barbini, Danilo Attard; Pelosi, Patrizia; Generali, Tiziana; Vergori, Luciano; De Merulis, Giovanni; Leonelli, Antonio; Stefanelli, Patrizia. Selective clean-up applicable to aqueous acetone extracts for the determination of carbendazim and thiabendazole in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, **833** 61-65. 1999.

Fernández, M.; Rodríguez, R.; Pico, Y.; Mañes, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. *Journal of Chromatography A*, **912** 301-310. 2001

Fernández, F.; Beltran J. and J.V. Sancho, J.V. Study of multi-residue methods for the determination of selected pesticides in groundwater. *The Science of the total Environment*, **132** 297-312. 1993.

Pawlowski, Tina M.; Pool, Colin F. Extraction of Thiabendazole and Carbendazim from Foods Using Pressurized Hot (Subcritical) Water for Extraction: A Feasibility Study. *J. Agric. Food Chem.*, **46** 3124-3132. 1998

Quattrocchi, Oscar A.; Abelaira, S.; Laba, R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Artes Gráficas, Farro S.A.. Buenos Aires. 1992.

Sannino, A. Investigation into contamination of processed fruit products by carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole. *Food Chemistry*, **52** 57-61. 1995.

Tharsis, N.; Portillo, J. L.; Broto-Puig, F.; Comellas, L. Simplified reverse-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of chromatography A*, **78** 95-101. 1997

Veneziano, Attilio; Vacca, Giovanni; Arana, Swizly; De Simone, Francesco; Rastrelli, Luca. Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chemistry*. 2004.

OCURRENCIA DE MICOTOXINAS EN TRIGO Y SOJA COSECHADOS EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS DURANTE LAS CAMPAÑAS 2.001/02 Y 2.002/03

GASPAROVIC, Alejandra M*, BROGGI, Leticia E*, GOLDARACENA, Carlos A*, RAFFO, Argelia C*, PIAGGIO, Orlando L* y SACCHI, Cecilia M*.

(*) Facultad de Bromatología. Universidad Nacional de Entre Ríos. Perón 64, (E2822EXB), Gualeguaychú, Entre Ríos, tel. 03446-426115, Fax: Int. 39, agasparovic@fb.uner.edu.ar, janyg_25@hotmail.com

RESUMEN

Los cultivos de soja y trigo ocupan el primer y tercer lugar respectivamente dentro del total de la producción agrícola de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Se evaluó el nivel de contaminación por aflatoxinas (AFs), zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON) en estos granos y fumonisinas (FBs) en soja durante las campañas 2.001/02 y 2.002/03, por su implicancia **en** la salud humana o animal. Se analizaron 25 muestras de trigo y 19 de soja por TLC y/o HPLC. Los niveles de DON en el trigo para el primer período oscilaron entre 0,249 y 1,243 µg/g (promedio: 0,84 µg/g y mediana: 0,87 µg/g), y en el segundo, entre 0,466 y 0,559 µg/g. No se encontraron AFs ni ZEA en los dos ciclos estudiados. En la soja no se detectó ninguna de estas toxinas en ambas cosechas. Éste es el primer diagnóstico de ocurrencia de micotoxinas en trigo y soja de Entre Ríos.

Palabras claves: aflatoxinas, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas, trigo, soja.

ABSTRACT

Soybean and wheat are the main and third crops cultivated in Entre Ríos province, Argentina. Occurrence of aflatoxins (AF), zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) in these seeds and fumonisins (FBs) in soybean was determined during the harvesting seasons of 2001/02 and 2002/03, which is very important for their implication in human and animal health. 25 samples of wheat and 19 of soybean were analyzed using thin layer chromatography (TLC) or high performance liquid chromatography (HPLC). DON levels in wheat in 2001/02 period were between 0.249 and 1.243 µg/g (mean: 0.844 µg/g and median: 0.870 µg/g) and in 2002/03 between 0.466 and 0.559 µg/g. AFs and ZEA were not detected in wheat on these periods. These mycotoxins were not detected in soybean during the same periods. This is the first report of the occurrence of mycotoxins in wheat and soybean in Entre Ríos, Argentina.

Key words: aflatoxins, zearalenone, deoxynivalenol, fumonisin, wheat, soybean.

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de soja ha tenido un fuerte incremento en las últimas décadas, con 201,067 millones de toneladas para la campaña 2.003/2.004. Argentina pasó de producir 11,500 millones de toneladas en 1.990 a 31,500 en la campaña 2.003/04, siendo en la actualidad el principal cultivo. Las provincias de Santa Fé, Córdoba y Buenos Aires produjeron el 78,2 %. Entre Ríos ocupó el cuarto lugar con una producción de 2.809.000 Tn en el período 2.002/03 (www.sagpya.mecom.gov.ar, 2.005). Respecto al trigo, en la campaña 2.002/03, Argentina produjo 12,301 millones de Tn, ocupando el quinto lugar como país exportador de este cereal (www.fyo.com, 2.003). Las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fé representaron en conjunto el 83,1 % del total producido durante el período 2.002/03 ocupando Entre Ríos el quinto lugar con un 3,78 % (www.sagpya.mecom.gov.ar, 2.004). En Entre Ríos la soja y el trigo ocuparon el primer y tercer lugar de la producción de cereales y oleaginosas durante la campaña 2.002/03. (www.bolsacer.com.ar, 2.004).

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por ciertos hongos toxicogénicos de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, principalmente. Muchos de estos compuestos han sido asociados a la aparición de efectos adversos en animales y humanos. Las aflatoxinas (AFs) tienen acción cancerígena. La zearalenona (ZEA) tiene actividad estrogénica y anabólica. Los tricotecenos son sustancias con una potente acción irritativa local y el deoxinivalenol (DON) podría ser nefropático. Intoxicaciones por fumonisinas ocasionaron brotes epidémicos de leucoencefalomalacia equina (ELEM) en varios países incluyendo Argentina y la denominada Mystery Swine Disease que se caracterizó por epidemias de mortalidad y disfunción respiratoria en cerdos adultos.

El objetivo de este trabajo fue determinar, la ocurrencia de AFs, ZEA y DON en estos cultivos y además FBs en soja durante las campañas 2.001/02 y 2.002/03 en la provincia de Entre Ríos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis de aflatoxinas, zearalenona y deoxinivalenol por TLC

Las muestras se tomaron según la metodología empleada en los distintos centros de acopio obteniéndose una muestra total de 10 kg como lo recomendado por Apro y col. (1.987). Se mezcló y cuarteó para obtener una submuestra de 2 kg que se almacenó en el laboratorio en freezer (-30°C) hasta la realización del análisis. Las muestras se molieron en un molinillo para cereales y se tamizaron por un tamiz malla nº 20 A.S.T.M. Se analizó

aflatoxinas (AFs) zearalenona (ZEA) y deoxinivalenol (DON) en 25 muestras de trigo y 19 de soja por TLC utilizando el método N° MY8402s, ROMER. 25 g de las muestras se extrajeron con 100 ml de acetonitrilo:agua (84:16) con agitación durante 3 minutos, luego se filtraron 5 ml por papel Whatman N° 4 a un tubo de ensayo con 10 µl de ácido acético. Se realizó el “clean up” con columna Mycosep 224 (Romer Labs). Se evaporaron 2 ml de este extracto purificado hasta sequedad en un baño de agua a 60°C bajo vacío. El residuo obtenido se resuspendió en 100 µl de tolueno:acetonitrilo (95:5) y se sembró 50 µl del extracto de cada muestra, en placas de TLC de sílica gel 60 (Merck 1.05553) contra puntos de estándar de 5 µl de AFs y 3 y 6 µl de estándares de ZEA y DON. La cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente utilizando como solvente tolueno:acetona (1:1). Luego de la corrida se observó la placa con luz UV a 366 nm para AFs y a 254 nm para ZEA, presentando una coloración azul las primeras y verdosa, la segunda. La confirmación de AFs se realizó asperjando con ácido sulfúrico al 20 % sólo en la zona de estas toxinas y observando el cambio de coloración de las manchas al amarillo. Para confirmar ZEA se sumergió la placa en cloruro de aluminio al 20 % en etanol: agua (1:1) observando a la luz UV el viraje al azul de las manchas. Para DON, se calentó la placa a 150 °C 4 minutos y se observó viraje al color azul de las manchas bajo luz UV a 366 nm. El estándar de aflatoxinas utilizado fue de 1,21 µg/ml B₁, 1,03 µg/ml B₂, 1,59 µg/ml G₁ y 0,53 µg/ml G₂ en benceno:acetonitrilo (98:2). El estándar de DON fue de 51,81 µg/ml en acetato de etilo:metanol (19:1) y el de ZEA de 100 µg/ml en cloroformo:metanol (1:1). El límite de detección de esta metodología para AFs fue de 1 µg/kg y 25 µg/kg para ZEA y DON.

Si se detectan AFs, se siembra otra placa contra 3 puntos de estándar de AFs y se desarrolla en cloroformo:acetona (9:1), donde se observan AFB₁ y AFB₂ de color azul y AFG₁ y AFG₂ de color verde. Luego se confirman con ácido sulfúrico al 20%.

Se estimó la concentración de cada toxina por comparación con los estándares y se cuantificó (González y col., 1.999; Pacin y col., 2001; Broggi, 2.003).

Análisis de fumonisinas por HPLC

Se analizaron las muestras de soja para determinar la presencia de FB₁, FB₂ y FB₃ de acuerdo con la metodología de Sydenham y col. (1.992). Una submuestra de 50 g se extrajo con 100 ml de solución de metanol:agua (3:1), se agitó durante 5 minutos con un agitador Osterrizer. Se centrifugó durante 10 minutos (500 G) y se filtró por papel Whatman N° 4. Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M. Se activó una columna SAX con 5 ml de metanol y 5 ml de metanol:agua (3:1). Se pasaron 10 ml del filtrado por este cartucho y se lavó el mismo con 5 ml de metanol:agua (3:1) y 3 ml de metanol. Se eluyeron las

toxinas con 10 ml de ácido acético:metanol (1:99) a una velocidad de 1 ml/minuto. El eluido se evaporó a sequedad a 60°C en corriente de Nitrógeno. Se redisolvió el residuo con 200 µl de metanol y se derivatizaron 25 µl con 225 µl de OPA (O-ftaldialdehído). Se inyectaron 10 µl antes de 1 minuto en el HPLC. La fase móvil utilizada fue metanol:NaH₂PO₄ 0,1 M (77:23) (pH 3,3) con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se utilizó columna de fase reversa C-18 termostaticada a 25 °C. Las toxinas se detectaron con detector de fluorescencia (λ excitación: 335 nm, λ emisión: 440 nm). Los límites de detección fueron: FB₁ : 10 ng/g ; FB₂ : 50 ng/g y FB₃ 10 ng/g. La recuperación promedio para FB₁ y FB₃ fue mayor al 94 % en un nivel de 100 µg/kg y para FB₂ superior al 90 % en el mismo nivel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen pocos trabajos sobre micoflora contaminante y ocurrencia natural de micotoxinas en soja. La mayoría de las publicaciones indican que esta oleaginosa es un sustrato poco favorable para el crecimiento de hongos. En 100 muestras de soja de Egipto, El Kady y Youssef (1.993) encontraron que el 35% estaban contaminadas con aflatoxinas, en un rango comprendido entre 5 y 35 µg/kg.

Díaz (1.995) informó, la presencia de aflatoxinas, ocratoxina A y toxina T-2. Los niveles de AFs detectados, en general, fueron bajos resultando potencialmente tóxicos los valores hallados de las otras dos toxinas. En EEUU Jacobsen y col. (1.995) estudiaron la contaminación con ZEA y DON en 24 muestras de esta oleaginosa. Detectaron ZEA en 19 muestras en un rango comprendido entre 80 y 1,720 ng/g y DON en 16, en un rango entre no detectable y 490 ng/g.

En el trabajo de Resnik y col. (1.995) se informa la presencia de aflatoxinas en soja de Argentina, Chile y Guatemala y en torta de soja de Panamá. En nuestro país, Fernández Pinto y col. (1.991) hallaron que un 9,6 % de 94 muestras analizadas de esta oleaginosa estaban contaminadas con AFs en un rango de 13 a 36 µg/kg. En muestras de cultivos experimentales de soja de la zona de Buenos Aires no se detectó ZEA ni DON (Boca y col., 2.000). Mallmann y col. (2.001) no detectaron FB₁ en muestras de harina de soja del sur de Brasil.

En este trabajo realizado en Entre Ríos no se detectaron AFs, ZEA, DON ni FBs en las 19 muestras de soja cosechadas durante los años 2.002 y 2.003. Esto difiere de los resultados obtenidos por, Fernández Pinto y col. (1.991), El Kady-Youssef (1.993), Jacobsen y col. (1.995), Resnik y col. (1.995) y por Díaz (1.995), y coincide con los datos previos hallados en la provincia de Buenos Aires (Boca y col., 2.000) y con el trabajo de

Mallman y col. (2.001) en lo que respecta a fumonisinas. Cabe señalar que la legislación MERCOSUR no establece límites para estas toxinas en la soja. Argentina y Uruguay legislan con un máximo de 30 µg/kg (www.micotoxinas.com.br, 2.004).

Respecto a los resultados obtenidos en el trigo, en la Tabla 1 se observan los niveles de contaminación por DON en este cereal de las cosechas 2.001/02 y 2.002/03 en Entre Ríos. No se detectó aflatoxinas ni ZEA en los períodos citados.

Tabla1. Niveles de DON en el trigo cosechado en Entre Ríos durante los períodos 2.001/02 y 2.002/03

Período	N° de muestras	+/totales	Rango (µg/g)	Promedio (µg/g)	Mediana (µg/g)
2.001/02	16	16/16	0,249-1,243	0,844	0,870
2.002/03	9	9/9	0,466-0,559	0,513	0,524

Fazekas y col. (2.000) estudiaron la contaminación natural con DON por HPLC en 99 muestras de trigo de Hungría de la cosecha 1.998. El 88 % de las mismas presentaron contaminación con esta toxina, con un nivel máximo de 4,3 mg/kg y un promedio de 0,94 mg/kg.

Desjardins y col. (2.000) investigaron la ocurrencia de especies de *Fusarium* y de fumonisinas, nivalenol y DON en maíz y trigo cosechados en Nepal y no detectaron DON ni NIV en las muestras de trigo. Döll y col. (2.002) estudiaron la contaminación con DON y ZEA en trigo y cebada de Thuringia (Alemania) en 1.998. El 65 % de las muestras de trigo presentó contaminación con DON con un promedio de 1.380 µg/kg de materia seca (MS) y un rango de 120 a 11.660 µg/kg de MS. En 11 muestras de 181 analizadas, se detectó ZEA (promedio: 69 µg/kg de MS, rango: nd - 250 µg/kg).

En nuestro país Pacin y col. en 1.997 informaron que de 60 muestras de trigo analizadas, el 93,3 % estaban contaminadas con DON, con un promedio de 1.798 µg/kg en un rango comprendido entre 100 µg/kg y 9.250 µg/kg. En el trabajo de Dalcerro y col. (1.997) se estudió la ocurrencia natural de DON y *F. graminearum* en el trigo de Córdoba del período 1.993/94. De 40 muestras analizadas, el 80 % presentó contaminación con esta toxina en niveles comprendidos entre 300 y 4.500 µg/kg. González y col. (1.999) estudiaron la micoflora contaminante y los niveles de contaminación por DON en 60 muestras de trigo del sureste de la provincia de Buenos Aires. En las 27 muestras positivas, los niveles de contaminación por DON estuvieron comprendidos en un rango entre 26 y 6.400 µg/kg.

Los valores de DON obtenidos en este trabajo, fueron menores a los encontrados por Pacin y col (1.997), Dalcerio y col. (1.997), González y col. (1.999), Fazekas y col. (2.000) y Döll y col. (2.002), y mayores que los de Desjardins y col. (2.000).

Los límites máximos permitidos de DON en trigo no se han establecido en la legislación MERCOSUR ni en la Argentina. Estados Unidos regula un máximo para DON de 1.000 µg/kg en alimentos a base de trigo y Canadá 2.000 µg/kg en trigo molido. La Unión Europea establece un máximo de 4 µg/kg para aflatoxinas totales y 2 µg/kg para AFB₁. En Francia el máximo permitido de ZEA en cereales es de 200 µg/kg y en Italia de 100 µg/kg (www.micotoxinas.com.br, 2.004). De acuerdo a estas reglamentaciones los valores encontrados en este trabajo para este cereal no superan los niveles legislados. Cabe destacar que 5 muestras superarían el valor de 1ppm que algunos molinos harineros de Entre Ríos establecen para el trigo que ingresa al procesamiento.

CONCLUSIONES

A partir de este trabajo, se cuenta con el primer diagnóstico de ocurrencia de micotoxinas en trigo y soja producidos en la provincia de Entre Ríos. En la soja cosechada en los años 2.002 y 2.003, no se halló contaminación por AFs, ZEA ni DON, resultado coincidente con los obtenidos por otros investigadores en Argentina. Es relevante destacar que no se detectaron FBs en dicho grano, resultado de interés por la importancia económica de este cultivo en la región. Respecto al trigo proveniente de estas campañas, no se determinaron niveles detectables de AFs ni ZEA, y los valores de DON hallados, no superaron los máximos establecidos por distintas legislaciones internacionales para este cereal. Cabe señalar que el 27,8 % de las muestras analizadas superaron el valor máximo de DON que algunos molinos harineros de Entre Ríos establecen para el trigo que ingresa al proceso de elaboración de harina.

AGRADECIMIENTOS

Estos autores agradecen a la Dra. Silvia Resnik y al Dr. Lucas González (Universidad de Buenos Aires) y a la Dra. Ana Pacin (Universidad Nacional de Luján, Centro de Investigación en Micotoxinas) por su colaboración científica en el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- **Apro N., Resnik S. L. y Ferro Fontán C. 1.987.** Representative samples for mycotoxin analysis. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 75, 501-510.

- **Boca R.T., Pacin A., González H.H.L., Resnik S.L., De Souza J. 2.000.** Micoflora contaminante y ocurrencia natural de micotoxinas en ensayos de evaluación de variedades de soja en la Pampa ondulada provincia de Buenos Aires. III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología, Córdoba, Argentina.
- **Broggi L. E. 2.003.** "Productos agrícolas de la provincia de Entre Ríos: contaminación potencial por mohos y micotoxinas e influencia de los procesos de molienda regional". Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Dalcero A., Torres A., Etcheverry M., Chulze S. y Varsavsky E. 1.997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Additives and Contaminants*, 14 (1), 11-14.
- **Desjardins, A. E., Manandhar G., Plattner R. D., Maragos C. M., Shrestha K. and McCormick S. P. 2.000.** Occurrence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Nepalese Maize and Wheat and the Effect of Traditional Processing Methods on Mycotoxin Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1.377-1.383.
- Diaz G. J., 1.995.** Micotoxinas presentes en la soya y sus subproductos. Seminario-Taller control de calidad y usos de la soya integral en alimentación animal. Asociación Americana de soya. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Colombia.
- **Döll, S., Valenta H., Dänike S. and Flachowsky G. 2.002.** *Fusarium* mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany. *Landbanforschung Völkenrode*, 52 (2), 91-96.
- **El-Kady I. A. and Youssef M. S. 1.993.** Survey of mycoflora and mycotoxins in Egyptian soybean seeds. *Journal of Basic Microbiology*, 33 (6), 371-378.
- **Fazekas B., Hajdu E. T., Tar A. K. y Tanyi J. 2.000.** Natural deoxynivalenol (DON) contamination of wheat samples grown in 1.998 as determined by high-performance liquid chromatography. *Acta Veterinaria Hungarica*, 48 (2), 151-160.
- **Fernandez-Pinto V. E., Vaamonde G., Brizzio S. B. and Apro N. 1.991.** Aflatoxin production in soybean varieties grown in Argentina. *Journal of Food Protection*, 54, 542-545.
- **González H. H. L., Martínez E. J., Pacin A. y Resnik S. L.. 1.999.** Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. *Mycopathologia*, 144, 97-102.
- **González H. H. L., Martínez E. J., Pacin A. M., Resnik S. L. and Sydenham E. W., 1.999.** Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. *Food Additives and Contaminants* , 16, 565-569.

- **Jacobsen B.J., Harlin K.S., Swanson S.P., Lambert R.J., Beasley V.R., Sinclair J.B. and Wei L.S.. 1.995.** Occurrence of fungi and mycotoxins associated with field mold damaged soybeans in the midwest. *Plant Disease*, 79, 86-89.
- **Mallmann C. A., Santurio J. M., Almeida C. A. A., Dilkin P. 2.001.** Fumonisin B1 levels in cereals and feeds from southern Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, 68 (1), 41-45.
- **Pacin A. M., Resnik S. L., Neira M. S., Molto G. and Martínez E. 1.997.** Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 14 (4), 327-331.
- **Pacin A. M., Broggi L. E., Resnik S. L. and González H. H. L. 2.001.** "Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Ríos province, Argentina". *Mycotoxin Research*, 17, 31-38.
- **Resnik S., Costarrica M. L. And Pacin A. 1.995.** Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control*, 6 (1), 19-28.
- **Sydenham E. W., Shepard G. S. and Thiel P. G. 1.992.** Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in Foods and Feeds. *Journal of AOAC International*, 75 (2), 313-318.
- www.bolsacer.com.ar. 2.004.
- www.fyo.com. 2.003.
- www.micotoxinas.com.br. 2.004.
- www.sagpya.mecon.gov.ar. 2.004.
- www.sagpya.mecon.gov.ar. 2.005.

CONDIÇÕES MICOTOXICOLÓGICAS DO ARROZ NO SISTEMA ESTACIONÁRIO DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO

HOELTZ, Michele¹; PEREIRA, Giuliana M.¹; GUZZON, Samanta¹; BALARDIN, Eduardo¹; KITAZAWA, Samira E.¹; FAGUNDES, Carlos A.²; NOLL, Isa B¹.

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul /UFRGS ²Instituto Rio-Grandense do Arroz/IRGA Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre/RS-Brasil, caixa postal 15090, CEP: 91501970, fone (51)33167242, fax (51)33167048, mhtz@bol.com.br

RESUMEN

El sistema de secado estacionario con almacenamiento en silo secador viene siendo utilizado con éxito por muchos productores de arroz. Este trabajo tuvo por objetivo evaluar ese sistema respecto a la incidencia de hongos y micotoxinas en el arroz con cáscara, relacionando factores no biológicos (abioticos). En comparación con la muestra inicial (granos no secados), el sistema presentó mayor contaminación fúngica en todo el período, siendo el tercio superior del silo secador significativamente mas contaminado que el tercio inferior. Las especies de mayor incidencia fueron *Penicillium commune* e *Aspergillus flavus*, siendo cuatro linajes de *A. flavus* productoras de aflatoxina B₁. No fueron detectadas micotoxinas en las muestras analizadas. La humedad del grano influyó positivamente la contaminación por hongos del tercio superior del silo secador, mientras que, en el tercio inferior el factor de influencia fue la temperatura en el interior del compartimiento del almacenado.

Palabras claves: arroz, secado, almacenamiento, hongos, micotoxinas

ABSTRACT

Stationary bin drying and storage system is utilized with success by many rice producers. The aim of this work was to evaluate fungi and mycotoxins contamination of rough rice in this system, related to none biological factors. In comparison with initial sample (not dried grains), the system presented larger fungi contamination in all period, being the upper third part significantly more contaminated than the lower third part. The species of elevated incidence were *Penicillium commune* and *Aspergillus flavus*, being four *A. flavus* isolates aflatoxin B₁ producers. Mycotoxins were not detected in the samples analyzed. Grain moisture influenced significantly fungal contamination in the intermittent handling

and in the upper third part of bin, while temperature inside the bin influenced contamination in the lower third part.

Key-words: rice, drying, storage, fungi, mycotoxins

INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) vem crescendo e o país pode, em pouco tempo, apresentar-se como um celeiro para alimentar a demanda interna e, inclusive, para competir com muita força no mercado internacional. O Rio Grande do Sul se destaca, neste contexto, como o maior produtor brasileiro de arroz contribuindo com 50% da produção nacional, o que corresponde com 25% do que é produzido na América Latina (Anuário Brasileiro do Arroz, 2004).

Estima-se que cerca de 16% da safra desse cereal é perdida anualmente. Essas perdas acontecem principalmente em decorrência do emprego de técnicas pós-colheita ineficientes (FAO, 2004).

Durante o armazenamento, as perdas se dão pelo ataque de insetos, roedores e pelo desenvolvimento fúngico. O desenvolvimento de fungos pode acarretar uma série de efeitos indesejáveis ao produto, como a perda do seu valor nutricional e a produção de micotoxinas, tornando-o impróprio ao consumo (Elias, 2000).

O sistema estacionário, avaliado no trabalho, consiste na passagem forçada do ar, com temperaturas entre 30 e 40°C, pela massa de grãos que permanece parada no compartimento de secagem (silo-secador); após serem secos, os grãos continuam armazenados no mesmo compartimento (Fagundes, 2003)

Considerando-se, portanto, a importância dos aspectos acima relatados, a pesquisa desenvolvida no trabalho teve por objetivo investigar a contaminação fúngica e por micotoxinas no arroz, avaliando os fatores de influência no processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O arroz foi obtido no Instituto Rio – Grandense do Arroz (IRGA), Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra inicial (Época 0) foi coletada representando os grãos recém colhidos e limpos. Duas outras amostras foram retiradas aos quinze (Época 1) e trinta dias (Época 2) durante o processo de secagem. No período de armazenamento, as amostragens foram realizadas a cada dois meses, de duas alturas do silo-secador - altura 1, terço inferior e altura 2, terço superior - em duplicatas (Épocas 3 a 8). A primeira análise realizada foi a contagem de bolores e leveduras em UFC/g de amostra (FDA, 1992).

Colônias morfológicamente distintas desenvolvidas nas placas de contagem foram isoladas sendo as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* identificadas seguindo método proposto por Klich e Pitt (1988) e Pitt (1988), respectivamente.

O gênero *Aspergillus* foi testado quanto ao seu potencial de produção de aflatoxinas e ocratoxina A, em ágar coco, conforme Lin e Dianese (1976). A confirmação da identidade das aflatoxinas foi realizada segundo Przybylski (1975).

A determinação de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e citrinina foi realizada por cromatografia em camada delgada, seguindo método multi-toxinas proposto por Soares e Rodrigues-Amaya (1989), que envolveu extração com metanol/KCl 4% (9:1) seguido de clarificação do extrato com sulfato de cobre 10% e partição líquido-líquido com clorofórmio.

Durante todo o período da pesquisa foram monitorados fatores que poderiam influenciar a contaminação fúngica como a temperatura e umidade do silo-secador e da massa de grãos (base úmida).

Resultados e Discussão

A amostra inicial apresentou uma contaminação fúngica de $5,4 \times 10^4$ UFC/g. Durante todo o período, essa contaminação se manteve em 10^4 UFC/g no terço inferior (altura 1) do silo-secador. O terço superior (altura 2) apresentou uma diferença significativamente maior em todo o período com uma média de 10^5 UFC/g (Figura 1).

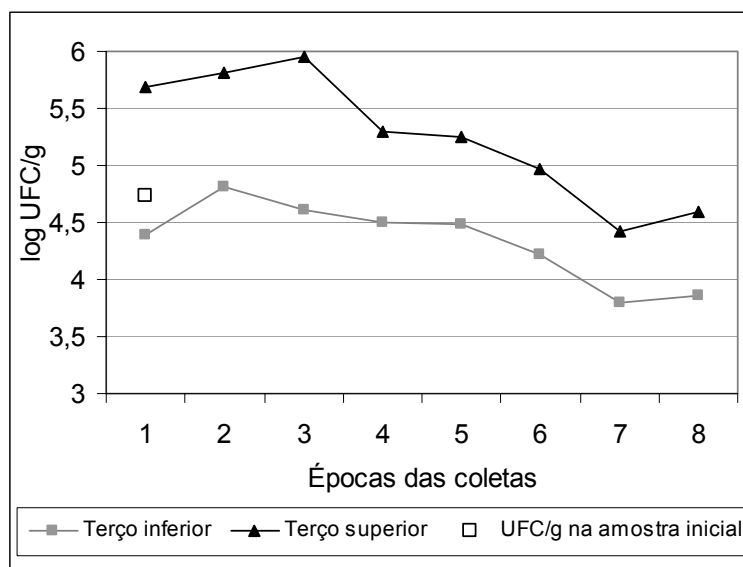


Figura 1. Contaminação fúngica, durante o período analisado, nas duas alturas do silo-secador.

Ao comparar diferentes manejos de secagem e armazenamento de arroz. Bianchini (2003) também observou uma diferença significativa em relação à enumeração fúngica em duas alturas do silo-secador. Nesse experimento, a altura superior apresentou maior contaminação que a altura inferior como observado nesse trabalho, entretanto as contagens foram superiores a 10^5 UFC/g.

O gênero mais observado no sistema foi *Penicillium*, que predominou ao longo da pesquisa. Na amostra inicial, ao contrário, foi observada uma predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*. Esse fato era esperado uma vez que o gênero *Fusarium* é representado por espécies que vêm já do campo e tendem a diminuir durante o armazenamento, onde as condições de umidade do grão são mais baixas. Já o gênero *Aspergillus*, mesmo sendo considerado de armazenamento apresentou redução, que pode ter ocorrido em função da competição com o gênero *Penicillium*, que se adapta melhor as condições de estresse.

Das espécies identificadas, das duas alturas do silo-secador, predominaram, durante todo o experimento, *Penicillium commune* e *Aspergillus flavus* (Tabela 1). As mesmas espécies foram destacadas também na amostra inicial (Época 0).

TABELA 1. Percentual das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas das duas alturas do silo-secador.

Espécies	Altura 1	Altura 2
<i>P. griseofulvum</i>	22	8,77
<i>P. commune</i>	40	38,6
<i>P. solitum</i>	4	5,26
<i>P. islandicum</i>	12	19,3
<i>P. variable</i>	0	5,26
<i>P. corylophilum</i>	18	21,06
<i>P. waksmanii</i>	0	1,75
<i>P. citrinum</i>	2	0
<i>P. canescens</i>	2	0
<i>A. flavus</i>	64,28	46,16
<i>A. parasiticus</i>	19,05	30,77
<i>A. oryzae</i>	11,9	0
<i>A. fumigatus</i>	4,77	0
<i>A. japonis</i> var <i>japonicus</i>	0	15,38
<i>A. niger</i> var <i>niger</i>	0	7,69

Da espécie *A. flavus*, quatro linhagens se mostraram produtoras de aflatoxina B₁ entretanto, não foi verificada a presença desse e dos outros compostos pesquisados em nenhuma das amostras analisadas.

Os grãos posicionados no terço inferior apresentaram valores inferiores de umidade quando comparados àqueles que estavam no terço superior, durante todo o período. Mas a partir da época 3 de coleta, os grãos apresentaram, de modo geral, umidade inferior a 13% (Figura 2). Através da análise estatística, pode-se afirmar que as umidades dos grãos nas alturas 1 e 2 do silo-secador diferem significativamente entre si, com $P = 0,0281$ e confiança de 95%.

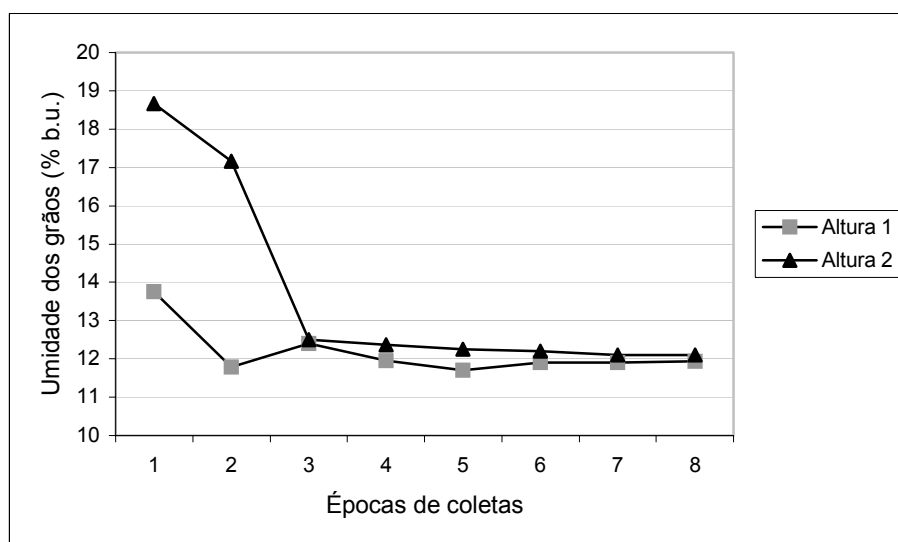


FIGURA 2. Comportamento da umidade dos grãos durante o manejo estacionário de secagem e durante o armazenamento.

Em relação à temperatura da massa de grãos, quando avaliada isoladamente, o terço inferior apresentou temperatura mais elevada em praticamente todo o período, quando comparada ao terço superior (Figura 3). Essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

Quando analisados esses dois fatores juntos, observou-se que a umidade do grão influenciou significativamente a contaminação fúngica do terço superior do silo-secador, com uma confiança de 90% e correlação positiva. Na medida que a umidade do grão diminuía, decrescia também a contaminação fúngica.

Ao verificar a influência da temperatura do interior do silo-secador na contaminação fúngica, em cada uma das alturas, observou-se que no terço inferior, esse fator foi

extremamente significativa, quando considerada uma confiança de 95% ($P < 0,05$). Ou seja, na medida que a temperatura aumentava, a contaminação fúngica decrescia (correlação negativa).

Em relação à umidade no interior do silo-secador, não foi observada sua influência sobre a contaminação fúngica em nenhuma das alturas analisadas.

Resultados semelhantes foram observados por Bianchini (2003) pesquisando a relação de fatores abióticos sobre a contaminação fúngica em arroz com casca armazenado em silos-secadores. Neste trabalho, a autora verificou influência dos fatores umidade, tempo, temperatura e Umidade Relativa, em ordem decrescente de importância.

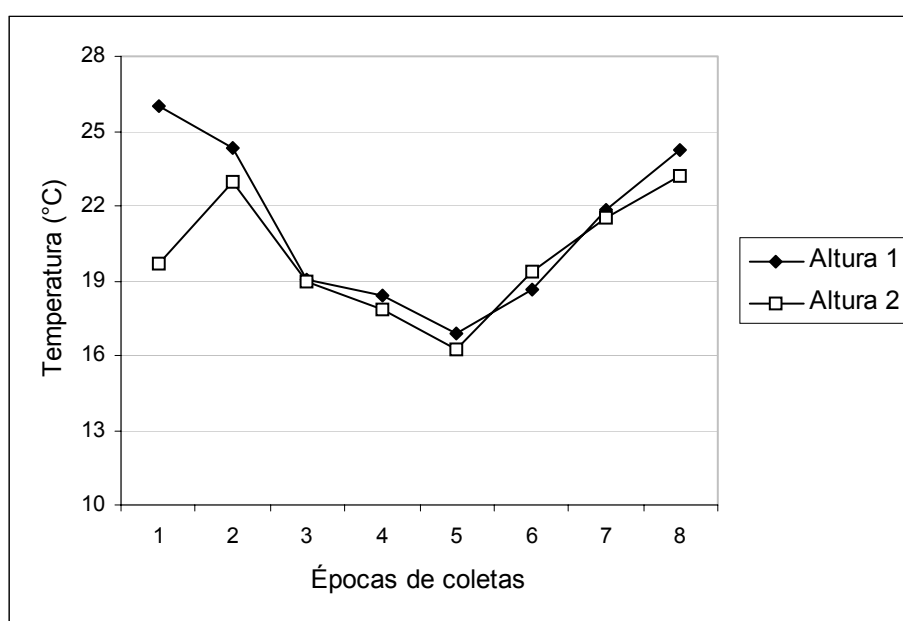


FIGURA 3. Comportamento da temperatura da massa de grãos durante o manejo estacionário de secagem e durante o armazenamento.

CONCLUSÕES

O sistema estacionário apresentou uma contaminação fúngica significativamente maior no terço superior do silo-secador. Foram encontradas 4 linhagens de *A. flavus* produtoras de aflatoxina B₁, mas não foi verificada a presença de micotoxinas nas amostras de arroz com casca analisadas. Os fatores de influência no processo foram a umidade dos grãos e a temperatura no interior do silo-secador (diferentemente da temperatura da massa de grãos).

BIBLIOGRAFIA

ANUÁRIO BRASILEIRO DO ARROZ. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2004. 136p.

BIANCHINI, Andréia. Estudo Comparativo entre Manejos de Secagem e Armazenamento de Arroz na Incidência de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. Porto Alegre: UFRGS, 2003. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

BIANCHINI, A. et al. Influência dos fatores abióticos sobre a microbiota fúngica potencialmente toxigênica isolada de arroz armazenado. In: III Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2003, Camboriú. *Anais*. 638-640p.

ELIAS, Moacir Cardoso. *Tecnologia em secagem e armazenamento de grãos: sistemas, processos e métodos.* Pelotas: Coredesul, 2000.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *All about rice.* Genova: FAO, 2004. Disponível em <http://www.fao.org/rice2004/em/rice9.htm>, acessado em 28/06/2004.

FAGUNDES, Carlos Alberto Alves. Secagem estacionária de arroz em baixas temperaturas. In: I Simpósio Sul-Brasileiro de Qualidade do Arroz, 2003, Pelotas. *Anais*. 275-278p.

FDA. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*, 6 ed. Arlington, EUA, 1992. 529p.

GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 67, n. 6, p. 1108-1110, 1984.

KLICH, M. A.; **PITT, J. I.** *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their telemorphs.* Austrália: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1988, 116p.

LIN, M. T.; **DIANESE, J. C.** A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, Washington, p. 1466-1469, dez. 1976.

PITT, J. I. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species.* Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1988, 187p.

PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 58, n. 1, p. 163-164, 1975.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS, ao Instituto Rio-Grandense do Arroz – IRGA, a CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – PPGMAA/UFRGS.

CONTAMINACION POR FUMONISINAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA MOLIENDA HUMEDA DE MAIZ

FUNES Gustavo J. ⁽¹⁾, TAGLIERI Daniela ^(2,3), CANO Gabriela ^(2,3), PACIN Ana ^(2,3), RESNIK Silvia L. ^(1,3)

(1) FCEyN-UBA, (2) CIM-UNLu, (3) CIC de la Provincia de Bs. As.

Centro de Investigación de Micotoxinas, Universidad Nacional de Lujan. TE: 02323-436940; Fax: 02323-436940; e-mail. anaxto@speedy.com.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es conocer como el proceso de la molienda húmeda afecta la contaminación de las distintas fracciones obtenidas a partir de maíz, en una planta industrial de procesamiento. Se realizó el estudio con granos de maíz cuyo rango de contaminación fue entre 1548-14287 µg/Kg y 385-6199 µg/Kg para fumonisina B1 y B2 respectivamente. La fracción más contaminada fue el "gluten meal", presentando este diferencias con el proceso a escala planta piloto, donde las fracciones mas contaminadas son el germen y el agua de maceración.

Este procesamiento de los granos de maíz, presenta una diferencia considerable con respecto al proceso de molienda seca. En este último observamos una distribución de las fumonisinas, en las fracciones obtenidas, mientras que en la molienda húmeda observamos una reducción de la cantidad de toxina inicial del maíz respecto a la suma de fumonisinas de cada fracción.

Palabras Claves: Molienda húmeda; maíz; Fumonisina B₁; Fumonisina B₂; Micotoxinas.

ABSTRACT

The objective of this work is to identify how wet milling process affects the contamination on the different fractions, obtained in a corn milling industry. The study was carried out with corn contaminated in the range of 1548-14287 and 385-6199 µg/Kg of fumonisins B₁ and B₂ respectively. The "gluten meal" fraction showed the highest contamination, which is different with respect to the scale pilot plant process, where the most contaminated fractions were germ and water maceration.

Wet milling is quite different from dry milling process, in which we observed a distribution of the fumonisins in the obtained fractions, while in the wet milling process, a reduction of

the amounts in corn initial mycotoxin with regard the sum of fumonisins of each fraction, was showed.

INTRODUCCION

El maíz producido en Argentina representa casi el 30% del total de la producción de cereales y oleaginosas (aproximadamente 10 millones de toneladas por año). El maíz exportado representa aproximadamente el 50 de dicha producción (Broggi y col., 2002). En nuestro país este grano es utilizado como alimento para animales (80%), el resto es procesado en molienda húmeda (17%) y seca (3%).

La molienda húmeda permite obtener como productos de maíz: almidón, germen, "gluten feed" (fibra o cáscara del grano) y "gluten meal" (matriz proteica). A partir de estos se producen: almidones modificados, aceite, alimento para animales y productos de azúcar. La producción en Argentina (en miles de toneladas por año) es aproximadamente de almidón 70, fructosa 300, glucosa 150, otros azúcares 70, aceite de maíz 30, "gluten feed" y "meal" 180 (C.A.F.A.G.D.A., 2000).

Las fumonisinas son los contaminantes naturales más importantes encontrados en los maíces argentinos (González y col., 1999; Pacin y col., 2001; Solovey y col., 1999). El objetivo del trabajo es conocer como el proceso de molienda húmeda afecta la contaminación de las distintas fracciones (almidón, germen, "gluten feed" y "gluten meal") obtenidas a partir del maíz original.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de maíz provenientes de una planta de procesamiento industrial, contaminados naturalmente, fueron analizadas para determinar la contaminación del maíz que ingresa al proceso de molienda húmeda. La molienda húmeda a diferencia de la molienda seca, utiliza en todo su proceso agua: para el macerado de los granos y para el lavado de todas las fracciones obtenidas, y las fracciones obtenidas no presentan mezcla con otras fracciones de la molienda. La molienda seca, no utiliza agua, y se obtienen las siguientes fracciones: maíz partido (granulometría menor 2000 μm), harina "C" (granulometría menor a 350 μm), germen, fibra (incluye germen, fibra y almidón) y fracción proteica (granulometría entre 2000-250 μm) (Broggi y col., 2002). Se seleccionaron silos que tuvieran contaminación por fumonisina B1 (FB1) y fumonisina B2 (FB2) a través de un análisis de toxinas previo al procesamiento. Se estudiaron 21 procesos que consistieron en la molienda de 120 toneladas por proceso. Para ello se hizo un muestreo del grano y

de todas las fracciones obtenidas; dicho muestreo fue en forma aleatoria y reduciendo dicha muestra hasta hacer una muestra representativa y adecuada para el trabajo de laboratorio.

Para el análisis de fumonisinas (AOAC, 1996), se extraen 50g de maíz con 100 ml metanol:agua (3:1) y las otras fracciones se agrega metanol de acuerdo al contenido acuoso para mantener la relación 3 de metanol por uno de agua (AOAC, 1996). Se licúa por 3 minutos. Se filtra y se ajusta a pH= 5.8 (NaOH 1 M) y se centrifuga 10 minutos. Se toman 10 ml del filtrado y se pasan por una columna de extracción, prelavada con 5 ml de metanol y 5 ml de metanol:agua (3:1) a flujo ≤ 2 ml/min. Se lava con 5 ml metanol:agua (3:1) y 5 ml de metanol. Las toxinas se eluyen con 10 ml de ácido acético:metanol (1:99) a flujo ≤ 1 ml/min. Se evapora. Se resuspende en 2000 μ l de metanol:acético (99:1). Se toman dos alícuotas de 800 μ l. Se secan y uno de los tubos se resuspende en 1000 μ l de acetonitrilo:agua 1:1. Se utiliza muestreador automático para la determinación, la derivatización es previa a la inyección. Se inyecta 54 μ l del derivado (20 μ l de la muestra). Tiempo retención entre 6.3 y 7.3, para FB1 y 13 a 15 para FB2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios anteriores demuestran que la contaminación por micotoxinas del maíz argentino, es frecuente y considerable (González y col., 1999; Solovey y col., 1999; Pacin y col., 2001), como se puede observar en el presente trabajo.

La Tabla I se encuentra los datos de contaminación inicial del maíz, a partir del cual se obtuvieron las fracciones analizadas.

En la Figura I se pueden observar las relaciones de concentración de las distintas fracciones respecto a la contaminación del maíz a la entrada de la maceración así como la distribución de esas relaciones a través de los Box plots correspondientes.

La relación de contaminación entre FB1 y FB2 encontrada en este trabajo en el maíz es aproximadamente de 2.7. En el trabajo de Bennett y col (1996) se observa que de las fracciones estudiadas el gluten presenta igual concentración de FB2 que FB1 y la fibra mayor FB2. A pesar del bajo numero de muestras analizadas (2) por estos autores, esta tendencia a presentar algunas fracciones mayor contaminación de FB2 se observa en el gluten meal, equivalente a la fracción gluten del trabajo citado.

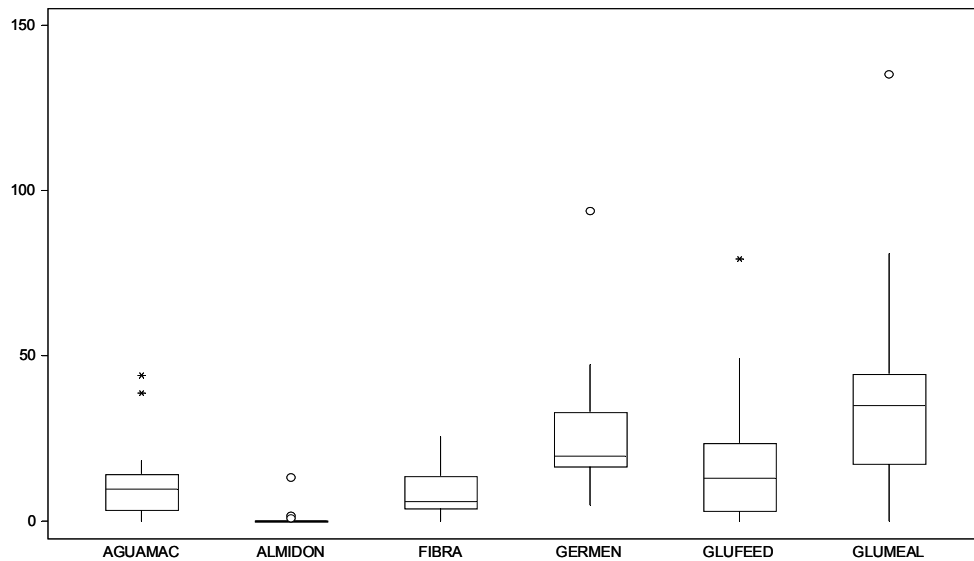
Es de destacar que el almidón (Figura I) no presenta contaminación por fumonisinas. Se puede observar también que todas las fracciones presentan menor concentración que el maíz original, contrariamente a lo observado por Broggi y col. (2002) en el proceso de

molienda seca del maíz donde se encuentran fracciones con mayor concentración de fumonisinas que el maíz original.

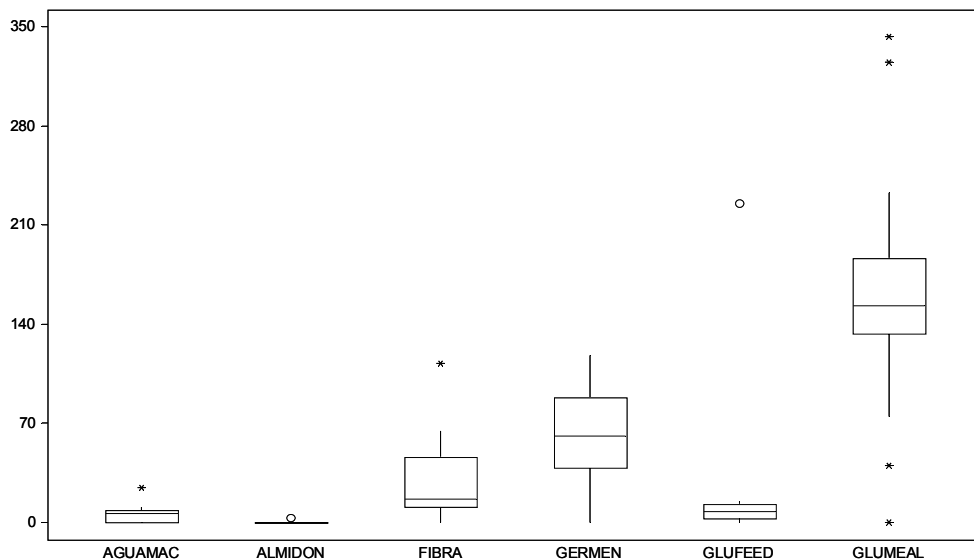
Tabla 1: Resultados del estudio de la contaminación por fumonisinas en el maíz y las distintas fracciones obtenidas de la molienda húmeda

Fracciones	N	Mínimo	Máximo	Mediana
Maíz FB1	19	1548	14287	6139
Germen FB1	18	334	2584	1211
Gluten Meal FB1	18	0	3520	2062
Gluten Feed FB1	11	0	2648	1020
Fibra húmeda sin agua de maceración FB1	16	0	1091	386
Fibra húmeda con agua de maceración FB1	4	180	3591	1398
Suspensión de almidón FB1	17	0	205	0
Agua de Maceración FB1	16	0	2079	492
Maíz FB2	19	385	6199	2170
Germen FB2	18	0	2506	1032
Gluten Meal FB2	18	0	5298	3317
Gluten Feed FB2	11	0	868	224
Fibra húmeda sin agua de maceración FB2	16	0	2087	413
Fibra húmeda con agua de maceración FB2	4	189	797	575
Suspensión de almidón FB2	17	0	198	0
Agua de Maceración FB2	16	0	347	158

FB1: Fumonisina B1; **FB2:** Fumonisina B2



(A)



(B)

Figura I: Relación de las concentraciones de las fracciones vs. Maíz para Fumonisina B1 (A) y Fumonisina B2 (B)

También se puede observar que la fracción mas contaminada en el proceso industrial de molienda húmeda es el “gluten meal”, mientras que en el procesamiento a escala planta piloto son el germen y las aguas de maceración (Funes y col., 2000)

Cuando se realiza un balance de masa de las fumonisinas presentes en todas las fracciones respecto a la cantidad de fumonisinas en el maíz que ingresa en el proceso de molienda industrial, la reducción de la contaminación observada es del 94 y 87 % para FB1 y FB2 respectivamente.

CONCLUSIÓN

El proceso de molienda húmeda de maíz, presenta diferencias importantes en la concentración de fumonisinas remanentes en las distintas fracciones obtenidas cuando se realiza a escala planta piloto o a escala industrial. En el proceso a escala planta piloto las fracciones más contaminadas son el germen y las aguas de maceración mientras que en el proceso a escala industrial la fracción más contaminada es el "gluten meal".

En el proceso de molienda seca se producen una distribución de las fumonisinas en las fracciones obtenidas, mientras que en el proceso de molienda húmeda hay una considerable reducción.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC, 1996, Official Method 995.15 Fumonisin B₁, B₂, and B₃ in corn Liquid Chromatographic Method AOAC-IUPAC Method. First Action 1995. Natural Toxins Chapter 49, pp 49 AOAC Official Method of Analysis (1995) Supplement March

Bennett G.A; Richard J.L; and Eckhoff S.R. 1996, Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. In Fumonisin in food. Edited by Jackson et al. Plenum Press New York, 317-322.

Broggi, L.E, Resnik S.L, Pacin A.M, González H.H.L, Cano G. and Taglieri D., 2002, Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 19(5), 465-469, ISSN 0265-203X. <http://www.tandf.co.uk> - Taylor & Francis Ltd.

C.A.F.A.G.D.A., 2000, Cámara Argentina de Fabricantes de Almidón, Glucosa y fines.

Lauren D.R and Ringrose M.A., 1997, Determination of the fate of three fusarium mycotoxins through wet milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 14, N°5, 435-443

Funes G.J, Bello M.O, Taglieri D, Resnik S.L y Pacin A.M., 2000, Influencia del proceso en la contaminación por fumonisinas de las distintas fracciones de la molienda húmeda de maíz *III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología*. Córdoba, República Argentina, 6-11 de Noviembre. p25.

González H.H.L, Martínez E.J, Pacin A.M, Resnik S.L and Sydenham E.W., 1999, Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field

trial corn in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 16(12): 565-569, ISSN 0265-203X.

Pacin A.M, Broggi L.E, Resnik S.L. and González H.H.L.,2001, Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Ríos province, Argentina. *Mycotoxin Research* 17: 31-38. ISSN 0178-788. <http://www.mycotoxin.de> - HWS.

Solovey M.M.Samar de, Somoza C., Cano G., Pacin A. and Resnik S., 1999, A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in corn-based food products in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 16(8): 325-329, ISSN 0265-203X.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la Universidad Nacional de Lujan; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires; Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, de la ANPC y T. A través del BID 1201/OC-AR PICTOR 2002-00012 y de la Comisión Europea, INCO-DEV Project Contract Number ICA4-CT-2002-10043.

MICOFLORA CONTAMINANTE Y PRESENCIA DE TRICOTECENOS TIPO A Y B EN TRIGO COSECHADO EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

PACIN ANA M. ^(1,2), GONZALEZ Héctor H.L. ^(3,4), RESNIK Silvia L. ^(2,5) MOLTO Gustavo A. ⁽⁵⁾
y MASANA Marcelo ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Universidad Nacional de Luján – CIM; ⁽²⁾ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires; ⁽³⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; ⁽⁴⁾ Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires; ⁽⁵⁾ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; ⁽⁶⁾ Instituto Tecnología de Alimentos, INTA Castelar FCE y N, Universidad de Buenos Aires y CIM-Universidad Nacional de Luján. Ciudad Universitaria, (C1428EHA), Buenos Aires, ARGENTINA. TE/FAX: 02323-436940; e-mail: anaxto@speedy.com.ar

RESUMEN

Se realizó un análisis micológico en 68 muestras de trigo de la cosecha 2004 en 5 localidades del noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Se calcularon las frecuencias de aislamiento y las densidades relativas de los mohos aislados. *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* y *Fusarium semitectum* fueron predominantes. *Aspergillus flavus* y *Penicillium citrinum* se aislaron a niveles de frecuencia y densidad relativa muy bajos. Se realizó un análisis de tricotecenos tipo A y B. Los tricotecenos de tipo A encontrados fueron toxinas HT-2 y T-2 triol y de Tipo B deoxinivalenol y acetil deoxinivalenol. En las muestras no se detectó toxinas T-2, T-2 tetraol, neosolanol, ni diacetoxiscirpenol. Tres muestras presentaron posible presencia de nivalenol. El tricoteceno prevalente fue deoxinivalenol, la contaminación en las muestras positivas varió entre 7 y 2.438 µg/kg.

ABSTRACT

A mycological survey was carried out on 68 wheat kernels samples from 5 localities of the northwestern Province of Buenos Aires in 2004. The isolation frequency and relative density of species were calculated. *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* and *Fusarium semitectum* were the predominant. *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* were isolated at very low isolation frequency and relative density levels. An analysis of trichothecenes type A and B natural contamination were performed. The trichothecenes type A detected were HT-2 and T-2 triol toxins and the type B were deoxynivalenol and acetyl deoxynivalenol.

T-2, T-2 tetraol toxins, neosolaniol and diacetoxyscirpenol were not detected. Three were suspected of possible nivalenol presence. The prevalent trichothecene found was deoxynivalenol with contamination levels in positive samples ranged from 7 to 2,438 µg/kg.

Palabras claves: *Alternaria*, *Fusarium*, *trigo*, tricotecenos, deoxinivalenol, micotoxinas.

INTRODUCCION

Los mohos son la contaminación microbiana más común en granos y semillas, y su presencia puede derivar en la producción de micotoxinas. Los mohos presentes en granos y semillas, orientan la búsqueda de contaminación por micotoxinas, en matrices alimenticias elaboradas a partir de dichos granos o semillas. Se conocen especies fúngicas, pertenecientes principalmente a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, que pueden ser capaces de producir micotoxinas que originan manifestaciones patológicas, al ser ingeridas en los alimentos por la población humana y animal.

En Argentina el trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es destinado principalmente a la alimentación humana [Pacin y col., 1999], esta es la razón por la que son importantes los estudios de la ocurrencia natural de tricotecenos tipo A, como las Toxinas T-2, HT-2, T-2 tetraol y T-2 triol, diacetoxyscirpenol (DAS) y neosolaniol (Neo) y tipo B como el deoxinivalenol (DON), 3 y 15 acetil deoxinivalenol (ADON) y nivalenol (NIV) y la micoflora contaminante asociada.

El objetivo de este trabajo es conocer y comparar la micoflora interna presente y la ocurrencia de algunos tricotecenos tipo A y B en trigo pan cosechado en distintas localidades del noroeste de la provincia de Buenos Aires.

MATERIALES Y METODOS

Muestreo. Un total de 68 muestras de trigo pan recién cosechado (≥ 3 kg) fueron colectadas al azar durante la cosecha 2004 en Arrecifes (12 muestras), Bragado (14), Junín (14), Pergamino (14) y San Antonio de Areco (14), provenientes de campos experimentales de INTA en las zonas citadas. Submuestras cuarteadas al azar de 500 g cada una, se destinaron al análisis de la micoflora y de micotoxinas.

Aislamiento de los mohos. Se realizó según la metodología propuesta por González y col. [1996] en agar YGC (Yeast Extract-Glucose-Chloramphenicol Agar, Merck N° 16000).

Identificación de los mohos. Los aislamientos de los mohos fueron identificados de acuerdo a las siguientes metodologías propuestas: especies de *Fusarium* de acuerdo a

Nelson y col. [1983]; especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y otros mohos según Pitt y Hocking [1997]. Se calculó la frecuencia de aislamiento (*Fr*) y la densidad relativa (*DR*) de géneros y de especies como está descrito en González y col. [1996].

Análisis de tricotecenos. El análisis de los tricotecenos se realizó empleando columna Romer para la extracción y limpieza de los extractos, cromatografía gaseosa y confirmación por capa delgada [Croteau y col., 1994]. En resumen se pesaron 25 g de muestra y se agregaron 100 ml de acetonitrilo:agua (84:16). Se agitaron durante 3 minutos a alta velocidad. La mezcla se filtró a través de un papel de filtro Whatman N° 4. Se tomaron 5 ml del filtrado y se trasvasaron a un tubo de 10 ml y se realizó el clean-up con columna ROMER #227. Se evaporó en un baño-maría a 40°C, bajo vacío. Se resuspendió el residuo en 200 µl de acetato de etilo : metanol (95:5). Se tomaron 100 µl y 100 µl de una solución toluénica de 2-amino-5-cloro-benzofenona. Se evaporó a sequedad bajo nitrógeno, se le agregó catalizador y heptafluorbutiril anhídrido ácido como derivatizante. Se agitó 30 segundos y se calentó a 60°C durante 30 min. Se neutraliza y se separa la fase toluénica.

Se identificaron las toxinas de acuerdo a la relación entre el tiempo de retención de cada una de ellas y el del estándar interno. Se calcula la concentración de la micotoxina de acuerdo a una curva de calibración y se confirma por cromatografía planar.

Análisis estadístico. Para analizar posibles diferencias en las frecuencias de aislamiento (*Fr*) de las especies fúngicas de interés micotoxicológico se utilizó el test exacto de Fisher [Conover, 1980]. Para ver diferencias de la contaminación con tricotecenos se usó el test de la mediana, empleando el programa Statistix 7.0 [2000].

RESULTADOS Y DISCUSION

Las *Fr* y *Dr* de las especies fúngicas aisladas de trigo en la Provincia de Buenos Aires en 2004 se muestran en la tabla 1. Se puede observar que *Alternaria alternata* (4.348 aislados), *Fusarium graminearum* (1.244), *Fusarium poae* (132) y *Fusarium semitectum* (75) son las especies predominantes. Es de destacar que *Aspergillus flavus* y *Penicillium citrinum* se aislaron con muy bajos niveles de *Fr* y *DR*.

En la tabla 2 se detallan las *Fr* y *DR* de todas los mohos aislados en cada región. Cualitativamente la micoflora interna identificada es similar a la observada en trabajos previos en trigo pan y candeal realizados en otras localidades de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y La Pampa [González y col., 1996; 1999].

No se observaron diferencias estadísticas en la comparación de *Fr* de las especies de interés micotoxicológico entre localidades.

Tabla 1. Frecuencia de aislamiento (*Fr*) y densidad relativa (*DR*) de mohos aislados de trigo pan en el noroeste de la Provincia de Buenos Aires en 2004.

Especies	Fr (%)	DR (%)
<i>Alternaria alternata</i>	100,0	63,9
<i>Aspergillus flavus</i>	4,4	0,06
<i>Arthriniun phaeospermum</i>	8,8	0,3
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	41,2	0,9
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	63,2	1,6
<i>Curvularia lunata</i>	16,2	0,3
<i>Epicoccum nigrum</i>	91,2	8,4
<i>Eurotium chevalieri</i>	29,4	0,6
<i>Fusarium</i>		
<i>F. acuminatum</i>	1,5	0,02
<i>F. avenaceum</i>	2,9	0,2
<i>F. culmorum</i>	7,4	0,1
<i>F. equiseti</i>	4,4	0,1
<i>F. graminearum</i>	100,0	18,3
<i>F. poae</i>	66,2	1,9
<i>F. sambucinum</i>	7,4	0,3
<i>F. semitectum</i>	36,8	1,1
<i>Mucor racemosus</i>	1,5	0,1
<i>Nigrospora oryzae</i>	35,3	1,3
<i>Penicillium citrinum</i>	13,2	0,3
<i>Phoma</i> spp.	2,9	0,1
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,9	0,03
<i>Ulocladium</i> spp.	1,5	0,01

Se analizaron los tricotecenos presentes y se confirmó la presencia de DON (mínimo de muestras positivas: 7 µg/kg, máximo: 2.438 µg/kg, media muestras positivas: 347,8 µg/kg), HT-2 (3,5 µg/kg, 41 µg/kg, 12,0 µg/kg), T-2 triol (21 µg/kg, 123 µg/kg, 47,1 µg/kg), acetil DON (14 µg/kg, 43 µg/kg, 19,5 µg/kg). Nivalenol detectado en tres muestras no se pudo confirmar por cromatografía planar. No se detectó la presencia de toxinas T-2, T-2 tetraol, diacetoxiscirpenol, ni neosolaniol.

El DON fue la micotoxina predominante. En la figura 1 se muestra el Box Plot de la contaminación de DON en las regiones estudiadas. Se puede observar que el nivel de contaminación de DON en San Antonio de Areco fue el más alto (mediana: 974,0 µg/kg), seguido de Bragado (mediana: 213,0 µg/kg). Estadísticamente la comparación de la mediana de la contaminación de DON en San Antonio de Areco y en Bragado mostró

diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre sí y cuando se compararon con el resto de las localidades.

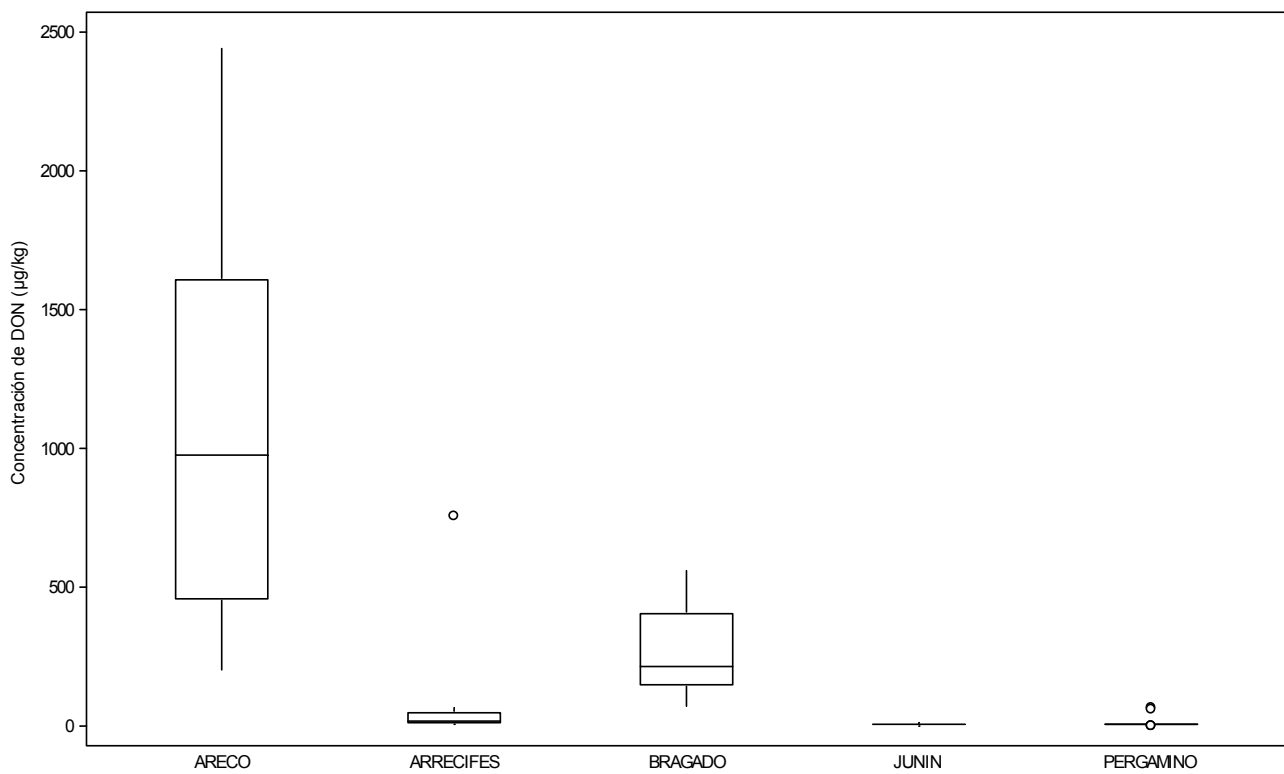


Figura 1. Box –Plot de la concentración de deoxinivalenol (DON) en muestras de trigo cosechado en localidades del noroeste de la Provincia de Buenos Aires en 2004.

CONCLUSIONES

Las especies fúngicas prevalentes y potencialmente micotoxicogénicas fueron: *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae* y *Fusarium semitectum*. La micotoxina predominante entre los tricotecenos analizados fue DON.

Las localidades San Antonio de Areco y Bragado presentaron un mayor nivel de contaminación por DON que Arrecifes, Junín y Pergamino.

La alta incidencia de *Alternaria alternata*, entre los mohos aislados, amerita que se estudie la ocurrencia natural de las toxinas de *Alternaria* en trigo.

BIBLIOGRAFIA

Conover WJ. 1980. Practical Nonparametric Statistic. John Wiley & Sons, New York.

Croteau SM, Prelusky DB and Trenholm HL. 1994. Analysis of trichothecenes mycotoxins by gas chromatography with Electron Capture Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 42: 928-934.

González HHL, Pacin AM, Resnik SL, Martínez EJ. 1996. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinean wheat in 1993. *Mycopathologia*; 135: 129-134.

González HHL, Martínez EJ, Pacin AM, Resnik SL. 1999. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinean durum wheat. *Mycopathologia*; 144: 97-102.

Nelson PE, Toussoun TA & Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

Pacin, AM, Martínez, EJ, Pita Martín de Portela, ML y Neira, MS. 1999. Consumo de alimentos e ingesta de algunos nutrientes en la población de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49:31-39.

Pitt JI and Hocking AD. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London-New York.

Statistix Version 7.0. 2000. Analytical Software. Tallahassee, Florida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero del CONICET, de la CIC, de la UBA, de la UNLu, del INTA y de la Comunidad Europea a través del proyecto INCO-DEV Contract Number ICA4-CT-2002-10043.

Tabla 2. Frecuencia de aislamiento (*Fr*) y densidad relativa (*DR*) de especies fúngicas aisladas de trigo pan en cinco localidades del noroeste de la Provincia de Buenos Aires en 2004.

	Arrecifes		Bragado		Junín		Pergamino		San Antonio de Areco	
Número de Aislamientos	1.200		1.400		1.400		1.400		1.400	
Especies	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>
<i>Alternaria alternata</i>	100,0	65,7	100,0	67,1	100,0	76,7	100,0	66,5	100,0	44,0
<i>Aspergillus flavus</i>	8,3	0,3	7,1	0,07	7,1	0,07	nd	nd	nd	nd
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	25,0	0,8	7,1	0,07	nd	nd	nd	nd	14,3	0,5
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	41,7	0,8	28,6	0,5	28,6	0,6	64,3	1,6	42,9	0,8
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	66,7	1,7	71,4	1,9	28,6	0,9	64,03	1,6	85,7	1,9
<i>Curvularia lunata</i>	8,3	0,3	42,9	0,6	21,4	0,3	nd	nd	7,1	0,07
<i>Epicoccum nigrum</i>	100,0	11,3	92,9	7,5	78,6	4,9	92,9	10,6	92,9	8,4
<i>Eurotium chevalieri</i>	33,3	0,6	21,4	0,4	21,4	0,8	42,9	0,6	28,6	0,9
<i>Fusarium acuminatum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,1	0,07
<i>Fusarium avenaceum</i>	nd	nd	10,53	0,25	nd	nd	nd	nd	14,3	1,1
<i>Fusarium culmorum</i>	16,7	0,2	nd	nd	nd	nd	7,1	0,6	14,3	0,4
<i>Fusarium equiseti</i>	nd	nd	7,1	0,1	nd	nd	14,3	0,4	nd	nd
<i>Fusarium graminearum</i>	100,0	13,3	100,0	16,6	100,0	10,6	100,0	13,4	100,0	36,9
<i>Fusarium poae</i>	83,3	2,8	85,7	2,6	57,1	1,7	42,9	1,0	64,3	1,8
<i>Fusarium sambucinum</i>	25,0	0,9	7,1	0,1	nd	nd	nd	nd	7,1	0,3
<i>Fusarium semitectum</i>	25,0	0,5	21,4	0,5	50,0	1,6	57,1	1,9	28,6	0,9
<i>Mucor racemosus</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,1	0,6	nd	nd
<i>Nigrospora oryzae</i>	33,3	0,7	42,9	1,5	21,4	0,9	35,7	1,3	42,9	2,1
<i>Penicillium citrinum</i>	25,0	0,4	14,3	0,3	21,4	0,8	7,1	0,07	nd	nd
<i>Phoma</i> spp	nd	nd	nd	nd	7,1	7,1	0,4	0,07	nd	nd
<i>Trichoderma harzianum</i>	nd	nd	7,1	0,07	16,67	7,1	0,07	nd	nd	nd
<i>Ulocladium</i> spp.	nd	nd	nd	nd	7,1	0,07	nd	nd	nd	nd

INFLUENCIA DE LA RELACION pH-CALCIO EN LA INTERACCION PROTEINAS-LECITINA DE SOJA Y LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES ACEITE EN AGUA (O/W).

IACOVELLI, MARIA C.; COMAS, DORINA; WAGNER, JORGE R. y TOMAS, MABEL C.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) – Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET) - 47 y 116, (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.
e – mail: mabtom@hotmail.com

RESUMEN

Las proteínas y lecitinas de soja están presentes en alimentos naturales y formulados. El objetivo del trabajo fue investigar la interacción proteínas de soja - lecitina en función de su entorno químico (pH, calcio), evaluando la estabilidad de emulsiones aceite en agua (O/W 25:75 p/p). Los resultados mostraron una disminución de la estabilidad de las emulsiones en presencia de calcio para todos los valores de pH estudiados con respecto al sistema control (sin calcio). Un comportamiento diferencial en función del pH fue evidenciado mediante las cinéticas de cremado, presentando mayor estabilidad los sistemas a pH 2.0 y 7.0, alejados del punto isoeléctrico de las proteínas ensayadas. La presencia de gluconato y lactato de calcio produjo una mayor desestabilización por cremado en las diversas condiciones de pH estudiadas, debido a factores de tipo estérico y de carga asociados al contraion.

Palabras clave: estabilidad, emulsiones, interacción proteínas-lecitinas, entorno químico, calcio

ABSTRACT

Proteins and lecithins are present in many natural and formulated foods being their interaction very important in the formation and stability of emulsions. The objective of this work was to study this interaction as a function of the chemical environment (pH, calcium) evaluating the stability of oil in water emulsions (O/W 25:75 w/w). The results obtained showed a diminution of the stability in the presence of calcium for all pH values studied respect to the control system (without calcium). A differential behavior as a function of pH was recorded by creaming kinetics, presenting more stability the systems at pH 2.0 and 7.0, values not closed to the isoelectric point of the proteins assayed. The presence of calcium gluconate and lactate produced a major destabilization by creaming at different pH conditions studied, probably due to esteric and charge factors associated to the counterion.

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones constituyen sistemas presentes en numerosos alimentos naturales y formulados (mayonesa, leche, cremas, sopas, margarina, manteca, etc.) (1) siendo sistemas termodinámicamente inestables. La inestabilidad de una emulsión puede involucrar diversos mecanismos, los cuales contribuyen a su transformación desde un sistema uniformemente disperso a un sistema de fases totalmente separadas (2).

Las proteínas y lecitinas de soja están presentes en alimentos naturales y formulados. La interacción entre estos componentes -con interesantes propiedades superficiales- es de gran importancia para la formación y estabilidad de sistemas alimenticios coloidales.

Por otra parte, la estructura de las proteínas y su funcionalidad puede verse afectada por las condiciones de su entorno químico tales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la concentración de iones calcio así como también por la presencia de fosfolípidos (3, 4, 5).

En el caso de las proteínas y fosfolípidos de soja y sus interacciones a nivel interfacial, las mismas no están aún totalmente dilucidadas en cuanto a la estabilización de las emulsiones ni al efecto de las condiciones del medio (6).

Dicha interacción entre proteínas, fosfolípidos e iones, puede traducirse en una alteración de la actividad superficial, en el desplegamiento de la estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas, en cambios de la carga neta y la viscoelasticidad, así como en la incorporación de proteínas en el interior de las micelas y vesículas de fosfolípidos (7). Además, tanto los iones Ca^{+2} como los contraiones pueden actuar como puentes entre las moléculas proteicas -cargadas en forma similar a los fosfolípidos-, afectando la estabilidad de las emulsiones (8).

Cabe señalar que el calcio juega un rol importante a nivel nutricional siendo un mineral esencial para el individuo, aunque una proporción significativa de la población no alcanza a ingerir los niveles recomendados para lograr un desarrollo saludable. Por ello, la deficiencia de calcio en la dieta trata de ser atenuada mediante la fortificación de los alimentos, con niveles similares a los existentes en los productos lácteos. En ese sentido, se emplean fundamentalmente sales inorgánicas como el carbonato y cloruro de calcio y orgánicas, tales como el gluconato y lactato de calcio.

El objetivo del trabajo fue investigar la interacción proteínas - lecitina de soja en distintas condiciones de su entorno químico (pH, sales de calcio), evaluando su efecto sobre la estabilidad de emulsiones aceite en agua (O/W 25:75 p/p).

MATERIALES Y MÉTODOS

- ◆ Aceite refinado de girasol como constituyente de la fase oleosa
- ◆ Lecitina de soja en polvo (Lec), caracterizada previamente mediante HPLC-ELSD (PE 31,9 %; PI 13,4 %; PC 44,1 %; PA y PS 10,4 %). Se preparó una solución madre de lecitina de soja en aceite refinado de girasol a 45 - 50 °C.

Obtención de aislados de proteínas nativas de soja (ANS): Se preparó un aislado nativo de soja (ANS), de acuerdo a Sorgentini y Wagner, 1999. (9)

Preparación de la fase acuosa: se prepararon soluciones buffer fosfato de sodio 0.01M ajustadas a pH 2.0, 5.5 y 7.0 adicionadas con diferentes sales de calcio: cloruro de calcio (CLO), gluconato de calcio (GLU) y lactato de calcio (LAC), La concentración final de Ca^{+2} fue de 10.00 mg de Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa, siendo determinado el contenido de calcio por espectroscopía de absorción atómica (IL457 Instrumentation Lab.) en el CINDECA– FCE (UNLP).

Se prepararon dispersiones de ANS (2 mg/ml) en buffer fosfato de sodio 0.01M a los distintos pH sin y con sales de calcio.

Preparación de la fase oleosa: A partir de la solución madre de lecitina de soja previamente descrita, se tomaron alícuotas correspondientes a 15 mg de Lec, ajustando el volumen final a 25 g con aceite refinado de girasol. **Preparación de las emulsiones:**

Se prepararon emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ($\phi = 0.25$) mediante un homogeneizador UTRATURRAX T25, a una velocidad de 20.000 rpm durante 30 segundos, usando aceite de girasol y lecitina como fase lipídica y dispersiones acuosas de aislados nativos de soja (ANS) como fase acuosa. Se ensayaron emulsiones control en ausencia de Lec o ANS en sus respectivas fases.

Caracterización óptica de las emulsiones: Las emulsiones fueron caracterizadas ópticamente mediante la utilización de un analizador vertical de barrido (Quick Scan) determinando los mecanismos y cinéticas de desestabilización involucrados en cada caso.

Cinéticas de desestabilización: Se realizó el estudio de cada emulsión durante un período de 2 h con mediciones efectuadas a intervalos de 1 minuto.

Distribución del tamaño de partículas: Se realizaron mediciones de la distribución del tamaño de partículas de las emulsiones a tiempo inicial mediante el empleo de un analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer (Malvern Instruments Ltd., UK) basado en difracción láser.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta la cinética de desestabilización de emulsiones ANS-Lec a pH 2.0, observándose una menor estabilidad en presencia de sales de calcio, con respecto al sistema control (sin calcio), registrándose que el lactato de calcio es la sal que más afecta a las mismas.

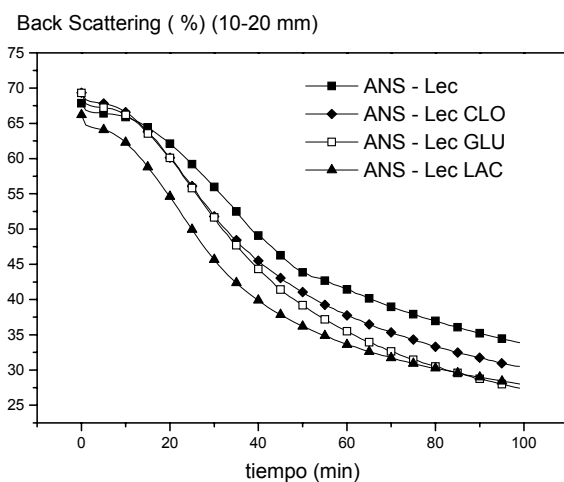


Figura 1 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 formuladas con distintas sales de calcio (10.00 mg Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa) a pH 2.0

Por otra parte, a pH 7.0 se registró una importante inestabilidad inicial en los sistemas ANS - Lec, lo cual se evidencia en las cinéticas de cremado mediante un descenso pronunciado en el Back Scattering (%). En este caso, las tres sales de calcio utilizadas inciden negativamente en la estabilidad de las emulsiones, siendo más relevante su efecto en el caso del gluconato de calcio, seguido por el cloruro y el lactato de calcio

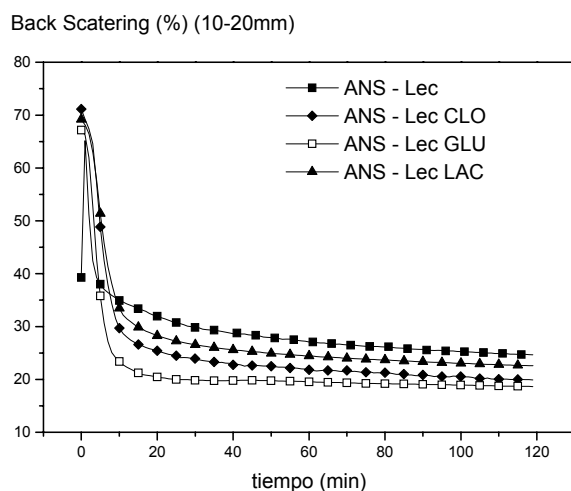


Figura 2 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 formuladas con distintas sales de calcio (10.00 mg Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa) a pH 7.0

Así, aunque la concentración de Ca^{2+} total en solución es equivalente (10 mg%), la cantidad de iones Ca^{2+} es diferente y depende del grado de disociación, siendo marcadamente mayor en el cloruro de calcio. Además, los resultados muestran que el efecto de las sales de calcio no depende sólo de la cantidad de calcio iónico que generan en el medio sino de factores de tipo estérico relacionadas con el tipo de contraion presente al pH dado.

El efecto negativo se pone de manifiesto más acentuadamente a pH 5.5 donde las tres sales de calcio citadas son igualmente desestabilizantes. Este comportamiento puede estar asociado a que este nivel de pH se encuentra en las cercanías del punto isoeléctrico de las proteínas constituyentes del aislado de proteínas de soja empleado. **(Figura 3).**

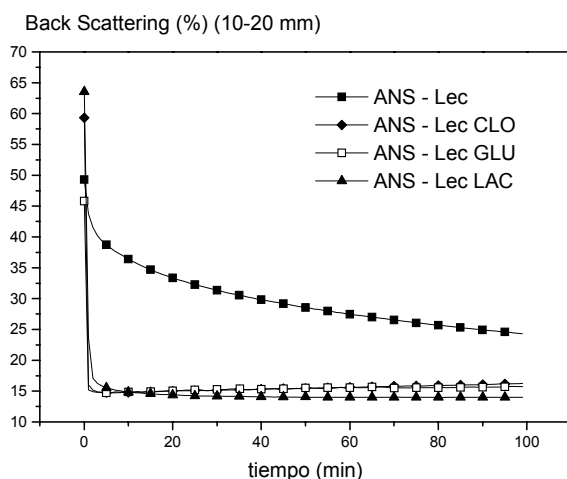
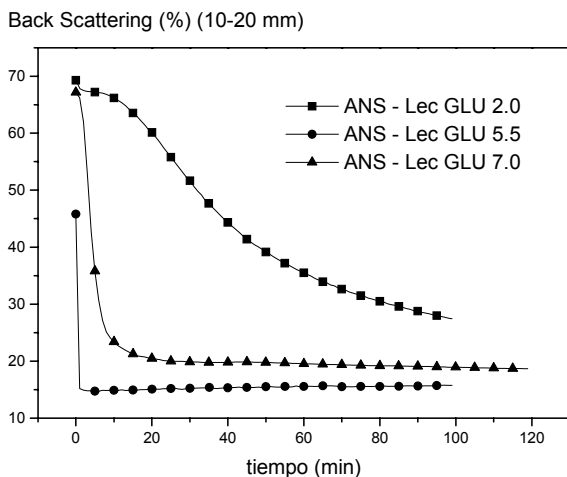


Figura 3 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 formuladas con distintas sales de calcio (10.00 mg Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa) a pH 5.5

Figura 4 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 con gluconato de calcio (10.00 mg Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa) a distintos valores de pH valores de pH



Las cinéticas de cremado de los sistemas ANS-Lec en función de los distintos valores de pH estudiados muestran el siguiente orden de estabilidad decreciente: 2.0 > 7.0 > 5.5, para todas las sales de calcio citadas. Así, a pH 2.0 se registra un mayor valor de Back Scattering (%) inicial, el cual permanece en su nivel presentando una cinética de cremado más lenta. En la **Figura 4** se visualiza este fenómeno en el caso del gluconato de calcio. Cabe señalar que a pH 2.0, la fracción proteica 11S se encuentra desnaturalizada en virtud del medio ácido por lo cual, en esas condiciones, el sistema presenta una mayor hidrofobicidad superficial, lo que puede traducirse en una mayor interacción proteínas-lecitinas y por ende, en una mayor estabilidad.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la determinación de la distribución del tamaño de partículas muestran un comportamiento similar para los distintos sistemas a pH 2.0 y 7.0, presentando los sistemas ANS - Lec una distribución bimodal para las tres sales estudiadas (**Figura 5 A**). A pH 5.5, se observa un desplazamiento hacia un mayor tamaño de partículas para las emulsiones formuladas en presencia de calcio con respecto al sistema control, especialmente en el caso del lactato de calcio (**Figura 5 B**).

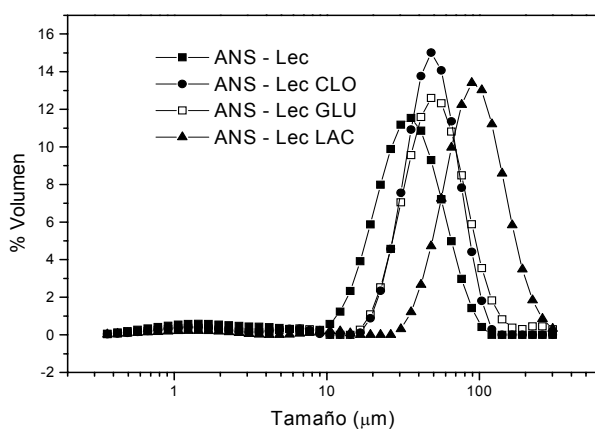


Figura 5. Distribución en volumen del tamaño de partículas correspondiente a emulsiones O/W 25:75 (% p/p) con ANS – LEC formuladas con distintas sales de calcio (10 mg Ca⁺²/ 100 ml de fase acuosa). **A)** pH 2.0 **B)** pH 5.5

CONCLUSIONES

La estabilidad de las emulsiones O/W formuladas con lecitina de soja a los distintos valores de pH ensayados fue afectada por la presencia de sales de calcio. Se evidenció un comportamiento diferencial en función del pH, presentando mayor estabilidad los sistemas a pH 2.0 y 7.0, alejados del punto isoeléctrico de las proteínas ensayadas. Las emulsiones obtenidas con gluconato y lactato de calcio produjo una mayor

desestabilización por cremado en las diversas condiciones de pH estudiadas. Este resultado puede atribuirse a factores de tipo estérico y de carga asociados al contraion, lo cual demuestra que el efecto desestabilizante no es sólo dependiente de la concentración de ión calcio en el medio. Los resultados obtenidos pueden ser de utilidad para la formulación de productos emulsionados en la industria alimentaria, ya que permite adecuar la elección de sales de calcio según el pH del producto final.

BIBLIOGRAFIA

Mc Clements, D. J. (1992), Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques, edited by CRC Press, New York, USA.

Friberg, S. y Larsson, K. (1997), Food Emulsions, Marcel Dekker, NY, USA.

Molina y Wagner, (1999), Food Research International **32**, 135.

Scuriatti, M.P., Tomás, M.C. y Wagner, J.R.,(2003), JAOCS **80** (11), 1093.

Comas, D. I., Wagner, J.R., Tomás, M.C., (2004), Proc. Food Colloids, Interactions, Microstructure and Proc., Harrogate, UK

van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, (1998), Fett/Lipid 100, Nr. 7, S 282.

Nylander y Ericsson, 1997, Lipids. In "Food Emulsions". Principles, Practice and Techniques, edited by CRC Press, New York, USA.

Dickinson y Mc Clements, (1995), Advances in Food Colloids, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.

Sorgentini y Wagner, 1999, J. Food Biochem., 23 (5) 489.

AGRADECIMIENTOS - Proyecto PICT 2002-09-10768, ANPCyTy X390 UNLP

- Refinerías de Maíz S.A. por la provisión del Analizador de micropartículas Mastersizer (Malvern, Inst, UK).

EVALUACIÓN REGIONAL DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS DERIVADOS DE CEREALES

FERNÁNDEZ, Eduardo L.¹, ROMAGNOLI, Romina A.¹, LÓPEZ, Tomás A², DANIEL, Peter³

1-FCA / UNMdP, 2- Laboratorio de Toxicología Veterinaria, EEA INTA Balcarce. 3- PROPAPA, EEA INTA Balcarce.

Laboratorio de Toxicología Veterinaria. EEA INTA Balcarce. Ruta 226 KM 73.5, CC 276 (7620) Balcarce. Tel: 02266-439122. E-mail: eduardo_l_fernandez@hotmail.com.

RESUMEN

Se describe un ensayo en muestras comerciales de harina de maíz, harina de trigo y arroz, para la detección y cuantificación de micotoxinas. Se utilizó una técnica de cromatografía en capa delgada para determinar el tenor de aflatoxina B1, sterigmatocistina, ocratoxina A, zearalenona, diacetoxiscirpenol y toxina T-2 en muestras adquiridas en supermercados y dietéticas de tres localidades del sudeste de la provincia de Buenos Aires (Tandil, Balcarce, Mar del Plata).

Se detectaron 22 ppb de aflatoxina B1 en arroz correspondiente a una marca líder en un supermercado de la ciudad de Mar del Plata; 16 ppb de aflatoxina B1 en harina de maíz correspondiente a una dietética de la ciudad de Tandil, y 3 ppm de toxina T-2 en harina de maíz de marca líder del mismo supermercado de la ciudad de Mar del Plata.

Palabras clave: micotoxinas en alimentos, cromatografía en capa delgada.

ABSTRACT

A study in commercial samples of corn flour, wheat flour and rice on the detection and quantification of mycotoxins is described. A thin layer chromatographic technique was used in order to determine the content of aflatoxin B1, sterigmatocystin, ocratoxin TO, zearalenone, diacetoxiscirpenol (DAS) and toxin T-2, in samples acquired in supermarkets and dietary shops of three towns of the southeast of the Buenos Aires Province (Tandil, Balcarce, Mar del Plata).

In rice, 22 ppb of aflatoxin B1 were detected, corresponding to a leader brand in a supermarket of the city of Mar del Plata. In corn flour, 16 ppb of aflatoxin B1 were detected, corresponding to a sample from a dietary shop in the city of Tandil, and 3 ppm of toxin T-2 in a sample of a leader brand in the same supermarket of the city of Mar del Plata.

Keywords: mycotxins in foods, thin layer chromatography

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son algunos de los metabolitos secundarios que elaboran ciertas especies de hongos filamentosos.

El impacto de estos metabolitos en la salud pública puede resultar beneficioso o dañino. En el primer caso se encuentran, entre otros, los antibióticos β -lactámicos; en el otro caso, las micotoxinas (Payne and Brown, 1998).

Está demostrado que basta una pequeña contaminación fúngica de los alimentos para hacerlos inadecuados tanto para el consumo humano como el animal (Linder, E., 1990)

La contaminación con micotoxinas puede ocurrir en el campo, durante la cosecha y almacenamiento, o en cualquier otro punto de la cadena agroalimentaria, previo al consumo del alimento (Ramakrishna et al., 1990), incluso en el domicilio del consumidor.

Los altos costos económicos involucrados, únicamente permiten la adopción de medidas preventivas y de reducción de la contaminación, pero no su eliminación completa. La adopción de medidas legislativas sobre micotoxinas es una cuestión reciente.

Existe una o varias micotoxinas que afectan cada órgano, es decir que no existe ningún órgano del cuerpo que no sea susceptible a la acción de estos compuestos. Es importante tener en cuenta que la intoxicación se produce cuando es superada la capacidad de detoxificación del organismo.

La necesidad de investigaciones en el área de micotoxinas se debe a que las micotoxicosis son de difícil diagnóstico, ya que los caracteres no son heredables ni transmisibles, la respuesta a los antibióticos es escasa y, en los animales, los casos están asociados frecuentemente con condiciones climáticas específicas.

Las micotoxinas más importantes desde el punto de vista agroalimentario son las aflatoxinas (AF), fumonisinas (FU), ocratoxina A (OA) y los tricotecenos nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON), toxina T-2 (T-2), diacetoxiscirpenol (DAS) y zearalenona (ZEA).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el grado en el cual la población regional se encuentra expuesta a estas toxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de las toxinas:

Se mezclaron 20 gr de muestra molida con 90 ml de acetonitrilo, 10 ml de cloruro de potasio 4% en etanol y 2 ml de ácido clorhídrico 5N, durante 3 minutos a alta velocidad.

Posteriormente, el extracto fue filtrado a través de papel de filtro (Whatman N° 4) y se recogieron 50 ml.

Este volumen se llevó a una ampolla de decantación, donde se agregaron 50 ml de agua y se realizaron dos delipidaciones con 50 ml de hexano cada una. Luego de agitar por aproximadamente un minuto, se descartó la capa superior de hexano. En una etapa posterior, se realizó la extracción de las micotoxinas con dos porciones de 50 ml de cloroformo. El extracto clorofórmico fue evaporado a sequedad en evaporador rotatorio y el residuo seco se redisolvió en 1 ml de cloroformo. La muestra así obtenida fue colocada en tubos de hemólisis y almacenada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la siembra en cromatofolios.

Cromatografía en capa delgada:

Para las determinaciones cromatográficas, se aplicaron 15 μl de extracto en la intersección de dos líneas imaginarias ubicadas a 1 cm de la base y de los costados de un cromatofolio de 10 x 10 cm. Estándares de todas las micotoxinas se colocaron sobre las mismas líneas que la muestra, pero más cerca de las dos esquinas laterales. Las placas fueron desarrolladas en cloroformo acetona (9:1) en la primera dirección y, luego de secarse bajo campana, se corrieron en la segunda dirección en tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (5:4:1). Finalmente, las placas fueron visualizadas bajo luz UV de onda corta y de onda larga. En estas condiciones, sterigmatocistina fluoresce de color rojo-anaranjado, zearalenona de color verdoso, ocratoxina A de color amarillo intenso y aflatoxina B1 fluoresce de color azul. Las micotoxinas T-2 y DAS no exhiben propiedades fluorescentes, por lo que debieron rociarse con ácido sulfúrico en etanol al 20 % para lograr su visualización. Luego de este tratamiento, ambas toxinas exhiben propiedades fluorescentes. La identificación de cada micotoxina se realizó por comparación visual de color con manchas de estándares y por su relación de frentes (Rf). La comparación visual de intensidades de color con respecto a los estándares se utilizó para la cuantificación de las toxinas.

Análisis estadístico de los resultados:

En cuanto al modelo estadístico utilizado, los autores de este trabajo optamos por un muestreo aleatorio estratificado (Cochran, W. 1980) dadas las características de heterogeneidad de los productos y de la distribución de micotoxinas en los lotes de alimentos (WHO Technical Report Series 906, 2002).

Justamente, el objetivo de la estratificación es dividir una población heterogénea en un número N de sub-poblaciones (estratos) internamente homogéneas. Se muestrearon unidades comerciales de harina de maíz, harina de trigo y arroz en supermercados y

dietéticas de tres localidades del sudeste de la provincia de Buenos Aires (Tandil, Balcarce y Mar del Plata). En el caso de supermercados se hizo un muestreo de una marca líder y de una marca bandera o del supermercado, con el fin de detectar diferencias en la calidad en cuanto a los niveles hallados de micotoxinas.

En el caso de los supermercados, cada estrato contuvo dos repeticiones por producto (n=2) tanto para la marca líder como para la marca bandera. Para el caso de dietéticas, el número de repeticiones fue de tres (n=3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 62 muestras analizadas, sólo 3 de ellas mostraron ser positivas para algún tipo de micotoxina (Tabla 1). De este modo, se hallaron cantidades considerables de aflatoxina B1 (22 ppb) en arroz correspondiente a la marca líder de un supermercado de la ciudad de Mar del Plata. Este nivel de toxina hallado excede los niveles máximos establecidos en el Código Alimentario Argentino, en la reglamentación del Mercosur, reglamentación de la Comunidad Económica Europea y la establecida por FAO/OMS (<http://www.micotoxinas.com.br>).

También se hallaron niveles menores de aflatoxina B1 (16 ppb) en harina de maíz correspondiente a una dietética de la localidad de Tandil.

Por último, se detectó la presencia de toxina T-2 (3 ppm) en harina de maíz correspondiente a la marca líder de un supermercado de la ciudad de Mar del Plata.

Las muestras halladas como positivas, si bien representan una proporción pequeña respecto del total, evidencian que en algunos casos, las micotoxinas son capaces de resistir los procesos a que son expuestas las materias primas agrícolas hasta llegar al consumidor.

En la actualidad existen varios trabajos que demuestran la presencia de micotoxinas en alimentos de consumo humano, en todas partes del mundo y en una gama muy amplia de productos (Galán y Rodríguez, 2003; Hidalgo Moya, 2004).

Dado que los mohos productores de estas toxinas son ubicuos es imposible pensar en alimentos libres de micotoxinas, si bien existen alimentos con mayores probabilidades de contenerlas.

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos, surge de manera evidente la necesidad de ampliar las unidades de producto muestreadas. Queda claro que la heterogeneidad en la distribución de micotoxinas en los lotes es uno de los principales factores que afectan los

resultados obtenidos y que la mejor herramienta para minimizar este factor es el muestreo de un número adecuado de unidades. Los autores también asumimos la responsabilidad de realizar un muestreo reducido, pero por cuestiones de índole económica y de tiempo se tornó imposible extender el muestreo.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de micotoxinas en alimentos no puede evitarse por completo y que estas suelen resistir a los tratamientos que reciben las materias primas durante los procesos de elaboración.

También se advierte la necesidad de realizar investigaciones en el área de micotoxinas en alimentos destinados al consumo humano, considerando la implicancia que estas sustancias tienen en la salud pública

Tabla 1: Niveles de micotoxinas hallados en los distintos productos.

Sustrato	Comercio	Localidad	Micotoxina	Valor hallado
Arroz (marca líder)	Supermercado	Mar del Plata	Aflatoxina B1	22 ppb.
Harina de maíz	Dietética	Tandil	Aflatoxina B1	16 ppb.
Harina de maíz (marca líder)	Supermercado	Mar del Plata	Toxina T-2	3 ppm.

BIBLIOGRAFIA

Cochran, W. Técnicas de Muestreo. Ed. CECSA. Cap. 5. Muestreo aleatorio estratificado. 125-194.

FAO Food and Nutrition Paper N° 64. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. Rome (1996).

Galán, L. C.; Rodríguez, J. J. (2003). La contaminación por micotoxinas. En: Observatori de la seguretat alimentaria. Universitat autònoma de Barcelona.

Hidalgo Moya, J. R. Legislación reciente sobre micotoxinas. En: www.consumaseguridad.com. (consulta: Mayo 2004)

Linder, E. (1990). Intoxicaciones a causa de la preparación inadecuada o alteración de alimentos. En *Toxicología de los alimentos*, Ed. Acribia. 117-145.

Payne, G. A. and Brown, M. P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:329-362.

Ramakrishna, Y.; Bhat, R. V. And Vasanthi, S. Natural occurrence of mycotoxins in satple foods in India (1990) *J. Agric. Food Chem.* 38: 1857-1859.

Richard, J. L.; Bennet, G. A. ; Ross, P. F. ; Nelson, P. E. (1993). Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. *J. Anim. Sci.* 71: 2563-2574.

Tapia, M. O. A quantitative thin layer chromatography method for the analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, T-2 toxin and sterigmatocystin in foodstuffs. (1985). *Rev. Arg. Microbiol.* Vol. 17, N° 4. 183-186.

WHO Technical Report Series N° 906 (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization. Geneva.

APLICACIÓN DE METODOS FISICOS Y QUIMICOS EN EL DESARROLLO DE *Aspergillus parasiticus* Y EN LA PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN MEDIOS SOLIDOS

TITO JOSE¹; MOLINA MONICA²; OTEIZA JUAN M²; CERRUTI CLAUDIO³; GIANNUZZI, LEDA² Y ZARITZKY NOEMI^{2,4}

¹Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba; ²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). CONICET. Fac. Cs. Exactas; ³Laboratorio Central, La Plata; ⁴Fac Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, calle 47 y 116, La Plata (1900), Argentina. E-mail: zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y la producción de aflatoxinas a 30°C en medios sólidos sintéticos mediante: 1) agregado de diferentes concentraciones de ácido propiónico (129, 516 ppm), 2) aplicación de radiación UV. La velocidad de crecimiento radial y la fase de latencia se determinaron a través de la medición del diámetro de las colonias en función del tiempo. Se interpretó el efecto de los tratamientos aplicados en crecimiento radial mediante un índice de inhibición, que resultó proporcional a la concentración de ácido propiónico y a la dosis de UV empleada. Una inhibición del 40% en el desarrollo micelar se observó con 516 ppm de ácido propiónico conjuntamente con un 60% de inhibición en la producción de aflatoxina B1. Con 1.0, 2.5, 4.0 y 6.0 J/cm² de radiación UV se logró una inhibición del 2, 9, 29 y 100% en el desarrollo micelar. Dosis de 1J/cm² presentaron una inhibición en la producción de toxina B1 de 64%; a mayores dosis la inhibición fue del 100%. Se propuso un modelo matemático que ajustó satisfactoriamente los resultados de producción de aflatoxinas.

Palabras claves: *Aspergillus parasiticus*, aflatoxinas, radiación UV, modelado matemático, Ácido propiónico.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the growth of *Aspergillus parasiticus* and the production of aflatoxins at 30°C in solid media as affected by: 1) addition of different concentrations of propionic acid (129, 516 ppm) 2) application of different UV doses. The rate of radial growth and the lag phase duration were determined by measuring the diameters of the colonies as a function of time. The effect of applied treatments on radial growth was interpreted in terms of an Inhibition Index that was

proportional to the concentration of propionic acid and to the doses of UV applied. A 40% inhibition of the micelar growth and 60% inhibition of B1 aflatoxin production were observed with 516 ppm propionic acid. By applying UV radiation with doses of 1.0, 2.5, 4.0 y 6.0 J/cm², inhibitions of 2, 9, 29 y 100% of the micelar growth were obtained; a 64% inhibition of B1 aflatoxin was obtained with 1 J/cm² UV doses. Higher doses produced 100% inhibition. A mathematical model that fitted experimental results of aflatoxin production was proposed.

INTRODUCCIÓN

Algunas cepas de *Aspergillus parasiticus* son productoras de aflatoxinas reconocidas por sus características de carcinogenicidad, teratogenicidad y efectos mutagénicas. Tanto el crecimiento de hongos toxicogénicos como la producción de aflatoxinas resultan afectadas por factores físicos y químicos; Entre los primeros, el ácido propiónico ha sido usado ampliamente como agente fúngico; entre los factores físicos, la luz ultravioleta presenta ventajas sobre los desinfectantes químicos ya que su empleo no deja residuo y es relativamente económica. El modelado microbiano del desarrollo de hongos filamentosos no ha recibido el mismo nivel de atención que el desarrollo bacteriano debido probablemente a la complejidad asociada con la cuantificación del desarrollo fúngico. Un pre-requisito para la utilización de un modelo confiable debe ser una base de datos conteniendo gran cantidad de datos relevantes preferentemente en la forma de curvas de crecimiento o supervivencia.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del agregado de ácido propiónico así como el empleo de radiación ultravioleta sobre el desarrollo de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas creciendo en medio de cultivo sólido condiciones óptimas modelando matemáticamente los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismo: Se utilizó una cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 productor de aflatoxinas B1, B2, G1, G2.

2. Inoculación: 10µl de esporas de *A. parasiticus* NRRL 2999 en concentración 10⁴ esporas/ml fueron sembradas en un medio sólido con extracto de malta (1%), extracto de levadura (2%), glucosa (2%) y agar (2%).

3. Efecto del ácido propiónico: Para los estudios con ácido propiónico, se agregaron diferentes concentraciones (129, 516 ppm), al medio antes de esterilizarlo. Las placas se

incubaron a 30°C, y durante el período de incubación se realizó la medición del desarrollo radial del hongo y la cuantificación de las aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) correspondientes.

4. Aplicación de radiación UV: Para los estudios de irradiación UV, un volumen de 10µl del inoculo se sembró en placas con medio de cultivo sin el agregado de ácido propiónico. Las mismas fueron sometidas a la radiación UV a 254nm (lámpara germicida, 30 W/G30 T8, Philips) en una cámara construida a tal efecto, variándose los tiempos de exposición. La radiación incidente y el tiempo de tratamiento fueron medidos con el sensor VLX-3W.

5. Medición del crecimiento radial: Se realizó midiendo un mínimo de 6 diámetros perpendiculares de cada placa. La velocidad de crecimiento radial (K_D) se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal obtenida entre el diámetro de la colonia versus el tiempo de incubación durante la fase de crecimiento. La fase de latencia (lag) fue determinada como el tiempo requerido para que el crecimiento de la colonia supere a la zona de inoculación (5mm).

6. Determinación de los niveles de aflatoxinas: Se realizó por cromatografía en placa delgada siguiendo el procedimiento de AOAC 26031 (1980). Los niveles de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 fueron determinados por duplicado mediante el empleo de un espectrodensitómetro a 366 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del agregado de ácido propiónico y de la radiación UV sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de *A. parasiticus*

La Figura 1a muestra el efecto del ácido propiónico sobre el desarrollo radial de *A. parasiticus* durante el almacenamiento a 30°C. El gráfico del diámetro de la colonia versus el tiempo muestra un comportamiento lineal, después de una fase de latencia.

Los valores de K_D y de la fase de latencia, lag, se presentan en la Tabla 1. El aumento de la concentración de ácido propiónico produce una disminución en los valores de K_D y un aumento de la fase lag. La Figura 1b muestra el efecto de la aplicación de diferentes dosis de radiación UV sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* durante la incubación a 30°C. Puede observarse que el aumento de la dosis de UV ejerce un efecto inhibitorio en el desarrollo del hongo dado por una disminución en los valores de K_D y en un aumento en los valores de la fase de latencia (Tabla 1). Empleando dosis de 6 J/cm² no se observó desarrollo micelar durante el experimento siendo el valor de $K_D=0$.

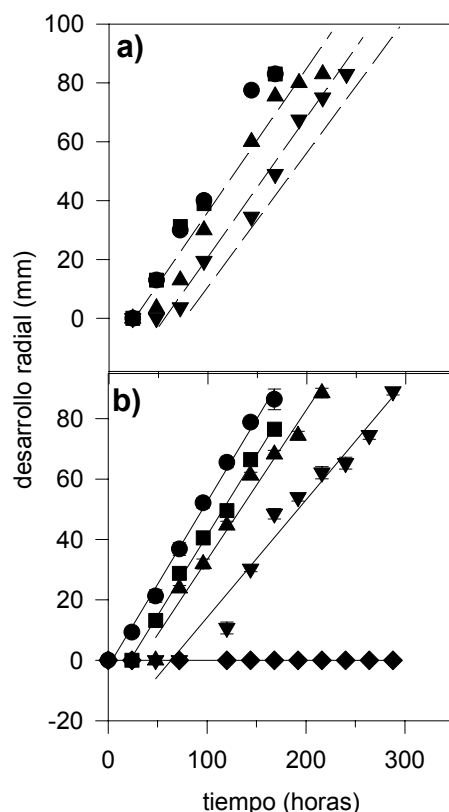


Figura 1: Crecimiento de *Aspergillus parasiticus* en medio sólido con el agregado de a) ácido propiónico 0 (●), 129 (■), 258 (▲) y 516 ppm (▼) y b) sometido a diferentes dosis de radiación UV sin tratar (●), 1 (■) 2.5 (▲), 4 (▼) y 6 J/cm² (◆).

Tabla 1: Efecto del agregado de ácido propiónico y de la dosis de radiación UV a 254nm sobre la velocidad de desarrollo radial (K_D) y la duración de la fase de latencia (lag) de *Aspergillus parasiticus*.

Ácido Propiónico			Dosis de radiación UV		
Concentración (ppm)	K_D (mm/h)	Lag (hs)	(J/cm ²)	K_D (mm/h)	Lag (hs)
0	0.52±0.03	13.01±2.01	0	0.55±0.003	12.91±3.01
129	0.51±0.02	21.01±2.45	1.0	0.53±0.003	31.44±7.21
258	0.47±0.03	24.00±2.00	2.5	0.49±0.002	37.57±8.89
516	0.35±0.02	32.00±1.97	4.0	0.389±0.01	76.48±9.41

Índice de Inhibición

Se estudió el efecto inhibitorio del agregado de ácido propiónico y de la aplicación de diferentes dosis de luz UV sobre el desarrollo micelar a través de la determinación del índice de inhibición (II) definido como:

$$II(\%) = \frac{K_{D\text{control}} - K_{D\text{tratado}}}{K_{D\text{tratado}}} * 100 \quad (1)$$

Donde $K_{D \text{ control}}$ y $K_{D \text{ tratado}}$ son las velocidades de crecimiento radial del control y del tratado respectivamente. II es 100 cuando el hongo permanece en fase de latencia ($K_{D \text{ tratado}} = 0$) durante el almacenamiento. II es 0 cuando el control y el tratado muestran la misma velocidad de crecimiento. II varía entre 0 a 100 debido a la acción del ácido propiónico o la luz UV.

La Tabla 2 muestra el valor de II para *A. parasiticus* obtenido mediante la Ec. (1) debido al agregado de propiónico y a la dosis de UV aplicada. El agregado de propiónico aumenta el valor de II hasta llegar a un máximo de inhibición del 32.6% con 516 ppm. Asimismo, el valor de II aumenta con la dosis de UV indicando el efecto antifúngico. Con la aplicación de 6 J/cm^2 , se observó un 100% en la inhibición del desarrollo del micelio, mientras que menores dosis de UV de 2.5 y 4 J/cm^2 presentaron valores de II 1.09 y 29.2%. Asimismo, resulta importante analizar la acción del ácido propiónico y de la luz UV sobre la producción de aflatoxinas durante el almacenamiento del hongo tratado. Para ello, se determinaron a los mismos tiempos de almacenamiento las concentraciones de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) y los resultados encontrados se modelaron matemáticamente.

Tabla 2: Índice de inhibición (II %) sobre el valor de K_D producidos por el ácido propiónico y la radiación UV.

Tratamiento	II (%)	
Concentración de Ácido Propiónico (ppm)	129	1.9
	258	9.6
	516	32.6
Radiación UV (J/cm^2)	1	1.6
	2.5	9.6
	4.0	29.1
	6.0	100

Modelado de la producción de aflatoxinas.

Durante el almacenamiento de un producto contaminado, la producción de aflatoxinas generalmente exhibe un aumento en la concentración hasta alcanzar un valor máximo para luego disminuir a valores cercanos a cero.

Este comportamiento fue demostrado para aflatoxinas (Pitt, 1993; Molina, 2002). Las diferentes fases de la síntesis y degradación de aflatoxinas por *A. parasiticus* en función del tiempo fue expresado mediante la siguiente función del tipo campana de Gauss:

$$\text{Aflatoxina } (\mu\text{g/cm}^2) = k * \exp\left(-\frac{0.5(t - m)^2}{s}\right) \quad (2)$$

Donde k ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) corresponde al valor máximo de la concentración de aflatoxina expresada por cm^2 (superficie de la placa de la cual ha sido extraída), m (días) es el tiempo necesario para alcanzar la máxima producción de aflatoxina (obtenida al derivar la ecuación 2 e igualarla a cero) y t el tiempo (días).

La Figura 2 muestra la aplicación del modelo a los datos experimentales de la producción de toxina B1, B2, G1 y G2 para el control. Se observó un buen ajuste del modelo a los datos experimentales siendo la aflatoxina B1 la que se produce en mayor proporción.

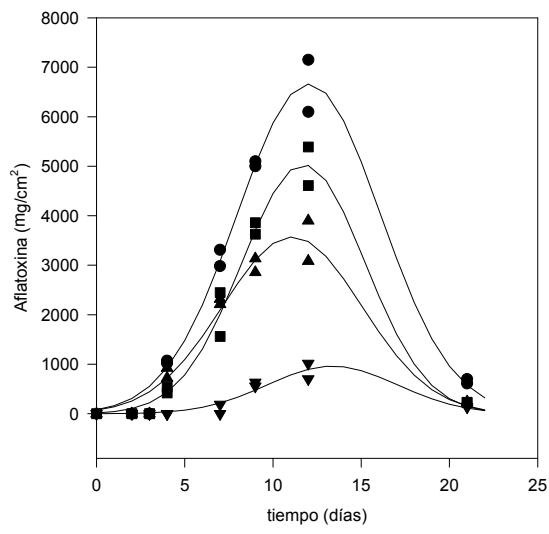


Figura 2: Ajuste del modelo propuesto (Ec. 2) a los datos experimentales correspondientes a la producción de aflatoxinas para el sistema control: B1(●), B2 (■), G1 (▲) y G2 (▼).

En la Tabla 3 se presentan los valores máximos de producción de aflatoxinas (k) predichos mediante la aplicación del modelo (ec. 2) y los tiempos a los cuales se producen esos valores de aflatoxinas para el caso de agregado de ácido propiónico y para el tratamiento con radiación UV. Un aumento en la concentración de ácido propiónico

Tabla 3: Niveles máximos de producción de aflatoxinas (VM) en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, tiempos a los cuales se produce el valor máximo (TM) en días del desarrollo de *A. parasiticus* en medio sólido en condiciones óptimas (control) y sometidas a tratamiento con diferentes concentraciones de ácido propiónico y $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ de radiación UV.

	Control		Concentración de Ácido Propiónico (ppm)						UV ($1\text{J}/\text{cm}^2$)	
			129		258		516			
Aflatoxina	VM	TM	VM	TM	VM	TM	VM	TM	VM	TM
B1	6035	12.75	2904	15.22	2654	16.15	2424	20.31	2155	8.98
B2	5037	11.73	1267	14.18	1260	14.46	1250	14.46	2021	10.14
G1	3570	11.09	1370	20.12	1100	20.12	1010	19.92	1304	9.04
G2	962	13.30	207	21.15	159	21.58	140	22.46	ND	ND

ND: No detectado

agregado disminuyó el máximo de producción de aflatoxina, aumentando el tiempo para alcanzar dicho máximo. Con el agregado de 516 ppm de ácido propiónico se logró un 60% de inhibición en la producción de aflatoxina B1. En el caso de aplicación de radiación UV una dosis de 1J/cm² produjo una inhibición del 64% en la producción de toxina B1. Con mayores dosis de UV (2.5 y 4 J/cm²) si bien se observaba desarrollo fúngico, la producción de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 fueron inhibidas en un 100%. El uso de radiación UV resultó ser efectivo tanto en la inhibición del desarrollo fúngico como en la producción de aflatoxina B1.

CONCLUSIONES

El modelo propuesto en el presente trabajo permite predecir la concentración de aflatoxinas producidas bajo la acción de un preservador químico como el ácido propiónico y un método físico como la aplicación de radiación UV. El uso de radiación UV resultó ser de gran efectividad tanto en la inhibición del desarrollo fúngico como en la inhibición de las aflatoxinas producidas por *A. parasiticus*.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen la contribución a este trabajo brindada por la Universidad Nacional de La Plata, CONICET y al Proyecto de Cooperación SECYT-CITMA (Argentina-Cuba).

BIBLIOGRAFIA

AOAC (1984). Official Methods of Analysis, 14 th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washinton DC.

Molina, M. y Giannuzzi, L. 1999. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Food Res. Int.* 32: 677-682

Molina, M. y Giannuzzi, L. 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentration. *Food Res. Int.* 35: 585-594.

Pitt, R. E. 1993. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *J. Food Protec.* 56:139-146.

TRATAMIENTO DE JUGO DE NARANJA CON LUZ UV. ACCION MUTAGÉNICA

RODRÍGUEZ MARIA¹, GIANNUZZI LEDA¹, OTEIZA JUAN M.¹, ZARITZKY NOEMI^{1,2} Y LOJO MERCEDES³

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA),² Facultad de Ingeniería UNLP, ³Cátedra de Genética Microbiana, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP), Calle 47 y 116, (1900). zaritzky@volta.ing.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue investigar empleando el ensayo de Ames el efecto mutagénico de la radiación UV en jugo de naranja exprimido tratado con dos intensidades de radiación (3.3 y 4.8 mW/cm²), dos dosis de UV (1.5 y 3.3 Joule/cm²) y dos temperaturas de tratamiento (4 y 20°C). Se definió el índice mutagenicidad (MI) como la relación entre los revertantes inducidos y los revertantes espontáneos considerándose mutagénico el tratamiento cuando el MI \geq 2. El tratamiento con radiación UV a intensidad de 4.8 mW/cm² y dosis de 3.0 J/cm² a 20°C produjo efecto mutagénico en el ensayo en presencia de activación metabólica presentando valores de MI de 2.1 y 9.0 para las cepas TA98 y TA97a respectivamente. Las otras condiciones ensayadas mostraron MI < 2 lo que indica que serían adecuadas como tratamiento no térmico de los jugos de naranja para reducir la carga microbiana de los mismos.

Palabras claves: mutagénesis, tratamiento UV, jugos de frutas, Test de Ames

ABSTRACT

The objective of the present work was to analyze the mutagenic effect of UV radiation on fresh orange juice treated with different radiation intensities (3.3 and 4.8 mW/cm²), two UV doses (1.5 and 3.3 Joule/cm²) and two radiation temperatures (4 and 20°C) using the Ames test. Mutagenic index (MI) was defined as the ratio between the induced revertants and the spontaneous revertants considering that the treatment is mutagenic when MI \geq 2. The UV treatment with an intensity of 4.8 mW/cm² and a dosis of 3.0 Joule/cm² at 20°C showed a mutagenic effect in the presence of metabolic activation. MI values of 2.1 and 9.0 were observed for TA98 y TA97a strains respectively. The other tested conditions showed MI < 2 indicating that UV treatment can be considered an adequate non thermal method to preserve orange juice.

INTRODUCCIÓN

Los jugos naturales de frutas como los de naranja presentan amplia aceptabilidad y consumo por gran parte de la población. Estos productos conocidos como mínimamente procesados pueden presentar deterioro de tipo microbiano a través de microorganismos presentes en la cáscara del fruto que al ser transferidos al jugo pueden crecer rápidamente utilizando los nutrientes del mismo. Los jugos de naranja son también vehículos de infección de *E coli* O157:H7 y en los últimos años se ha focalizado el estudio de estos productos debido a que han sido implicados en brotes de gastroenteritis.

The National Food Processors Association estableció que los jugos de frutas deben recibir un tratamiento como la pasteurización o algún tratamiento equivalente para asegurar la producción de jugos libre de microorganismos patógenos. El riesgo que acompaña al consumo de estos productos no pasteurizados requiere el uso de preservadores químicos como benzoato o sorbatos para inhibir el crecimiento microbiano.

Los tratamientos no térmicos han sido propuestos para lograr una reducción en el nivel de microorganismos que los hagan seguros para la salud y al mismo tiempo se preserven los componentes de los aromas y el flavor del jugo recién exprimido.

El tratamiento con radiación UV puede ser una alternativa interesante a la pasteurización. La radiación UV a 254 nm es empleada en la industria de los alimentos debido a sus propiedades bactericidas. Asimismo, el uso de radiación UV en jugos de frutas presenta ventajas sobre la desinfección química debido a que no deja residuos químicos y tiene relativamente bajo costo.

Oteiza y col (2005) informaron que el empleo de radiación UV sobre jugo de naranja en forma de película de 0.7 mm de espesor y bajo condiciones de agitación permitió obtener valores $D=0.11\text{J}/\text{cm}^2$ (siendo D = dosis de radiación UV requerida para reducir en un ciclo la población microbiana) sobre dos cepas de *E.coli* (ATCC 25922 y O157:H7 EDL 933). Sin embargo, la aplicación de radiación UV puede generar productos mutagénicos en los jugos. Por ello, la seguridad de esta nueva tecnología en el campo de los alimentos requiere ser evaluada.

El "test de Ames" es un ensayo de genotoxicidad "in vivo" que apunta a cuantificar el daño ocasionado al material genético. Este test de mutagenicidad, es considerado una prueba primaria, ya que se realiza en bacterias. La cepa empleada es la *Salmonella tiphimurium* Histidina⁻, la cual posee una mutación que no le permite crecer en ausencia de este aminoácido. Estas cepas poseen características genotípicas y fenotípicas que le son propias. Entre ellas, la capacidad de revertir espontáneamente la mutación His⁻ en

His⁺, en un número repetible de colonias. Cuando son inducidas por sustancias de diferentes orígenes (fármacos, drogas, etc) aumenta el número de colonias por encima de la reversión espontánea determinando la actividad mutagénica del compuesto, en relación a la dosis del mismo. Se considera que una sustancia es mutagénica, cuando duplica el número de la reversión espontánea de estas cepas.

Existe una gran cantidad de productos químicos que necesitan ser modificados "in vivo" para que algún derivado tenga actividad mutagénica. Esta es la principal limitación de cualquier sistema bacteriano de detección de mutágenos, ya que la bacteria no reproduce el metabolismo del mamífero, que puede activar o desactivar (desde el punto de vista mutagénico) una sustancia determinada. La activación o desactivación de estos productos la llevan a cabo las enzimas microsómicas contenidas en la fracción postmitocondrial S9 (conjunto de vesículas, túbulos y gránulos relacionados con el retículo endoplásmico granular y el aparato de Golgi) y cuya actividad es dependiente de NADPH, NADP, y Glucosa -6- fosfato. Por este motivo es indispensable realizar todo los ensayos por duplicado, con y sin activación metabólica.

En trabajos previos utilizando jugos de naranja comercial irradiados con luz UV se observó un comportamiento tóxico frente a las cepas de Salmonella TA98, TA97a. La curva dosis respuesta indicó un claro efecto mutagénico frente a la cepa TA97a tanto del jugo de naranja tratado como el no tratado con luz UV empleando activación metabólica. Las cepas que presentaron mayor sensibilidad al ensayo de mutagénesis fueron las cepas TA98 y TA97a (Rodríguez, 2004).

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto mutagénico de la radiación UV en jugo de naranja natural exprimido, tratado con dos intensidades de radiación UV (3.3 y 4.8 mW/cm²), dos dosis de radiación UV (1.5 y 3.3 Joule/cm²) y dos temperaturas de radiación (4°C y 20°C) empleando el ensayo de Ames.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Las naranjas var. Valencia fueron compradas en el comercio local. El jugo de naranja se obtuvo exprimiendo un lote de naranjas previamente lavadas con agua clorada, cepilladas manualmente y seguidamente enjuagadas dos veces con agua sin cloro. Luego las naranjas se cortaron y se exprimieron empleando para ello una máquina exprimidora previamente lavada y desinfectada.

Lámpara UV y tratamiento de las muestras

Cinco mililitros de jugo se colocaron en placas de Petri abiertas logrando un espesor de 5mm, las cuales fueron sometieron a la radiación UV en condiciones de agitación empleando un agitador orbital a 200 rpm en cámara de temperatura controlada a 4 y 20°C.

Para la irradiación de las muestras, se utilizó una lámpara de baja presión de vapor de mercurio germicida la cual irradia luz UV a 254 nm (Modelo 30W/G30 T8, Phillips) ubicada en una cámara a 20°C y 4°C. La intensidad y la energía de luz UV fueron medidas a 254 nm usando un radiómetro UV digital (modelo VLX-3W CE).

El jugo fue sometido a dos intensidades de radiación 3.3 y 4.8 mW/cm² y dos niveles de dosis de UV (obtenidas como el producto de la intensidad x el tiempo de exposición) de 1.50 y 3.33 J/cm². Estos valores corresponden a niveles de 5 y 10D (D= dosis de reducción decimal) calculados previamente en los estudios de inactivación por radiación UV utilizando cepas de diferente origen de *E. coli* O157:H7 (Oteiza y col, 2004).

Diseño del experimento

Se realizó un diseño factorial de 3 factores en 2 niveles (dosis, intensidad y temperatura). Dosis de radiación UV: 1.5 y 3.3 J/cm², Intensidad: 3.3 y 4.8 mW/cm², Temperaturas a las cuales se realizó la radiación: 4 y 20°C. Total: 2x2x2= 8 condiciones. En todos los casos, los ensayos se realizaron por duplicado.

Test de Ames (Ensayo Salmonella microsomal)

El ensayo de mutagénesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Maron y Ames, (1983) empleando cepas de *Salmonella typhimurium* (provistas por Xenometrix Gene Information, 2004), TA97a, TA98 con y sin activación metabólica (S9).

Como mutágenos diagnóstico se utilizaron: 2-nitrofluoreno (2NF) (25µg/placa) para la cepa TA98 y (5µg/placa) para la cepa TA97a, sin activación metabólica; 2-amino fluoreno (2AF) (1µg/placa) para TA98 y TA97a respectivamente en los ensayos con activación metabólica. Estos constituyen los controles positivos (CP) que permiten verificar que las cepas funcionan correctamente.

Los compuestos fueron considerados mutagénicos cuando el número de revertantes inducidos fue al menos el doble del número de revertantes espontáneos (índice de mutagenicidad) $MI = \text{Revertantes Inducidos/Revertantes espontáneos} \geq 2$ ($p < 0.05$).

RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los resultados del recuento de los revertantes en presencia de jugo de naranja sin tratar (Ensayo control). Se muestran los valores medios de MI. Puede

observarse que utilizando 50µL de jugo de naranja sin tratar no se observa efecto mutagénico frente a las dos cepas estudiadas.

Tabla 1: Comportamiento de los sistemas control (sin tratamiento UV). Inducción de revertantes His+ trabajando con las cepas TA98 y TA97a por el agregado de jugo de naranja con y sin activación metabólica (+S9) (-S9).

Cepa	Volumen de jugo µL	-S9		+S9	
		MI	His+	MI	His+
TA98	0		26± 4		34±6
	50	1.1	29± 4	1.5	39±6
	CP		+++		+++
TTA97a	0		135±17		
	50	0.8	108.3±13	1.0	148±21
	CP		+++		+++

Control Positivo: 2AF(1µg/placa para TA98, TA97a) con activación metabólica, 2NF (25µg/placa para TA98 y 5µg/placa para TA97a), sin activación metabólica. MI: Índice de Mutagenicidad = Revertantes Inducidos / Revertantes Espontáneos. Los valores ± corresponden a los desvíos standard de los recuentos.

La Tabla 2 presenta los revertantes inducidos para las dos cepas TA98 y TA97a con y sin activación metabólica en jugo de naranja tratado con radiación UV bajo diferentes condiciones (intensidad, dosis de radiación UV y temperatura de radiación).

Los resultados encontrados indicaron que el jugo de naranja tratado con luz UV a intensidades de 4.8 mW/cm² y dosis de 3.0 J/cm² a 20°C produjo un efecto mutagénico en el ensayo que utiliza activación metabólica (fracción microsomal) presentando MI>2 las cepas TA98 y TA97a al emplear 50µl por placa

Las otras condiciones ensayadas mostraron un MI ≤ 2(p< 0.05) lo que indica que estas dosis e intensidades no producirían mutagénesis según el Test de Ames.

A 4°C la aplicación de radiación UV en dosis de 3.0 J/cm² e Intensidad de 3.3 mW/cm² presentaron MI de 2.0 con activación metabólica. Las otras condiciones analizadas no mostraron efectos mutagénicos ya que el MI fue ≤2 con o sin activación metabólica. Estos resultados indican que la radiación UV aplicada a bajas temperaturas (4C°) no formaría compuestos mutagénicos, siendo estas condiciones adecuadas para ser utilizadas como tratamiento no térmico de preservación de los jugos de naranja. Puede observarse que la cepa TA97a manifiesta mayor sensibilidad que la cepa TA98 los cual estaría dado por los mayores valores de los desvíos estándar en algunos resultados. Se ha informado que la

presencia de sustancias reductoras como es el ácido ascórbico en el jugo podría disminuir la formación de compuestos mutagénicos; esto ha sido probado en agua irradiada con agregado de agentes reductores (Hamada y col, 1999). Al respecto, Oteiza y col (2004) informaron que durante la irradiación de jugo de naranja con luz UV se observaba una disminución en el contenido del ácido ascórbico a 20°C. Es probable que cuando el ácido ascórbico disminuye su concentración por debajo de un determinado valor, se generen compuestos mutagénicos. En esas condiciones podrían formarse radicales libres debido a las reacciones fotoquímicas que se producen con el empleo de luz UV. Estas hipótesis requieren para su comprobación de la realización de estudios específicos sobre el rol de los agentes reductores en la acción mutagénica de la radiación UV.

Tabla 2: Inducción de revertantes His+ TA98 y TA97a con y sin activación metabólica (+S9) (-S9), en jugo de naranja tratado con radiación UV bajo diferentes condiciones (Intensidad, Dosis de radiación UV y Temperaturas).

Dosis: 1.5J/cm², Intensidad: 4.8mW/cm²						Dosis: 3.0J/cm², Intensidad: 4.8mW/cm²			
T(C°)	Cepa	-S9		+S9		-S9		+S9	
		MI	His+	Mi	His+	MI	His+	MI	His+
20	TA98		-----	1.2	49.3±2	0.7	21± 4	2.1	83±11
	TA97 a	0.9	107±16	1.2	185±9	1.1	125±16	9.0	1334±346
4	TA98	1.0	29.3±7	0.8	32.5±2	0.8	26±4	0.5	23±0
	TA97 a	1.4	153±15	1.0	118.5±2	1.0	116±1	1.2	173±3
Dosis: 1.5J/cm², Intensidad: 3.3mW/cm²						Dosis: 3.0J/cm², Intensidad : 3.3mW/cm²			
T(C°)	Cepa	-S9		+S9		-S9		+S9	
		MI	His+	MI	His+	Mi	His+	Mi	His+
20	TA98	0.8	25±3	0.7	28±4	0.6	19±6	0.9	36±7
	TA97 a	0.9	100±3	0.7	103±3	0.9	101±16	0.7	105±6
4	TA98	0.7	21±3	0.9	37±6	0.7	22±4	2.0	78±4
	TA97 a	1.1	118±0.5	0.8	123±15	0.8	97±18 **	0.7	113±35 **

MI: Índice de Mutagenicidad = Revertantes Inducidos / Revertantes Espontáneos.
Los valores ± corresponden a los desvíos standard de los recuentos. **indica toxicidad

CONCLUSIONES

El tratamiento del jugo de naranja con luz UV a intensidades de 4.8 mW/cm² y dosis de 3.0 Joule/cm² a 20°C produjo un marcado efecto mutagénico en el ensayo con activación metabólica presentando MI>2 para las cepas TA97a y levemente mutagénico para la cepa TA98. A 4°C la aplicación de UV en dosis de 3.0J/cm² e intensidad de 3.3 mW/cm²

presentaron MI=2.0 con activación metabólica. Las otras condiciones analizadas no mostraron efectos mutagénicos con o sin activación metabólica, siendo entonces adecuadas para ser utilizadas como tratamiento no térmico para preservar jugos de naranja.

BIBLIOGRAFÍA

Maron, M. y Ames, B. 1983. Revised methods the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*113: 173-215.

Oteiza, J. M.; Peltzer, M.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. 2005. Antimicrobial efficacy of UV radiation on *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices of different absorptivities. *J. of Food Protect.* 68: 49-58.

Rodríguez, M.; Giannuzzi, L.; Lojo, M. y Zaritzky, N. 2004. Actividad mutagénica de jugo de frutas tratados con luz ultravioleta. XXXIII Congreso Argentino de Genética. *Journal of Basic & Applied Genetics Volumen XVI (suplement),* pag S58, M4.

DESARROLLO Y APLICACION DE MODELOS MATEMATICOS PARA PREDECIR RESIDUALIDAD DE PESTICIDAS EN CITRICOS

RICCA ALEJANDRA P.^{1,2}, ZANELLI MARTA², SANOW CLAUDIO¹

(1) Laboratorio de Residuos de Pesticidas, Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, CC. 77. B1708WAB Morón. Tel: 54-11-4621-0446/0457. Fax: 54-11-4621-2012. e-mail: aricca@cnia.inta.gov.ar

(2) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón (UM).

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue predecir el comportamiento residual de pesticidas en cítricos mediante modelos matemáticos. Se estudiaron las variables: temperatura, humedad, luminosidad, pH, dosis de aplicación, solubilidad, peso molecular, tipo de formulación y aplicación, variedad. Se determinaron las curvas de disipación reales y de simulación; las velocidades de degradación y tiempo de vida media para malatión, imidacloprid, tetradifón y dicofol. Se propuso el modelo lineal múltiple de la forma: $y = X \beta + \varepsilon$ donde y es el vector de respuesta, ε el vector de errores aleatorios, β el vector de los coeficientes desconocidos y X la matriz de escalares de las variables experimentales. Los modelos fueron validados mediante ensayos experimentales realizados en la Estación Experimental de Concordia Entre Ríos, Argentina. Se concluye que los modelos propuestos predicen contenidos residuales de pesticidas en cítricos.

Palabras claves: modelos, pesticidas, cítricos, disipación

ABSTRACT

The objective of the work was to predict the residual behavior of pesticides in citric fruit by means of mathematical models. The variables studied were: temperature, humidity, brightness, pH, application, doses, solubility, molecular weight, formulation and application type, variety. The real and of simulation dissipation curves, the degradation speeds and time of half life for malation, imidacloprid, tetradifon and dicofol were determined. The multiple lineal models propused was $y = X \beta + \varepsilon$, y the answer vector, and ε the vector of aleatory errors, β the vector of the unknown coefficients and X the matrix of scalars of the experimental variables. The models were validated by means of experimental rehearsals carried out in the Estación Experimental de Concordia Entre Ríos, Argentina. The proposed models predict residual contents of pesticides in citric fruit.

Keys words: models, pesticides, citric fruit, dissipation.

INTRODUCCION

A partir del momento de la aplicación del plaguicida y a lo largo del tiempo, los residuos van disminuyendo progresivamente por la acción de diversas causas (crecimiento del órgano vegetal tratado, eliminación por agentes mecánicos como lluvia y viento, eliminación por causas físicas como volatilización y solubilización, degradación química, etc.). Estas causas a su vez están influidas por distintos factores (naturaleza del sustrato vegetal, velocidad de desarrollo de la planta, características de la molécula del plaguicida, tipo de formulación aplicada, factores climáticos como temperatura, viento, lluvia, humedad relativa, insolación). El conjunto de unos u otros determinan el modelo y velocidad de disipación del plaguicida y la cantidad de residuos en un momento dado. Surge así el concepto de aplicar modelos matemáticos que contruídos sobre bases teóricas permiten realizar estimaciones cuantitativas y cualitativas del comportamiento de plaguicidas bajo la acción de los diversos factores. El modelado de plaguicidas muestra avances en algunos campos, por ejemplo el transporte de plaguicidas en el ambiente (software de modelado PRZM2, US EPA, 1999), en aplicaciones aéreas (Wu, Nofziger, 1999), en sistemas complejos agrarios (Keiya, Yasuo Kitamura, 1999). En los mismos se utilizan técnicas variadas de predicción como nomogramas, métodos estadísticos no paramétricos, métodos estocásticos para simular variables climáticas, sistemas expertos y redes neuronales artificiales, modelos sencillos para computadoras en Excel y software de difusión masiva.

El modelado de predicción de residualidad en alimentos no ha tenido el mismo desarrollo que en los campos mencionados. Existen estudios en los que se utilizan algoritmos que permiten el estudio de la influencia de hasta 22 variables (Splynu, 1989), modelos simplificados (Coscollá, 1993), modelos por regresión lineal múltiple (Kreuger, Tornqvist, 1996). En nuestro país el modelado y la optimización de tecnologías de procesamiento tendientes a mejorar la calidad final de los productos alimenticios, es un área de vacancia.

Dentro de lo que denominamos modelos de investigación se encuentran aquellos complejos ya que involucran gran cantidad de variables y los más sencillos en los que el número de parámetros requeridos es menor. En este trabajo se ha optado por estudiar estos últimos ya que en la práctica se consideran de mayor utilidad para su uso en la agricultura. Ante esta situación resulta de gran importancia el aprovechamiento de herramientas matemáticas e informáticas para la generación de conocimientos, por

ejemplo mediante la aplicación de técnicas de modelado, con las ventajas que se alcanzan en practicidad, disminución de costos y ampliación de las capacidades de estudio.

OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue predecir el comportamiento residual de pesticidas en cítricos mediante modelos matemáticos.

MATERIALES Y METODOS

Se simularon ensayos en el laboratorio de degradación de residuos de pesticidas en cítricos en condiciones controladas de temperatura (20-25°C) y humedad (65 % HR). Las variedades estudiadas fueron Naranja Valencia, Pomelo Henderson X Flame, Mandarina Ellenndale, Mandarina Nova, Limón Meyer, Limón Rugoso. Los ensayos a campo se realizaron en lotes comerciales de la Estación Experimental Concordia (EEA) del INTA. En diferentes meses del año. (Temp. Media 20-25 °C, 65%HR, 130hs Heliofanía, precipitaciones 80-110 mm). Los agroquímicos utilizados corresponden a formulaciones comerciales. Las dosis utilizadas fueron las recomendadas por el Protocolo de Producción Integrada (PIC): de 200 g/hl para malatión; de 42g/hl para dicofol, Tetradifón: 15 gr/hl y 17,5 g/hl para imidacloprid. (en ensayos de simulación y a campo). Se tomaron muestras al azar y por triplicado a diferentes tiempos antes y luego de aplicado el plaguicida. (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 21, 30 días). Se determinaron % de acidez, pH, °Brix y % de Jugo, utilizando técnicas estandarizadas de IRAM y de la AOAC. Se determinaron cromatográficamente los residuos de malatión, dicofol, imidacloprid, tetradifón en fruta entera utilizando técnica multiresidual desarrollada y validada previamente por el grupo de investigación (Ricca, Kulczykcki, Greco 2002) y por técnicas oficiales internacionales. Se determinaron las curvas de disipación reales y de simulación; las velocidades de degradación y tiempo de vida media.

RESULTADOS Y DISCUSION

Correlaciones entre variables fisicoquímicas y concentración residual de pesticidas
Con cada una de las mediciones evaluadas en los frutos se estimaron las correlaciones de Pearson (r_P) y de Spearman (r_S), no paramétrica. Se consideraron ambos tipos de variables aleatorias que pueden o no estar asociadas funcionalmente. Para aquellos casos en los que se detectó una correlación positiva, se construyeron gráficos de dispersión con el fin de visualizar algún tipo de relación funcional. En general para todas

las variedades las correlaciones significativas fueron entre acidez, ° Brix , % de jugo y los productos aplicados (cuadro 1)¹. A partir del seguimiento realizado sobre las curvas de degradación, se observó leves incrementos en el contenido de sólidos solubles totales.

Cuadro 1: Correlaciones de Pearson (r_p) y de Spearman (r_s) de Imidacloprid con variables físico-químicas en pomelo.

Variabes	Pearson	Spearman
Imidacoprid con Acidez	$r_p = 0.6965$ (0.0172)	$r_s = 0.7084$ (0.0010)
Imidacoprid con Brix,	$r_p = 0.5156$ (0.0285)	$r_s = 0.5622$ (0.0152)
Imidacoprid con Jugo	$r_p = 0.8218$ (0.0000)	$r_s = 0.8128$ (<0.0001)

Nota: a lo fines prácticos se ejemplificó el análisis realizado en una sola variedad y producto

Este aumento, según Echeverría y Valich (1989), estaría relacionado con la degradación de los ácidos. El aumento, en general fue progresivo y superó 1,0° Brix durante 30 días. Similar a lo reportado por El-Otmani y Coggins (1991) en naranjos Washington Navel. Hubo una disminución progresiva y consistente de la acidez de la fruta, llegando a valores inferiores a 1.92% que determinarían una menor calidad de fruta. La disminución de los valores de acidez de fruta coincide con lo reportado por El-Otmani y Coggins (1991) y El-Zeftawi (1976 y 1977) en naranjas Valencia y Lane Late. Todos los compuestos para las diferentes variedades presentan diferentes ajustes en los modelos de degradación. En general a excepción del dicofol presentaron una curva de eliminación rápida al comienzo y que se asocia principalmente a acciones mecánicas (viento, lluvia, etc) seguida de una eliminación más lenta debido a causas físicas (volatilización, solubilización, grado de esparcimiento del plaguicida, etc) para evolucionar hacia la última fase determinada por el bloqueo del plaguicida en el fruto. Además debe considerarse que la volatilización depende de la tensión de vapor del plaguicida, del viento y de la temperatura. Diferentes autores consideraron que la volatilización es la principal causa de eliminación de los residuos. Willis, McDowell 1987; Harper, 1983; también reportaron acerca de la influencia de otros factores sobre la volatilización que inducen a la degradación de plaguicidas.

Para Velocidad De Degradación y Tiempo De Vida Media

Se estimó así los dos parámetros fijos C_0 y k , en función de una serie de variables (x_i) donde la concentración de residuos al cabo de un tiempo t (C_t) es función de la concentración inicial (C_0) y del tiempo transcurrido (t), pero también de una serie de variables de diferente valor según la influencia que cada una de estas variables tenga en la disipación. Se propuso modelos lineales que incluyen efecto debido a la Especie por variable (pomelo Henderson X Flame, naranja Valencia, mandarina Nova,

Mandarina Ellendalle, limón Meyer, limón Rugoso), y efectos de la interacción (especie por producto) por el diferente comportamiento de las especies con los productos. Se utilizó como estimación del error la variabilidad de las determinaciones. Las variables analizadas son diferencia entre los valores predicho (simulado en el laboratorio) y real (es el obtenido en el campo). (Cuadro 2)

Cuadro 2: La diferencia de velocidad de degradación entre predicho y real para los tres productos

Producto	Dicofol	Imidacloprid	Malatión
Limón Meyer	-0.0640	-0.0496	-0.0020
Limón rugoso	-0.0603	-0.0067	-0.0207
Mandarina	-0.0077	0.0112	-0.0720
Naranja	0.0556	0.0103	-0.0103
Pomelo	0.0423	0.0342	0.0097

Se observó buen ajuste de los datos a los modelos con R cuadrado Ajustado de 99,77.

La partición de la Sumas de Cuadrados del Modelo en sus partes; especie, producto e interacción indica que esta última es significativa indicando que las especies se comportan diferentemente bajo los productos aplicados. (fig.1)

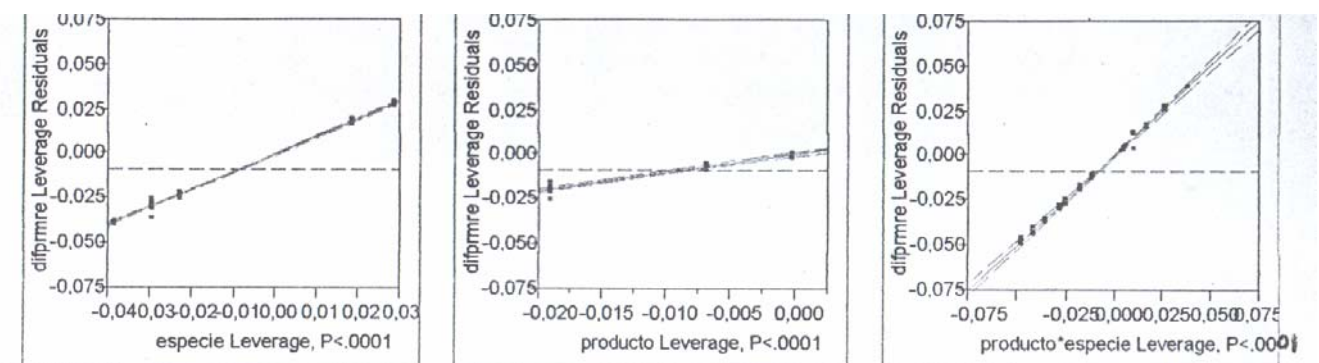


Fig1: Interacción producto-especie

Se observa que la variable velocidad de degradación en naranja y pomelo tiene medias altas y positivas con respecto a los limones mientras que para mandarina se mantiene en valores intermedios. En relación a los productos malatión es el de mayor valor

medio. Las variaciones de persistencia de diferentes plaguicidas no sólo se observan entre especies o variedades distintas sino entre los diferentes órganos de una planta (Coscollá, 1993). En relación a la variable tiempo de vida residual media se observa que las medias de las especies son diferentes y oscilan alrededor de 0,4.(fig.2)

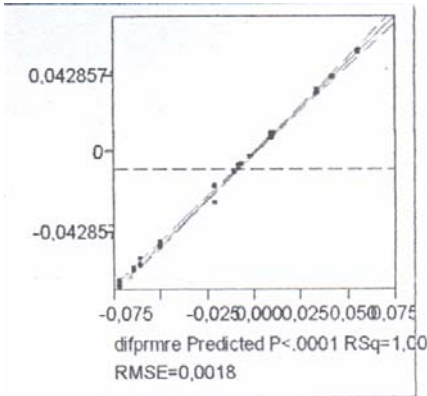


Figura 2: Modelo de Predicción

Respecto de las medias de los productos Imidacloprid es el de mayor media mientras los otros tienen medias similares. El tetradifón tiene un comportamiento similar al imidacloprid. Algunos autores (Mulla, 1981; Carman, kelili, 1982); han determinado en diversos productos vegetales tiempos de vida media, encontrando además valores superiores en los frutos cítricos.

Construcción Del Modelo De Predicción

En general expresado matemáticamente se cumple que $C(t) = F(x, t)$, en la que $C(t)$ es la concentración actual del compuesto en la fruta, t es el tiempo transcurrido desde la aplicación y x es el vector de factores que definen el proceso de degradación del plaguicida. Se propone el siguiente modelo de regresión lineal múltiple para cada variedad (fig.3).

$$\ln C_t = \ln C_0 + b_0 \int dt + b_1 \int x_1 dt + b_2 \int x_2 dt + \dots + b_n \int x_n dt$$

Donde $k_i = f(x_i)$ $k_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n$ responde a un modelo lineal múltiple de la forma:

$$y = X \beta + \varepsilon$$

en la que y es el vector de respuesta, ε es el vector de errores aleatorios, β es el vector de

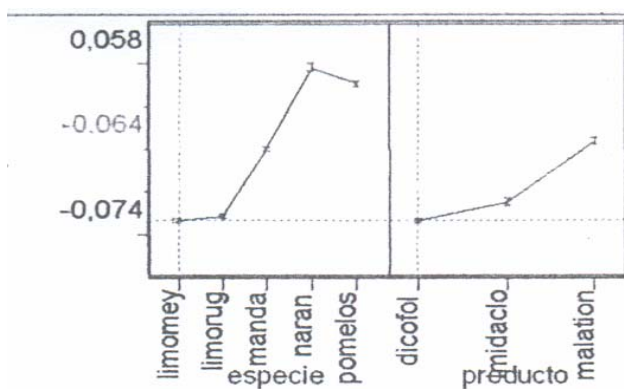


Figura 3: Perfil de Interacción entre variedades y productos.

los coeficientes desconocidos y X es la matriz de escalares de las variables experimentales (Factores climáticos: temperaturas medias, HR% media, lluvia, vientos; dosis de aplicación, plaguicida, tiempo, tensión de vapor, solubilidad, °Brix, acidez, % de jugo). La estimación de los coeficientes β se efectuaron por el cálculo de los coeficientes b mediante el método de los cuadrados mínimos, siendo b el mejor estimador lineal insesgado de β . La resolución matemática de las ecuaciones lineales planteadas y la estimación de los coeficientes por regresión lineal se realizó utilizando software estadístico específicos.

VALIDACION DEL MODELO

Los modelos obtenidos fueron validados mediante ensayos experimentales realizados en la Estación Experimental de Concordia Entre Ríos.

Las experiencias se desarrollaron adoptando las condiciones de operación que incluyen valores controlados de las variables estudiadas y condiciones diferentes a las empleadas en la construcción del modelo a los fines de comprobar el grado de ajuste de los resultados experimentales con los obtenidos mediante la predicción teórica surgida del modelo.

CONCLUSION

Se concluye que:

- Existe variación en la degradación sufrida por los diferentes compuestos estudiados, esto se atribuye a los factores que intervienen en la velocidad de disipación y a las posibles interacciones entre ellos.
- Existe en general correlación significativa entre °Brix y la acidez Vs concentración de residuos.

- En los productos estudiados la degradación en frutos cítricos se divide en tres fases: a) en primer lugar, se tendrían las pérdidas que se producen por aplicación, b) las producidas inmediatamente después de la aplicación cuando aún el plaguicida permanece en la superficie del fruto y c) cuando éste penetra y alcanza el equilibrio. Mientras que en las dos primeras fases las pérdidas principalmente se deben a mecanismos de volatilización y fotodescomposición en la tercera sería la degradación química o biológica la causa principal de desaparición del plaguicida en el fruto.
- Las cinéticas de degradación simuladas y reales fueron similares.
- El valor de vida media residual estimado debe considerarse como un valor orientativo y útil para comparaciones relativas.
- Deben considerarse modelos matemáticos para cada variedad de cítricos y que los mismos son de gran utilidad para predecir el comportamiento residual de pesticidas.

BIBLIOGRAFIA

- Carman G.** Potencial residue problem associated with low volume sprays on Citrus in California. *Bull.Env. Cont.Toxic.*, **8**, 38-45. (1972).
- Coscollá R.** Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales. Edic.Mundi Prensa. España,(1993).
- Echeverria, E.D. and J. Valich.** Enzymes of sugar and acid metabolism in stored Valencia oranges. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* vol. N° 114 (3), p. 445-449,(1989).
- Ei-Otmani, M. And Coggins., 1991.** Growth regulator effects on retention of quality of stored citrus fruits. *Scientiae Horticulturae* vol. N°45, p.261-272.
- Ei- Zeftawi, B.** An evaluation of the fruit quality and storage behaviour of Lane Late Navel oranges. *Aust. J.Exp.Agr. Anim. Husb.* vol. N°17,p. 515-519., (1977)
- Ei- Zeftawi, B.** Cool storage to improve the quality of Valencia Orange. *J. Hort. Sci.* vol. N°51, p. 411-418,(1976).
- Harper, L.** Microclimate effects on toxaphene and DDT volatilization from cotton plants. *Agron.J.*, 75, 295-302.(1983);
- Keiya Inao and Yasuo Kitamura.** Pesticide paddy field model (PADDY) for predicting pesticide concentrations in water and soil in paddy fields. *Pestic. Sci*, **55** : 38-46, (1999).
- kelili, D.** Constance des valeurs de demi-vie des résidus persistants des pesticides. *Les Cahiers de la Recherche Agronomique*, **39**, 157-167 (1982).
- Kreuger J; Tornqvist L.** Multiple regression analysis and prediction of pesticide occurrence in subsurface drainage and streamflow related to pesticide intrinsic properties and quantities applied. *Symp.Pestic.Chem. 10 Meet.*, 681-85, (1996).

Mulla, M.S. Distribution, transport and fate of insecticides. *Residue Rev.*, **81**, 2-136.(1981).

Ricca A., Kulczykcki C., Greco J. IX Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, "Metodología multirresidual": Una alternativa para el análisis de diferentes grupos de pesticidas en frutos cítricos.2002.

Spynu, E.I. Predicting pesticide residues to reduce crop contamination. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, **109** 89-107 (1989).

Willis G., McDowell. L., Pesticide persistence on foliage. *Rev. Env. Cont. Tox.*, **100**, 21-73 (1987);

Wu J.; Nofziger D. L. Incorporating temperature effects on pesticide degradation into a management . *J.Environ.Qual.* **28** 1 92-100(1999)

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se realizó con fondos provenientes de INTA del Programa Frutales asignados para el Proyecto: Puntos Críticos para el Mejoramiento de la Competitividad de los Cítricos Argentinos mediante la aplicación del Sistema de Producción Integrada.

HIDROLISIS ENZIMATICA DE NARINGINA

BLANCO Silvia, SORIA Fernando, MACORITTO Alberto, y GERONAZZO Hugo.

Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI). Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSa). Av. Bolivia 5150 (4400). Salta. República Argentina. Tel.: 0387-4255575. E-mail : hgerona@unsa.edu.ar

RESUMEN

Se estudió a nivel de laboratorio la hidrólisis enzimática de naringina, para la producción de ramnosa y prunina. Se caracterizó la enzima a utilizar determinando su estabilidad térmica y su actividad en función del pH y de la temperatura. Se usaron soluciones sobresaturadas de naringina, las que permanecen estables durante seis horas a 50 °C – 60 °C. A 50 °C y pH 4 se alcanzó un rendimiento de obtención de prunina del 90% al cabo de seis horas, siendo la actividad enzimática residual del 90%. A 60 °C y pH 4 se logró una conversión del 98% a las seis horas con una actividad enzimática remanente del 80%. Bajo otras condiciones los rendimientos fueron menores.

Se concluye que operando a pH 4 con soluciones sobresaturadas de naringina se logra una excelente conversión que llega casi al 100% a 60°C en seis horas, facilitando además la posterior separación de ramnosa y prunina por ausencia de naringina remanente.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of naringin for the production prunin and rhamnase at level laboratory was studied. The enzyme to use was characterized determining its thermal stability and its activity based on pH and on the temperature. Supersaturated naringin solutions were used, which remain stable to 50 °C - 60 °C during 6 hours. At 50 °C and pH = 4 a yield of 90% in prunin were obtained after six hours of hydrolysis, being the residual enzymatic activity of 90%. At 60 °C and pH = 4 the conversion was 98% after 6 hours, with a remaining enzymatic activity of 80%. Under other conditions the yields were smaller.

It was concluded that operating at pH = 4 with supersaturated naringin solutions an excellent conversion is achieved, which was almost to 100% to 60 °C in 6 hours. Rhamnase and prunin recovery was facilitated by absence of naringin.

Keywords: *naringin, hydrolysis, naringinase, prunin, rhamnase.*

INTRODUCCION

La naringina es el bioflavonoide más abundante en pomelos (*Citrus paradisi*), constituyendo las frutas pequeñas inmaduras derramados naturalmente, una materia prima muy conveniente por su alto contenido en este flavonoide y el bajo nivel de pectinas. Un nuevo proceso para la producción de naringina a partir de pomelos fue desarrollado por nuestro grupo de investigación (Geronazzo y col., 2000), existiendo ensayos que muestran la viabilidad de realizar hidrólisis de naringina en soluciones sobresaturadas a mayor velocidad (Ellenrieder y col., 1998). La estructura de la naringina se muestra en la figura 1, su aglicona es la naringenina, el disacárido constituyente está formado por L-ramnosa y D-glucosa, unidos entre sí por un enlace α -glicosídico (α 1 \rightarrow 2); y enlazado a la aglicona por un enlace β -glicosídico. La naringina y sus derivados ramnosa y prunina se utilizan en la industria química-farmacéutica (propiedades antiinflamatorias, antivirales, antioxidantes) y alimenticia (amargantes) (Benavente-García y col., 1997). En ésta publicación se informa sobre los resultados obtenidos al estudiar la hidrólisis enzimática de naringina (obtenida en nuestro laboratorio), con el objeto de producir ramnosa y prunina. Se caracterizó la enzima a utilizar y se trabajó con soluciones sobresaturadas de naringina a distintos pH y temperaturas, para optimizar la hidrólisis y facilitar la posterior separación de ramnosa y prunina.

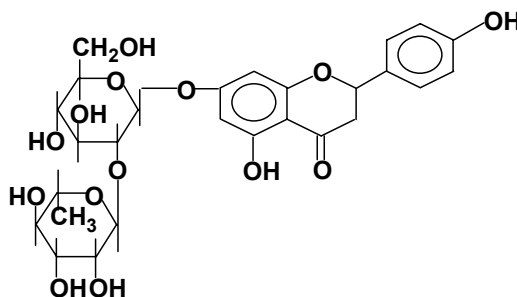


Figura 1. Naringina (7-ramnoglucósido de naringenina)

MATERIALES Y METODOS

Materiales: p-nitrofenil α -L-ramnósido (PNR), p-nitrofenil β -D-glucósido (PNG) fueron adquiridos a SIGMA (St.Louis, Mo, USA). La naringina utilizada para los ensayos fue obtenida en nuestro laboratorio con una pureza del 95 %. Los estándares naringina y prunina para cromatografía líquida HPLC fueron de Extrasynthese (Genay, Francia) y la

enzima hespíridinasa (que presenta actividad de α -ramnosidasa), fue una donación de Tanabe, Japón. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Métodos analíticos

Ensayo de actividad de α -ramnosidasa

La actividad de α -ramnosidasa fue determinada usando p-nitrofenil α -L-ramnósido de acuerdo al método descrito por Romero y col., 1985. A diferencia de este método se empleó buffer ácido cítrico / citrato de sodio 50 mM y pH 4. La absorbancia del p-nitrofenolato formado se midió a 400 nm (coeficiente de absortividad molar del p-nitrofenolato de sodio, ϵ^{400} 21,44 mM⁻¹ cm⁻¹) (Romero y col., 1985). Se definió una unidad de actividad de enzima como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a pH 4,0 y 50°C.

Ensayo de actividad de β -glucosidasa.

La actividad de β -glucosidasa fue determinada usando p-nitrofenil β -D-glucósido de acuerdo al método descrito por Kohchi y col., 1985. A diferencia del método de Kohchi se empleó como medio básico NaOH 0,5 M y buffer ácido succínico / succinato de sodio 50 mM pH 5. Una unidad de actividad de enzima se tomó como la cantidad de catalizador que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a pH 5 y 50°C.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática.

Para el perfil de actividad-pH se utilizó buffer Na₂HPO₄ / ácido cítrico (buffer McIlvaine) a 50°C. A pH superior a 7, se midieron blancos de sustrato simultáneamente para corregir el efecto de la degradación natural del p-nitrofenil α -L-ramnósido. El perfil de actividad-temperatura de α -ramnosidasa fue determinado midiendo la actividad en el pH óptimo (buffer ácido cítrico / citrato de sodio 50 mM pH 4), en el rango de 40° a 80°C.

Actividad enzimática en tratamientos térmicos llevados a cabo en presencia de naringina.

La estabilidad térmica de la enzima se determinó midiendo su actividad directamente en presencia de naringina y sus productos de hidrólisis, ya que por la dilución requerida para la medida de actividad la cantidad de naringina y productos de hidrólisis no interfieren en la determinación. En este procedimiento se disminuye la concentración de naringina de 80 mg ml⁻¹ (8%) a 0,80 mg ml⁻¹ en la muestra para ensayar la actividad. De la mezcla de reacción se tomó 100 μ l de muestra a distintos tiempos y se llevó a 10 ml con buffer ácido cítrico / citrato de sodio 50 mM pH 4, de ésta última solución se tomó la alícuota para la medida de actividad.

Hidrólisis de naringina en soluciones sobresaturadas

La hidrólisis de naringina se estudió en fase homogénea. Se prepararon soluciones sobresaturadas disolviendo el sustrato a 90°C, y enfriando después la solución a la temperatura de reacción (50° y 60°C) antes del agregado de la enzima. Las hidrólisis se llevaron a cabo en soluciones de naringina al 8%, en buffer ácido cítrico / citrato de Na 50 mM pH 4 con 7 U ml⁻¹ de enzima en la mezcla de reacción a la temperatura de hidrólisis y se incubaron durante seis horas. Se tomaron alícuotas de 2 ml a distintos tiempos y la reacción se detuvo en un baño a 90°C durante 5 minutos. El contenido de flavonoides (naringina y prunina) fue analizado por HPLC en un equipo Shimadzu LC-4 provisto de una columna C₁₈ y un detector de UV(280 nm). Las muestras fueron eluidas con una mezcla 32:68 (v:v) de acetonitrilo/agua a una velocidad de flujo de 0,8 ml min⁻¹. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los gráficos y regresiones no lineales fueron realizados usando el software PRISM de GraphPad, USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pH y la temperatura en la Actividad enzimática.

Se estudió el efecto del pH y de la temperatura en la actividad enzimática utilizando como sustrato p-nitrofenol L-ramnósido. En la figura 2a se observa que el pH óptimo de α -ramnosidasa Tanabe fue 4,0, siendo este valor similar al encontrado para otras α -ramnosidasas (Gallego y col., 2001). La actividad de la enzima también fue ensayada a varias temperaturas entre 40°C y 80°C, resultando más activa en el rango de 70°C - 80°C, con una temperatura de máxima actividad a 75°C (figura 2b). Este valor es diferente del encontrado para otras α -ramnosidasas (Manzanares y col. 2000) (Soria y col., 1999).

Hidrólisis enzimática de soluciones sobresaturadas de naringina

La enzima utilizada mostró una baja actividad de β -glucosidasa ($2,68 \times 10^{-2}$ U/mg de α -ramnosidasa y $1,11 \times 10^{-4}$ U/mg de β -glucosidasa), lo cual posibilita la producción de ramnosa con bajo contenido de glucosa, que es generada por hidrólisis de prunina.

Se estudio la inactivación térmica de la enzima en presencia de naringina a fin de seleccionar las condiciones experimentales más convenientes para la hidrólisis. En la figura 3 se observa que a 50°C y al cabo de 6 horas la actividad residual es del 90%, y a 60°C en el mismo tiempo es del 80%

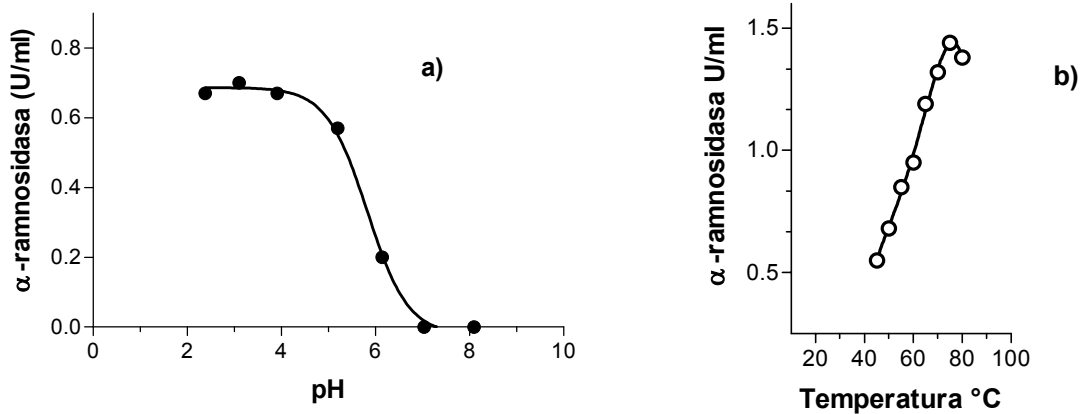


Figura 2. Efecto del pH (a) y temperatura (b) en la actividad enzimática de α -ramnosidasa Tanabe. (a) Acido cítrico/ Na_2HPO_4 (buffer de McIlvaine), 50°C . (b) Buffer acido cítrico/citrato de sodio 50 mM pH 4.

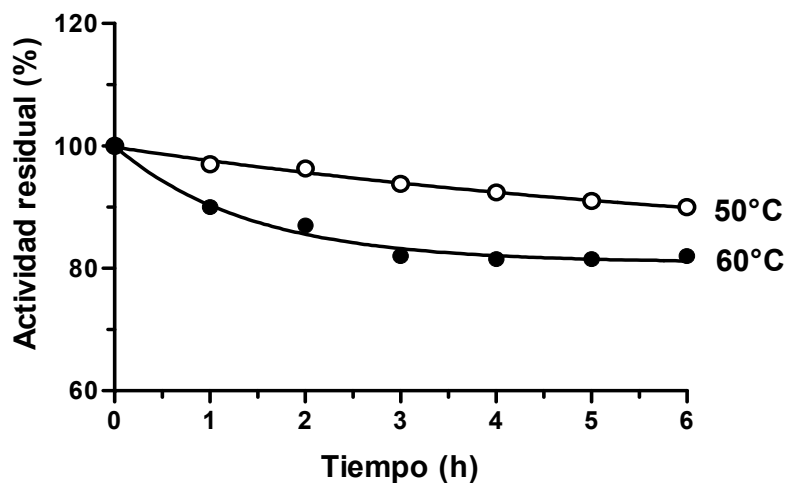


Figura 3. Inactivación térmica de α -ramnosidasa Tanabe en presencia de naringina al 8%. Actividad inicial: 7 Uml^{-1} ; buffer: 50 mM ácido cítrico/citrato de sodio pH 4,0.

En el estudio de la hidrólisis de soluciones sobresaturadas de naringina, se ensayó dentro de la primeras seis horas de reacción porque en este lapso de tiempo el proceso puede llevarse a cabo en fase homogénea (Ellenrieder y col., 1998). La hidrólisis enzimática de naringina se estudió a pH 4,0 y 5,5 y a dos temperaturas diferentes (50°C y 60°C). En la figura 4 se observa que a pH 5,5 y a 60°C se logra en 6 horas un rendimiento de hidrólisis del 90%. A pH 4 y 50°C (figura 5) se alcanza en dos horas un 74% de hidrólisis, que llega al 90% en seis horas. A 60°C se logra el mayor nivel de obtención de prunina, con un rendimiento de hidrólisis del 84% en dos horas y que alcanza un máximo del 98% a las seis horas.

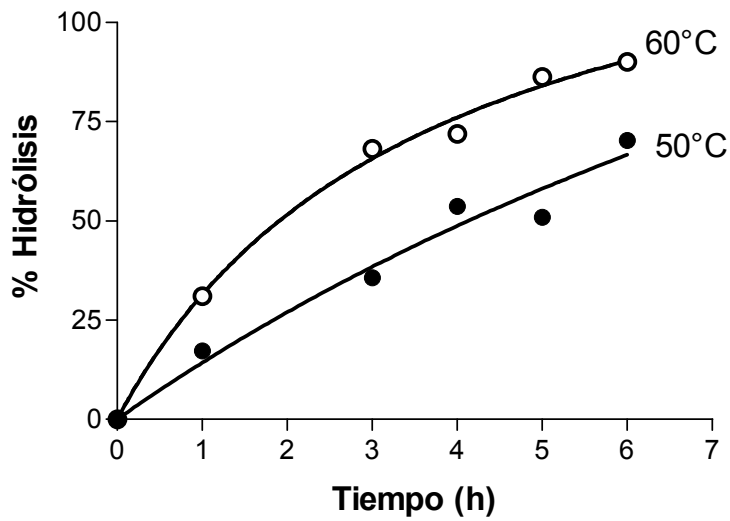


Figura 4. Hidrólisis enzimática de soluciones sobresaturadas de naringina (8%). 7 U ml⁻¹ de enzima. Buffer ácido succínico / succinato de sodio pH 5,5.

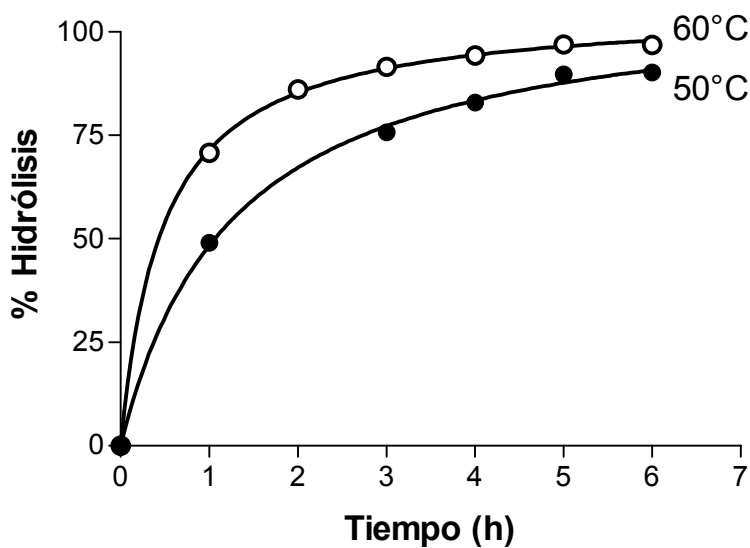


Figura 5. Hidrólisis enzimática de soluciones sobresaturadas de naringina (8%). 7 U ml⁻¹ de enzima. Buffer ácido cítrico / citrato de sodio pH 4.

CONCLUSIONES

-La α -ramnosidasa Tanabe es un catalizador muy conveniente para la hidrólisis de la naringina obtenida en nuestro laboratorio, debido a su bajo contenido de β -glucosidasa y a su elevada estabilidad térmica durante los ensayos realizados.

-Es posible, en fase homogénea y en determinadas condiciones, una hidrólisis enzimática prácticamente completa, lo cual facilita además la posterior separación de los productos por ausencia de naringina remante, reduciendo costos de producción y dejando abierto un prometedor camino para la producción de prunina y ramnosa.

BIBLIOGRAFIA

Geronazzo, H., J. Robin, S. Blanco, C. Cuevas, and G. Ellenrieder. 2000. Aprovechamiento Integral de Residuos de Producción y Procesamiento de Pomelos. Un Proyecto de Innovación Tecnológica. Anales del VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Rafaela Argentina, Junio.

Ellenrieder, G., S. Blanco, and M. Daz. 1998. Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase. *Biotechnol. Tech.* 12:63-65.

Benavente-Garcia, O., J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño, and J. A. Del Rio. 1997. Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45:4505-4515.

Romero, C., A. Manjon, J. Bastida, and J. L. Iborra. 1985. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal. Biochem.* 149:566-571.

Kohchi, C., M. Hayashi, and S. Nagai. 1985. Purification and properties of b-glucosidase from *Candida pelliculosa* var. *acetaetherius*. *Agric. Biol. Chem.* 49:779-784.

Gallego, M. V., F. Pinaga, D. Ramon, and S. Valles. 2001. Purification and characterization of an a-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *J. Food Sci.* 66:204-209.

Manzanares, P., M. Orejas, E. Ibanez, S. Valles, and D. Ramon. 2000. Purification and characterization of an a-L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:198-202.

Soria, F. F., C. Cuevas, and G. Ellenrieder. 1999. Purification and some properties of a-L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus*. *Applied Biological Science* 5:109-120.

PRODUCCION DE NEOHESPERIDINA A PARTIR DE NARANJITAS AGRIAS

ROBIN Juan H., BLANCO S., MACORITTO Alberto M., y GERONAZZO Hugo I.

Instituto de investigaciones para la industria química (iniqui). Consejo de investigaciones de la universidad nacional de salta (ciunsa). Avenida bolivia 5150–4400 salta – argentina. Tel: 0387-4255575, e-mail: hgerona@unsa.edu.ar

RESUMEN

Se determinó la solubilidad de neohesperidina pura en distintos medios y condiciones: a) en agua a distintas temperaturas, b) en soluciones acuosas a distintos pH y c) en mezclas hidroalcohólicas. En a) y en b) se observó un notable incremento de la solubilidad con el aumento de la temperatura y el pH. En el tercer caso, la curva de solubilidad presenta un máximo de 10 g/L para un porcentaje de alcohol etílico entre el 60% y el 70 % en volumen. Se estudió la producción de neohesperidina en planta piloto a partir de naranjitas agrias o amargas (*Citrus aurantium*), utilizando un proceso ensayado en laboratorio. Los mejores resultados se obtuvieron extrayendo neohesperidina en columnas de lecho fijo con mezclas hidroalcohólicas a temperatura ambiente, lográndose un rendimiento total cercano al 70 % y una pureza del 98 %. Se concluye que, controlando adecuadamente las condiciones de extracción, el proceso desarrollado es un excelente camino para la obtención de neohesperidina a partir de naranjitas agrias.

Palabras Claves: Naranjitas, *Citrus aurantium*, neohesperidina, solubilidad, extracción.

ABSTRACT

The solubility of pure neohesperidin was studied. There were tested different mediums and conditions: a) solubility in water at different temperatures; b) solubility in aqueous solutions at different pH values at room temperature; and c) solubility in mixtures of water and alcohol at room temperature. In cases a) and b) an notably increasing of solubility was observed with the raising of pH and temperatures values. In the third case it is reached a maximum of 10 g/L when the percentage of ethyl alcohol is between 60 and 70% in volume. The neohesperidin in pilot plant was made by processing sour little oranges (*Citrus aurantium*) in fix bed column by using a process tested in laboratory. The better results were reached with hydro-alcoholic mixtures at room temperature. A total yield close to 70% and a purity of 98% were attained. It is concluded that controlling the extraction conditions, the developed process is an excellent way to obtain neohesperidin from sour little oranges.

Keywords: *Little oranges, Citrus aurantium, neohesperidin, solubility, extraction.*

INTRODUCCION

La neohesperidina se encuentra presente en las naranjitas agrias o amargas (*Citrus aurantium*), variando su concentración entre el 20 % y el 25 % en peso para diámetros próximos a los 10 mm y decayendo notablemente con el aumento de tamaño^{1, 2}. Este flavonoide se utiliza como antioxidante y principalmente en la producción de dihidrochalcona de neohesperidina, un edulcorante no calórico mil veces más dulce que la sacarosa^{3, 4}. Estudios realizados a escala laboratorio por nuestro grupo de investigación mostraron la factibilidad de obtener neohesperidina en columnas de lecho fijo a partir de naranjitas agrias⁵. En este trabajo se informa sobre los resultados obtenidos en : 1) estudio de solubilidad de la neohesperidina pura en los siguientes medios y condiciones: a) en agua a distintas temperaturas b) en soluciones acuosas a distintos pH y temperatura ambiente c) en mezclas hidroalcohólicas a temperatura ambiente, y 2) determinación de las condiciones de extracción – precipitación de neohesperidina en planta piloto a partir de naranjitas agrias, utilizando resultados de laboratorio, y desarrollo de un proceso para la obtención de neohesperidina con miras a su producción industrial.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Muestras: naranjitas agrias frescas procedentes de Salta (Argentina), con diámetros entre 5 y 15 milímetros.

Reactivos : neohesperidina y naringina marca Sigma; estándar para cromatografía líquida HPLC de Extrasynthese (Francia); alcohol etílico comercial de 96°. Los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico. La neohesperidina utilizada para el estudio de la solubilidad fue obtenida en nuestro laboratorio con una pureza del 98 %.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el análisis de las muestras de naranjitas agrias se tomaron alícuotas de las mismas procesadas en planta piloto en un molino continuo a cuchillas con una capacidad de 600 kg/hora, se secaron a 50 ° C y se molieron nuevamente hasta polvo fino en un molinillo de laboratorio. Porciones de 100 mg de las muestras fueron extraídas con 20 mL de N,N-dimetilformamida: agua en relación volumétrica 2:1 durante al menos 6 horas a 60°C bajo agitación y luego diluidas convenientemente para su determinación analítica. La neohesperidina y otros flavonoides fueron determinados en todos los casos por HPLC

usando un equipo Shimadzu LC-4A con una columna C18 y un detector UV (280 nm). Como solventes se utilizaron mezclas de acetonitrilo - agua (32:68, % en volumen) y acetonitrilo - metanol - ácido acético - agua (10:10:5:75, % en volumen).

Determinación de la solubilidad de neohesperidina

Para determinar la solubilidad de este flavonoide se incubaron suspensiones de neohesperidina (obtenida en nuestro laboratorio), durante 5 horas en erlenmeyer de 25 ml agitado a 100 rpm al ph, temperatura o % de alcohol seleccionado. Las suspensiones se filtraron en papel de filtro n° 589³ blue ribbon. A 100 µl de cada filtrado se le agregan 2 ml de una mezcla de dimetilformamida - agua en una relación volumétrica 2:1 y se determinó la concentración de neohesperidina en la solución siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente para hplc. Para la determinación de la curva de solubilidad-ph, previo a la filtración, se modificó el ph de la mezcla de neohesperidina-agua a 20 °c por el agregado de hcl 1m ó de naoh 1m. La curva de solubilidad en función de la temperatura se determinó a partir de suspensiones del flavonoide en agua manteniéndose el ph próximo a 7. Para la curva de solubilidad en función del contenido de alcohol, se utilizaron mezclas hidroalcohólicas a 20°C.

Extracción de flavonoides en columnas de lecho fijo a escala piloto:

En una columna de acrílico de 14 cm de diámetro x 100 cm de altura se colocó el material molido y se puso en contacto con la mezcla hidroalcoholica indicada a 20 °c y durante 20 minutos. Luego se eluyó a una velocidad de 3 litros por minuto y los extractos eluidos se dejaron reposar por 30 horas para permitir la cristalización de los flavonoides. Las suspensiones se filtraron al vacío y los cristales obtenidos se lavaron con agua y se secaron en una estufa de circulación forzada a 50 °c por 10 horas. Se determinó el contenido de neohesperidina en los extractos, en los sólidos agotados o residuos y en el producto final.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dependencia de la solubilidad de la neohesperidina con la temperatura

En la figura 1 se observa que a temperatura ambiente y hasta los 55 °C aproximadamente, la solubilidad de este flavonoide puro en agua es muy baja con valores próximos a los 0,50 g/L. Si la temperatura se eleva hasta los 90 °C su solubilidad se incrementa cerca de 20 veces alcanzando los 10 g/L. Cuando se

extrajo en laboratorio neohesperidina de naranjitas agrias o amargas los rendimientos fueron elevados tanto a 20 °C como a 80 °C pero su precipitación prácticamente nula⁵.

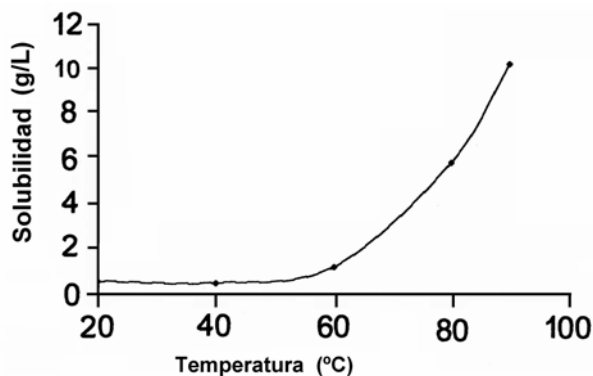


Fig. 1. Solubilidad de Neohesperidina en función de la temperatura a pH = 6,9

Dependencia de la solubilidad de la neohesperidina con el pH

En la figura 2 se puede observar el cambio de solubilidad de la neohesperidina pura en función del pH. En medio ácido y ligeramente alcalino la solubilidad de la neohesperidina es mínima elevándose notablemente a partir de valores de pH cercanos a 8. Este comportamiento puede deberse a la ionización de grupos fenólicos y/o a la apertura de un anillo de la flavonona que pasa a chalcona soluble para luego reconstruirse al bajar el pH⁶. La extracción de neohesperidina a nivel laboratorio fue buena tanto a pH = 6 como a pH = 11 pero su separación poco significativa⁵.

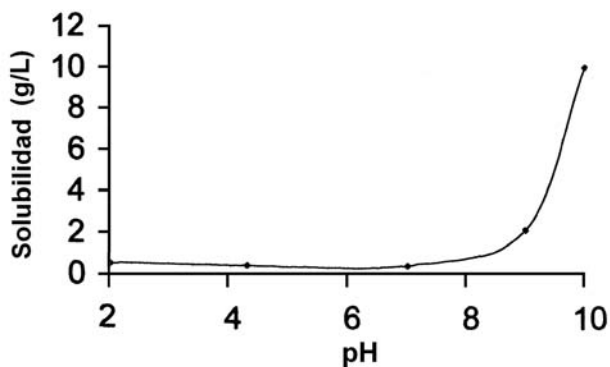


Fig. 2. Solubilidad de neohesperidina en función del pH a 20 °C

Dependencia de la solubilidad de la neohesperidina en mezclas hidroalcohólicas

Como puede verse en la figura 3, la solubilidad de neohesperidina pura en mezclas hidroalcohólicas a 20 °C presenta un máximo de 10 g/L cuando el porcentaje de alcohol está entre el 60% y el 70% en volumen. Para contenidos alcohólicos mayores o menores la solubilidad decae rápidamente. La extracción de neohesperidina en laboratorio a partir de naranjitas agrias fue elevada utilizando distintos porcentajes de alcohol –agua, pero solo operando con mezclas entre el 25 % - 35% de contenido alcohólico a temperatura ambiente se obtuvo neohesperidina aunque con bajos rendimientos⁵. Estas condiciones se seleccionaron para los ensayos en planta piloto.

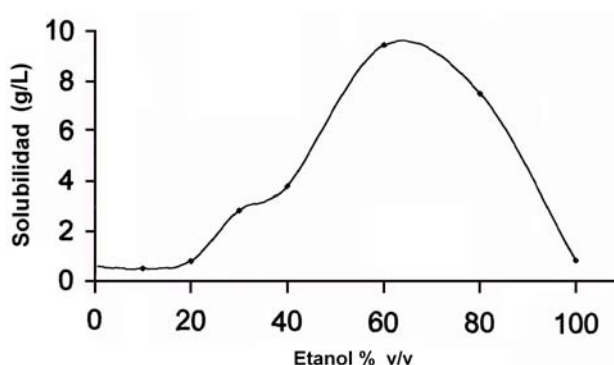


Fig. 3. Solubilidad de neohesperidina en mezclas hidroalcohólicas a 20 °C

Producción de neohesperidina en planta piloto

Los ensayos realizados en plantas piloto, en las condiciones arriba mencionadas, dieron como resultado una eficiente extracción y elevada separación de neohesperidina de alta pureza, resultados que entendemos se debe al cambio de escala que modifica la extracción y la estabilidad del flavonoide en el extracto. En la Tabla 1 se muestran los valores de: rendimientos de extracción $\eta_{\text{extracción}}$ (porcentaje de neohesperidina extraído de la materia prima), rendimiento total de recuperación η_{totales} (porcentaje de la neohesperidina total contenida en el producto final) y pureza del producto final. Se observa que operando con mezclas con un 30 % de alcohol (experiencias 1 y 2), y una cantidad de materia prima fresca de 6,2 y 6,0 kg respectivamente, se obtuvieron elevados rendimientos de extracción con aceptables rendimiento totales y una elevada pureza. La experiencia 3, realizada con solución hidroalcohólica al 25 % y con 4,6 Kg. de materia prima fresca, muestra una notable mejora en los rendimientos de extracción y total y una pureza del producto final del 98 %.

Tabla 1. Obtención de Neohesperidina en planta piloto a partir de naranjitas agrias

Nº	Medio de extracción	Materia Prima (g)	Neohesperidina Base seca (%)	$\eta_{\text{Extracción}}$ (%)	η_{Total} (%)	Pureza
1	30 % alcohol a 20°C	6.200	19,8	85,8	58,5	95
2	30 % alcohol a 20°C	6.000	20,0	83,8	56,4	94
3	25 % alcohol a 20°C	4.600	18,4	91,7	68,3	98

En la figura 4 se muestra el esquema del proceso desarrollado en planta piloto para la obtención de neohesperidina, detallando las cantidades de entrada y salida correspondientes a la experiencia 3.

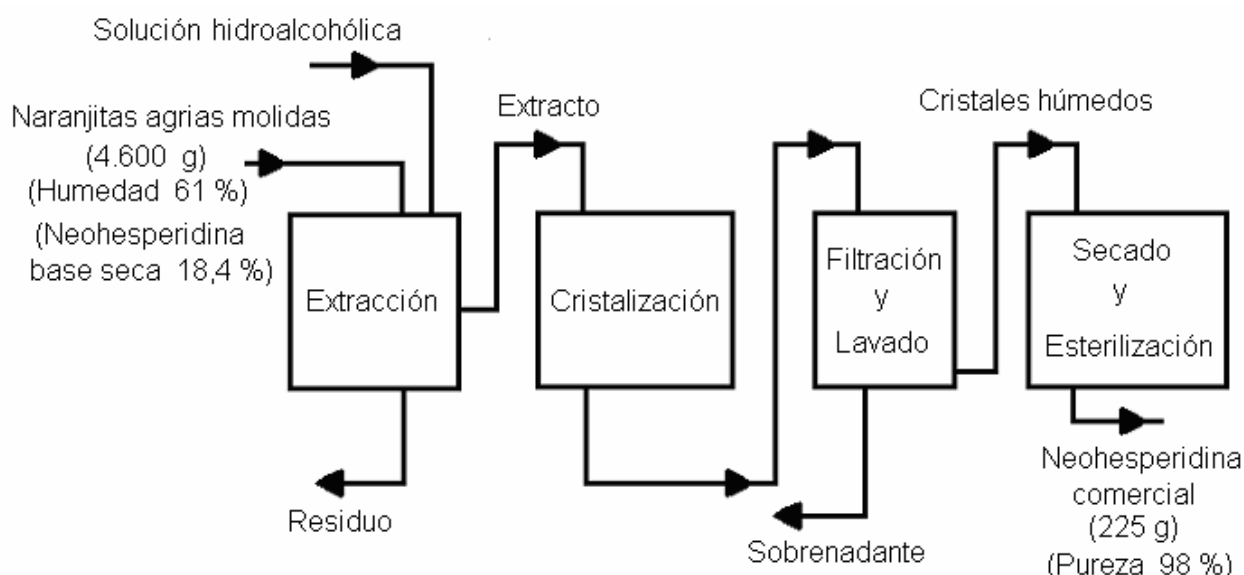


Fig. 4. Esquema del proceso desarrollado en planta piloto para la obtención de neohesperidina

CONCLUSIONES

- La solubilidad de la neohesperidina pura se incrementa notablemente con el aumento de la temperatura y del ph y presenta un máximo en soluciones hidroalcohólicas.
- en sistemas complejos como las naranjitas agrias la extracción de neohesperidina es elevada en todos los medios y condiciones ensayados, no así su separación que está relacionada con las características del extracto obtenido.
- el proceso desarrollado en planta piloto para la producción de neohesperidina a partir de naranjitas agrias o amargas en columnas de lecho fijo y con determinadas mezclas

hidroalcohólicas a temperatura ambiente, permite obtener neohesperidina de alta pureza y con elevados rendimientos, resultando dicho proceso es un excelente camino para la obtención de neohesperidina a nivel industrial.

BIBLIOGRAFIA

Del Rio, J. A., M.D. Foster, F. Sabater, Porras, A. Garcia Lifon, y A. Ortuño; Selección of Citrus Varieties Highly Productive for the Neohesperidin Dihydrochalcone Precursor, Food Chemistry: 59(3), 433 – 437 (1997).

Geronazzo, H., S. Blanco y J. H. Robin. Contenido de Glicósidos de Flavonoides en frutos Inmaduros de Citrus aurantium y Citrus sinensis del Noroeste Argentino. Información Tecnológica: Vol. 13 N° 3 – 2002.

Bär, A., F. Borrego., O. Benavente, J. Castillo y J. A. Del Rio. Neohesperidin Dihydrochalcone; Properties and Applications. Lebens M.- Wiss. U. – Technol., 23, 371-376 (1990).

Benavente - Garcia O., J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuño, y J.A. Del Rio; Uses and properties of Citrus Flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry: 45 (1997).

Macoritto, A., J. Robin, S. Blanco , H. Geronazzol . Obtención de Flavonoides a Partir de Frutos Inmaduros de Citrus Aurantium . Innovación : Año 16, N° s 1 y 2 (2004) 39 - 42.

Di Mauro A., B. Fallico, A. Passerini, P. Rapisarda y E. Maccarone; Recovery of Hesperidin from Orange Peel by Concentration of Extracts on Styrene-divinylbenzene Resin. Journal of Agricultural and Food Chemistry: 47 (10), 4391-4397 (1999).

APROVECHAMIENTO DE CÁSCARAS DE SANDÍA EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CRISTALIZADOS

GONTERO, Mauro M., BRANDELI, Adriano, NOREÑA, Cacio P. Z.

Departamento de Tecnologia de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP.91591-970. Fone: (51)33166681, Fax: (51)33167048, e-mail: czapatan@ufrgs.br.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el aprovechamiento de las cáscaras de sandía para la elaboración de frutas cristalizadas. Para esto fue eliminado la capa más externa de la cáscara, cortados en forma de cubos de aproximadamente 7mm, escaldado (0, 5 y 10 minutos) y tratados con solución de cloruro de sodio al 10%. Después fueron sometidas a concentraciones crecientes de soluciones de sacarosa (30 a 72°Brix) y finalmente secadas en estufa a diferentes temperaturas (40, 60 y 80°C). El diseño experimental empleado fue el de bloques completos balanceados y los resultados analizados a través de la prueba no paramétrica de Friedman y las comparaciones múltiples entre los tratamientos fueron realizadas a través de la diferencia mínima significativa. Fue constatado que el tratamiento con mayor aceptabilidad por parte del panel sensorial fue la que había sido sometida a un escaldado de 5 minutos y secada en estufa a 60°C.

Palabras claves: osmosis, sandía, deshidratación.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce crystallized candy from watermelon rind. The following procedure was developed: the outer peel (around 4mm) was removed off, the material was sliced into 7mm cubes, blanched for, 0, 5 and 10 minutes, and then treated with 10% sodium chloride solution. This product was treated with solutions of sucrose (30 to 72°Brix), and finally dried in a stove at different temperatures (40, 60 and 80°C). The experimental design used was randomized blocks and the results were analyzed by the Friedman's non-parametric test. The multiple comparisons among treatments were carried out by the minimal significant difference. The best acceptance of the sensory panel was for the product obtained by 5 minutes blanching followed by drying at 60°C.

INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo un alto porcentaje de alimentos se pierden por la no aplicación de tecnologías apropiadas de conservación pos cosecha, siendo la deshidratación osmótica un de los métodos que permite el aumento de la vida de anaquel de estos productos.

La deshidratación osmótica es una de las tecnologías de conservación más antiguas, siendo el principio de conservación, la reducción de la actividad de agua (a_w), permitiendo de esta forma disminuir la velocidad de las reacciones químicas, bioquímicas y microbiológicas responsables por el deterioro de los alimentos (Berbari y col., 1992). Rastogi y col. (1997) definen la deshidratación osmótica como un proceso de remoción parcial del agua de un alimento, tales como vegetales o frutas, cuando sumergidos en una solución hipertónica.

En los últimos tiempos los productos obtenidos por deshidratación osmótica han recibido mayor atención por parte de los consumidores debido a que son productos más saludables y mínimamente procesados (Torreggiani y Bertolo, 2001). La utilización de este proceso en la industria de alimentos ha tenido ventajas importantes en cuanto a la calidad del producto (color, sabor, textura, embalaje, disminución de los costos de energía, distribución y almacenamiento) (Park y col., 2003).

Las frutas cristalizadas, son productos preparados a base de frutas en las cuales se produjo una sustitución de parte de su agua por azúcares a través del proceso de ósmosis (Berbari y col., 1992). Terminado el proceso de azucaramiento se somete el producto a un secado con aire caliente (Southgate, 1992).

Soler y col. (1995) clasifican las frutas deshidratadas osmóticamente por azúcares, como: cristalizadas, cuando están o no cubiertas por una capa de cristales de azúcar; glaseadas, cuando fueron recubiertas por una capa de solución sobresaturada de azúcar.

Alvarez y col. (1995) estudiaron el efecto del escaldado y la concentración por osmosis con glucosa sobre la velocidad de secado por aire a 55°C en fresas, encontrando que los coeficientes de difusión del agua fueron fuertemente afectados por el escaldado y no por la inmersión en glucosa.

Nieto y col. (2001) evaluaron el efecto del escaldado, en vapor por un minuto, y la deshidratación osmótica con glucosa (a presión atmosférica y vacío) sobre el proceso de secado por aire a 60°C en mango. Encontraron que ambos tratamientos hicieron que la difusividad del agua disminuya y el blanqueamiento resultó en una mayor incorporación de glucosa y modificaciones en el almidón celular y en las sustancias mucilaginosas.

El objetivo de este trabajo fue la elaboración de frutas cristalizadas a partir de cáscaras de sandía, evaluando el efecto del escaldado y la temperatura del aire de secado sobre el producto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las sandías fueron compradas en el mercado central de la ciudad de Porto Alegre, Río Grande do Sul, Brasil. Fueron utilizados también sacarosa comercial como agente osmótico, cloruro de sodio comercial y ácido cítrico de grado alimentario.

Procesamiento

Las sandías fueron sometidas a selección, lavado y separación de la parte comestible y semillas, siguiendo luego con la eliminación de la capa más externa de la cáscara (alrededor de 4 milímetros). La cáscara fue cortada en cubos de aproximadamente 7 milímetros, y escaldada en agua en ebullición durante 0, 5 y 10 minutos, después de esto se prosiguió a introducir la muestra en una solución de sal al 10% durante 5 horas. Cumplido el tiempo se sumergieron los trozos de cáscaras en una solución de azúcar de 30°Brix (medido con refractómetro de mesa, marca Abe Carl Zeiss), los cuales permanecieron en dicha solución durante 24 horas. Luego fueron colocadas en una solución de azúcar de 40°Brix, dejando en reposo otras 24 horas. Este procedimiento fue repetido sucesivamente (50 60, 70°Brix) hasta introducir las mismas en una solución de 72°Brix.

Cuando fue empleado la solución de 60°Brix, se llevó el pH (medido con pH-metro, marca Analion) de la solución a un valor de 4, con el objetivo de facilitar la conservación de la fruta.

Las soluciones osmóticas fueron preparadas disolviendo el azúcar en agua caliente, siguiendo con la ebullición de la misma durante 5 minutos, esto permitió aumentar la solubilidad del azúcar y evitar la cristalización de la misma dentro de la fruta.

Después del proceso de impregnación de azúcares, se retiró del jarabe la fruta y esta fue lavada con agua destilada y escurrida, para retirar el exceso de solución de la superficie y posteriormente secadas en estufa (marca Thomas Co.) a las temperaturas de 40, 60 y 80°C durante 4 horas. Después, la superficie de esos productos fueron humedecidas con jarabe y cubiertas con una capa de azúcar cristalizado e dejadas en estufa a 60°C durante 1 hora. Posteriormente el producto resfriado fue embalado en bolsas de polietileno de alta densidad.

Diseño estadístico

El planeamiento experimental para el análisis sensorial, fue realizado de acuerdo con el diseño de bloques completos aleatorios. Para observar si existían diferencias entre los tratamientos, fue empleado la prueba no paramétrica de FRIEDMAN (Meilgaards y col., 2000). Para el uso de esta prueba los valores obtenidos del análisis sensorial fueron ordenados, asignando el puesto 1 a la menor observación, el puesto 2 a la segunda menor, e así sucesivamente hasta el puesto k que fue la mayor de todas las observaciones del evaluador. No caso de empates, fue asignado el valor medio de los valores asignados (Rosas y col., 1990; Siegel y col., 1975). Las comparaciones múltiples entre os tratamientos fueron realizadas a través de la diferencia mínima significativa.

Para el análisis estadístico fue empleado el paquete estadístico SAS (1992).

Los tratamientos evaluados son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos aplicados a las muestras

Tratamientos	tiempo de escaldado (minutos)	temperatura de secado (°C)
A	0	40
B	0	80
C	10	40
D	10	80
E	5	60

Análisis sensorial

Las pruebas de degustación fueron realizadas en cabinas individuales, iluminadas con luz fluorescente de color blanca. Las muestras fueron servidas en platos de porcelana blancos, codificadas con números aleatorios de tres cifras, junto con un vaso de agua a temperatura ambiente.

Los jueces evaluaron las muestras con base a los atributos levantados por el método de lista previa: apariencia (brillo de las muestras), sabor (asociado al gusto dulce de la sacarosa), masticabilidad (facilidad con que el producto é triturado por los dientes) y gomosidad (si el producto se queda adherido en los dientes).

Con el auxilio de una escala horizontal no estructurada, los evaluadores en número de ocho, previamente seleccionados de 20 a 45 años de edad, analizaron la intensidad percibida en cada atributo. La ficha de evaluación contenía una escala de 9,0 cm, entre limites de disguste extremamente e guste extremamente.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir de la prueba estadística de FRIEDMAN indicaron que cuanto a la apariencia, sabor, masticabilidad y gomosidad existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Con respecto al sabor no hubieron diferencias.

Las comparaciones entre los tratamientos, para los atributos donde hubo diferencias, son mostrados en la Tabla 2.

TABLA 2. Suma de los valores asignados en los atributos sensoriales de las muestras de cáscara de sandía deshidratado a diferentes tiempos de escaldo y temperaturas del aire.

Tratamientos	Apariencia	Sabor	Masticabilidad	Gomosidad
0min/40°C (A)	16,0 ^{a, c}	14,5 ^a	24,5 ^{a, b}	18,0 ^a
0min/80°C (B)	25,5 ^{a, c, d}	14,0 ^a	14,5 ^a	15,5 ^{a, c}
10min/40°C (C)	8,0 ^a	36,0 ^b	37,0 ^b	36 ^b
10min/80°C (D)	30,5 ^{b, c}	19,5 ^{a, b}	10,5 ^a	14,5 ^{a, c}
5min/60°C (E)	40,0 ^{b, d}	36,0 ^b	33,5 ^b	36 ^b

Valores seguidas de por lo menos una letra igual significan que no difieren significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Cuanto a la apariencia los resultados indicaron que existieron diferencias entre los tratamientos C con D y E, y de este último con A. Siendo que la muestra escaldada durante 5 minutos y secada a 60°C (E), fue la que presentó la mayor intensidad en relación a dicho atributo. La menor intensidad correspondió al tratamiento realizado con 10 minutos de escaldado y secado a 40°C (C).

Cuanto al sabor los tratamientos A y B fueron diferentes de C y E. Obteniéndose las mayores intensidades en las muestras sometidas a un escaldado de 5 minutos y secada a 60°C y la escaldada durante 10 minutos y secada a 40°C (E y C respectivamente), las cuales no presentaron diferencia entre ellas ($p \geq 0,05$). Con respecto a las muestras que resultaron con menor puntuación en el panel sensorial fueron los tratamientos A y B ambas sin escaldar.

Al ser evaluado la masticabilidad, el tratamiento B fue diferente de C y de E, y estos diferentes del tratamiento D. En este atributo, se observó que la muestra con mayor intensidad fue la que había sido sometida a un escaldado de 10 minutos y secada a 40°C (C), mientras que el segundo lugar en orden de preferencia fue para la muestra E, correspondiente al tratamiento de 5 minutos de escaldado y secado a 60°C, no

encontrándose diferencias entre ellas. En contrapartida, las que resultaron menos intensas fueron las muestras que no sufrieron escaldado o que fueron sometidas a 80°C. Con respecto a la gomosidad los tratamientos A y B fueron diferentes de los tratamientos C y E y estas del tratamiento D. Las muestras que presentaron mayor intensidad fueron la C (escaldada 10 minutos y secada a 40°C) y la E (escaldada durante 5 minutos y secada a 60°C), no habiendo diferencia entre ellas. Por el contrario los tratamientos con menor intensidad fueron los no sometidos a escaldado o a la temperatura de secado de 80°C (muestra A, B y D).

De los dos últimos atributos estudiados, puede apreciarse que en los tratamientos C y E, los panelistas asociaron la facilidad con que las muestras son trituradas y la no adherencia en los dientes.

A partir de los resultados obtenidos, puede indicarse que el tratamiento más aceptado fue el que había sido sometido a un escaldado de 5 minutos y secado a 60°C (E). El escaldado, además de evitar el oscurecimiento enzimático (fijando el color y la textura), ablanda el tejido celular, aumenta la permeabilidad de las paredes celulares, la velocidad de deshidratación y promueve la remoción de las sustancias mucilaginosas. La muestra C (escaldada 10 minutos y secada a 40°C) tuvo una aceptación equiparable a la anterior en la mayoría de los atributos, excepto en la apariencia. NIETO y col. (2001) mencionan que la disminución en la difusividad debido al escaldado es atribuida al encogimiento del tejido, la expulsión del aire y a las alteraciones del contenido celular (gelatinización del almidón y desnaturalización de las sustancias mucilaginosas) y estos fenómenos predominan sobre el daño de la estructura de la pared celular y la ruptura de la membrana celular que podría facilitar el transporte de agua.

CONCLUSIÓN

El tratamiento al cual el panel sensorial atribuyó mayor intensidad para los atributos evaluados fue el sometido a un escaldado de 5 minutos y secado a 60°C durante 4 horas. En contrapartida los tratamientos que presentaron menor intensidad por los degustadores fueron las que no fueron sometidos a escaldado o sufrieron temperaturas de secado de 80°C.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez, C. A., Aguerre, R., Gomez, R., Vidales, S., Alzamora, S. M., Gerschenson, L. N. 1995. Air dehydration of strawberries: effects of blanching and osmotic pretreatment on the kinetics of moisture transport. *Journal of Food Engineering*, v. 25, p. 167-178.

- Berbari, G. S. A., Menegale, C. L. L., Almeida, M. E. 1992.** Processamento e controle de qualidade de frutas cristalizadas. *Higiene Alimentar*, v. 6, n. 24, p. 28-36.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T.** *Sensory Evaluation Techniques*. Florida: C. R. C. Press Inc., 2000. 281 p.
- Nieto, A., Castro, M. A., Alzamora, S. M. 2001.** Kinetics of moisture transfer during air drying of blanched and/or osmotically dehydrated mango. *Journal of Food Engineering*, v. 50, n. 3, p. 175-185.
- Park, K. J., Bin, A., Brod, F. P. R. 2003.** Drying of pear d'Anjou with and without osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, v. 56, n. 1, p. 97-103.
- Rastogi, N., Raghavarao, K., Niranjana, K. 1997.** Mass Transfer During Osmotic Dehydration of Banana: Fickian Diffusion in Cylindrical Configuration. *Journal of Food Engineering*, v. 31, n. 4, p. 423-432.
- Rosas, F. P., Copa, F. T., Salinas, F. J.;** *Métodos Estadísticos Aplicados a la Industria Alimentaria*. 1ª ed. Lima: Universidad Nacional Agrária, La Molina, 1990. 35 p.
- SAS. Statistical Analysis System, version 6.08. The SAS Institute, Cary, N. C., 1992.**
- Siegel, S. *Estatística não Paramétrica (Para as Ciências do Comportamento)*. São Paulo: Mc Graw-Hill, São Paulo, 1975. 350 p.
- Soler, M. P., Fadini, A. L., Hilst, M. A. S., Okada, C. E. 1995.** Frutas: compotas, doce em massa, geléias e frutas cristalizadas para micro y pequenas empresas. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 73 p.
- Southgate, D. Conservación de frutas y hortalizas. 1992.** Zaragoza: Acribia S. A., 216p.
- Torregiani, D., Bertolo, G. 2001.** Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical physical and structural effects. *Journal of Food Engineering*, v. 49, n. 2-3, p. 247-253.

EVALUACIÓN DE FIDEOS DE MAIZ OBTENIDOS POR EXTRUSION-COCCION

MERAYO, Yanina A.; GONZÁLEZ, Rolando J.; CARRARA, Carlos R.; TORRES, Roberto L. y DE GREEF, Dardo M.

INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS - FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA - U.N.L.-
C.C.:266 (3000) SANTA FE. TEL/FAX: 0342-4571148 ROLGONZA@FIQUS.UNL.EDU.AR

RESUMEN

Se obtuvieron fideos de maíz por extrusión-cocción utilizando dos tipos de maíz (colorado duro y amarillo dentado) y un diseño experimental de dos variables (temperatura y humedad). En los fideos se evaluaron el tiempo de cocción y las pérdidas por cocción y en las harinas correspondientes se evaluaron el % de cristalinidad, por difracción de rayos x (drx) y grado de cocción por calorimetría diferencial de barrido (dsc). Los resultados indican que el proceso de extrusión-cocción permite elaborar fideos con buenas propiedades de cocción y resistencia a la sobrecocción, con baja pérdida de sólidos. Las condiciones más adecuadas corresponden al menor nivel de humedad (27%) para los tres niveles de temperatura utilizados. Durante la extrusión-cocción se produce una pérdida parcial de la estructura nativa y la formación de nuevas estructuras que corresponden a la amilopectina retrogradada y al complejo amilosa-lípido, cambios estructurales que son observados por drx y dsc.

Palabras claves: FIDEOS, MAÍZ, EXTRUSIÓN-COCCIÓN

Evaluation of corn spaghetti made by extrusion-cooking

ABSTRACT

Corn spaghettis were obtained by cooking extrusion, using two types of corn (red hard and yellow dent) and a two factors (temperature and moisture) experimental design. The cooking time and the solids lost during cooking were determined on each spaghetti sample and on their corresponding flours the crystallinity and cooking degrees were evaluated using drx and dsc techniques. Results shows that corn spaghettis with both good cooking characteristics and resistance to overcooking can be obtained by extrusion cooking. The best conditions correspond to low corn grits moisture content (27%) for the three temperature levels used. During extrusion cooking the native structure is partially destroyed and new crystalline ones are formed, which correspond to the retrograded

amylopectin and to the amylose lipid complex, these changes were observed by drx and dsc.

INTRODUCCIÓN

La producción de cereales en argentina está concentrada en el trigo y en el maíz; y existe la necesidad de los productores y de la industria molinera nacional de ubicar nuevos mercados. Son conocidas las dificultades que tienen los enfermos celíacos para disponer de alimentos con características similares a los de trigo. El maíz es uno de los cereales considerados inocuos para los celíacos y si tenemos en cuenta a este grupo de individuos y a la necesidad de diversificar el uso de productos a base de cereales, el desarrollo de tecnología para elaborar fideos de maíz, permitiría no sólo aumentar la oferta de productos para celíacos sino también ampliar el abanico de productos derivados de este cereal.

Es sabido que la producción de fideos sin gluten de trigo, requiere la gelatinización del almidón para lograr la cohesividad (waniska y col., 1999). Para que tenga lugar la gelatinización, se necesita que el agua difunda en el interior de las partículas de la harina y si esta se acepta como el paso limitante en el proceso de extrusión, el grado de gelatinización alcanzado puede ser dependiente del tamaño de partícula, por lo tanto la selección del tamaño de partícula adecuado es un aspecto importante a considerar. Por otra parte durante la extrusión, el almidón sufre transformaciones tanto a nivel estructural como granular y las mismas serán dependientes de las condiciones utilizadas las cuales pueden ser evaluadas por difracción de rayos x (drx) y calorimetría diferencial de barrido (dsc). En cambio en el producto obtenido interesan las características de cocción y textura. Teniendo en cuenta, los escasos trabajos realizados sobre fideos a base maíz y en particular aquellos referidos al efecto del tipo de endospermo, que en el mercado argentino no existe este tipo de producto y que la extrusión brinda ventajas interesantes, tal como el mínimo deterioro de nutrientes, en el presente trabajo se estudió el efecto de las condiciones de extrusión y la dureza del endospermo del maíz, sobre las características de los fideos tipo "spaghetti".

MATERIALES Y MÉTODOS

A) obtención de la harina de maíz: se seleccionaron dos tipos de maíz: colorado duro y amarillo dentado. Los granos fueron transformados en harina según un diagrama desarrollado previamente utilizándose la fracción comprendida entre 141 y 420 micrones (robutti y col..2002).

B) elaboración de fideos: la harina previamente humectada al nivel correspondiente a cada ensayo, fue extrudida, utilizando un extrusor brabender 10 dn, con boquilla de 3 orificios de 1,5 mm de diámetro cada uno y una velocidad del tornillo de 100 rpm. Las condiciones de extrusión fueron seleccionadas de acuerdo con un diseño experimental de dos variables (temperatura y humedad) en tres niveles: 80, 90 y 100 °c y 27, 31 y 35 %, respectivamente. Los fideos luego de obtenidos fueron secados a baja velocidad, utilizando una estufa con control de humedad. Una parte fue molida en un molino ciclotec para obtener la harina correspondiente, la cual se utilizó para analizar las modificaciones estructurales del almidón.

C) evaluación de las características de cocción: en los fideos se evaluaron tanto el tiempo de cocción (t_c), como las pérdidas por cocción. El tiempo de cocción se definió como: tiempo requerido para la desaparición del centro no cocido en 9 de cada 10 fideos. Las pérdidas por cocción (pst %) para el t_c y para sobrecocción ($t_c + 10$ minutos) se determinó en el agua de cocción como residuo seco.

D) evaluación de las modificaciones estructurales del almidón: se evaluaron utilizando las técnicas de drx y de dsc. La drx se llevó a cabo utilizando un difractómetro shimadzu dx-1. El porcentaje de cristalinidad de cada estructura se calculó realizando la deconvolución de todos los picos y haciendo la relación entre el área correspondiente a la fracción cristalina de cada estructura (suma de picos) respecto del área total. La calorimetría (dsc) se llevó a cabo con una estación de análisis térmico mettler toledo dsc821. A partir del área correspondiente a cada pico endotérmico, se calculó la entalpía por gramo de muestra ($\delta h/g$). A los efectos de disponer de otros indicadores relacionados con el grado de cocción y con las propiedades de hidratación, se determinaron la susceptibilidad enzimática, utilizando alfa amilasa fungal con actividad igual a 5000 skb y un tiempo de incubación de 30 minutos (aacc 1984) y la absorción de agua por el método que originalmente fuera propuesto por baumann (remondetto y col., 2001).

D) evaluación de las características sensoriales: por medio de una evaluación sensorial realizada por un panel entrenado compuesto de dos personas, se otorgaron puntajes (según una escala de 5 puntos) a cada una de las siguientes características: firmeza, adhesividad de los fideos (grado de separación entre ellos) y pegajosidad percibida en los dedos. El puntaje final se obtuvo con la suma de los tres valores, es decir que cuanto menor es el puntaje mejores son las características texturales del fideo cocido.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y se utilizó el programa statgraphics para obtener el polinomio de regresión y el análisis de varianza de los términos correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de cocción de los fideos: los resultados mostraron que los tiempos de cocción (t_c) para ambos tipos de maíz variaron entre 7 y 11 minutos, observándose una relación inversa entre t_c y puntaje, es decir cuanto mayor es t_c mejores son las características texturales del fideo cocido. La figura 1 muestra la relación directa entre el puntaje y la pérdida de sólidos totales para 10 minutos de sobrecocción pst (t_c+10), correspondiéndose las mejores características texturales (puntaje menor o igual a 5). Estas muestras fueron obtenidas a 27 % de humedad a las tres temperaturas y a 100 °c, para los tres niveles de humedad, excepto para h 35% en el caso del maíz colorado. Esto sugiere que para las condiciones experimentales elegidas, las diferencias en dureza de endospermo no alteran significativamente los efectos de las variables de extrusión sobre las características de cocción de los fideos, no obstante se debe destacar que el color del maíz amarillo otorgaría al fideo una característica más atractiva para el consumidor.

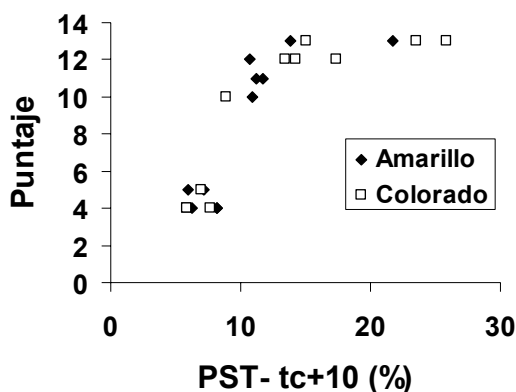


Figura 1: relación entre el puntaje de los fideos cocidos y las pérdidas de sólidos totales (%), ambos para un tiempo de sobrecocción de 10 minutos (t_c+10).y para los dos maíces.

La figura 2 muestra la superficie de respuesta correspondiente al puntaje (t_c+10), obtenida con los fideos de maíz amarillo. Se pueden observar claramente las tendencias mencionadas. El anova realizado para los términos del polinomio indica que todos los términos del polinomio son significativos (todos los valores de p son inferiores a 0,05) y considerando que la falta de ajuste no es significativa, el modelo obtenido se considera adecuado, para describir los efectos de las condiciones de extrusión sobre las características texturales de los fideos cocidos. Para el maíz colorado se obtuvieron resultados similares (que por razones de espacio no se muestran). La figura 3 muestra la superficie de respuesta correspondiente a las pérdidas de sólidos totales, pst (t_c+10), obtenida también con los fideos de maíz amarillo, la cual confirma las tendencias ya

mencionadas. En este caso el anova indica que solamente los términos lineales (h y t) y el término cruzado txh son significativos y también para este caso el modelo es adecuado.

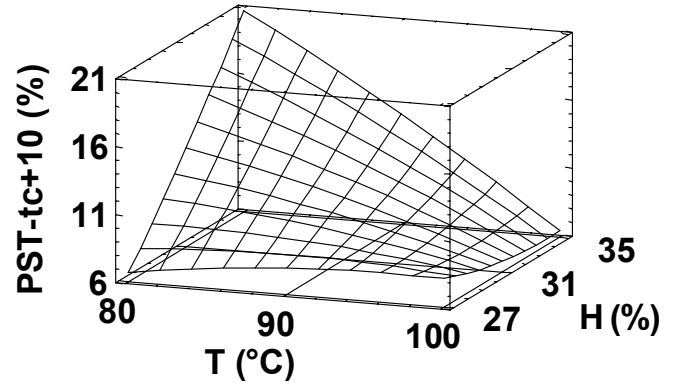
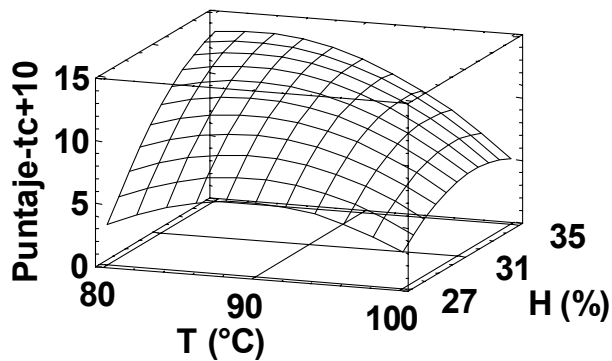


Figura 2: superficie de respuesta para el puntaje de los fideos cocidos para un tiempo de sobrecocción de 10 minutos (tc+10) correspondiente a los fideos de maíz amarillo.

Figura 3: superficie de respuesta para las pérdidas de sólidos totales (%) para un tiempo de sobrecocción de 10 minutos (tc+10) correspondiente a los fideos de maíz amarillo.

Análisis de los cambios estructurales del almidón:

A) indicadores del grado de cocción y propiedades de hidratación de la harina obtenida de los fideos: la figura 4 muestra, que hay una relación directa entre la absorción de agua (aa) y la susceptibilidad enzimática (se) (para el caso del maíz colorado los valores de ambos indicadores, para las mismas condiciones de extrusión, tienden a ser menores y con mayor grado de dispersión). Las muestras que presentaron la suma de mejores puntajes

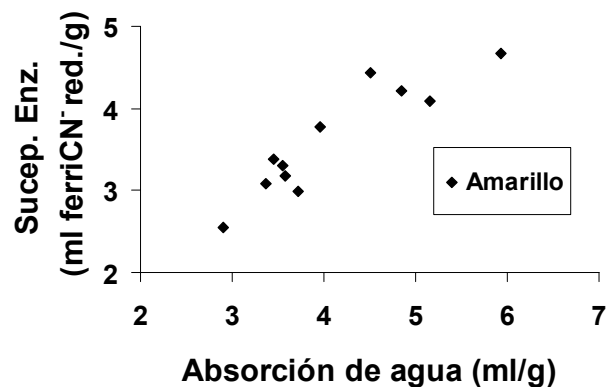


Figura 4: relación entre la susceptibilidad enzimática y absorción de agua para fideos de maíz amarillo.

(menor o igual a 5) son también las que poseen valores de se mayores a 4 y de aa mayores a 3,8, indicando que para lograr buenas características texturales es necesario que la muestra extrudida haya superado un cierto grado de cocción, por encima del cual la cohesividad del sólido hidratado sería suficientemente alta como para evitar un excesivo hinchamiento durante la cocción de los fideos y por ende, presentar menores pérdidas de sólidos (pst %). Sin embargo, un mayor grado de cocción debería provocar una mayor hidratación y consecuentemente una mayor pérdida de sólidos. Esta aparente contradicción debe ser explicada sobre la base de otros factores que otorguen a la estructura del sólido (fideo) una mayor resistencia a una excesiva hidratación durante la cocción. Es sabido que durante los procesos de cocción de harinas no solo se produce la destrucción (parcial o total) de la estructura cristalina nativa del almidón, sino que además (si las condiciones lo permiten) se pueden formar nuevas estructuras, tales como el complejo amilosa-lípido, amilosa retrogradada y amilopectina retrogradada. Podría argüirse que estas nuevas estructuras podrían ser las responsables de las buenas características texturales que presentan algunas de las muestras obtenidas, es decir resistencia a la sobrecocción con baja pérdida de sólidos.

B) indicadores estructurales: las figuras 5 y 6 muestran respectivamente, uno de los termogramas (dsc) y uno de los diagramas de difracción de rayos x (drx), típicos obtenidos para las muestras extrudidas, junto al correspondiente maíz sin tratar. Se puede observar en la figura 5 que las muestras de maíz sin extrudir presentan solamente la endoterma de gelatinización, mientras que con la muestra extrudida, aparecen dos picos nuevos: uno entre 45-60 °c o h1, que corresponde a la amilopectina retrogradada y el otro entre 85-100 °c o

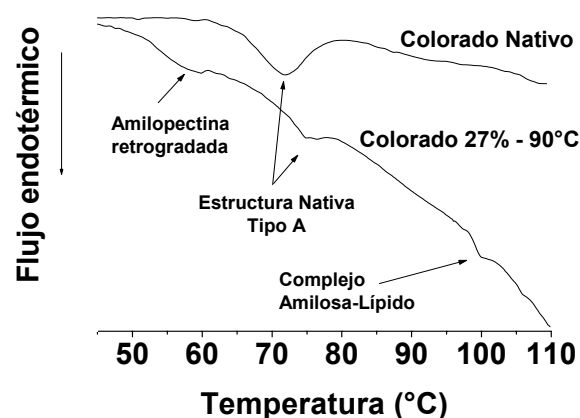


Figura 5: termogramas representativos correspondientes a la estructura nativa del maíz sin procesar y de una de las muestras extrudidas (27%h-90°C), indicando en el primer caso la endoterma de la estructura cristalina nativa y en el segundo las de la amilopectina retrogradada, la estructura nativa remanente y el complejo amilasa-lípido

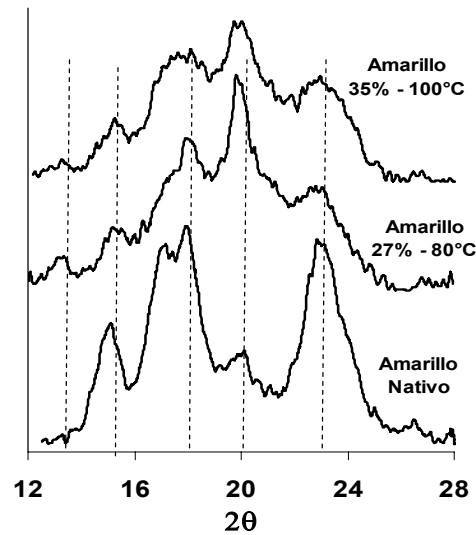


Figura 6: difractogramas de rayos x para el maíz amarillo correspondientes a las muestras de harina de maíz nativo y a las de fideos obtenidos a 27%h-80°C y a 35%h-100°C .

H3, que corresponde al complejo amilosa-lípido. Además se observa una reducción del área correspondiente a la gelatinización (entre 70-80 °c o h2). Por su parte, la figura 6 muestra al maíz nativo con los tres picos característicos de la estructura nativa de los almidones de cereales (ángulos de difracción 2θ : 15, 18 y 23), mientras que con la muestra extrudida aparece una reducción estos picos y un incremento de los dos picos característicos del complejo amilosa lípido (2θ :13 y 20). El pico correspondiente a la amilopectina retrogradada (2θ : 17,3), queda solapado con los de la estructura nativa. La figura 7 muestra la relación directa entre los valores de entalpía correspondientes a la estructura nativa (h2) y la suma de las intensidades de los picos de difracción correspondientes a la misma estructura ($drx_{15+18+23}$), comprobando la validez de ambos métodos. La dispersión de los datos es razonable, teniendo en cuenta el orden de magnitud de los errores experimentales y las diferencias entre los dos maíces.

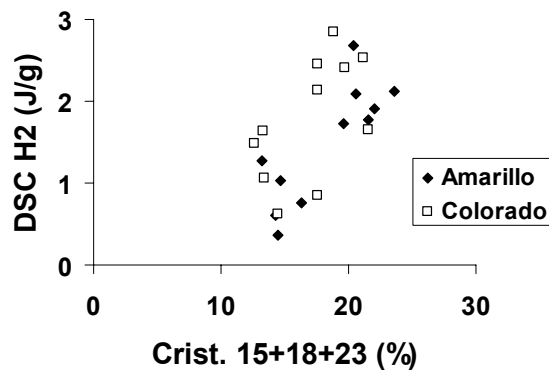


Figura 7: relación entre el área correspondiente al pico endotérmico de la estructura del almidón nativo (dsc h2) y la cristalinidad correspondiente a la suma de los picos a $2\theta=15,18$ y 23, para ambos maíces.

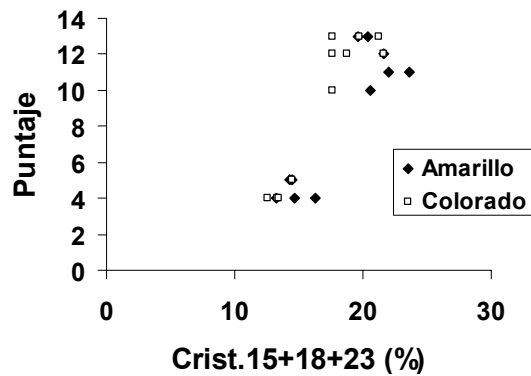


Figura 8: relación entre el puntaje de los fideos cocidos para un tiempo de sobrecocción de 10 minutos (t_c+10) y la cristalinidad correspondiente a la suma de los picos a $2\theta=15,18$ y 23 , para ambos maíces.

La figura 8 muestra la relación directa entre puntaje y los valores de drx ($15+18+23$), ratificando los resultados obtenidos con la se y con la aa, es decir a mayor grado de cocción mejores características texturales. La figura 9 muestra la relación (ahora inversa) entre el puntaje y los valores de drx ($13+20$) (para ambos maíces), indicando que a mayor contenido de la estructura correspondiente al complejo amilosa-lípido mejores son las características texturales. Finalmente la figura 10 muestra, para el maíz amarillo, el efecto de las condiciones de extrusión sobre la cantidad de complejo formado, ratificando lo ya expresado respecto a cuales son las mejores condiciones de extrusión.

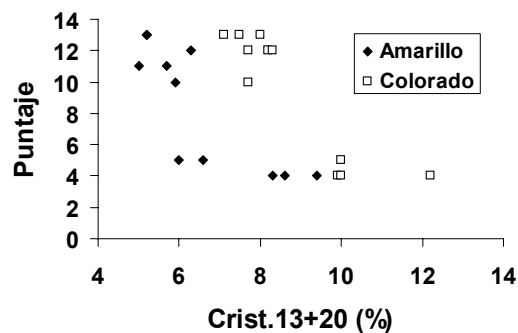


Figura 9: relación entre el puntaje de los fideos cocidos para un tiempo de sobrecocción de 10 minutos (t_c+10) y la cristalinidad correspondiente a la suma de los picos a $2\theta=13$ y 20 , para ambos maíces.

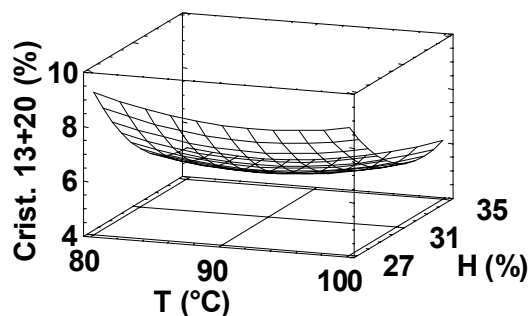


Figura 10: superficie de respuesta para la cristalinidad correspondiente a los picos a $2\theta=13$ y 20 , para los fideos de maíz amarillo.

CONCLUSIÓN

El proceso de extrusión-cocción permite elaborar fideos con buenas propiedades de cocción y resistencia a la sobrecocción, para ambos tipos de maíces. Las condiciones más adecuadas corresponden al menor nivel de humedad (27%) para los tres niveles de temperatura utilizados, aunque también se obtienen buenas características a 100°C para el maíz amarillo. Durante la extrusión-cocción se produce una pérdida parcial de la estructura nativa y la formación de nuevas estructuras que corresponderían a la amilopectina retrogradada y al complejo amilosa lípido. Estas nuevas estructuras otorgarían al sólido la resistencia a la hidratación excesiva, necesaria para soportar la sobrecocción, sin deteriorar la estructura del fideo cocido.

BIBLIOGRAFÍA

A.a.c.c. (american association of cereal chemist.). "methods 76-30 a". En: aacc approved methods (1984). St. Paul-minnessota.

Robutti, j.l.; borrás, f.s.; gonzález, r.j.; torres, r.l.; de greef, d.m.. food sc and technology /lwt. 35(8): 663-669 (2002).

Waniska, r.d., yi, t., lu, j., xue-ping, l., xu, w. And lin, h. **Food science and technology international**. 1.999; 5 (4): 339-346.

Remondetto, g.e, añón, mc; gonzález, r.j.. Brazilian archives of biology and technology, vol 44, (4); pp. 425-431, 2001.

ALIM V1.0 EN LA FORMULACION DE ALIMENTOS

LESCANO, Gerardo R., DEL CASTILLO, Valeria C., ARMADA DE ROMANO, Margarita

Instituto De Investigaciones Para La Industria Química - Consejo De Investigación
Facultad De Ingeniería - Universidad Nacional De Salta.
Buenos Aires 177 - 4400 Salta - Tel/Fax: (0387)4251006 - Lescano@Unsa.Edu.Ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue desarrollar y aplicar una herramienta informática, ALIM V1.0, tanto para formular nuevos alimentos, como para evaluar la calidad de los existentes en el mercado. ALIM V1.0 permite el cálculo de mezclas nutricionalmente balanceadas, en macro y micronutrientes, energía y aminoácidos.

Los alimentos se formularon a partir de ingredientes de disponibilidad local, teniendo en cuenta los hábitos alimentarios y los requerimientos de la población a la que están destinados.

Los productos formulados (galletas, arroz con leche, pastel de trigo, etc.) cubren los requerimientos de nutrientes y energía, y presentan un cómputo químico igual o mayor a 80, según Patrón Preescolares FAO 85.

A fin de comprobar la calidad nutricional de algunas preparaciones ofrecidas en Programas Sociales de la Provincia de Salta, se evaluaron las mismas con la herramienta desarrollada, resultando desbalanceadas en nutrientes y deficientes en aminoácidos esenciales.

Con ALIM V1.0 es posible optimizar el valor nutricional de nuevas fórmulas alimenticias y estimar la calidad nutricional de alimentos comerciales existentes.

Palabras claves: alimentos, calidad nutricional, herramienta informática, formulación y evaluación.

ABSTRACT:

ALIM V 1.0 IN FOOD FORMULATION

The aim of this work was the development and application of an informatic tool for new food formulation as well as the evaluation in quality of other foods available in the market. With ALIM V 1.0 it is possible to calculate mixtures nutritionally balanced in macro and micro-nutrients, energy and aminoacids.

Foods were formulated with local available ingredients, taking into account alimentary habits and population requirements.

The formulated foods (biscuit, rice with milk, wheat pie, etc.) cover nutrient and energy requirements and show a chemical score higher or equal than 80, according to preschool Pattern FAO 85.

In order to check the nutritional quality of some preparations given in Social Programs in the Province of Salta, they were evaluated with this software resulting unbalanced in nutrients and deficient in essential aminoacids.

ALIM V 1.0 allows to enhance the nutritional value of food formulations and to estimate the nutritional quality of current commercial food products.

Keywords: foods, nutritional quality, informatic tool, formulation and evaluation.

INTRODUCCIÓN:

En etapas previas de esta investigación se formularon y desarrollaron alimentos para situaciones de emergencia a corto y largo plazo en el cual se utilizaron otros programas de desarrollo propio (3, 4). Estos alimentos presentaban características de fácil disponibilidad, aceptabilidad y valor nutricional adecuado a los requerimientos para dichas situaciones. Además, el aporte de aminoácidos de estos alimentos debe cubrir las necesidades de los distintos grupos poblacionales en situación de riesgo nutricional frente a una catástrofe.

En el desarrollo de los alimentos se tuvo en cuenta la disponibilidad de cultivos propios de la región como los cereales, las legumbres y derivados, junto a otros ingredientes de consumo habitual entre la población como el aceite (grasa o manteca), el azúcar, la carne, la leche, etc.

Para la formulación de estos alimentos se necesita contar con una herramienta informática capaz de encontrar las combinaciones mas adecuadas de dichos ingredientes, teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales (energía, macro y micronutrientes) y de aminoácidos de la población a la que serán destinados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Programa de Computación:

Utilizando una planilla de cálculo (Excel) (5, 6) se creó una base de datos de los alimentos disponibles regionalmente y que además son de interés para nuestro estudio. Esta base de datos incluye macro y micronutrientes, humedad, calorías, composición aminoacídica y

otros, de cada uno de los ingredientes, para ello se utilizó la tabla de Composición Química de alimentos de USDA (8). Se fijaron además restricciones en cuanto a las recomendaciones nutricionales, de Valor Calórico Total y porcentajes de ese valor calórico que deben ser cubiertos por hidratos de carbono (50-60%), proteínas (11-15%) y grasas (30-35%) (2, 7, 9).

Para el cálculo de Cómputo Químico de aminoácidos se utilizó como patrón preescolares FAO 85 (1), considerándose como buenas, aquellas formulaciones cuyo aminoácido limitante sea igual o mayor que 80.

ALIM V 1.0 permite combinar más de 60 alimentos e ingredientes de producción local como son los cereales (maíz, arroz, trigo), las leguminosas (soja, poroto, etc.), azúcar, grasa, leche, etc. en distintas proporciones de manera que las formulaciones obtenidas se adecuen a las restricciones a fin de cubrir los requerimientos de los diversos grupos poblacionales.

Formulación de los alimentos

Los alimentos desarrollados con Alim V 1.0 fueron: Galleta, Arroz con Leche, Anchi con Leche, Mazamorra, Postre de Maiz-Soja, Pastel de Arroz, Pastel de Trigo, Pastel de Sémola, Barra y Pan Trigo-Soja. Una de las premisas importantes fue que dichos alimentos además de cumplir con todas las especificaciones nutricionales, fueran de bajo costo. Para ello se calcularon los costos en alimentos (no incluyen gasto energético ni mano de obra) de los ingredientes de cada formulación de acuerdo a los precios minoristas en el mercado local (vigentes a diciembre de 2004). El cálculo del costo se realizó tanto para 100 g de alimento, como para 1000 Kcal.

Utilizando Alim v 1.0 se evaluaron también preparaciones comerciales tales como: Arroz con Leche María Bonita, postre San Remo y preparaciones que se suministran en Planes Sociales de la Provincia de Salta (Anchi y Arroz con Leche Escuela).

RESULTADOS Y DISCUSION

En las Tablas 1 y 2 se observan los porcentajes del Valor Calórico (% VC) en 100 g de alimento, que son cubiertos por cada macronutriente, tanto de los alimentos formulados como de los comerciales evaluados.

Estos porcentajes se sitúan dentro de los recomendados (2, 7, 9).

El Valor Calórico de los productos formulados (Tabla 1) varía entre 130 y 400 Kcal siendo los valores más altos correspondientes al Pan y la Galleta, por tener estos, menores porcentajes de humedad.

TABLA 1: Alimentos Formulados. Macronutrientes y Valor Calórico por 100 g.

Alimento	% Valor Calórico			Kcal/100 g
	Proteínas	Grasas	HC	
Arroz con Leche	12	29	59	131
Postre Maiz-Soja	14	30	56	132
Mazamorra	12	30	58	138
Pastel de Trigo	15	29	56	155
Pastel de Arroz	12	32	56	173
Pastel de Sémola	13	31	56	204
Anchi de Leche	11	30	59	217
Barra	14	31	55	256
Pan Trigo-Soja	15	30	55	381
Galleta	14	29	57	400

De los productos comerciales estudiados (Tabla 2), el Postre “San Remo” presenta porcentajes de macronutrientes similares a los productos formulados mientras el Pan Francés y el Arroz con Leche María Bonita son bajos en grasas y altos en carbohidratos.

De las preparaciones ofrecidas en los planes sociales (Tabla 2) se puede observar que el Anchi aporta excesivos carbohidratos (94%) siendo muy pobre el aporte de proteínas, grasas (3% en ambos casos) y también bajo aporte de calorías. El Arroz con Leche “Escuela” aporta proteínas e hidratos de carbono cercanos a los recomendados, un menor porcentaje de grasas (22 %) y un valor calórico similar al Arroz con Leche formulado.

TABLA 2: Alimentos Evaluados. Macronutrientes y Valor Calórico por 100 g.

Alimento	% Valor Calórico			Kcal/ 100 g.
	proteínas %	grasas %	HC %	
Anchi Escuela	3	3	94	67
Postre “San Remo”	12	28	60	86
Arroz con Leche Escuela	11	22	67	131
Arroz con Leche “María Bonita”	10	16	74	161
Pan Francés	11	12	77	234

Los cálculos químicos de los productos formulados (Tabla 3) presentan como primer aminoácido limitante en algunos casos a la Lisina (86 para el Pan Trigo-Soja) y en otros al Triptofano (93 para el Pastel de Sémola), considerándose dichos valores como buenos. De los productos evaluados (Tabla 4), el Pan Francés, el Anchi y el Postre “San Remo” presentan cálculos químicos deficientes en Lisina. Los aminoácidos con menor cálculo químico presentes en el Arroz con Leche “María Bonita” y el Arroz con Leche Escuela son Lisina 110 para el primero y Triptofano 125 para el segundo.

TABLA 3: Alimentos Formulados. Aminoácido Limitante y Costos

Alimento	A.A. Limit.	Precio 100 g	Precio/1000 Kcal
Pan Trigo-Soja	Lis 86	0,247	0,647
Pastel de trigo	Lis 90	0,18	1,161
Galleta	Lis 91	0,165	0,413
Pastel de Sémola	Tri 93	0,164	0,802
Barra	Lis 95	0,112	0,439
Pastel de Arroz	Tri 103	0,154	0,891
Postre Maiz-Soja	Lis 107	0,114	0,865
Anchi de Leche	Tri 113	0,221	1,018
Mazamorra	Tri 113	0,153	1,106
Arroz con Leche	Tri 123	0,151	1,15

Con respecto a los costos de los alimentos formulados (Tabla 3) se sitúan entre \$0,112 y \$0,247 por 100 g para la barra y el pan trigo-soja respectivamente; mientras que los costos de los alimentos evaluados varían entre 0,028 para el anchi y \$0,171 para el Arroz con Leche “María Bonita” (Tabla 4).

TABLA 4: Alimentos Comerciales Evaluados. Aminoácido Limitante y Costos.

Alimento	A.A. Limit.	Precio 100 g	Precio/1000 Kcal
Pan Francés	Lis 42	0,122	0,522
Anchi Escuela	Lis 49	0,028	0,41
Postre San Remo	Lis 75	0,137	1,473
Arroz con Leche “María Bonita”	Lis 110	0,171	1,062
Arroz con Leche Escuela	Tri 125	0,149	1,138

Si se relacionan estos costos con el aspecto nutricional se puede destacar que si bien el Pan Trigo-Soja es más caro por 100 g aporta nutrientes más balanceados y mejor cómputo químico que el pan francés.

Con respecto al Anchi ofrecido en planes sociales, es muy económico pero muy desbalanceado en nutrientes y deficiente en aminoácidos esenciales.

El Arroz con Leche “María Bonita” tiene un costo similar al Arroz con Leche “Escuela” y al Arroz con Leche Formulado, presentando además composiciones similares en macrocomponentes y muy buenos valores de aminoácidos limitantes.

Los costos por 1000 Kcal son útiles a nivel de alimentación de grupos, cuando es necesario cubrir un determinado valor calórico a menores costos y también a los fines comparativos entre dos o mas raciones completas (cuatro comidas principales) ofrecidas a nivel comunitario. Los costos aquí calculados es posible mejorarlos si los precios de los ingredientes se obtienen del mercado mayorista.

En la Figura 1 puede observarse una captura de pantalla del programa que muestra un gráfico circular con los porcentajes de los macronutrientes de uno de los alimentos formulados (Pastel de Arroz), también muestra un gráfico de barras de los valores del cómputo químico de aminoácidos. En la columna alimentos es factible, en cada fila, utilizar un menú desplegable para seleccionar un componente para la mezcla. Hacia el margen derecho muestra una grilla donde se presenta información de macrocomponentes, calorías, agua, energía, fibras y cenizas.

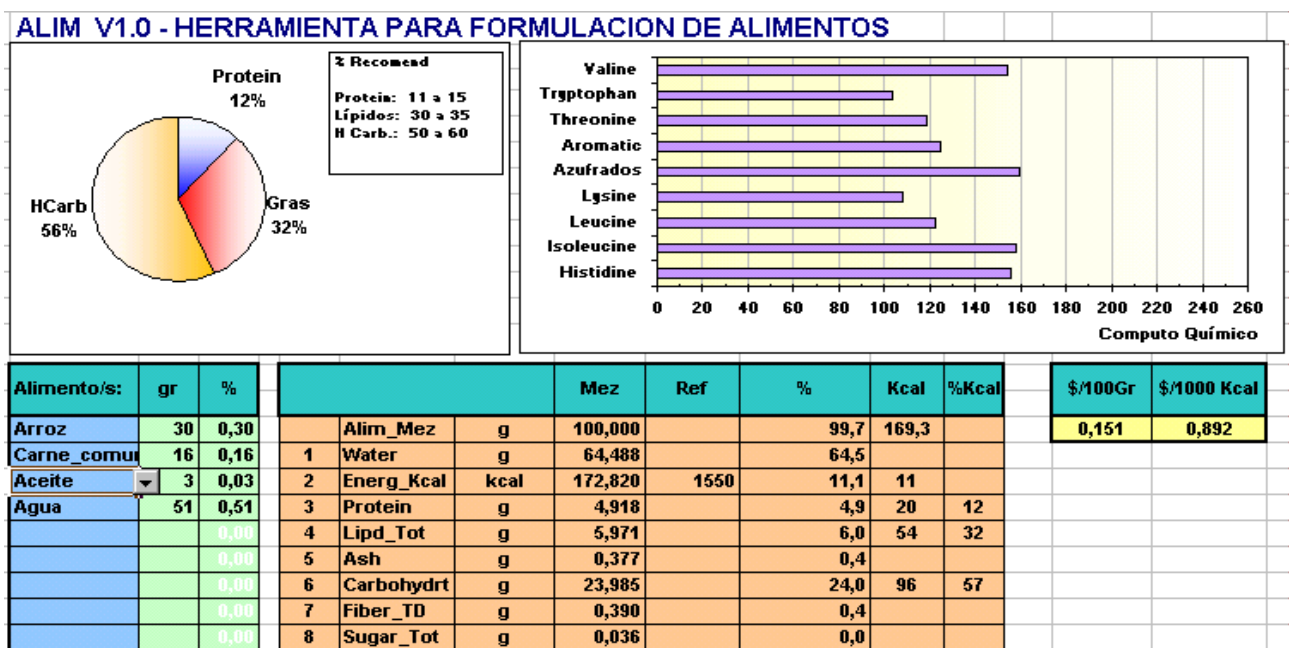


Gráfico 1: Alimento formulado (Pastel de Arroz).

La misma información se muestra en la Figura 2, para uno de los alimentos evaluados (Anchi Escuela).

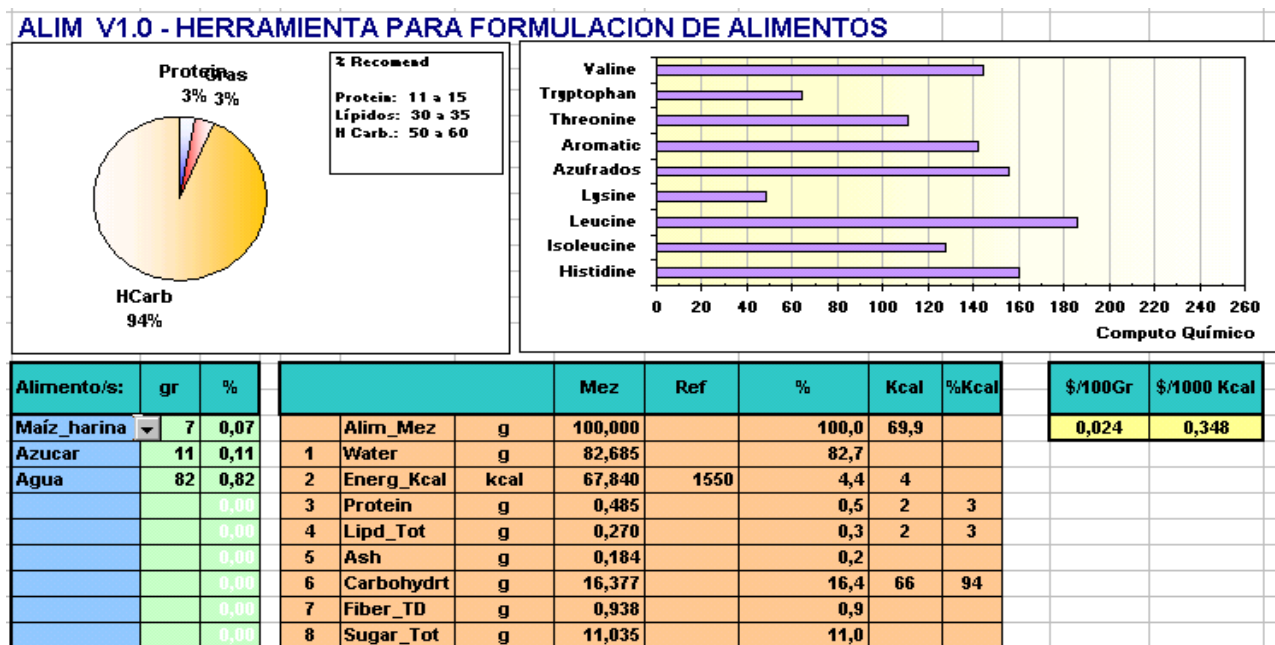


Gráfico 2: Alimento evaluado (Anchi “Escuela”).

CONCLUSIONES

Con ALIM V 1.0 es posible:

- Formular nuevos alimentos para diversos grupos poblacionales en función de los requerimientos de macro y microcomponentes y aminoácidos.
- Evaluar alimentos o preparaciones alimentarias comerciales y ofrecidas en planes sociales.

Los alimentos formulados poseen mejor valor nutritivo y mejor cómputo químico comparado con los alimentos comerciales evaluados.

BIBLIOGRAFIA

FAO/OMS. Reunión Consultiva de Expertos. Necesidades de Proteínas y Energía. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. 1985.

Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. September 2002.

Lescano, G. **Compos V. 01** Programa Computacional para el Calculo de Mezclas para Situaciones de Emergencia. Universidad Nacional de Salta. 1999.

Lescano, G. Maxami. Programa Computacional para el Cálculo de Mezclas Optimas de Proteínas. Programa utilizado en el Curso de Capacitación “Formulación de Mezclas Proteicas Optimas”. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta. Septiembre de 1995.

Sánchez, Claudio. Guía Visual Excel 97. MP Ediciones. Buenos Aires. Argentina. 1998.

Sánchez, Claudio. Proyectos con Macros en Excel. MP Ediciones. Buenos Aires. Argentina. 2002.

Torun, B. and col. Protein-Energy Iteractions. International Dietary Energy Consultancy Group. Proceedings of and IDECG Workshop. USA. October. 1991.

USDA. United State Department of Agriculture. Nutrient Data Laboratory. National Nutrient Database for Standard Reference Release 17. 2004.

Young, V. R. and col. The Effects of Different Levels of Energy Intake on Protein Metabolism and of Different Levels of Protein Intake on Energy Metabolism. A Statistical Evaluation from the Published Literature. Proceedings of and IDECG Workshop. USA. October. 1991.

PANIFICACIÓN CON HARINAS MEZCLAS TRIGO – POROTO

FILI, Josefina M.(1) ; ARMADA, Margarita (2).

- (1) INTA EEA Salta Ruta Nac. 68 Km 172. Cerrillos Salta. mfili@correo.inta.gov.ar
(2) Fac. Ingeniería- INIQUI UNSa, Av. Bolivia 5150, Salta Tel/Fax:03874251006

RESUMEN

En panes elaborados con harinas trigo:poroto, crudo y cocido, (85:15), (80:20), (70:30), se evaluó textura y aceptabilidad. La lisina disponible se ve poco afectada por la cocción del poroto, y un aumento en los niveles de sustitución de trigo incrementan los contenidos de la misma.

El volumen del pan es menor en harinas más sustituidas, y el parámetro L en colorímetro Hunter varía poco para miga de pan con poroto crudo. A mayor nivel de deformación sólo se afectan los parámetros texturales de dureza y masticabilidad, se presenta leve modificación en gomosidad y ninguna incidencia en cohesividad y esponjosidad. Son preferidos los panes elaborados con menor nivel de sustitución del trigo, sin que afecte el tratamiento de cocción.

Se puede panificar con niveles de sustitución del hasta el 20%, con harina de poroto, obteniendo productos aceptables, de buen valor nutricional, utilizando el poroto de descarte.

ABSTRACT

Texture and acceptability were evaluated in breads elaborated with flours of wheat bean, raw and cooked, (85:15), (80:20), (70:30). The available lysine is little affected by the cooking of the bean, and an increase in the levels of wheat substitution increase the lysine content.

The volume of the bread is smaller in flours more substituted, and the Hunter Color L varies little for crumb of bread with raw bean. At higher level of deformation, only the textural parameters of hardness and chewiness are affected, while there is a light modification in gumminess and any incidence in cohesiveness and springiness. The breads elaborated with lower level of substitution of the wheat are preferred, without effect of the cooking treatment.

One can make bread with substitution levels up to 20%, with bean flour from discard beans, obtaining nutritional and acceptable products of good value.

Palabras clave: harinas, porotos, panificación, calidad proteica.

INTRODUCCIÓN

Las legumbres son fuente importante de proteína vegetal y han sido un alimento alternativo para solucionar el problema emergente de la grave crisis económica y social del país. En tal sentido, el consumo de la soja ha sido muy difundido, a pesar de sus limitaciones en el consumo familiar, ya que no es hábito de consumo en la población.

El NOA produce en promedio 230.000 tn. anuales de poroto, del cual un 85% se exporta. Esta legumbre es nutricionalmente similar a la soja, se encuentra disponible en la región y puede ser incorporada a la alimentación humana con mayor facilidad y menor requerimiento de combustible que aquella.

Dada la deficiencia de aminoácidos, lisina en trigo y de metionina y azufrados en leguminosas, se elaboraron panes con harinas fortificadas con porotos, a fin de llegar a la población, con un producto de consumo masivo que tenga mayor valor nutricional y menor costo al utilizarse poroto descarte.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron granos de poroto “descarte” de distintos tipos comerciales, provenientes de la planta de procesamiento de INTA EEA Salta del Valle de Lerma (Campaña 2003). Los granos se seleccionaron y dividieron en dos lotes para efectuar los tratamientos: crudos y cocidos según el diagrama de flujo de la Figura I, para la obtención de las harinas. Se usó harina de trigo Tipo 000, de origen comercial.

Obtenidas las harinas de poroto, se elaboraron las mezclas en las siguientes proporciones con trigo y poroto crudo sin tratar (HP) y cocido (HPt): 70:30; 80:20 y 85:15.

Se determinó composición en las harinas puras y mezclas, según método de AOAC, Lisina Disponible por Método de Carpenter y Cómputo Químico (CQ) con programa de computación de Lescano.

Con las harinas mezcla en distinto grado de sustitución y tratamiento se elaboraron panes tipo molde, con la siguiente fórmula: harina 100g; agua 52cc; grasa 6g; sal 2g; azúcar 3,5g; levadura 4g; jarabe 2g. Se midió textura con Texturómetro QTS en tres niveles de deformación: 25, 50 y 75 %, durante distintos tiempos de almacenamiento: 1, 2, 6 y 9 días desde su elaboración. El color de cortezas y migas se midió en colorímetro Hunter L.

Se realizaron pruebas de aceptabilidad con panelistas no entrenados, utilizando una escala de cinco puntos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la composición de las harinas (Tabla I), se puede observar que las proteínas en poroto duplican a las de trigo, en tanto que los hidratos de carbono disminuyen en porotos entre un 20 a un 23%, para crudo y cocido respectivamente; también se observa que a mayor nivel de sustitución de trigo por poroto tanto crudo como cocido aumentan los contenidos de proteínas, lípidos, fibras y minerales, en tanto que es menor la proporción de hidratos de carbono.

Si bien los valores de proteína provenientes de poroto disminuyen en las mezclas, respecto al poroto solo, se mejora la calidad, al incrementar el valor biológico de las proteínas. A través del cálculo teórico de Cómputo Químico (CQ), según el patrón de aminoácidos para preescolares de FAO 1985, la mejor mezcla es la de trigo:poroto (70:30) con valores para lisina de 82 y treonina 92, como se observa en Tabla II. Las harinas de poroto fueron tratadas térmicamente en su obtención; los valores de Lisina Disponible como se ve en Tabla I, no se afectan por el tratamiento, siendo 7,94g en crudo frente a 7,57g en cocido y aumentan en tanto se incrementan los niveles de sustitución de poroto crudo como de cocido. Ello responde a la mejora proteica esperada por la fortificación. En la evaluación de las características físicas del pan se observa que el volumen obtenido disminuye conforme aumenta el nivel de sustitución, como así también el efecto de tratamientos en harinas de poroto (Tabla III).

El color de la miga se incrementa a medida que aumenta el nivel de sustitución, y el tratamiento de la harina, con valores L para las migas de 48,16 para 70-30 HPt y 58,99 del pan elaborado con grano de poroto sin tratar 85-15 HP, siendo el patrón de valor 65,51. En la corteza el comportamiento del color no guarda relación con el nivel de sustitución y tratamiento; aparentemente es más fuerte la influencia de temperatura, tiempo de horneado y ubicación dentro del horno; de hecho, el color en la miga está menos condicionado que el de la corteza.

En cuanto a textura, en el pan fresco se observa que conforme aumentan los niveles de deformación, en pan fresco sólo se modifican los parámetros de masticabilidad y dureza, muy levemente gomosidad y sin incidencia en adhesividad, esponjosidad y cohesividad, como se ve en la Figura II. La dureza y masticabilidad se incrementan con los niveles de sustitución en harinas no tratadas, en tanto que en las tratadas el comportamiento es similar al patrón en 80-20 y 85-15; sólo el pan 70-30 y al 75% de deformación es notoriamente más duro y masticable como se ve en la Figura III.

Durante el estacionamiento de los panes se observa que todos los panes aumentan su masticabilidad y dureza con el envejecimiento, para todos los niveles de deformación (Figura IV). Al evaluar aceptabilidad, ninguna muestra fue rechazada totalmente, el 16 % manifestó "no me gusta" en alguna muestra; hubo un 43% de preferencia y un 38% de indefinición. Las preferidas fueron en este orden: Patrón, 85 -15 (HPt), 85-15 (HP). Las más controvertidas fueron 70-30 (HP), 80-20 (HPt) y 80-20(HP), con un 46% aproximadamente de indiferencia. Llama la atención la muestra 70-30 (HPt), que tiene sólo 13 % de indiferencia, un 46% de aceptación y un 41% de "no me gusta"; con lo cual el pan así obtenido tiene características particulares propias.

CONCLUSIONES

El contenido de nutrientes se incrementa con el nivel de sustitución y también aumenta el valor biológico de la proteína.

Si bien la mejor mezcla por CQ es la de T:P (70-30), no tiene buena aceptabilidad, por lo tanto la más viable para panificar, resulta la de T:P (80-20).

Los panes frescos de mayor volumen y mejor textura son los elaborados con harinas crudas hasta un 20% de sustitución y con harinas tratadas hasta con un nivel de sustitución del 15%.

BIBLIOGRAFIA:

Uebersax, M.E. ; Ruengskulrach, S. And Occeña, L.: Strategies and Procedures for Processing Dry Beans. Food Technology, September, 1991.

Kohnhorst, A.; Smith, D.; Uebersax, M. And Bennink, M.: Compositional, Nutritional and Functional Properties of Meals, Flours and concentrates from Navy and kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Food Quality 13, 1990.

Silaula,S.; Lorimer, N.; Zabik, M. And Uebersax, M.: Rheological and Sensory Characteristics of Bread Flour and Whole Whwat Flour Droughs and Breads Containing Dry-roastedAir-Classifield Pinto and Navy Bean High-Protein Fractions. Cereal Chemistry 66: 486, 1990.

De Simone, M.; Failde de Calvo, V: "El cultivo de poroto en la República Argentina", Capítulo 11: Ediciones INTA, Gofica Impresores, Salta, diciembre de 2002.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International 16th ed. By AOAC International, 1995.

Figura I Flujo de trabajo: Obtención de harinas de poroto

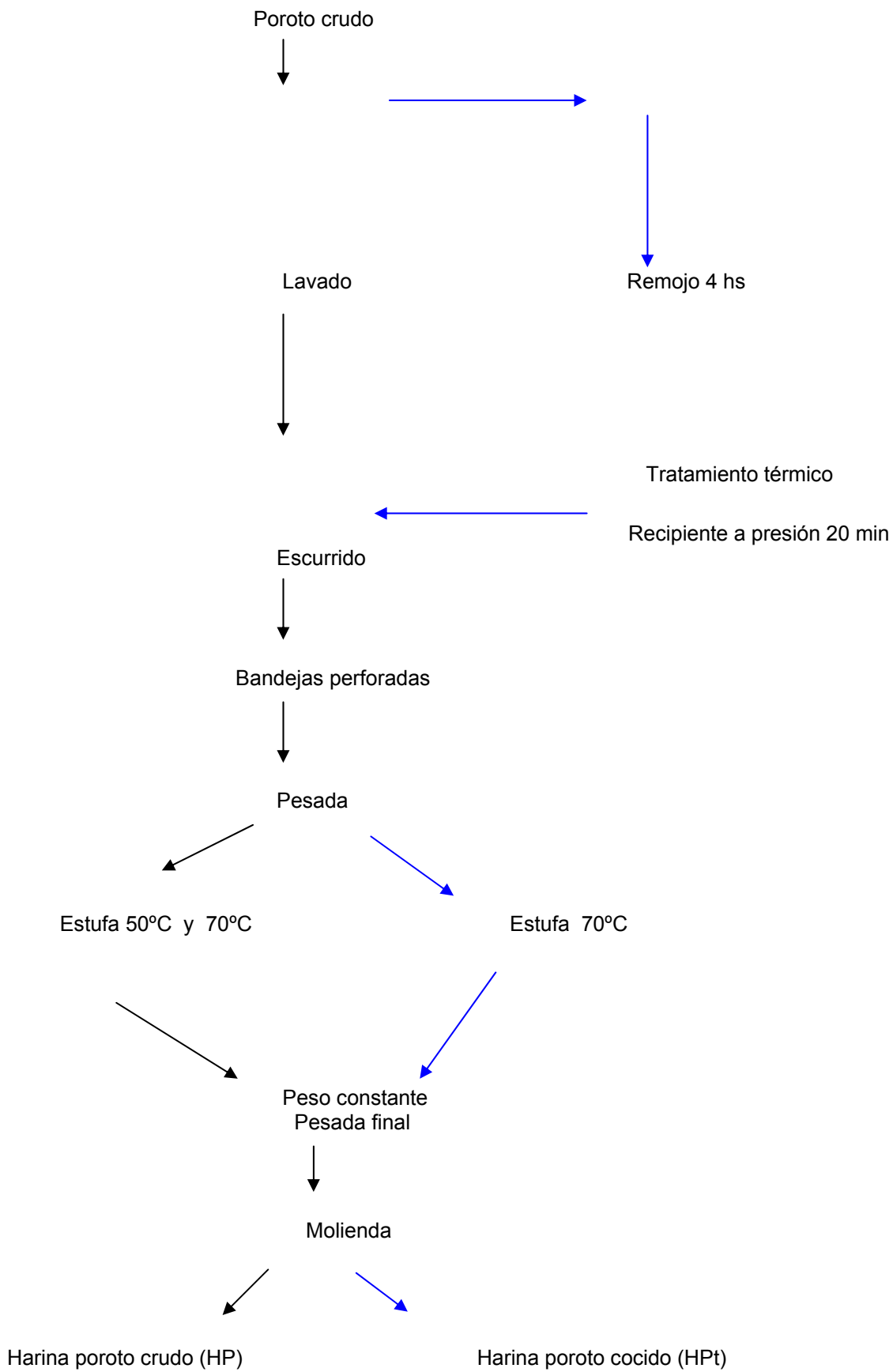


Tabla I: Macrocomponentes y Lisina Disponible de Harinas: Trigo, Poroto y Mezclas

Producto	Hidratos de Carbono	Proteínas	Lípidos	Fibra	Cenizas	Humedad	Lisina Disponible
	g/100g (sss)						g.ξNH ₂ Lis/ 100 g. M
Harina Trigo (T)	71,51	12.8	0.27	0,06	0.90	13.33	2.03
Poroto Crudo (HP)	57.30	25.5	1.20	8.50	4.13	2.95	7.94
Poroto Cocido (HPt)	55.50	25.4	1.37	11.3	3.90	6.25	7.57
T-HP (70-30)	66.80	17.4	0.72	2.75	1.95	9.74	3.64
T-HP (80-20)	67.55	15.9	0.60	2.06	1.61	10.18	3.37
T-HP (85-15)	68.99	15.2	0.55	2.04	1.4	11.16	2.89
T-HPt (70-30)	66.3	17.1	0.64	4.3	1.8	9.84	3.48
T-HPt (80-20)	69.10	16.2	0.60	2.76	1.5	10.69	3.31
T-HPt (85-15)	68.09	15.1	0.50	2.18	1.40	11.76	2.83

Fuente: Lab. de Alimentos INIQUI UNSa. y Laboratorio Central de Análisis INTA EEA .Salta, Mayo 2004

Tabla II: Cómputo Químico (CQ) de aminoácidos en las mezclas Trigo: Poroto (T:P), según Patrón FAO 1985 para preescolares.

Aminoácido	CQ T:P (70:30)	CQ T:P (80:20)	CQ T:P (85:15)
Lisina	82	70	64
Treonina	92	89	87
Leucina	106	106	105
Triptofano	107	108	109
Histidina	123	121	120
Valina	125	122	121
Aromáticos	123	125	125
Isoleucina	136	132	131
Azufrados	128	136	140

Fuente: INIQUI UNSa. Setiembre 2004

Tabla III : Volúmenes de los panes

Tipo de pan	Volumen en cc	% respecto al patrón
Patrón	520	100
85-15 (HP)	560	107
80-20 (HP)	420	80.77
70-30 (HP)	320	61.54
85-15 (HPt)	380	73
80-20 (HPt)	370	71
70-30 (HPt)	220	42

Fuente: Laboratorio Calidad de Cocción INTA EEA Salta, Noviembre 2004

Figura II

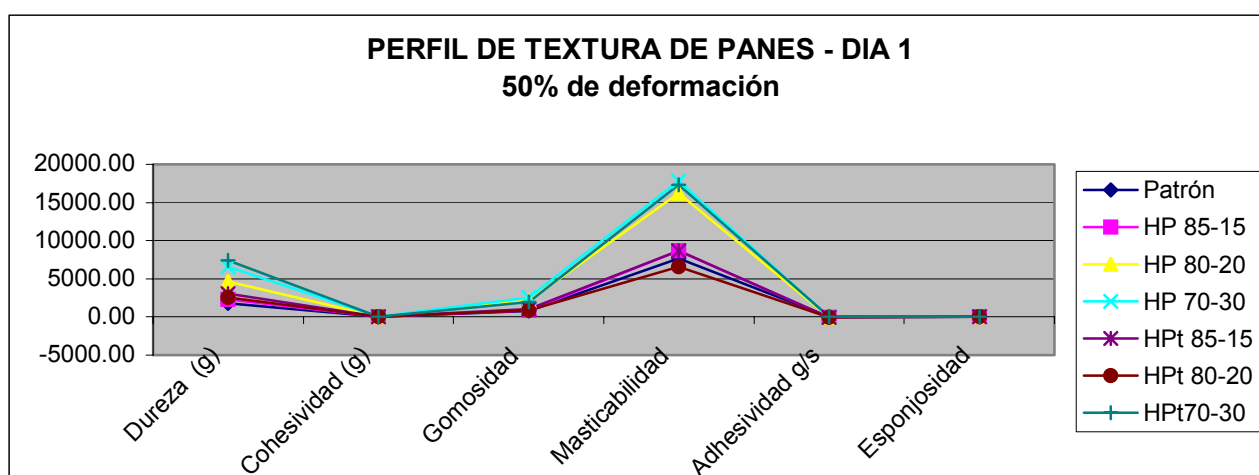


Figura III

PERFIL DE TEXTURA DE PANES – DIA1
75% de deformación

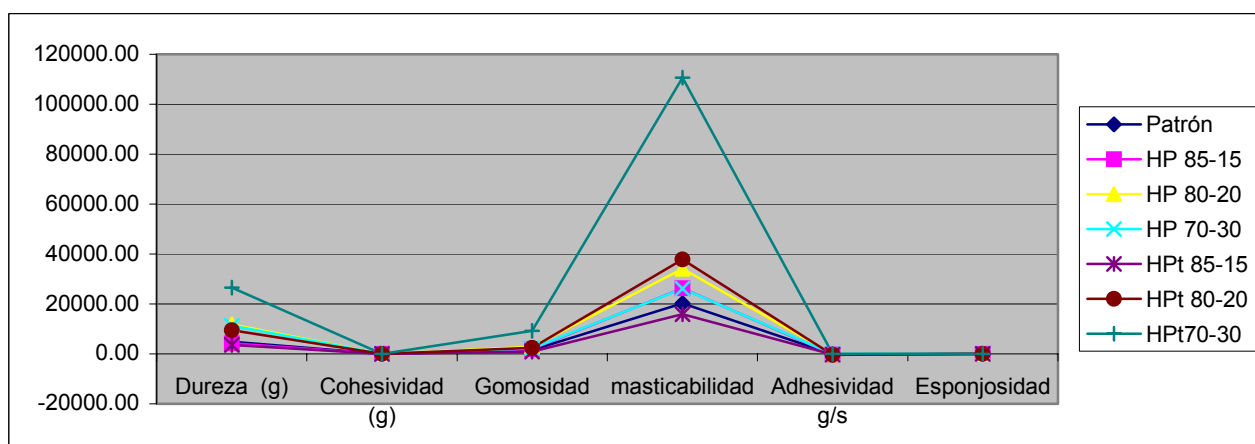
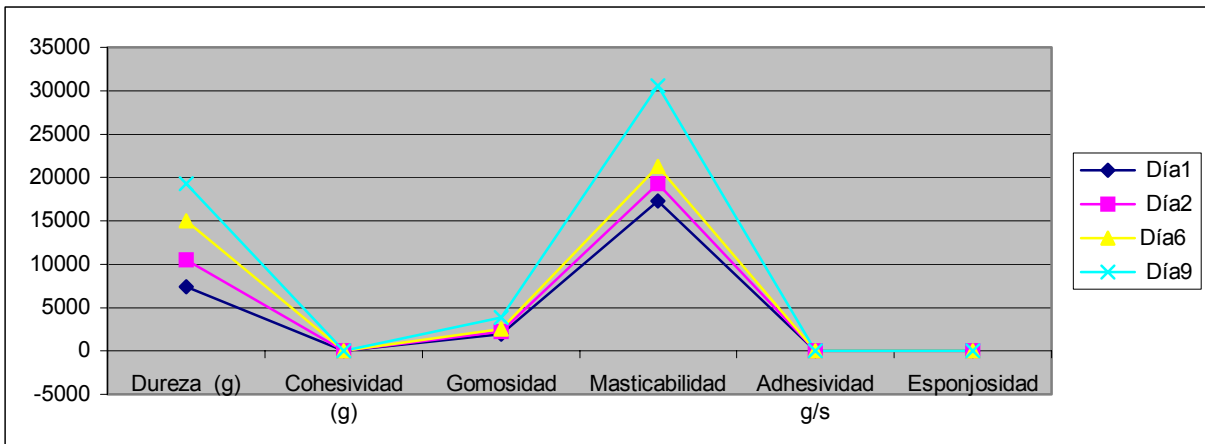


Figura IV PERFIL DE TEXTURA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO DE PANES HPt 70-30 50% de deformación.



CARACTERISTICAS SENSORIALES DE GALLETITAS FORMULADAS CON HARINA DE ALGARROBO

SABBAG, Nora G.; BERNARDI, Cecilia; DRAGO, Silvina, COSTA, Silvia C.

Instituto de Tecnología de Alimentos – Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral) Ciudad Universitaria – Santa Fe (Argentina) e-mail: nsabbag@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

Dado el alto contenido de nutrientes esenciales, se destaca el uso de harina de algarrobo en la formulación de productos alimenticios con adecuada disponibilidad “in vitro” de hierro y calcio, lograda por adición de ácido ascórbico, ácido cítrico y jugo de limón. Con el propósito de determinar las características sensoriales de galletitas elaboradas con harina de algarrobo blanco, un panel entrenado evaluó aroma, color, textura y flavor de las mismas.

Los resultados obtenidos permiten inferir que la incorporación de ácido ascórbico y/o ácido cítrico afecta el color y la distribución de los alvéolos mientras que, para la formulación con jugo de limón se encontraron diferencias significativas en aroma, aspecto, gusto dulce, flavor genuino y sensación residual.

La muestra que presentó la mejor disponibilidad “in vitro” de hierro y calcio tuvo buena aceptabilidad entre los consumidores consultados, potenciando el uso de harina de algarrobo blanco en la formulación de este tipo de producto.

Palabras claves: análisis sensorial-galletitas-harina de algarrobo

ABSTRACT

Because a considerable iron, calcium and fiber contents had been previously determined in *Prosopis alba* (algarrobo) pulp., it could be important to use it in the formulation of food products. As good iron and calcium availabilities measured by an “in vitro” technique were obtained by adding ascorbic acid, citric acid and lemon juice to cookies formulation containing algarrobo pulp. Its sensory characteristics such as odor, color, texture and flavor were determined by a trained panel.

From results, it can be concluded that additions of ascorbic acid and/or citric acid affect the color and cells distribution. Also, the sample including lemon juice showed significative differences in odor, aspect, sweet taste, genuine flavor and residual sensation ($p < 0.05$).

Samples with the best iron and calcium availabilities had very good acceptability among consumers. This result contributes to increase the use of algarrobo pulp to prepare this type of product.

Key-words: sensory analysis-crackers-algarrobo meal.

INTRODUCCIÓN

El *Prosopis* es una Dicotiledónea de la Familia Leguminosae, Subfamilia Mimosoideae, árbol que presenta gran resistencia a la sequía y a la salinidad, y tiene alta capacidad de fijar nitrógeno. Su fruto, algarrobo, es una legumbre con altos contenidos de proteínas e hidratos de carbono, que varía en tamaño, color y características químicas, según la especie. Además, se ha encontrado que la especie *Prosopis alba* (algarrobo blanco) contiene un interesante nivel de fibra dietaria y minerales, hierro y calcio fundamentalmente. Esto hace que su cultivo sea recomendado con una doble finalidad: detener el avance de la desertificación y erosión del suelo en zonas áridas y semiáridas, y utilizar sus frutos para alimentación humana en dietas deficientes en minerales. (Fagg y Stewart, 1994).

El objetivo de este trabajo fue determinar las características sensoriales y la aceptabilidad de galletitas formuladas con harina de algarrobo blanco y distintos agregados de ácido ascórbico, cítrico y jugo de limón, con el propósito de mejorar la biodisponibilidad de hierro y calcio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se formularon muestras con 30 % de harina de algarrobo y distintos agregados de ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC), con relaciones molares diferentes (Fe/AA o Fe/AC) y jugo de limón, según se muestra en el siguiente cuadro:

El contenido de AA y AC del volumen de jugo de limón adicionado en la formulación 4 correspondería a la cantidad de dichos ácidos orgánicos agregados en la Muestra 1. La disponibilidad lograda mediante esta formulación fue del 4 % para el hierro y del 27 % para el calcio, siendo la inicial de las galletitas, sin el agregado de promotores, no detectable para el primero y del 13 % para el segundo.

Identificación de las muestras	Harina de Algarrobo (%)	Acido Ascórbico (mg)	Acido Cítrico (gr)	mMFe/mMAA	mMFe/mMAC	Jugo de limón (ml)
1	30	86	0.8	1/5	1/50	--
2	30	--	0.8	--	1/50	--
3	30	86	--	1/5	--	--
4	30	--	--	1/1,25	1/150	25

Análisis Sensorial

Siete evaluadores con experiencia en la metodología de trabajo, fueron seleccionados entre el personal del Instituto de Tecnología de Alimentos (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina). Se evaluaron los atributos Aroma, Color, Aspecto, Textura (Fragilidad, Alvéolos, Sensación residual) y Flavor (Genuino, Astringencia, Gusto dulce). Los descriptores de textura y flavor fueron consensuados por el panel durante el período de entrenamiento.

El entrenamiento se realizó en seis sesiones utilizando como patrón, galletitas elaboradas con algarrobo. Los evaluadores seleccionaron las características sensoriales que más se destacaban en el producto y que permitían una mejor descripción del mismo. La definición de cada característica y los extremos de las escalas correspondientes se presentan en la Tabla 1.

Para la evaluación de las muestras incluidas en esta etapa del trabajo, se aplicó Análisis Descriptivo Cuantitativo utilizando escalas no estructuradas, de 10 cm, ancladas en los extremos. Las sesiones del panel se realizaron en forma individual, por duplicado, en una sala ambientada al efecto, iluminada con luz fluorescente.

Con la formulación que presentó mejores características, y la mayor biodisponibilidad de hierro y calcio, se realizó un ensayo de aceptabilidad en el que participaron 170 consumidores, de ambos sexos y con un rango de edades entre 13 y 65 años.

Disponibilidad de hierro y calcio:

La disponibilidad de hierro y calcio fue determinada "in vitro" mediante la técnica de Miller (1981) modificada por Wolfgor et al (2002).

Evaluación de los resultados

Se aplicó ANOVA de una vía para determinar las diferencias entre las muestras ensayadas, utilizando el soporte estadístico Statgraphic Plus 3.0. Para el estudio de correlaciones y la distribución porcentual de los distintos grados de aceptabilidad se utilizó el programa Excel.

<i>Descriptor</i>	Definición	<i>Escala</i>	
		Límite Inferior Superior	Límite
Aroma	Mezcla de vainilla y chocolate tostado	Suave	Intenso
Color	Chocolate	Claro	Oscuro
Aspecto	Apariencia de la superficie. Sin puntos de otro color.	Malo	Muy bueno
Fragilidad	Facilidad con que se rompe al intentar partirla en dos trozos	Mucha	Poca
Alveolos	Forma, tamaño y distribución regular en el interior de la masa	No uniforme	Uniforme
Astringencia	Sensación de sequedad percibida en la lengua, asociada a la producida por el te común concentrado.	Apenas perceptible	Muy perceptible
Gusto dulce	Gusto asociado con azúcares	Apenas	Intenso
Flavor genuino	Mezcla de miel, vainilla y chocolate	Apenas perceptible	Muy perceptible

Tabla 1. Descriptores, definición y extremos de las escalas utilizadas en el análisis sensorial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis de los valores medios obtenidos para cada atributo y para cada muestra ensayada, se observa que hay coincidencias entre las muestras formuladas con ácido ascórbico y ácido cítrico, para algunas características sensoriales mientras en otras, como color y distribución de alvéolos, las diferencias fueron significativas, tal como se comprobó con el Análisis de Variancia realizado.

En la Tabla 2 se presentan los estadísticos obtenidos del ANOVA. Se encontró que las cuatro muestras evaluadas no difieren en fragilidad y astringencia. Además, las muestras

1, 2 y 3 no difieren en aroma, aspecto, gusto dulce, flavor genuino y sensación residual. En cambio se encontraron diferencias significativas al nivel $\alpha \leq 0,05$ en las características sensoriales de la muestra con jugo de limón respecto de las otras tres.

Tabla 2. Valores medios, F y homogenidad de grupos para cada atributo y muestra ensayada

Descriptor	Valor medio (x)				F
	M1	M2	M3	M4	
Aroma	5.11b	4.65b	4.38b	2.86a	13.00
Color	3.76b	4.59c	6.60d	3.00a	47.84
Aspecto	7.01b	6.81b	7.07b	5.91a	2.69
Fragilidad	5.20a	4.80a	4.84a	5.36a	0.76
Alvéolos	3.54a	4.85b	5.90c	4.64b	8.88
Astringencia	2.23a	2.67 ^a	2.50a	2.51a	0.47
Gusto dulce	3.82b	3.66b	4.29b	2.45a	7.01
Flavor genuino	4.15c	3.75b	4.58c	2.12a	17.45

Nota: letras distintas indican diferencias significativas al nivel $\alpha \leq 0.05$

El estudio de correlaciones dio buena correlación del flavor genuino con el gusto dulce, con coeficientes en el orden de 0,8559 y 0,9967, respectivamente.

La muestra formulada con harina de algarrobo y jugo de limón presentó menor score de aroma, color, aspecto, gusto dulce y flavor genuino. En cambio tuvo marcada sensación residual astringente y picante.

Respecto del ensayo de aceptabilidad, se encontró que el 77,65 % de los consumidores consultados, ubicó la muestra entre “Me gusta moderadamente” y “Me gusta mucho”. (Figura 1).

La distribución de la aceptabilidad por rango de edades fue la siguiente:

< 25 años	41,76 %
25 – 50 años	20,00 %
> 50 años	15,89 %

CONCLUSIONES

Las muestras formuladas con ácido ascórbico y/o ácido cítrico presentan aroma agradable, buen aspecto, fragilidad media, distribución no uniforme de los alvéolos, baja

astringencia, son relativamente dulces, con flavor genuino adecuado y escasa sensación residual.

La muestra formulada con jugo de limón presenta menos color y aroma relativamente suave, gusto dulce y flavor genuino poco intensos; en cambio, presenta pronunciado gusto a limón y sensación residual astringente y picante.

La muestra formulada con ácido ascórbico y ácido cítrico tuvo buena aceptabilidad entre los consumidores consultados, siendo ésta la formulación que presentó mayor biodisponibilidad de hierro y calcio.

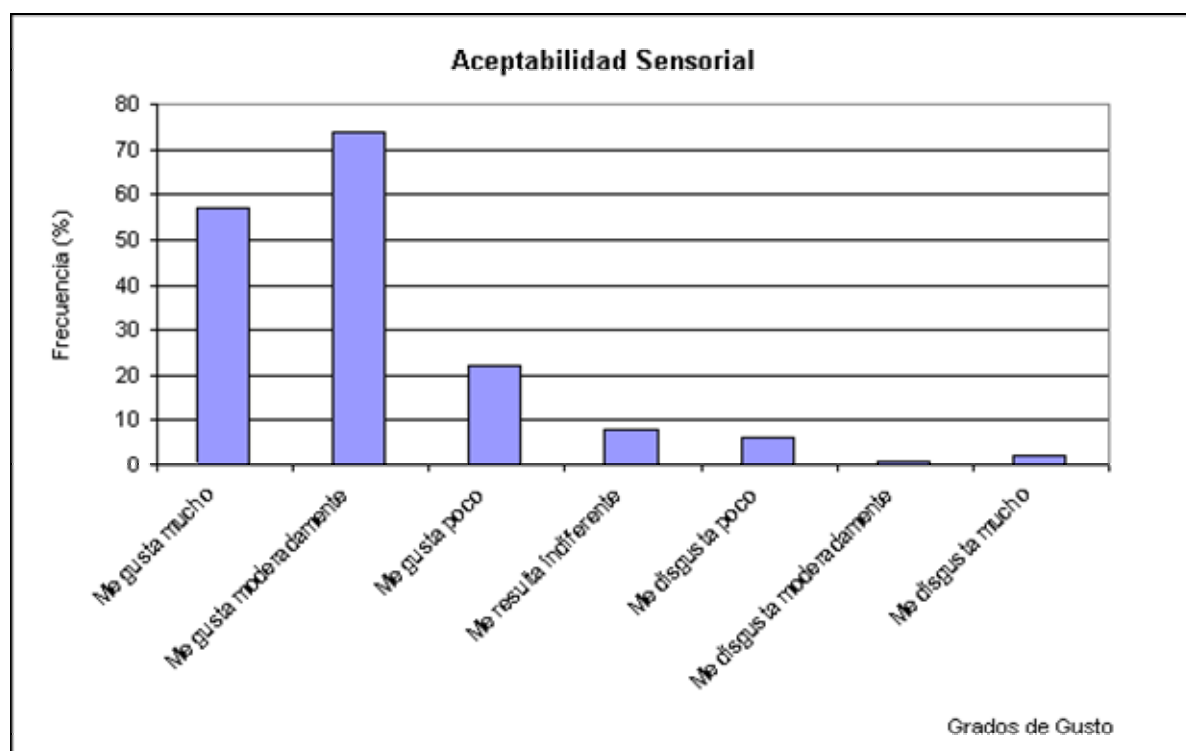


Figura 1. Distribución de frecuencia porcentual para cada grado de gusto

La muestra ensayada no tuvo rechazo resultando de buena aceptabilidad, con un grado ponderado promedio igual a 6,44.

AGRADECIMIENTOS

* Al panel de evaluación de evaluadores entrenados del Instituto de Tecnología de Alimentos (Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral).

* A los consumidores que colaboraron en la degustación del producto.

BIBLIOGRAFÍA

ASTM. American Society for Testing and Materials, 1981. Guidelines for the selection and training of sensory panel members. Special Technical Publication (STP) 758, 1-35.

M. A. JELTEMA, M. E. ZABIK and L. J. THIEL. Prediction of Cookie Quality from Dietary Fiber Components. *Cereal Chemist* 60(3):227-230. **MILLER D. D., SCHRIKER B. R. .** An in vitro method for the estimation on iron availability in meals. 1981. *Am. J. Clin Nutr.* 34: 2248-2256.

STONE AND SIDEL. *Sensory Evaluation Practice.* 2nd. Edition, 1993. p. 216-242.

Y. V. WU, K. L. BETT, D. E. PALMQUIST and D. A. INGRAM. Sensory Analysis of Brownies Fortified with Corn Gluten Meal. *Cereal Chemistry* 79(4):496-499.

PELICULAS COMESTIBLES COMPUESTAS DE ALMIDON Y FIBRAS NATURALES UTILIZADAS COMO RECUBRIMIENTO DE ALIMENTOS

FAMÁ, Lucía M^{1,2,3}, Andérica, María P¹, Goyanes, Silvia N^{1,4}, GERSCHENSON, Lía N^{2,4}

¹Lab. de Polímeros y Materiales Compuestos, Dep. de Física, FCEN-UBA y ²Dep. de Industrias, FCEN-UBA. Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina. ³Becaria Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET). ⁴Miembro de la Carrera del Investigador (CONICET). Teléfono/FAX: 54-11-45763366. E-mail: lia@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se estudiaron las propiedades de películas comestibles obtenidas a partir de almidón de mandioca y conteniendo glicerol y sorbato de potasio, en presencia y ausencia de salvado de trigo. Se desarrolló una técnica de fabricación de compuestos almidón-fibra de trigo y se estudió su respuesta mecánica a temperatura ambiente. Se realizó la caracterización de las películas en cuanto a su contenido de humedad, cristalinidad y color. Se observó que el agregado de fibra de trigo modificaba las propiedades mecánicas, aumentando el módulo de almacenamiento y disminuyendo la tangente de pérdida. Las películas conteniendo salvado de trigo presentaron una mayor cristalinidad y menor contenido de humedad; así como un mayor índice de amarillo.

Palabras claves: Películas comestibles compuestas, Almidón de Mandioca, Salvado de Trigo, Propiedades Mecánicas.

ABSTRACT

The properties of edible films based on tapioca and containing glycerol and potassium sorbate, with or without wheat bran, were studied. The technique for starch-wheat bran film obtention was developed and moisture content, cristallinity, color and mechanical behavior at ambient temperature were studied.

It was observed that the presence of wheat fiber changed mechanical properties, increasing the elastic modulus and decreasing loss tangent. It also determined a higher cristallinity and yellow index and a lower moisture content.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de los consumidores por productos alimenticios frescos y naturales, ha generado un interés creciente en el desarrollo de recubrimientos comestibles que contribuyan a una mejor preservación del alimento, logrando extender su vida segura sin polucionar el medio ambiente. Los mismos son fabricados en base a polisacáridos, proteínas y/o lípidos, pudiendo retardar la migración de humedad, aceites y grasas, el transporte de gases y de solutos así como ser portadoras de aditivos y/o nutrientes y facilitar el manipuleo de los alimentos. Generalmente, las películas comestibles, contienen algún plastificante a fin de aumentar su flexibilidad.

En los últimos años se ha tratado de mejorar las propiedades mecánicas de estas películas mediante el agregado de fibras vegetales.

Las fibras alimenticias tienen un importante valor nutricional y poseen importantes propiedades funcionales para la formación de películas biodegradables (Le Tien y col., 2000). Dichas fibras tienen la capacidad de reforzar el material, cambiando las propiedades mecánicas de las películas.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la influencia de la presencia de salvado de trigo en las propiedades de películas comestibles con base en almidón de mandioca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se prepararon dos tipos de materiales: el que denominaremos "material *matriz*", consistente en una suspensión acuosa de base almidón de mandioca (5 g/100g), glicerol (2,5 g/100g), sorbato de potasio (0,2 g/100g) y agua destilada (92,3 g/100g) y el que denominaremos "material *compuesto*", consistente en el material matriz con el agregado de 0,17 % de salvado de trigo; es decir 0,17 g de fibra cada 100 g de "material *matriz*".

La fabricación del material *matriz* se realizó mediante un proceso de gelificación, calentando la suspensión en una platina de temperatura controlada (velocidad de calentamiento $\approx 1,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), hasta 82°C . Se desgasificó el gel durante 30 min. mediante vacío con bomba mecánica y se lo distribuyó en placas de vidrio, las cuales fueron colocadas en una estufa con corriente de aire, a 52°C , durante 2 horas. Se completó el secado en una cámara a 25°C durante cuatro días, obteniendo películas de ≈ 0.4 mm de espesor, las cuales se equilibraron a una actividad acuosa (a_w) de $\approx 0,575$ (25°C).

Para la realización del material *compuesto*, se hidrató el salvado de trigo (tamaño de grano entre 75 y 125 μm) durante 25 horas en el 50 % del agua utilizada para la fabricación de la matriz. Luego, se lo incorporó al resto de los componentes previo al

calentamiento y se continuó con el proceso descrito anteriormente. En este caso, durante la desgasificación, se mantuvo la agitación del sistema mediante un agitador orbital, para evitar que la fibra decantara.

Determinación de la humedad

Para evaluar el contenido de humedad de las películas, se colocó ≈ 0.5 g de muestra, en una estufa de vacío a 70°C , sobre cloruro de calcio (CaCl_2 , hasta peso constante).

Los resultados informados son el promedio de cinco determinaciones.

Difracción por Rayos X

Mediante un difractómetro Philips con goniómetro vertical (PW1510) ($\text{rCu K}\alpha$, $\lambda=1542 \text{ \AA}$), se obtuvieron los espectros de rayos X de las películas estudiadas. El barrido de las muestras se realizó entre 3° y 33° (2θ), a $1^{\circ}/\text{min}$.

Se estimó la fracción amorfa como el área encerrada entre una curva envolvente dibujada sobre la base de los picos cristalinos y una línea recta entre 12° y 25° (2θ). La fracción cristalina se obtuvo estimando el área por encima de la curva envolvente (Hermans y Weidinger, 1961).

Color

La determinación del color se realizó mediante un Colorímetro Minolta CM-508d (Japonés). Se obtuvieron los parámetros ΔE (diferencia de color) y YI (índice de amarillo) utilizando las escalas Hunter y CIE, respectivamente.

Los resultados reportados son el promedio de 30 mediciones.

Caracterización mecánica

Para la caracterización mecánica se utilizó un analizador mecánico dinámico (Rheometric, DMTA IV) en el modo tensión rectangular.

Los ensayos dinámicos fueron realizados a 1 Hz y a una deformación constante de $0,04\%$. Se obtuvo información de los módulos de almacenamiento (E') y tangente de pérdida ($\text{Tan } \delta$) para ambas películas estudiadas.

Los ensayos cuasi-estáticos se realizaron a una velocidad de deformación constante de $5 \cdot 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$. Se obtuvo las curvas de tensión (σ) – deformación (ε) y se calculó la tensión a una deformación fija, para las dos clases de películas.

Las muestras se evaluaron por septuplicado, reportándose el valor promedio y el error estadístico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 puede observarse el contenido de humedad, la fracción cristalina y los resultados de color de las películas obtenidas a partir del material *matriz y compuesto*.

Tabla 1. Contenido de humedad, fracción cristalina, parámetros de color y tensión a una deformación fija de las películas estudiadas.

		Matriz	Compuesto
Contenido de humedad (g de H₂O/100 g de m seca)		54,2 ± 1,1	40,4 ± 1,4
Fracción Cristalina (%)		8,6 ± 0,4	16,8 ± 0,8
Color	YI	11,4 ± 0,2	26,7 ± 0,8
	ΔE	7,2 ± 0,1	14,3 ± 0,4
Tensión, σ al 75 % (Mpa)		0,32 ± 0,01	0,55 ± 0,10
Deformación a ruptura , ε_r (%)		> 75 %	> 75 %

El contenido de humedad del material *matriz* es mayor que en el caso de las muestras conteniendo la fibra. Los resultados de la espectroscopia por Rayos X muestran que, con la incorporación del salvado de trigo, la fracción cristalina aumenta casi un 100%. En estas últimas películas, el índice de amarillo aumenta su valor a más del doble y el ΔE disminuye a la mitad (Tabla 1).

En la Figura 1 se muestran los resultados de módulo de almacenamiento y tangente de pérdida, a temperatura ambiente, para las dos clases de películas estudiadas, observándose un aumento en E' y una disminución en Tan δ, con el agregado de fibra. Este comportamiento, parecería indicar que la incorporación de salvado de trigo, tendría un efecto inverso al de un plastificante.

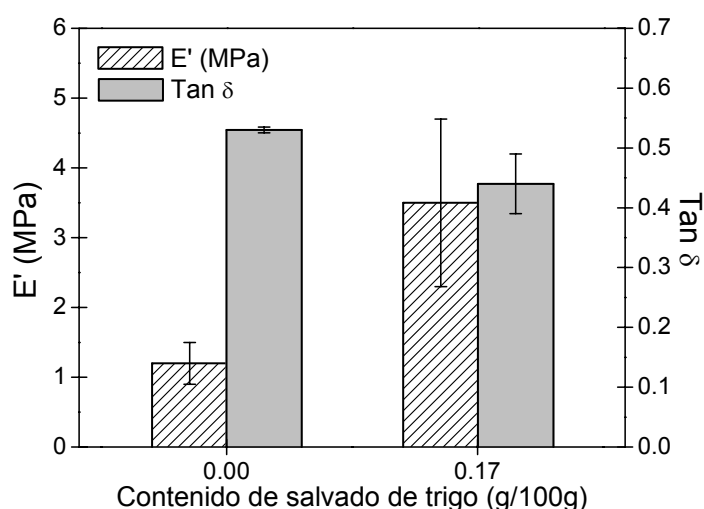


Figura 1. Módulo de almacenamiento y Tangente de pérdida de las películas estudiadas.

Nabi Shaeb y Jog (1999) observaron que la incorporación de fibras en materiales poliméricos aumenta el módulo de almacenamiento y disminuye la elongación a ruptura. Por otro lado, es interesante remarcar que el comportamiento observado en la Figura 1 puede explicarse haciendo uso de los resultados de Rayos X y humedad retenida reportados en la Tabla 1. La muestra conteniendo salvado de trigo posee un mayor grado de cristalinidad y una menor retención de humedad que la muestra fabricada a partir del material *matriz*. El agua es un conocido plastificante, cuya presencia conduce a una disminución del módulo de almacenamiento y un incremento en la tangente de pérdida; un aumento en la cristalinidad también conduce a un aumento en E' y a una disminución en $\text{Tan } \delta$. Los efectos, en las propiedades mecánicas, de un incremento en la fracción cristalina y una disminución en el contenido de humedad, son similares a los observados previamente por los autores, en películas alimenticias de composición similar a la empleada en este trabajo como material *matriz* (Famá y col., 2004).

La Figura 2 muestra las curvas $\sigma - \varepsilon$ de las distintas películas estudiadas. Lamentablemente, nuestro dispositivo de medición no permite llegar a la rotura de las muestras. Por ello, en la Tabla 1, se reportan los valores de tensión al 75 % de deformación de las diferentes películas. Como se puede observar en dicha tabla o bien en la Figura 2, el compuesto fibrado tiene un mayor valor de tensión para una deformación fija. Este resultado concuerda con el reportado por Glenn y col. (2001), para muestras de almidón con y sin fibra. Estos autores observaron que la incorporación de fibra conduce a que la tensión de ruptura, prácticamente, se duplique.

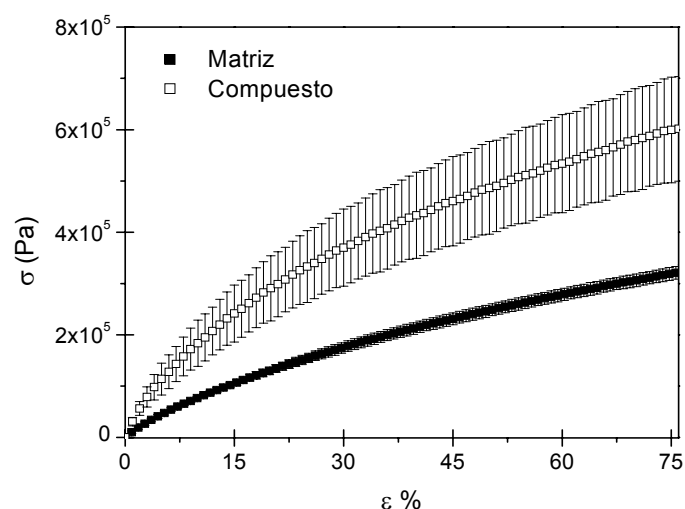


Figura 2. Curvas de Tensión – deformación de las películas estudiadas.

Finalmente, debe remarcarse que los resultados mostrados en la Figura 2, son coherentes con los resultados obtenidos de cristalinidad y humedad. Un aumento de la cristalinidad y una reducción en el contenido de humedad son factores que conducen a una disminución en la elongación a rotura y un incremento en la tensión a rotura (Famá y col., 2004).

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la influencia de la incorporación de un 0,17 % de salvado de trigo a películas comestibles constituidas por almidón de mandioca, agua, glicerol y sorbato.

Se observó que el agregado de ese pequeño porcentaje de dicha fibra aumenta el índice de amarillo y conduce a un incremento en la fracción cristalina y a una disminución en el contenido de humedad de las películas estabilizadas a una a_w de 0.575. Estos resultados se vieron reflejados en las propiedades mecánicas de las mismas, observándose aumentos en el módulo de almacenamiento y en la tensión a una deformación fija, y una disminución en la tangente de pérdida en los compuestos fibrados respecto del material *matriz*.

BIBLIOGRAFIA

- Famá L., Rojas A. M., Goyanes S. y Gerschenson L. (2004).** Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. Aprobada en impresión.
- Glenn G. M., Orts G. y Nobes A. R. (2001).** Starch, fiber and CaCO_3 effects on the physical properties of foams made by a baking process. *Industrial Crops and Products* 14, 201-212.
- Hermans P.H. y Weidinger A. (1961).** On the determination of the crystalline fraction of polyethylenes from X-ray diffraction. *Makromolekular Chemistry*, 44-46, 24-36.
- Le Tien C., Letendre M., Ispas-Szabo P., Mateescu M. A., Delmas-Patterson G., Yu H-L. y Lacroix M. (2000).** Development of biodegradable films whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5566-5575.
- Nabi Shaeb D., Jog J. P. (1999).** Natural fibre polymer composites: a review. *Advance in Polymer Technology*, 18 (4), 351-363.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer el apoyo financiero de la Fundación Antorchas, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la República Argentina (ANPCyT).

DISEÑO DE PASTA DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*)

BAIMA GAHN¹, Débora; KOHAN¹, Gisela; PERELLÓ¹, Gabriela; MARTINEZ SOUTO², María, L.; YEANNES^{1,3}, María I.

(1) Facultad de Ingeniería, UNMDP, (2) Centauro S.A., (3) CONICET. Cátedra: Trabajo Final en Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ingeniería. UNMDP. J. B. Justo 4302. 7600 Mar del Plata. Argentina. TE: 54 223 4816600. FAX: 54 223 4810046. E-mail: giselakohan@yahoo.com.ar

RESUMEN

Mediante Convenio Específico entre la Facultad de Ingeniería y la empresa pesquera Centauro S.A. se concuerda en el diseño de una pasta de anchoíta (*Engraulis anchoita*) y su línea elaboradora. La misma se realizará a partir de los recortes de la línea de elaboración de filetes de anchoíta en aceite y debe poseer las siguientes características: untabilidad tipo "paté", brillo que relacione la especie utilizada y menor tenor salino que las presentes en el mercado.

Se realizaron experiencias de desalado de los recortes a utilizar a fin de obtener un modelo de comportamiento de esta operación que permita seleccionar el valor más aceptable desde el punto de vista sensorial e inocuidad de producto. Para definir la formulación se realizaron experiencias con aceite, emulsionantes y espesantes, alcanzándose las características deseadas. Se obtuvo un producto final con 8.59 % de sal y 0.87 de actividad de agua. La vida útil sensorial determinada en forma acelerada fue de 6 meses a 8 °C, disminuyendo a mayores temperaturas de almacenamiento.

Palabras claves: pasta, anchoíta, desalado, caracteres sensoriales, vida útil.

ANCHOVY PASTE DESIGN (*Engraulis anchovy*)

ABSTRACT

The Apprenticeship Agreement between the Engineering Faculty and Centauro Fishing Company states the engineering development of an anchovy paste and its production process. Anchovy belly and tail cuttings from processing fillets of anchovy in oil will be used in the elaboration of the paste. The paste should have the following characteristics: spreadability like as "paté", brightness in agreement with the species used, and lower salt content than similar products in market. To obtain a behaviour model of desalting operation, which enables to select the most appropriate sensory and safety value, desalting experiments using cuttings were conducted. On defining the paste formulation,

experiments with oil, emulsifier and thickeners were conducted, obtaining the desired characteristics.

An end product containing 8,59% of salt and 0,87 of water activity was obtained.

The shelf life, estimated by accelerated methods, was 177 days, depending on the storage temperature.

Key words: paste, anchovy, desalting, sensory characters, shelf life.

INTRODUCCIÓN

El salado-madurado de anchoíta (*Engraulis anchoíta*) es actualmente el principal producto que se elabora a base de esta especie. Éste es un producto intermedio, siendo el producto final los filetes en aceite. En el proceso de elaboración de los mismos, se generan recortes, considerados como desecho o bien, exportados en tambores con el fin de elaborar pasta de anchoíta.

Los objetivos de este trabajo fueron obtener una pasta con los recortes mencionados anteriormente que presente las siguientes características: untabilidad tipo "paté", brillo que relacione la especie utilizada, menor tenor salino que las presentes en el mercado y determinar su vida útil.

Se buscaron alternativas que sustituyan a la margarina, fase grasa tradicionalmente utilizada en este tipo de productos, debido a la presencia de ácidos grasos trans en la misma, cuyos efectos son actualmente tema de investigación y discusión.

Se realizaron ensayos con aceites vegetales y almidones modificados con el fin de obtener las características sensoriales deseadas.

Dado el elevado tener salino de la materia prima y el perfil de producto deseado se realizaron experiencias de desalado a fin de obtener un modelo de comportamiento de esta operación que permitiera seleccionar el valor más aceptable desde el punto de vista sensorial sin afectar a la inocuidad del producto. Para ello se establecieron las condiciones en que debía realizarse la operación de desalado y se plantearon dos alternativas tecnológicas para la operación de extracción de agua luego del mismo, se evaluaron sus ventajas y desventajas.

Para el diseño de la formulación se consideró la obtención de aspectos tales como: adecuada adherencia al cuchillo, óptima estabilidad de la emulsión y mínima rancidez. Para ello se efectuaron distintas formulaciones seleccionándose mediante evaluaciones sensoriales las que respondieran mejor a las características deseadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de la materia prima

La materia prima para este producto se obtiene de los recortes de la etapa de corte de panza y cola (ver Figura 1). Éstos están formados por: espinazo, huevas y trozos de filetes. A la misma se le realizaron las siguientes determinaciones: proteínas por Kjeldahl (Pearson, 1976), lípidos por hidrólisis ácida (Pearson, 1976), humedad por secado en estufa hasta peso constante (Pearson, 1976), cenizas por calcinación en mufla a 500 °C (Pearson, 1976), contenidos de sal por Mohr (Pearson, 1976) y a_w utilizando una correlación para anchoíta salada (Boeri et. al. 1981). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los recuentos microbiológicos realizados fueron los siguientes: bacterias halófilas (IRAM, 1987), *Staphylococcus aureus* por siembra directa en placas de agar Baird Parker (ICMSF, 1983), mohos y levaduras (ICMSF, 1983), recuento de aerobios en placa (ICMSF, 1983) y Clostridium sulfito reductores (ICMSF, 1983).

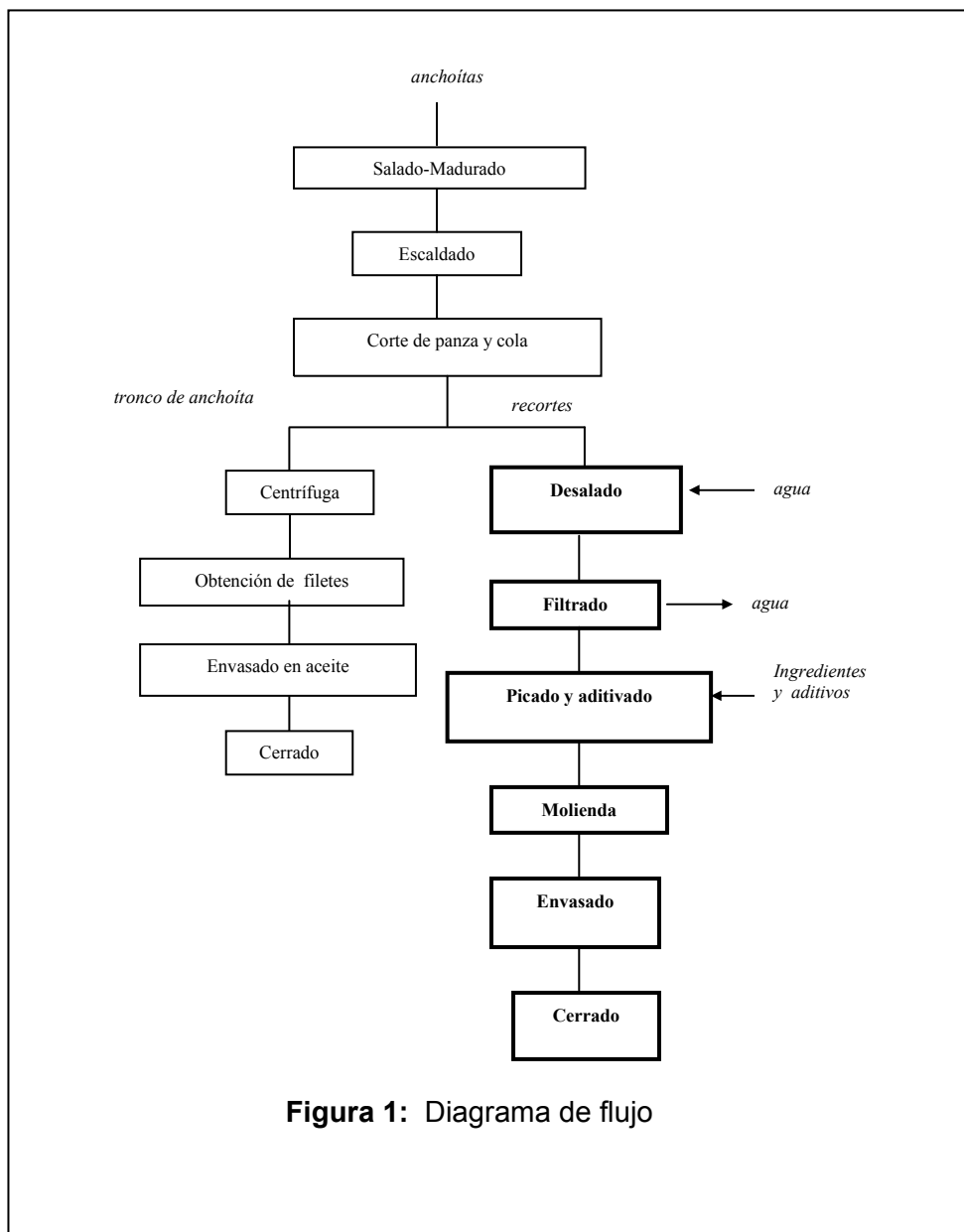


Figura 1: Diagrama de flujo

Experiencias de desalado

Se colocó la materia prima en una bachaza con agua en una proporción 1:3 (materia prima:agua potable). Se retiraron muestras a los siguientes tiempos: 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 340, 550, 880, 1330 y 1810 minutos a fin de determinar la curva de desorción. Las determinaciones de Humedad, Contenido de Sal y a_w se realizaron por los métodos mencionados anteriormente.

Formulación

El objetivo de la formulación fue obtener una pasta con las siguientes características sensoriales: untuosidad, brillo, estabilidad de la emulsión y adherencia de la pasta al cuchillo. Las características mencionadas anteriormente se evaluaron sensorialmente con escalas estructuradas con los siguientes extremos respectivamente: 1 = sin untuosidad y 5 = muy untuoso, 1 = sin brillo y 5 = mucho brillo, 1 = nada separada y 5 = muy separada. Para adherencia de la pasta al cuchillo: 1 = muy adherida, 2 = adherida, 3 = óptimo, 4 = poco adherida y 5 = nada adherida. Las evaluaciones sensoriales se realizaron con dos paneles de percepción uno afectivo para determinar la preferencia del consumidor final (25 alumnos de entre 23-25 años, 60% mujeres y 40% hombres) y uno discriminativo para relacionar las características evaluadas con el sabor percibido (7 jueces entrenados en productos pesqueros: 2 personal de fábrica y 5 investigadores de la UNMDP, 100% mujeres).

Se llegó a la formulación mediante experiencias en serie de adición de cantidades variables de aceite, emulsionantes (almidones modificados y jarabe de glucosa) y espesantes (caseinato de sodio, proteínas del suero lácteo). Una vez seleccionada sensorialmente la primera variable, se procedió siguiendo la secuencia y seleccionándose las cantidades más adecuadas de cada una de ellas.

Características del producto final

Se realizó la determinación de la composición centesimal y recuentos microbiológicos.

Estimación de la Vida Útil

La vida útil se puede determinar a tiempo real, requiriéndose períodos prolongados de almacenamiento que superen la vida útil esperada o mediante métodos acelerados. Por lo tanto, en este proyecto se estimó la vida útil mediante técnicas aceleradas de vida útil.

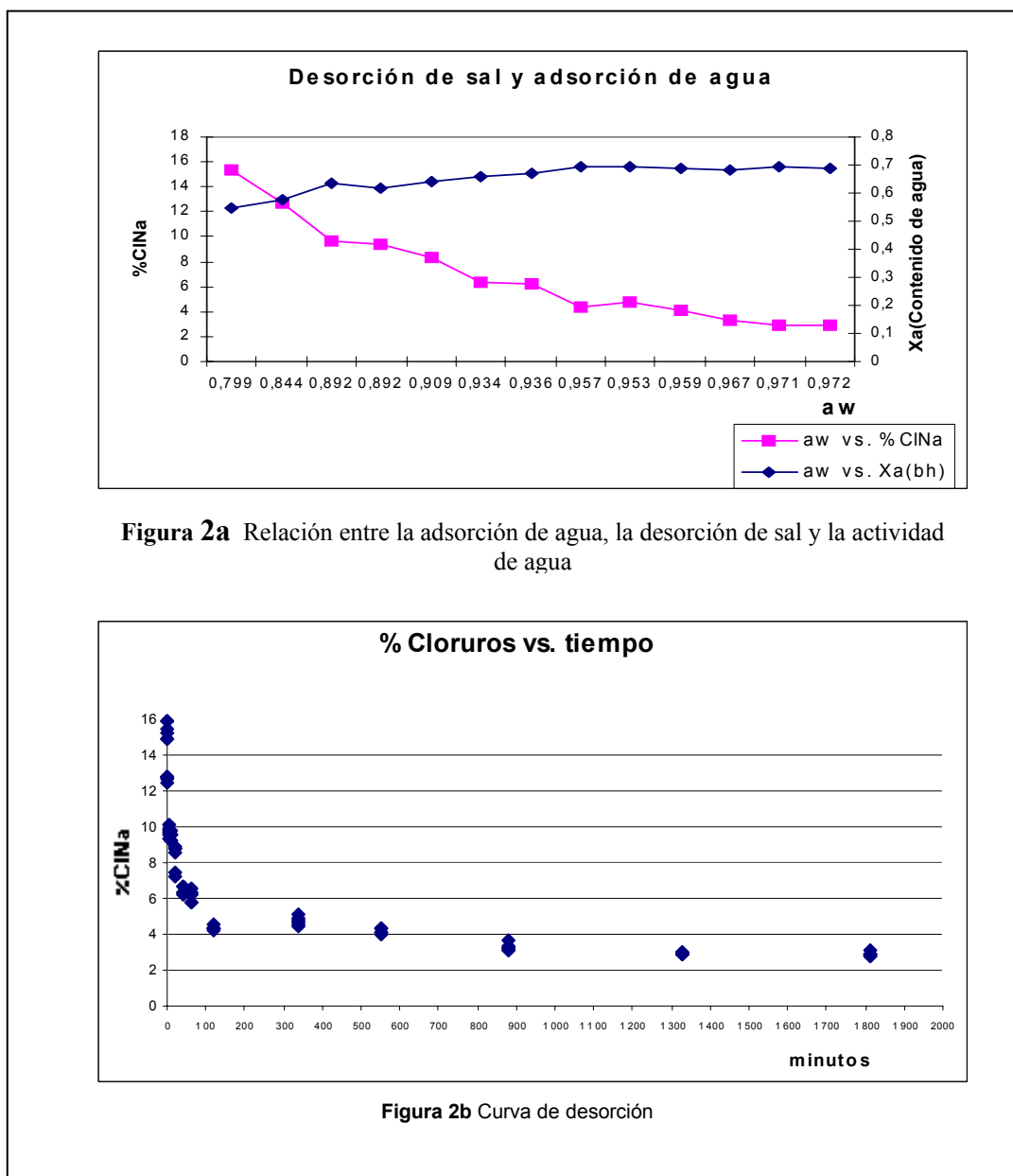
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recortes utilizados como **materia prima** tuvieron la siguiente composición: 8,79% de proteínas, 10,39% de lípidos, 15,85% de sal y 0,79% de contenido de agua. Las

características microbiológicas fueron las siguientes: bacterias halófilas, 11×10^1 ufc/g; Staphylococcus aureus, ausencia; mohos y levaduras, 10×10^1 ufc/g; recuento de aerobios en placa, 25×10^3 ufc/g; Clostridium sulfito reductores, ausencia.

Modelo de comportamiento de la operación de desalado

Para mantener la estabilidad microbiológica se seleccionó un rango de a_w (0.83-0.91), a partir del cual se obtuvo un rango de % ClNa de la **Figura 2a**. Con el valor correspondiente de %ClNa determinado en función de la aceptación de un panel sensorial afectivo se obtuvo el tiempo de desalado adecuado (**Figura 2b**).



Se consideraron dos alternativas tecnológicas para la extracción de agua luego del desalado (Figura 1): centrifugación y filtración. Las muestras centrifugadas fueron de un color más claro que las filtradas. Con respecto a la palatibilidad de las mismas no hubo

preferencias por parte del panel afectivo. Por lo tanto, la operación elegida fue la filtración, por ser la más simple.

Formulación

La pasta diseñada contiene los siguientes ingredientes: aceite de girasol, proteínas del suero lácteo (emulsionante), almidón de maíz pregelatinizado (espesante) y cantidades permitidas de antioxidante y conservante.

Características del producto final

Se obtuvo una pasta untuosa, con una adherencia al cuchillo que permite ser esparcida sin quebrar una galletita de agua, con el brillo deseado y un tenor salino de aceptación por el panel de consumidores. La composición de la misma fue: proteínas 23.41%, lípidos 13.50%, 8.59% de contenido de sal, un a_w de 0.87 (ITP, 1991) y calcio 3% (Vogel, 1960). No se detectaron: mohos y levaduras; *Staphylococcus aureus*; *Clostridium sulfito reductores*; halófilos y aerobios en placa $< 1 \times 10^1$ ufc/g.

Estimación de la vida útil

Se almacenaron muestras de Pasta de Anchoíta a 10, 25 y 45 °C, en envases de vidrio. Se almacenó una muestra control a 4 °C. Dado que la rancidez es el parámetro que mayor variación presentaba se tomó para efectuar el seguimiento de la vida útil. Éste se evaluó sensorialmente a través del tiempo a cada una de las temperaturas mencionadas. Para ello, el panel discriminativo utilizó una escala no estructurada con extremos de 0 = Extremadamente rancio y 10 = Nada rancio. Considerando a Q el puntaje de la escala no estructurada otorgado al atributo de calidad que varía con el tiempo, se puede observar en la Figura 3a que la velocidad de pérdida del mismo, es lineal a través de un período de tiempo, es decir sigue una cinética de orden cero.

El panel afectivo evaluó las muestras almacenadas a 45 °C en distintos períodos de tiempo y determinó a partir de cuál percibía alteraciones en el sabor, éste se consideró el punto de corte o fin de la vida útil (en días) de la Pasta de Anchoíta a esa temperatura. La evaluación de esta muestra con la escala estructurada determinó que el valor de Q como punto de corte por parte de los consumidores era 5. La estimación del fin de la vida útil para las temperaturas correspondientes a 10 y 25 °C, se realizó mediante una extrapolación lineal de la línea de tendencia hasta el punto de corte.

Por lo tanto, para las temperaturas: 10, 25 y 45 °C, el tiempo de vida útil es el siguiente: 99, 51 y 3 días (Figura 3a) respectivamente.

La dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura se representó mediante la Ecuación de Arrhenius (Hough, 2002), tal como muestra la Figura 3b. De la misma se

obtienen los siguientes parámetros cinéticos: k_0 (constante de velocidad) = $2,4 \times 10^9$ y E_a (energía de activación) = 134.6 kJ/mol.

La estimación de la vida útil a distintas temperaturas se puede determinar mediante la ecuación (Baima Gahn et. al. 2004) que se encuentra representada en la Figura 3c. En ella se estima que la Pasta de Anchoíta tiene una vida útil de hasta 177 días si es almacenada a 8 °C.

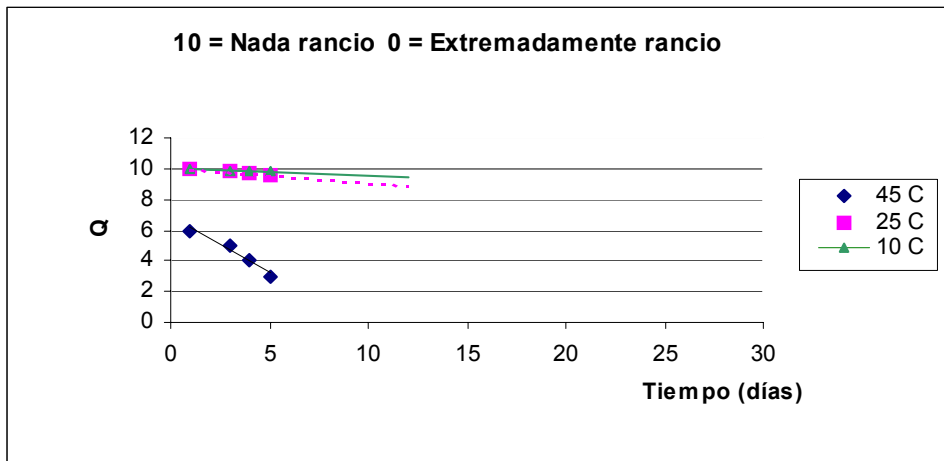


Figura 3a Variación del del atributo durante el almacenamiento a distintas temperaturas

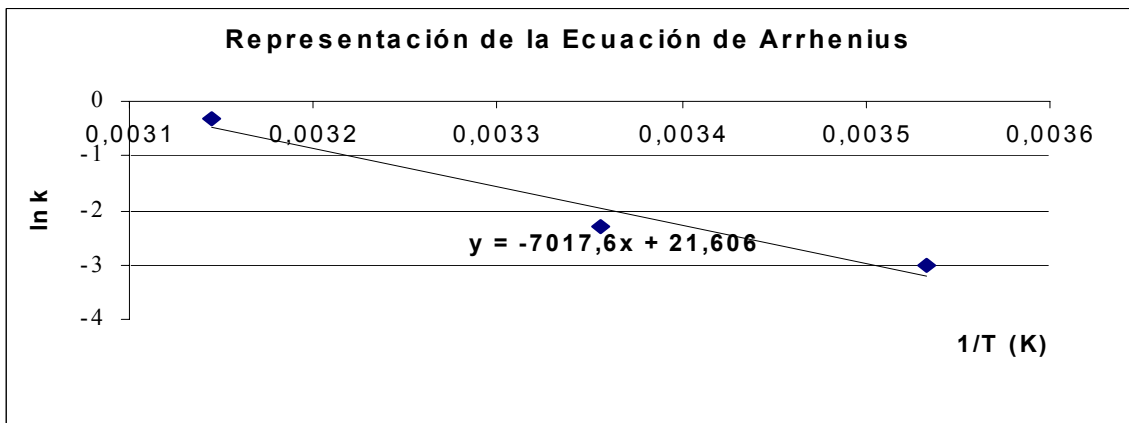


Figura 3b Influencia de la temperatura en la constante de reacción

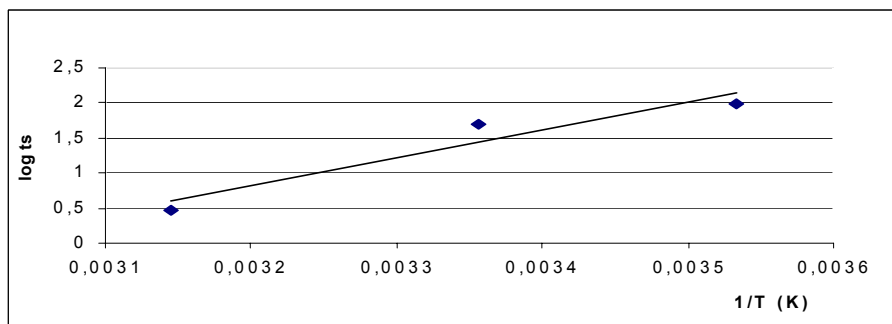


Figura 3c

CONCLUSIONES

Se obtuvo un producto disminuido en el contenido en Cloruro de Sodio (en un 50%), con mayor contenido en Ca y con mayor aceptabilidad sensorial que los similares que se encuentran en el mercado.

La vida útil sensorial estimada fue de hasta 177 días dependiendo de la temperatura de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Baima Gahn D, Kohan GD, Perello GS. 2004. Desarrollo de Pasta de Anchoíta y su Línea Elaboradora. Trabajo Final de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Mar del Plata.

Boeri RL, Lupin H. M, Moschiar SM. 1981. Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. J. Fd Technol. (1981) 16, 31-38.

Hough G. 2002. Diseños experimentales, Curso Taller Vida Útil de los Alimentos Aplicado a la Industria, CYTED-Subprograma XI Tratamiento y Conservación de Alimentos, Montevideo, Uruguay.

ICMSF. 1983. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos, Vol. 1. 2º edición. Ed. Acribia, Zaragoza (España).

IRAM. 1987. Productos de la Industria Pesquera.

ITP. 1991. Curso Internacional de Productos Pesqueros. Productos curados y en conserva. Callao_Perú.

Pearson D. 1976. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Vogel A. 1960. Química Analítica Cuantitativa. Vol 1. Ed. Kapeluz S.A. Buenos Aires.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos la colaboración en distintos aspectos de este trabajo, de la Tec. en Alimentos Irene Amestoy, Dra. Silvia Barañano y Lic. Juan José Zaccardo.

DESARROLLO DE UN PRODUCTO NUTRITIVO DE BAJO COSTO COMO SUPLEMENTO DIETARIO

MALVESTITI, Leonardo¹, GIANNUZZI, Leda², FERRERO, Cristina²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118 (1900), La Plata.
²CIDCA-Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 116 (1900), La Plata, Pcia. Buenos Aires. e-mail: lmalvest@senasa.gov.ar

RESUMEN

Se desarrolló un suplemento dietario en base a menudencias bovinas (hígado, mondongo) y porotos de soja de bajo costo, fácil procesamiento y adecuada aceptabilidad. Se utilizó un diseño de mezcla tricomponente (mínimo de cada ingrediente: 16,5 %, máximo: 67 %). La composición de las siete formulaciones obtenidas varió dentro de los siguientes rangos: proteínas 17,32-25,56 %, lípidos 3,22-3,87 %, fibra 1,50-4,50 %, minerales 1,44-2,72 %. Los niveles de hierro total variaron entre 1,38 y 2,98 mg/100 g y los de calcio entre 15,07 y 34,01 mg/100g.

El análisis del perfil de textura mostró que al aumentar la proporción de soja se incrementaba la dureza y la consistencia del producto; por el contrario las formulaciones ricas en mondongo fueron las de mayor elasticidad y cohesividad. Desde un punto de vista sensorial el producto fue considerado aceptable. Los análisis microbiológicos indicaron que el proceso de elaboración fue seguro.

Palabras Clave: mondongo, hígado, soja, suplemento dietario, mezcla

ABSTRACT

A dietary supplement was developed with bovine tripe and liver and soybeans, being of low cost, easy preparation and an adequate acceptability. A three component mixture design was used (minimum of each ingredient: 16.5 %, maximum: 67 %). The composition of the seven obtained formulations varied within the following ranges: proteins 17.32-25.56 %, lipids 3.22-3.87 %, fiber 1.50-4.50 %, minerals 1.44-2.72 %. Total iron levels varied between 1.39 and 2.98 mg/100 g and calcium levels between 15.07 and 34.01 mg/100g. Texture Profile Analysis showed that, when soy proportion in products was increased, hardness and consistency increased; on the contrary, formulations enriched in tripe were those of higher elasticity and cohesiveness. From a sensorial point of view, products were acceptable. Microbiological analysis indicated that the elaboration process was safe.

INTRODUCCIÓN

Una dieta equilibrada debe proveer las calorías suficientes requeridas por el individuo para su crecimiento, mantenimiento metabólico y desarrollo de actividades. Además, la dieta debe incluir proteínas de buen valor biológico que contribuyan a la formación de masa muscular en personas en etapa de crecimiento. Una de las deficiencias en la dieta observadas a partir de la agudización de la crisis económica es la carencia de proteínas en general, de alta calidad en particular (carne, leche, huevos) y la deficiencia en hierro biodisponible que han establecido a la anemia como una de las enfermedades prevalentes en grandes sectores de la población. Teniendo en cuenta que la de proteínas es una de las deficiencias más importantes y que algunas menudencias bovinas son económicamente más accesibles que el corte menos costoso de carne y que la soja está siendo incorporada paulatinamente a la dieta se pensó en un producto a base de mondongo, hígado y porotos de soja.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Obtener las mejores formulaciones que incluyan, como fuentes de proteínas, hígado, mondongo y soja en la elaboración de un chacinado, 2) Determinar el perfil nutricional del producto desarrollado: contenido de proteínas, hidratos de carbono y lípidos, fibra, principales vitaminas y minerales, en particular hierro, 3) Determinar instrumentalmente las características organolépticas (color, textura) y correlacionar los resultados con análisis sensoriales que evalúen la aceptabilidad del producto, 4) Realizar estudios de desafío con microorganismos patógenos a efectos de determinar la seguridad del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación y elaboración del producto

Diseño experimental: se realizaron combinaciones de los tres componentes principales (hígado, mondongo y porotos de soja) poniendo un mínimo de cada componente de 16,5 % y un máximo de 67%. La Tabla 1 muestra las mezclas preparadas de acuerdo a las proporciones definidas por el diseño experimental Simplex-Centroide para tres componentes, de acuerdo al software Statistica (Stat Soft, Oklahoma, USA). Las mezclas se embutieron en film y se sometieron a la cocción en agua hirviendo por un lapso de 90 minutos registrándose la historia térmica con una termocupla.

Composición y atributos sensoriales.

Actividad acuosa (a_w): se midió en equipo Aqualab Quick Start.

Color: se utilizó un colorímetro triestímulo Minolta Chroma Meter CR- 300.

Análisis de textura: se utilizó un equipo TA-TX21i, con celda de 25 kg, acoplado al software Texture Expert, realizándose dos ciclos de compresión. La fuerza máxima durante el primer ciclo se relacionó con la dureza, de la suma de áreas de los picos positivos de ambos ciclos se obtiene la consistencia y la relación de áreas se define como cohesividad, el área negativa del primer ciclo se relaciona con la adhesividad.

Análisis sensorial: se utilizó como método de análisis la prueba de aceptabilidad sensorial.

Humedad: se determinó por secado en estufa a 105°C hasta lectura de peso constante.

Proteínas: se estimaron a partir de la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning.

Lípidos: se determinaron como extracto etéreo por el método de Soxhlet.

Cenizas: se determinaron por calcinación a 550°C hasta peso constante

Fibra bruta: se cuantificó por el método de filtración única (C.A.A. Metodología Analítica Oficial)

Minerales: se determinaron las cantidades de hierro, calcio y sodio en un espectrómetro de absorción atómica.

Vitaminas: se cuantificaron tiamina (B₁) y riboflavina (B₂) por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando la técnica extractiva de Ndaw y col (2000).

Tabla 1: Porcentajes para una mezcla de tres componentes

Formulación	Mondongo	Poroto de Soja	Hígado
1	16,5	16,5	67,0
2	67,0	16,5	16,5
3	16,5	67,0	16,5
4	16,8	41,6	41,6
5	41,6	16,8	41,6
6	41,6	41,6	16,8
7	33,3	33,3	33,3

Estudios microbiológicos

La determinación de mesófilos totales tanto de la pasta sin cocción como de los embutidos cocidos se realizó en Plate Count Agar (37°C, 48hs). Para determinar coliformes totales y fecales se utilizó la metodología del Número Más Probable (NMP) (AOAC, 1984).

La inoculación de la pasta recién preparada se realizó con un cultivo fresco de *E. coli*. Dos embutidos inoculados fueron sometidos a los dos procesos de cocción: 100°C durante 90

minutos y 120 minutos en forma separada. Antes y después del proceso de cocción se determinó el número de *E. coli*/g en agar EMB (37°C, 24 hs).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición y aporte nutricional

En la Tabla 2 se muestran los valores hallados de humedad, cenizas, proteínas, lípidos (determinados como extracto etéreo) y fibra bruta (celulosa, parte de las hemicelulosas) de las diferentes formulaciones.

Tabla 2. Composición porcentual de las distintas formulaciones (F) y contenido (expresado en mg por cada 100 gramos de producto) de calcio, sodio y hierro (base húmeda)

F	Humedad	Proteínas	Extracto Etéreo	Fibra	Cenizas	Ca	Hierro	Sodio
1	67,69 (0,11)	23,56 (0,28)	3,63 (0,16)	2,00 (0,07)	2,37 (0,01)	29,08 (0,02)	2,38 (0,03)	159,08 (0,03)
2	72,35 (0,02)	17,32 (0,01)	3,79 (0,03)	1,50 (0,07)	1,88 (0,02)	15,07 (0,02)	1,39 (0,04)	198,67 (0,02)
3	66,62 (0,40)	20,42 (0,40)	3,87 (0,06)	3,10 (0,20)	2,72 (0,14)	25,95 (0,03)	1,48 (0,04)	125,86 (0,02)
4	67,64 (0,30)	20,24 (0,47)	3,22 (0,12)	4,50 (0,35)	2,61 (0,09)	25,82 (0,01)	2,60 (0,02)	146,54 (0,04)
5	71,42 (0,56)	19,16 (0,06)	3,44 (0,12)	2,41 (0,02)	2,14 (0,06)	34,01 (0,04)	2,98 (0,01)	131,72 (0,01)
6	72,13 (0,36)	17,97 (0,37)	3,22 (0,03)	2,5 (0,14)	1,44 (0,27)	32,78 (0,04)	2,38 (0,01)	130,43 (0,01)
7	71,58 (0,93)	22,23 (0,65)	3,26 (0,14)	3,1 (0,14)	1,81 (0,02)	21,57 (0,03)	1,80 (0,04)	117,38 (0,03)

Los contenidos de humedad variaron entre 66,62 y 72,35 % y los contenidos proteicos fueron similares ó más altos que los de embutidos disponibles en el comercio e incluso la formulación 2 supera el valor proteico de un corte de carne vacuna magra. El contenido lipídico fue muy inferior en los productos desarrollados con respecto a los comerciales. El aporte de fibra bruta, varió dentro de un rango de 1,5 a 4,5 %, siendo mayor al aumentarse la proporción de porotos de soja.

La formulación que presentó mayor cantidad de Ca y Na fue la 5 correspondiente a 41,6 % de mondongo, 16,8% de poroto de soja y 41,6 % de hígado. El contenido de Fe varió entre 1,39 y 2,98 mg/100 g base húmeda. Las formulaciones 1, 4, 5 y 6 fueron las de

mayor contenido Fe. Los valores de tiamina y riboflavina variaron entre 0,50 y 1,99 mg/100 g y 1,12 y 2,48 mg/100g respectivamente según la formulación.

La contribución calórica total es de 111 kcal por porción (sin considerar los hidratos) y de hasta 131 kcal considerando el aporte de hidratos de poroto de soja y de la harina utilizada como ligante (estimados en 20 kcal/100g).

Análisis de la textura a través de superficies de respuesta

En la Tabla 3 se muestran los promedios de Dureza (Newton), Adhesividad (N s), Cohesividad (adimensional), Elasticidad (mm) y Consistencia (N s).

Tabla 3. Resumen de los parámetros de textura de las distintas formulaciones

Formulación	Dureza (N)	Consistencia (N s)	Adhesividad (N s)	Cohesividad	Elasticidad (mm)
1	30,9 (1,8)	245 (20)	2,11 (0,46)	0,50 (0,01)	3,80 (0,10)
2	25,8 (3,2)	182 (31)	0,059 (0,02)	0,56 (0,01)	7,59 (0,76)
3	33,5 (0,7)	228 (20)	3,98 (0,64)	0,47 (0,09)	2,66 (0,75)
4	26,1 (1,8)	172 (14)	2,45 (0,29)	0,47 (0,01)	3,24 (0,10)
5	22,7 (1,1)	157 (12)	1,18 (0,24)	0,53 (0,00)	3,68 (0,15)
6	36,5 (2,9)	227 (22)	0,56 (0,22)	0,51 (0,01)	3,23 (0,13)
7	26,6 (1,5)	178 (20)	2,04 (0,27)	0,50 (0,01)	3,42 (0,20)

Los valores son promedio de 6 determinaciones.

Entre paréntesis se muestran los errores típicos

Los modelos que mejor ajustaron los parámetros texturales analizados fueron los que contemplaron las interacciones de segundo orden entre los componentes. En la Figura 1 se observan las superficies de respuesta obtenidas.

Las zonas de mayor dureza corresponden a las muestras con mayor contenido de porotos de soja procesados. En el caso de la adhesividad, todas las muestras presentaron valores bajos; si bien se observa que este atributo es mínimo en la formulación que contiene mayor proporción de mondongo y máximo en las muestras con mayor proporción de poroto de soja. La tendencia a valores más altos de elasticidad se encuentra en las formulaciones con mayor contenido de mondongo, lo que puede relacionarse con la presencia de elastina (Fig. 1). La cohesividad de las muestras fue similar entre sí, con valores variando entre 0,47 y 0,56. Esos resultados se corresponden con el buen mantenimiento de la integridad del producto frente a la manipulación y el cortado. La

máxima cohesividad correspondió a la muestra con mayor proporción de mondongo, lo que puede atribuirse al aporte del colágeno de este ingrediente.

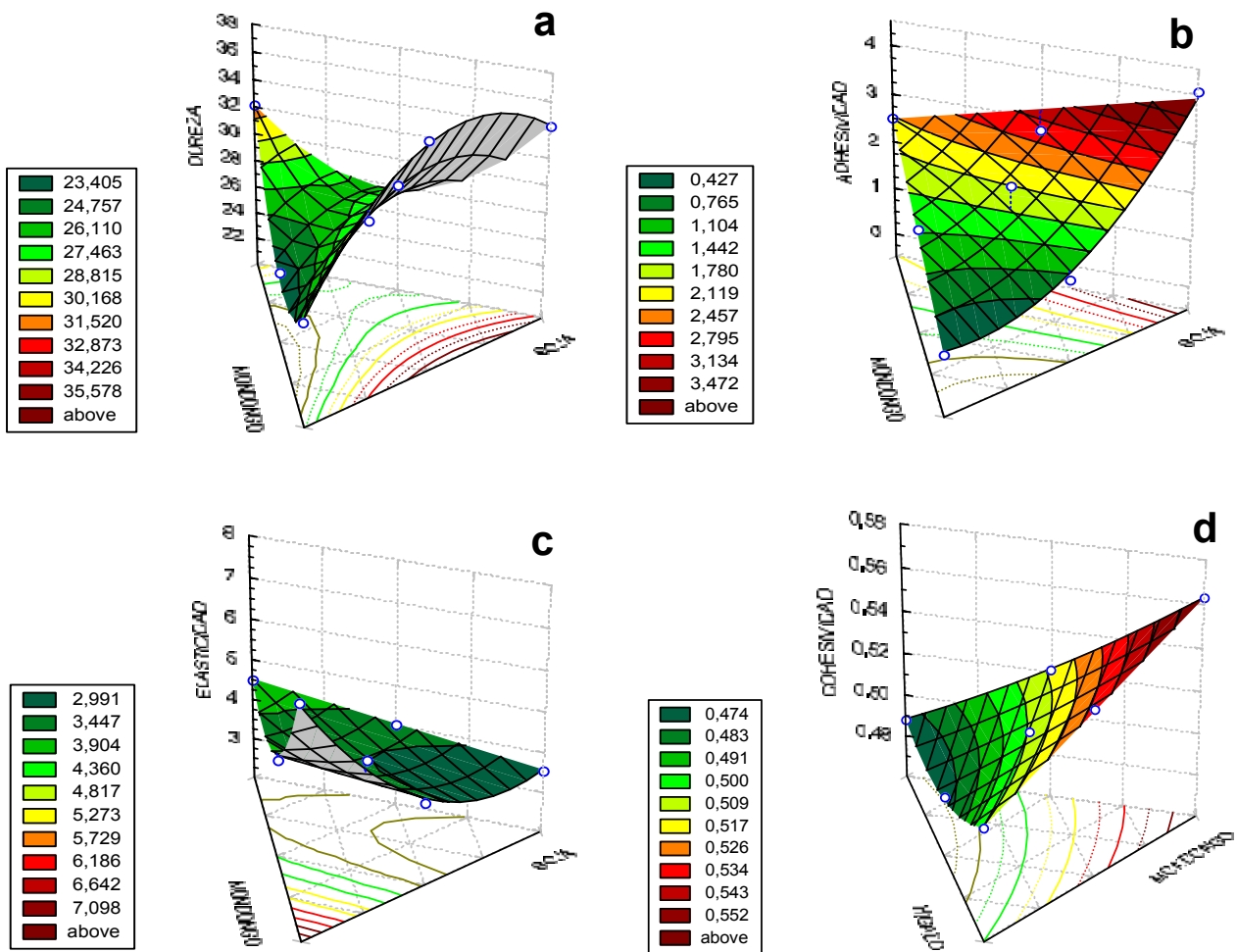


Figura 1. Superficies de respuesta de los parámetros texturales: a) dureza; b) adhesividad; c) elasticidad y d) cohesividad

Análisis de color

La presencia de hígado es probablemente el principal factor que incide con la coloración del producto después de la cocción, por la formación de metamioglobina y metahemoglobina provocada por acción del calor. Los parámetros de color a y b no presentaron una tendencia definida. El valor de L (luminosidad) varió entre 55,2

(formulación 1) y 63,4 (formulación 3) siendo los valores más altos los correspondientes a la formulación con mayor contenido de poroto de soja.

Evaluación sensorial

A través del análisis sensorial realizado por el panel no entrenado, no se encontraron diferencias significativas en los atributos de Apariencia, Consistencia y Aceptabilidad Global. Existen diferencias significativas para el atributo sabor en las formulaciones 1, 2 y 3 pertenecientes a los extremos del triángulo es decir; aquellas en las cuales predomina un ingrediente (en 1, hígado; en 2, mondongo y en 3, poroto de soja) por sobre los otros dos. Estas formulaciones fueron las de menor aceptación, y los evaluadores no notaron diferencias entre ellas. La formulación 7, que posee iguales proporciones de cada ingrediente y corresponde por lo tanto al centro del triángulo, fue la de mayor aceptación.

Ensayos microbiológicos

Se realizaron estudios microbiológicos de la pasta antes del proceso térmico (materias primas procesadas y mezcladas con el resto de los ingredientes) y luego de los dos procesos térmicos (90 y 120 minutos a 100°C). Con el objeto de evaluar si los tratamientos térmicos resultaron efectivos se sometió a un desafío con inóculo de *E. coli*. La pasta no inoculada antes de la cocción presentó recuentos de microorganismos totales del orden 10^5 UFC/g debido a la carga inicial proveniente de los ingredientes crudos utilizados como el hígado y el mondongo. Si bien se encontraron resultados altos en coliformes totales y fecales, no se detectó la presencia de *E. coli*. La pasta inoculada presentó recuentos de microorganismos totales de 10^7 UFC/g y presencia de *E. coli* debido al inóculo incorporado. Pudo observarse que todos los tratamientos térmicos resultaron efectivos, teniendo en cuenta los recuentos microbianos totales (menor a 100 UFC/g) y la ausencia de coliformes y *E. coli*. Esto indica que con el tratamiento de 90 minutos a 100°C se garantiza la inocuidad del producto aun en las muestras que han sido inoculadas.

CONCLUSIONES

Los productos formulados resultan ser aceptables, de costo reducido, de buen valor nutricional principalmente por su aporte proteico, de fibra y hierro. Las formulaciones evaluadas cubren un amplio rango de composición lo que facilitaría su preparación de acuerdo a la disponibilidad de materias primas sin reducir sustancialmente el aporte

nutricional mencionado. La metodología de elaboración propuesta ha demostrado ser lo suficientemente segura para ser implementada a nivel artesanal.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC: Analytical Official Analysis Chemistry. Official Methods of Analysis Capítulo 46. Microbiological Methods (1984).

Código Alimentario Argentino. De la Canal y Asociados (1999).

Ndaw S., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D., Hasselmann C. (2000), Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. Food Chemistry 71 (2000) 129-138.

CARACTERIZACIÓN DE PANES OBTENIDOS CON MEZCLAS DE HARINA DE TRIGO Y DE SOJA

GAZZANEO, María V.¹; FERRERO, Cristina²; BEVILACQUA, Alicia E.^{1,2}

¹Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, 1 y 47 (1900), La Plata. ²CIDCA-Facultad de Ciencias. Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 116 (1900), La Plata, Pcia Buenos Aires e-mail: aebevila@volta.ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se analizó el efecto del agregado de distintas proporciones de harina de soja en la calidad de pan tipo francés. Se sustituyeron porcentajes crecientes de harina de trigo por harina de soja (5%, 10%, 15%, 20% y 25%). Los ensayos reológicos de la masa mostraron una disminución de la respuesta viscoelástica al incorporar la soja.

El volumen específico de las piezas de pan disminuyó significativamente. El análisis del perfil de textura de la miga (TPA) mostró un aumento de la consistencia, variando entre 24,5 Ns (control) hasta 84,3 Ns (25% de harina de soja). La diferencia de color de la miga (ΔE) varió entre 4.1 y 7.8 (5% y 25% de harina de soja respectivamente). Desde el punto de vista de la composición es destacable el incremento en la cantidad de proteínas (de 8,3 a 12,6 % en base húmeda) lo que indica una mejora en la calidad nutricional en los panes.

Palabras Clave: harina de trigo, harina de soja, panificación, calidad

ABSTRACT

The effect of addition of soy flour on the quality of French type bread was analyzed. Different percentages of wheat flour were substituted by soy flour (5%, 10%, 15%, 20% y 25%). Rheological assays on mass showed a decrease in viscoelastic response when soy flour was incorporated. Texture Profile Analysis (TPA) of bread crumb indicated that consistence increased when soy flour content increased, varying from 24.5 N s (control) up to 84.3 Ns (25% of soy flour in flour mix). This variation was parallel to a significative decrease in specific volume of breads. Differences in color of crumb (ΔE) varied between 4.1 and 7.8 for breads obtained from mixes with 5% and 25% of soy flour respectively. From a nutritional point of view, the most remarkable result was the increase in protein quantity (from 8.3 up to 12.6 %) indicating an improvement in nutritional quality of breads.

INTRODUCCIÓN

La soja, planta leguminosa que se adapta fácilmente a los distintos tipos de suelos y climas, es actualmente la semilla oleaginosa de mayor importancia en el mundo y su cultivo es la actividad más relevante del sector agropecuario argentino.

La soja es elevadamente nutritiva debido a la calidad de sus proteínas y aceite. En lugares donde no es posible disponer de leche u otros productos de origen animal, la soja puede ser utilizada como alimento complementario. Adecuadamente procesada, les proporciona a los alimentos una textura satisfactoria que los hace más apetecibles. Tiene, además, importantes funciones biológicas proporcionando beneficios para la salud debido a su potencial para prevenir y tratar enfermedades crónicas, como la hipercolesterolemia (Potter y col., 1993, Messina y Messina, 1990)

La soja, en forma de diversos derivados, ya ha sido incorporada en muchos alimentos tradicionales, incluyendo aderezos, sopas crema y recubrimientos para productos de pastelería. Además de las ventajas nutricionales que proporciona el consumo de proteínas de soja, éstas tienen propiedades funcionales que las hacen ingredientes importantes en muchos alimentos procesados.

El pan es el producto alimenticio más importante consumido en todos los hogares. Según el Código Alimentario Argentino, se entiende por la denominación de pan, al producto obtenido por la cocción de una masa hecha con harina, agua potable y sal en cantidad suficiente, amasada en forma mecánica y fermentada por el agregado de levaduras.

Por su relativo bajo costo, está al alcance de amplios sectores de la población y constituye además un producto de gran aceptabilidad. Por estas razones, la industria alimentaria se ha preocupado en mejorar la tecnología de panificación y de aumentar su valor nutricional. La harina de trigo es la única apta para panificar, debido a que contiene proteínas (gliadinas y gluteninas), encargadas de formar durante el amasado una red viscoelástica, el gluten, que posibilita la retención de gases formados durante la fermentación conduciendo a las características de buen volumen de pan y esponjosidad de la miga que lo hacen aceptable. Al pan se le pueden incorporar además otros componentes como: harina de otros cereales, grasa, harina de soja, leche, emulsionantes, etc.

Teniendo en cuenta que desde un punto de vista nutricional, podría resultar conveniente la incorporación de la soja en un producto de consumo masivo como el pan, el objetivo del presente trabajo fue optimizar una formulación de pan tipo francés que incluya harina de soja, estimando las mejores proporciones para lograr un producto de buen valor nutricional y al mismo tiempo aceptable en su textura, color y sabor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las piezas de pan

Se utilizaron harinas de trigo y de soja. La formulación de pan tipo francés utilizada como base fue: harina 000 100 g, agua 60 cm³, levadura 1 g, sal 2 g. Se preparó primero una masa esponjosa con parte de la harina, levadura y agua dejándose levar 35 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 2 g de sal con el resto de la harina y se amasó manualmente durante 15 minutos. Se colocó la masa en una estufa a 40°C y se dejó levar 30 minutos. Se estiró la masa y se cortaron las piezas (5 cm de diámetro y 2 cm de altura) que se dejaron 15 minutos más a 40°C. Las piezas fueron horneadas a 200°C durante 13 minutos.

En la preparación de las masas con harina de trigo y de soja, se siguió el mismo procedimiento sustituyendo un porcentaje de harina de trigo por harina de soja (5%, 10%, 15%, 20% y 25% p/p).

Composición y características de los panes obtenidos

Composición de las piezas: se utilizaron el método indirecto para determinación de humedad, método de Kjeldahl para determinar proteínas, extracción de lípidos por Soxhlet y cenizas por calcinación en mufla a 550°C. La cantidad de hidratos de carbono se determinó por diferencia.

Determinación del volumen de pan: por desplazamiento de semillas de lino.

Evaluación de la textura de la miga y corteza: se obtuvieron los perfiles de textura de la miga con un texturómetro TA.XT 2i – Stable Micro Systems (dos ciclos de 30 % de compresión). Se obtuvieron los siguientes parámetros: dureza, consistencia, adhesividad, cohesividad y elasticidad. Sobre la corteza se realizaron ensayos de ruptura de la corteza por penetración (5 mm) con punzón de 11,2 cm de largo y un diámetro de 0,5 cm.

Determinación de color: el color de la miga del pan fue medido con un colorímetro Minolta CR-300. Se determinaron la luminosidad (L), y los parámetros cromáticos “a” (verde-rojo) y “b” (azul-amarillo).

La diferencia de color entre dos muestras en este sistema viene dada por la expresión:

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

Análisis reológico de las masas

Las propiedades viscoelásticas de las masas fueron analizadas a través de ensayos dinámicos con un reómetro oscilatorio Haake RS600, provisto de un sistema sensor plato-

plato, con altura entre platos de 1 mm. Los ensayos se realizaron a temperatura constante de 25°C. Se realizaron a) barridos de deformación a frecuencia constante (1 Hz) para determinar el rango de viscoelasticidad lineal, en donde el comportamiento del material (evaluado a través del módulo dinámico complejo G^*) es independiente de la deformación aplicada; b) barridos de frecuencia, a una deformación constante dentro del rango de viscoelasticidad lineal, para obtener los espectros mecánicos (variación del módulo dinámico elástico G' , y dinámico viscoso G'' en función de la frecuencia).

RESULTADOS

3.1. Composición de los panes obtenidos

En la Tabla 1 se muestran las composiciones correspondientes a las harinas de trigo y de soja utilizadas en la elaboración de los panes.

Tabla 1. Composición de las harinas

	Humedad	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Hidratos de Carbono
Harina de trigo	13,97±0,06 *	11,92±0,02	0,95±0,26	0,64±0,01	72,53±0,29
Harina de soja	9,95±0,01	31,0 ±1,0	21,05±0,07	5,02±0,03	32,94±1,20

Los valores son promedio de duplicados

(*) desviación estándar

En la tabla 2 se muestran las composiciones de los panes obtenidos con las diferentes mezclas de harina de trigo y soja. A medida que aumenta el contenido de harina de soja en la mezcla disminuye el contenido de agua presente en los panes, lo que se puede relacionar, por una lado por el diferente contenido de agua de ambas harinas (Tabla 1) y por otro, con una diferente capacidad de retención de humedad durante el horneado.

El porcentaje de proteínas se incrementó significativamente con el agregado de harina de soja hasta llegar a un 12,58 %. Esto constituye un incremento del 51,6 % en el contenido proteico respecto al control (8,3 %). Esto significa una mejora importante desde el punto de vista nutricional, no sólo porque se aumenta el contenido proteico sino además porque las proteínas de soja y las de cereales resultan complementarias desde el punto de vista del perfil aminoacídico.

Los porcentajes de lípidos y de cenizas aumentaron en función del porcentaje de harina de soja.

Tabla 2. Composición de los panes

g soja / 100 g *	Humedad	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Hidratos de Carbono
0	30,95±1,06 **	8,3±0,12	0,08±0,01	1,76±0,16	58,91±0,91
5	30,75±1,4	9,4±0,02	0,29±0,19	1,9±0,12	57,66±0,67
10	27,02±2,14	9,51±1,86	0,36±0,04	2,31±0,01	60,08±1,95
15	26,68±3,11	10,8±0,19	1,13±0,3	2,82±0,01	58,5±2,92
20	23,93±2,01	11,73±0,02	1,36±0,38	2,97±0,01	60,01±2,00
25	23,01±0,15	12,58±0,04	1,86±0,38	3,08±0,01	59,47±0,48

Los valores son el promedio de tres muestras de pan.

(*) mezcla de harina de trigo y de harina de soja (**) desviación estándar

3.2. Características de la masa y de los panes obtenidos

Análisis reológico de la masa

En la Figura 1 se observan los valores de ambos módulos en función de la frecuencia para las masas con distintos contenidos de harina de soja.

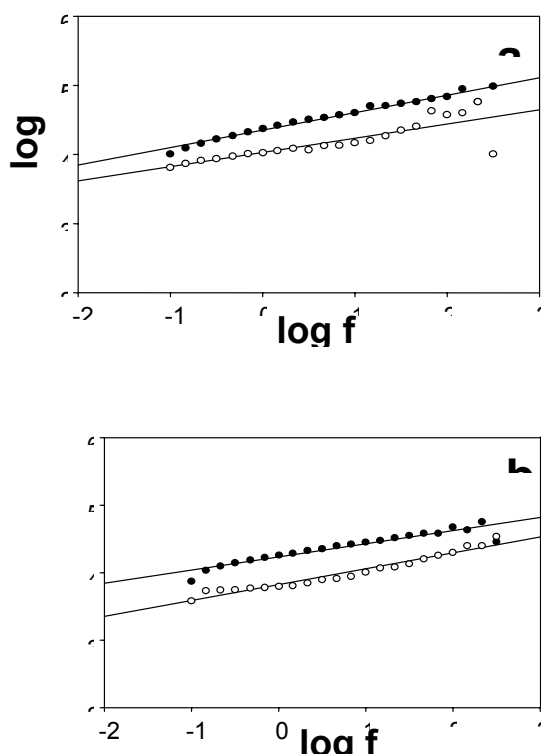


Figura 1. Módulos dinámicos en función de la frecuencia correspondientes a la masa con 0 % (a) y con 25 % (b) de harina de soja. (●) G' , módulo elástico o de almacenamiento (○) G'' módulo viscoso o de pérdida. Las rectas representan las regresiones lineales correspondientes a la expresión logarítmica de las ecuaciones 2 y 3.

Se aprecia que, en todos los casos, el módulo elástico se mantiene más alto que el viscoso en todo el rango de frecuencia ensayado y aumenta en función de la frecuencia.

El tipo de comportamiento observado es típico de un sistema viscoelástico donde predomina la respuesta elástica. A diferencia de los geles, G' aumenta sensiblemente en función de la frecuencia. Los valores de los módulos fueron ajustados con expresiones potenciales del tipo:

$$G' = a \cdot \omega^b \quad (2)$$

$$G'' = c \cdot \omega^d \quad (3)$$

donde ω es la frecuencia. Como se observa en la Tabla 3, los valores de los coeficientes no difieren significativamente entre las masas control y con distintos porcentajes de harina de soja lo que indica que el comportamiento es del mismo tipo. Sin embargo, a medida que aumenta el contenido de soja los valores de G' y G'' disminuyen; esto se puede relacionar con la menor consistencia observada en la masa a medida que se incrementaba la cantidad de harina de soja. Las proteínas de soja no contribuyen a la formación de gluten; por el contrario, al incorporar la harina de soja se produce una disminución relativa de la cantidad de gliadinas y gluteninas (respecto a la cantidad total de masa) y por lo tanto a pesar de que la cantidad de proteínas totales aumenta, se ve afectada la aptitud de la mezcla para obtener panes de buena calidad.

Tabla 3. Coeficientes de las ecuaciones potenciales $G' = a \omega^b$ y $G'' = c \omega^d$

g soja / 100 g *	a	b	c	d
0	4,35±0,21*	0,25±0,04	4,3±0,4	0,23±0,04
5	4,32±0,06	0,30±0,08	4,04±0,01	0,20±0,02
10	4,20±0,05	0,30±0,02	3,96±0,11	0,27±0,09
15	4,05±0,20	0,24±0,01	3,69±0,13	0,22±0,01
20	4,05±0,02	0,23±0	3,68±0,03	0,22±0,01
25	4,28±0,07	0,21±0,02	3,88±0,09	0,25±0,02

(*) desviación standard

Volumen de pan

Se calcularon los volúmenes específicos de los panes a partir del volumen y el peso de las piezas obtenidas. Los resultados (promedio de cinco muestras de pan) se muestran en la Figura 2. Se observa una disminución progresiva del volumen específico a medida que

aumenta la cantidad de harina de soja incorporada. Por otro lado, esta disminución del volumen específico incidió en la calidad de la miga obtenida. A medida que se incrementaba la cantidad de harina de soja, la miga de los panes resultaba más compacta, de menor esponjosidad que el control. Estos cambios en las características de la miga se evaluaron cuantitativamente a través de análisis de perfil de textura.

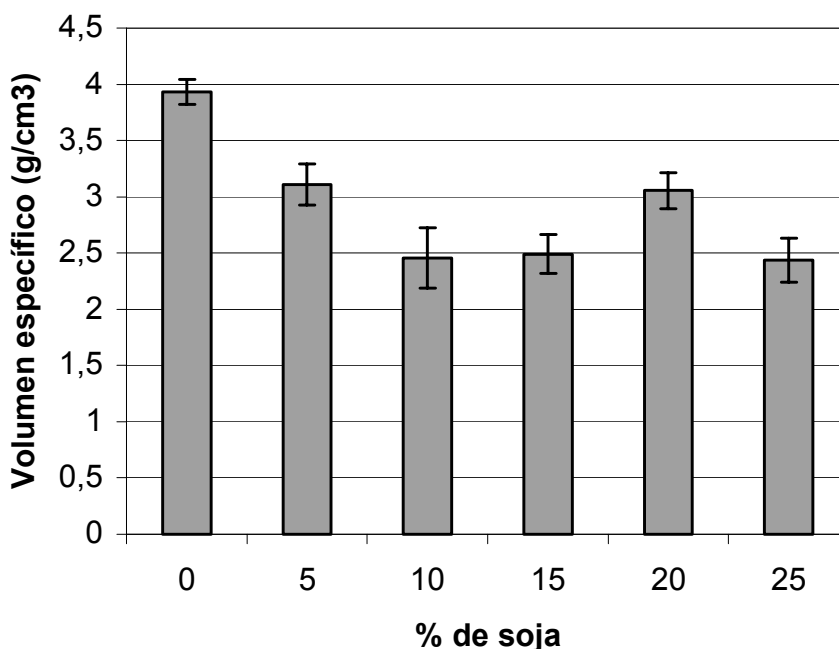


Figura 2. Variación del volumen específico en función del porcentaje de harina de soja agregado. Barra: desviación estándar

Análisis de Perfil de Textura de la miga de pan

En la Tabla 4 se resumen los valores promedio obtenidos para los distintos parámetros texturales. Se observa un incremento en la dureza y la consistencia al incorporar la soja que se puede relacionar con el menor volumen de pan obtenido en estos casos; la miga resultó menos esponjosa y por lo tanto más dura. La menor esponjosidad se relaciona con una deficiente retención de gases, que está directamente relacionada con la calidad de la red de gluten formada, afectada por la incorporación de las proteínas de soja. Los valores de adhesividad fueron bajos en todos los casos. Las distintas masas presentaron grados comparables de cohesividad pero este parámetro tiende a disminuir cuando se incorpora mayor proporción de harina de soja.

Test de ruptura

Los resultados indican que no hay diferencia significativa entre los panes obtenidos con distintas mezclas, variando entre 0,09-0,13 N para la corteza inferior y 0,012-0,015 N para la corteza superior.

Tabla 4. Parámetros del Perfil de Textura

	g harina de soja/100 g mezcla					
	0	5	10	15	20	25
Dureza	2,80	3,23	6,70	6,68	4,98	7,47
(N)	±0,17	±0,36	±0,38	±0,44	±0,27	±0,5
Consistencia	24,49	29,79	57,66	62,52	53,41	84,29
(N s)	±1,45	±3,9	±4,13	±5,7	±2,13	±7,54
Adhesividad	0,020	0,010	0,010	0,030	0,020	0,050
(N s)	±0,005 *	±0,005	±0,004	±0,007	±0,008	±0,013
Cohesividad	0,620	0,610	0,600	0,610	0,600	0,580
(adimensional)	±0,004	±0,003	±0,005	±0,003	±0,002	±0,002
Elasticidad	8,88	9,79	8,27	9,49	9,69	9,58
(mm)	±0,38	±0,36	±0,25	±0,34	±0,24	±0,18

(*) error estándar

Análisis de color

El ΔE de la miga (ecuación 1) varió de 4,09 hasta 7,85 a medida que aumentaba el porcentaje de harina de soja incorporado a la mezcla. Sin embargo en ningún caso llegó a ser desagradable como para ser inaceptable el producto.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que es posible la obtención de un pan de características aceptables reemplazando hasta un 25 % de harina de trigo por harina de soja. Se obtiene de esta manera un pan más nutritivo en cuanto al contenido proteico, notándose un incremento del 51,6% y con un mejor perfil aminoacídico, resultado de la combinación de las proteínas de soja y de trigo, en comparación con el pan realizado con harina de trigo solamente. En cuanto a las características del pan así obtenido se pudo observar que a mayor cantidad de harina de soja incorporada disminuye el contenido de agua presente en los panes y que la masa de los mismos se vuelve menos consistente, respondiendo al comportamiento de un sistema viscoelástico con predominio del comportamiento elástico, resulta de miga más compacta y menos esponjosa a medida que se incrementa la proporción de harina de soja. En cuanto al volumen específico de los panes se observa una disminución progresiva del mismo cuando se aumenta la cantidad de harina de soja

incorporada. Esto se relaciona con un incremento en la dureza y la variación de la consistencia y la esponjosidad de la miga. La menor esponjosidad tiene vinculación con una deficiente retención de gases debida a la calidad de la red de gluten formada, afectada por la incorporación de las proteínas de soja. La adhesividad de los panes fue baja en todos los casos y la cohesividad fue comparable entre ellos, demostrando esta similitud de valores la aceptabilidad de los mismos. En cuanto a la variación de color, si bien el mismo aumenta con el agregado de harina de soja, presenta un color agradable para su consumo.

BIBLIOGRAFIA

Código Alimentario Argentino, capítulo IX, art. 726 De la Canal y Asociados

Potter, S.M., Bakhit, R.M., Essex-Sorlie, D.L., Weingartner, K.E., KM Chapman, K.M., Nelson, R.A., Prabhudesai, M., Savage, W.D. Nelson, AI y Winter, L.W. Depression of plasma cholesterol in men by consumption of baked products containing soy protein. Am. J. Clinical Nutrition, 58: 501 - 506.

Messina M y Messina V. (1991) Increasing use of soyfood and their potential rol in cancer prevention. J Am Diet Assoc; 91:836-840.

PELICULAS COMESTIBLES OBTENIDAS A PARTIR DE BIOPOLIMEROS DERIVADOS DE LAS SEMILLAS DE AMARANTO

TAPIA, Delia¹, MAURI, Adriana N.², MENEGALLI, Florencia C.¹, SOBRAL, Paulo³, AÑÓN, María C.²

1. Departamento de Engenharia de Alimentos, FEA, UNICAMP, Fax (019) 37884027 CEP 13083-970, Campinas – Brasil : drtapia@fea.unicamp.br, fcu@fea.unicamp.br. 2. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). 47 y 116. La Plata, 0221 424-9287. anmauri@quimica.unlp.edu.ar. 3. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga - Brasil Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). 47 y 116. La Plata, 0221 424-9287. anmauri@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se elaboraron y caracterizaron películas biodegradables y comestibles a partir de subproductos derivados del amaranto: harina y un extracto formado principalmente por proteínas y lípidos (P-L, obtenido al retirar el almidón de la semilla). Las películas se elaboraron por casting, usando glicerol como plastificante. Las películas de harina resultaron más deformables y ligeramente más resistentes a la rotura, con menor permeabilidad al vapor de agua, y menos coloreadas que las películas de P-L aunque ambos tipos de películas presentaron solubilidades y contenido de agua similares. Estas propiedades correlacionan con la microestructura de las películas, la matriz de harina mostró una microestructura de redes entrecruzadas, mientras que la de P-L tiene la apariencia de una película emulsionada.

Palabras claves: películas comestibles, harina de amaranto, proteínas de amaranto, permeabilidad al vapor de agua, microestructura.

ABSTRACT

Biodegradable and edible films were obtained from amaranth subproducts: flour and an extract formed mainly by proteins and lipids (P-L, obtained by removing the starch from the seeds). Films were obtained by casting, using glycerol as a plasticizer. Flour films were more deformable and slightly more resistant at break, had lower water vapour permeability, and were less color than P-L films, although both presented similar solubility and water content. These properties correlated with films microstructure, flour films showed a microstructure of crosslinked networks, while P-L films had the appearance of an emulsified film.

Key words: edible films, amaranth flour, amaranth proteins, water vapor permeability, microstructure.

INTRODUCCIÓN

La obtención de películas y recubrimientos para alimentos a partir de polímeros derivados de la agricultura se presenta como una buena alternativa para aumentar la aplicación de estos productos así como para reemplazar los polímeros sintéticos no degradables. Existen varios estudios sobre películas obtenidas a partir de mezclas de almidón y proteínas de fuentes diferentes (Arvanitoyannis et al., 1997, Coughlan, 2004; Jagannath, 2003; Parris et al., 1997) y también sobre el agregado de lípidos en la formulación para mejorar la permeabilidad al vapor de agua de esas películas (Bravin et al., 2004; Kim & Ustunol, 2001; Monahan, 2002). Sin embargo, son pocos los estudios sobre películas obtenidas a partir de estos polímeros y los lípidos extraídos de una misma fuente (Mariniello et al., 2003; Tapia-Blácido et al., 2005).

El amaranto es un pseudocereal resistente a condiciones climáticas adversas y a distintas plagas, ampliamente cultivado en los países andinos como Perú y Bolivia, y otros países de América central como México y Guatemala. Su grano tiene un contenido relativamente alto de proteínas ($\cong 15\%$) y de almidón (superior al 62 %), y un contenido de lípidos entre un 6-8%. Las películas de harina de amaranto desarrollada por Tapia-Blácido et al. (2005) presentaron características diferentes a otras películas como resultado de la interacción del almidón, proteínas y lípidos. Para evaluar el efecto de las proteínas y los lípidos dentro de esta matriz compleja, en este trabajo se elaboraron películas de proteína-lípido extraídos de las semillas de amaranto y se compararon con las películas de harina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. La harina de amaranto fue extraída a partir de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) según la metodología desarrollada por Tapia-Blácido (2005). El subproducto proteína-lípido (P-L) fue extraído por molienda húmeda a partir de las semillas de amaranto. Primero se realizó una maceración de las semillas en una solución de NaOH 0,25%, después se procedió a la molienda y tamizado del extracto líquido, el cual fue centrifugado para separar el almidón. El sobrenadante se reguló el pH a 4,5 con el objetivo de precipitar las proteínas, que fueron separadas por centrifugación junto con los lípidos. Finalmente, este precipitado fue secado por liofilización.

Formación de las películas. Las películas de harina se obtuvieron por casting a partir de soluciones acuosas que contenían 4 % de harina (P/P) y 1.125 %P/P glicerol a pH 10.7.

Dichas soluciones se calentaron por 15 minutos a 82°C y luego se vertieron sobre las placas. Las películas se secaron a 40°C en una estufa con convección mecánica hasta peso constante (Tapia, 2005).

Las películas P-L se obtuvieron por casting a partir de soluciones acuosas que contenían 5 % de P-L (P/P) y 1.125 %P/P de glicerol a pH 10.7 y secadas a 60°C durante 24h.

Las películas obtenidas se almacenaron durante 48 h a 20 °C y 59 % de humedad relativa, previo a realizar las determinaciones de caracterización.

Composición. Se determinó el contenido de proteínas, lípidos, cenizas y humedad de la harina y del producto proteína-lípido según la metodología recomendada por la AOAC (1997).

Caracterización de las películas. Las propiedades mecánicas en tracción fueron determinadas de acuerdo a la norma ASTM D882-95a (1995), utilizando un texturómetro TA-XT2, Stable Micro Systems (Scarsdale NY). La solubilidad se determinó según la metodología propuesta por Gontard et al. (1992). El contenido de humedad de las películas se determinó de acuerdo a la norma ASTM D644-94 (1995). La permeabilidad al vapor de agua de las películas se midió según la norma ASTM E96-80 (1995). El color se determinó con un colorímetro Minolta Chroma meter (CR 300, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón) según los parámetros de Hunter Lab. El espesor de las películas se determinó con un medidor electrónico de espesores Elcometer 350 para sustancias no conductoras sobre base no ferrosa.

Microestructura. Las películas fueron lavadas en buffer, luego deshidratadas en acetona y secadas en un secador de punto crítico marca Polaron. Se metalizaron con oro en un sputter coater marca Pelco 91000. Y finalmente se examinaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL 35 CF (Tokyo, Japón).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la materia prima. Se estudió la composición de los materiales de partida. La harina de amaranto está compuesta por 74 % de almidón (7,58% ± 0,40 de amilosa y aproximadamente 67% de amilopectina), 8,93 ± 0,03 de lípidos, 14,21 % ± 0,77 de proteína, 7,97 % ± 0,18 de agua y 2,14% ± 0,03 de cenizas. El producto P-L está compuesto por 55.33 ± 8.47 % de proteína, 30.40 ± 0.53 de lípidos, 3.53 ± 0.04 de cenizas, 3.93 ± 0.23 % de agua y aproximadamente 10,7% de almidón.

Caracterización de las películas. Los resultados de las propiedades mecánicas en tracción de las películas de harina y proteína-lípido se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de las películas de amaranto

Propiedades	Películas de harina	Películas P-L
Mecánicas		
- Tensión (MPa)	1,79 ± 0,08	1,20 ± 0,07
- Elongación (%)	150,71 ± 6,18	67,72 ± 16,38
Solubilidad en agua (%)	43,41 ± 3,77	44,36
WVP (g/m seg Pa)	7.54x10 ⁻¹¹ ± 9.72x10 ⁻¹²	1.24x10 ⁻¹⁰ ± 3.53x10 ⁻¹²
Contenido de agua (%)	16.03 ± 2,11	17.28 ± 1,19
Espesor (mm)	0,080 ± 0,020	0,096 ± 0.008

Las películas de harina presentaron mayor elongación y resistencia a la rotura que las películas de proteína-lípido. De todas maneras las dos películas son muy flexibles a diferencia de otras películas encontradas en la bibliografía. Posiblemente los lípidos presentes en las formulaciones estén actuando como plastificantes. A pesar del mayor contenido de lípidos en las películas P-L, los valores de elongación fueron menores que los obtenidos en las películas de harina de amaranto. Probablemente la mayor elongación de las películas de harina se debe al alto contenido de almidón en la harina (74%), especialmente de amilopectina (67% en la harina) ya que según Lourdin et al. (1995) las películas de amilopectina son menos resistentes y más flexibles que las películas de amilosa, y también más sensibles al aumento de glicerol. Esto hace suponer que además de la contribución de los lípidos en la alta flexibilidad de las películas de harina existe una contribución de la red formada por la amilopectina y el glicerol. La mayor resistencia de las películas de harina puede atribuirse a que la matriz de estas películas está formada por dos redes entrecruzadas: la de proteína y la de almidón, reforzándose mutuamente.

Ambas películas presentaron contenidos de agua y solubilidades en agua similares. Se suponía que el mayor contenido de lípidos presentes en la formulación P-L hubiese disminuido la afinidad de las películas por el agua, por lo que tanto la solubilidad como el contenido de agua hubiesen sido menores que los correspondientes a la película de harina. Pero a pesar que los valores de solubilidad en agua fueron similares, el comportamiento de las películas frente al solvente fue distinto. Las películas P-L conservaron su estructura, mientras que las películas de harina se desintegraron totalmente dando un precipitado insoluble. Este hecho se atribuye a la presencia de

amilosa en la red polimérica, siendo esta macromolécula más soluble en agua que la amilopectina originando posiblemente la desintegración de la estructura.

También en contraposición a lo esperado, la permeabilidad al vapor de agua de las películas de harina fue menor que la correspondiente a las de P-L. Evidentemente, en la película P-L los lípidos están distribuidos en la matriz proteica, sin ejercer un efecto barrera considerable. La menor WVP de la película de harina podría atribuirse a dos efectos, por un lado el mayor entrecruzamiento de su matriz, y por otro al menor espesor de esta película respecto del correspondiente a la de P-L (tabla 1). Se ha mostrado para películas de biopolímeros tales como pectinas, amilosa, éteres de celulosa, caseinato de sodio y proteínas de soja, que WVP aumenta cuando el espesor de la película aumenta (McHugh H.T. et al., 1993; Ghorpade V.M. et al., 1995).

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de color de Hunter. Las películas P-L presentan una mayor coloración amarillenta (b es mayor) y una mayor opacidad (L es menor) que las de harina. La mayor coloración desarrollada probablemente este relacionada con el mayor contenido de lípidos en la formulación.

Tabla 2. Valores de los parámetros de color de las películas de amaranto

	Películas de harina	Películas de P-L
a*	0,02 ± 0,08	-0,22 ± 0,25
b*	11,09 ± 0,95	26,53 ± 2,07
L*	86,58 ± 0,47	80,39 ± 1,49
ΔE	13,09 ± 1,06	29,65 ± 2,47

Patrón de calibración: L= 97,3, a= 0,14 y b=1,71

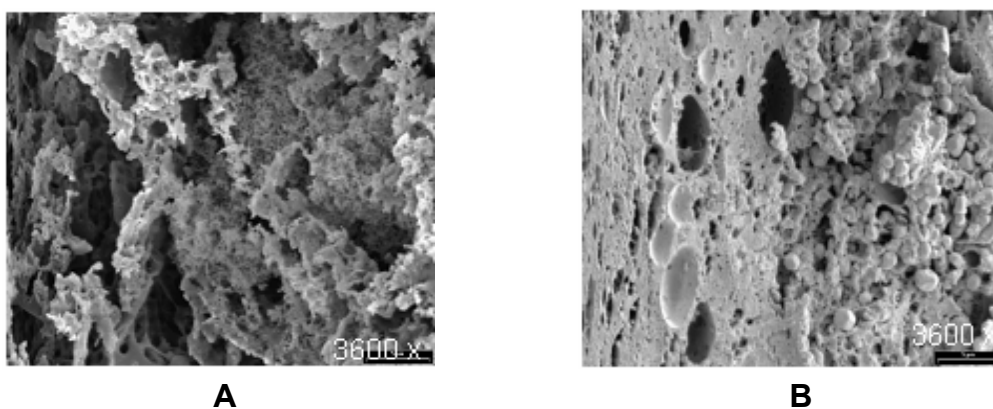


Figura 1. Microestructuras del área transversal de las películas A) de harina y B) de P-L.

Microestructura de las películas. Para comprobar las suposiciones estructurales realizadas, se observó la microestructura de las películas. En la Figura 1 se muestran las áreas transversales de las películas de harina y P-L.

Se observa que la película de harina presenta una estructura de redes entrecruzadas formadas por el almidón (especialmente la amilopectina) y las proteínas, y con espacios vacíos indicando zonas de plastificación por la presencia de glicerol y lípidos. Esta estructura justifica la alta flexibilidad que tiene las películas de harina. También se observa que ambas redes están entremezcladas.

En cambio las películas de proteína-lípido presentan una cierta apariencia de encontrarse emulsionada. Con una fase proteica continua muy densa, con espacios vacíos circulares atribuibles a los lugares donde estarían ubicados los lípidos. También se observa la presencia de gránulos de almidón, indicando que el tratamiento térmico utilizado en la obtención de estas películas (24 h a 60°C) no fue suficiente para gelatinizarlo e incorporarlo dentro de la matriz polimérica. Tanto los lípidos como los gránulos de almidón están interfiriendo en la formación de una red continua. Los mismos actuarían como concentradores de tensiones, provocando la rotura temprana de estos materiales

CONCLUSIONES

Las películas de harina presentaron una estructura de redes entremezcladas como resultado de la interacción del almidón y de la proteína, con los lípidos y el glicerol distribuidos entre ellas originando zonas de plastificación. El alto contenido de amilopectina en las películas aumenta la elongación contribuyendo a la formación de una estructura ramificada, a diferencia de las películas de P-L que presentan bajo contenido de amilopectina y cuya estructura resultó más densa. A pesar del alto contenido de lípidos de las películas de P-L, la permeabilidad al vapor de agua fue mayor que las películas de harina debido a que los mismos se encuentran emulsionados dentro de la matriz proteica disminuyendo la cohesividad de la red proteica, no favoreciendo a las propiedades barrera ni a las mecánicas.

AGRADECIMIENTOS

A la FAPESP (Fundación de ayuda a la Investigación del Estado de San Pablo-Brasil) por el financiamiento referido al proceso 02/13045-8. A la ANPCyT (Argentina) por el financiamiento de los proyectos PICT 09-12242/02 y 09-12085/02. Al proyecto CYTED XI-20 por el financiamiento del viaje de Delia Tapia a la Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, 1995.
- AOAC, Official Methods of Analysis. 16^a Edition. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1997.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., & Yamamoto, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part. 3. *Food Chemistry*, 60, 593-604 (1997).
- Bravin, B.; Peressini, D.; Sensidoni, A. Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21), 6448-6455, (2004).
- Coughlan, K., Shaw, N.B, Kerry, J.F., Kerry, J.P. Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Journal of Food Science*, 69(6), E271-E275, (2004).
- Ghorpade V.M., H. Li, A. Gennadios, M.A Hanna. Chemically modified soy protein films. *Trans. ASAE* 38 (6): 1805-1808 (1995).
- Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J. L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, v.57, n.1, p.190-195, (1992)
- Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D.K., Bawa, A.S. Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(1), 64-71, (2003).
- Kim, S.J, Ustunol, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4388-4391. (2001).
- Lourdin, D., Della Valle, G., Colonia, P. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27, 261-270, (1995).
- Mariniello, L.; Di Pierro, P.; Esposito, C.; Sorrentino, A.; Masi, P.; Porta, R. Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102 (2), 191-198, (2003).
- McHugh H.T., R. Avena-Bustillos, and J.M. Krochta, Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects, *Ibid.* 58: 899-903 (1993).

Monahan, F.J., Shaw, N.B., O'Riordan, E.D., O'Sullivan, M. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. *Journal of Food Engineering*, 51(4), 299-304, (2002).

Parris, N., Dickey, L., Kurantz, M.J., Moten, R.O., Craig, J.C. Water vapor permeability and solubility of Zein/Starch hydrophilic films prepared from dry milled corn extract. *Journal of Food Engineering*, 32, 199-207, (1997).

Tapia-Blácido, D., Sobral, P., Menegalli, F. Development and Characterization of Biofilms based on Amaranth Flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*. 67: 215-223, (2005)

FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES EMULSIONADAS A BASE DE PROTEÍNAS DE SOJA – CERA DE ABEJAS

DENAVI, Gabriela A., MAURI, Adriana N., AÑÓN, María C.

CIDCA - Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) - 47 y 116 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. TE/Fax: 54(221)4254853 - 54(221)4890741 - 54(221)4249287 - cidca@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se estudió la obtención de películas emulsionadas de proteínas de soja-cera de abejas bajo distintas condiciones. Las películas se obtuvieron por casting a partir de emulsiones formadas por 5%P/V de aislado proteico y glicerol (2,5%P/V) con distintas proporciones de cera (0-25%P/V). Se obtuvieron películas homogéneas emulsificando en un Ultraturrax durante 5 minutos-8000rpm y secándolas 24 horas-20°C más 24 horas-60°C. Al aumentar el contenido de cera hasta 7,5%P/V, disminuyó levemente la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y el contenido acuoso, pero aumentó la opacidad y disminuyó la elongación y la resistencia a la rotura de las películas. A concentraciones de cera superiores las películas resultaron inhomogéneas. En películas con 7,5%P/V de cera, se logró disminuir significativamente WVP agregando un postcurado a 80°C. También se mejoraron sus propiedades mecánicas al bajar el contenido de glicerol (1,25%P/V), y al enfriar en hielo las emulsiones antes del secado. En todos los casos las ceras se encontraron cristalizadas.

Palabras claves: Películas comestibles, emulsiones, proteínas de soja, cera de abejas, permeabilidad al vapor de agua.

ABSTRACT

In this work, emulsion films obtained by mixing soy proteins and beeswax under different processing conditions, were studied. Films were obtained by casting of emulsions prepared with soy protein isolate (5%P/V) and glycerol (2.5%P/V), in combination with different amounts of waxes (range 0-25%P/V). Emulsions were homogenized with an Ultraturrax at 8000 rpm-5 minutes, and dried during 24 hours at 20°C followed by another 24 hours at 60°C. Increasing wax concentration up to 7.5%P/V produced a decrease of film water vapor permeability (WVP) and of water content. In addition there is an increase in film opacity, and a decrease in tension strength and elongation at break. Not homogeneous films were obtained with waxes concentrations higher than 7.5%P/V. WVP

of films prepared with wax 7.5%P/V was significantly improved when a post heating treatment at 80°C was performed. Mechanical properties were also enhanced by cooling the emulsion in ice before film casting and by reduction of glycerol concentration to 1.25%P/V. Crystallization of beeswax was observed in all films studied.

Key words: Edible films, emulsions, soy proteins, beeswax, water vapor permeability.

INTRODUCCIÓN

En general, as películas de proteínas presentan propiedades mecánicas moderadas y bajas permeabilidades al oxígeno, pero cuentan con la desventaja de tener una WVP alta (Gennadios y col. 1993 y 1994a; Krochta 1997). El mejoramiento de esta propiedad ampliaría su utilización en packaging de alimentos.

La formación de películas compuestas en base a proteínas - lípidos se muestra como una alternativa para mejorar la permeabilidad al vapor de agua de las películas proteicas (Kamper y Fennema 1985). Existen dos metodologías alternativas para la obtención de estas películas: la formación de bicapas y de películas emulsionadas. Estas últimas generan mayor interés a nivel industrial ya que necesitan un solo paso de secado en contraposición con los dos que precisan las bicapas, y que además, usadas como recubrimientos, pueden aplicarse a temperatura ambiente (Quezada Gallo y col. 2000).

En un estudio preliminar sobre formación de bicapas, se halló que la cera de abejas ofrecía las mejores condiciones de barrera, por lo que se eligió esta cera como material lipídico para la realización del presente trabajo (Kester y Fennema 1986).

En este trabajo se estudió la obtención de películas emulsionadas proteínas de soja-cera de abejas, con el objetivo de mejorar las propiedades de las películas proteicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Se utilizó un aislado de proteínas de soja comercial *Samprosoy 90EG*, *Bunge Alimentos*, glicerol *Andera (acs)* como agente plastificante, y dos ceras de abejas comerciales.

Formación de las películas. Las películas se formaron a partir de emulsiones de proteínas de soja-cera de abejas con un homogeneizador *Ultraturrax T-25*, *Janke & Kunel*, *IKA Labortechnik (IKA-Tron DZM5)*. Se ensayaron distintos tiempos y velocidades de homogeneización y condiciones de secado de las películas. Se formaron películas con distinto contenido de ceras (0-25%P/V), con distintas concentraciones de glicerol (0, 1,25, y 2,5%P/V), con el agregado de etapas de postcurado térmico de las películas y enfriamiento previo de las emulsiones.

Caracterización de las películas. Se determinó el contenido de agua de las películas según norma *ASTM D664-94*. La cristalinidad de las ceras se analizó por calorimetría diferencial de barrido (*Polymer Laboratories Rheometrics Scientific DSC*). La permeabilidad al vapor de agua se midió según las modificaciones a la norma *ASTM E96-80* (Gennadios y col. 1994b). Las propiedades mecánicas en tracción fueron determinadas de acuerdo a la norma *ASTM D882-91*, utilizando un *Texturómetro TA-XT2, Stable Micro Systems (Scarsdale NY)*. El color se determinó con un colorímetro *Minolta Chroma Meter (CR 300, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón)* según parámetros Hunter Lab, y el espesor con un calibre electrónico *Elcometer 350*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de formar películas emulsionadas homogéneas se analizaron distintas condiciones de procesamiento. En un principio se utilizaron emulsiones con concentraciones de cera inferiores al 5%, homogeneizadas a distintas velocidades: 8000, 9500 y 15000 rpm, y combinaciones de las mismas. Se observó que a menor velocidad se obtenían películas más homogéneas, con un menor contenido de burbujas y mejor distribución de la fase lipídica. Se estudiaron distintos tiempos de homogeneización a 8000 rpm: 1, 2, 3, 4, 5 y 10 minutos. Se seleccionó el tiempo de 5 minutos, ya que por debajo de éste no se lograba distribuir homogéneamente la cera, mientras que a 10 minutos aumentaba la aparición de burbujas. Las emulsiones se secaron a 20 y 60°C, siendo necesario secarlas durante 4 y 1 día respectivamente. Se llegó a una condición óptima de secado de 24 horas a 20°C seguidas de otras 24 horas a 60°C. La primera etapa es necesaria para liberar las burbujas presentes, y la segunda para minimizar el tiempo de secado y/o disminuir el contenido de agua (Perez-Gago y Krochta 2000 y 2001).

Con las condiciones de procesamiento elegidas anteriormente, se estudió el efecto del contenido de cera en la emulsión sobre las propiedades de las películas resultantes. Se trabajó con 0, 2,5, 5, 7,5, 10 y 25%P/V de cera de abejas. Se obtuvieron películas con un contenido máximo de 10% de cera, pero para esta última concentración las películas no resultaron totalmente homogéneas (Hagenmaier1997). Las de 25%P/V fueron imposibles de desmoldar.

En la Tabla 1 se muestran la permeabilidad al vapor de agua, el contenido de agua y los parámetros de color de las películas formadas. Se observa que, aunque la película con 10%P/V de cera presenta un valor similar al de la proteica, WVP disminuye al aumentar el contenido de cera, aunque en forma leve. Esto puede deberse probablemente a que las

moléculas de agua pueden atravesar la película a través de la fase continua (Krochta 1990). Cabe señalar que la película de proteínas fue sometida a las mismas condiciones de procesamiento que las emulsionadas. Resultados semejantes fueron obtenidos por otros autores (Martin-Polo y col. 1992; Debeaufort y Martin-Polo 1993). En la Tabla citada se observa también, lógicamente, que el contenido acuoso de las películas disminuye con el aumento de la concentración cerosa. Además, el agregado de ceras aumenta la opacidad (como lo demuestra la disminución del parámetro L), así como la coloración amarillenta (se incrementa b) de las películas. Esto se debe al color de la cera utilizada (Perez-Gago y Krochta 2001), ya que la misma se encuentra parcialmente cristalizada, lo cual fue comprobado por DSC (datos no mostrados).

Tabla 1: Caracterización de películas emulsionadas a partir de proteínas de soja con diferentes concentraciones de cera de abejas.

Película (% cera)	WVP (gr/(Pa*s*m))	Contenido de agua (%)	Color		
			L	a	b
0	$2,38 \cdot 10^{-10} \pm 1,34 \cdot 10^{-11}$	$32,86 \pm 1,96$	$93,49 \pm 0,56$	$- 6,82 \pm 0,52$	$16,09 \pm 2,66$
2.5	$1,92 \cdot 10^{-10} \pm 1,89 \cdot 10^{-11}$	$26,04 \pm 3,42$	$88,60 \pm 0,85$	$- 5,66 \pm 0,08$	$21,75 \pm 1,36$
5	$1,66 \cdot 10^{-10} \pm 3,50 \cdot 10^{-11}$	$25,14 \pm 1,03$	$88,72 \pm 0,87$	$- 5,64 \pm 0,08$	$21,75 \pm 1,36$
7.5	$1,34 \cdot 10^{-10} \pm 1,98 \cdot 10^{-11}$	$21,40 \pm 0,48$	$87,67 \pm 1,10$	$- 5,37 \pm 0,15$	$22,88 \pm 1,59$
10	$2,10 \cdot 10^{-10} \pm 2,50 \cdot 10^{-11}$	$19,25 \pm 0,29$	$87,76 \pm 0,57$	$- 5,86 \pm 0,06$	$25,51 \pm 1,27$

En la Figura 1 se muestran las propiedades mecánicas de estas películas. Tanto la elongación como la tensión a la rotura disminuyen con el aumento de la concentración de cera, aunque para la película con 2,5%P/V no se observó una variación significativa en la deformación respecto de la película proteica (Perez-Gago y Krochta 2001).

La disminución en la resistencia da indicios de que los lípidos podrían estar plastificando la matriz (Shellhammer y Krochta 1997), a pesar de no provocar un aumento en la elongación. Esto podría deberse a que pequeñas inhomogeneidades presentes en las películas compuestas podrían actuar como concentradores de tensiones, iniciando la ruptura temprana de las películas. Por esta razón, y para lograr mejorar sus propiedades mecánicas, se bajó la concentración de glicerol a 0 y 1,25%. Esto se realizó utilizando la película con 7,5%P/V de cera, ya que presentaba la mejor WVP de la serie analizada. Cabe aclarar también que la cera de abejas utilizada para los experimentos siguientes es de una partida diferente de la que se usó en los estudios anteriores. Si bien los valores de las propiedades estudiadas pueden no coincidir con los citados para películas similares, se comprobó, mediante ensayos realizados a tal fin, que se mantienen las tendencias observadas en las películas con diferentes concentraciones.

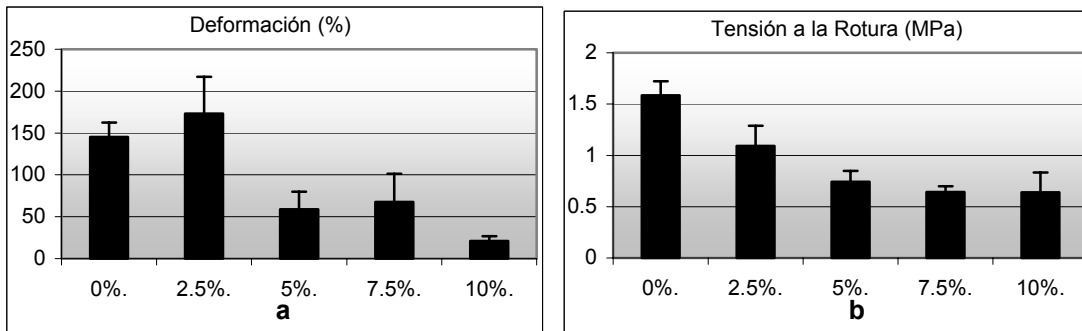


Figura 1: Propiedades mecánicas de películas emulsionadas a partir de diferentes concentraciones de cera de abejas: **a)** deformación a la rotura y **b)** resistencia a la rotura.

La película sin glicerol resultó tan frágil que no se pudo realizar una evaluación de sus características. En la Figura 2 se grafican las propiedades mecánicas de las películas obtenidas con 1,25%P/V de glicerol, además de otros tratamientos que se describirán más adelante. En ella se observa que esta película resultó más resistente que la película utilizada como patrón (7,5%P/V de cera y 2,5%P/V de glicerol), pero menos deformable ya que la elongación disminuyó a aproximadamente la mitad. En la Tabla 2 se observa que el menor contenido de plastificante disminuye, aunque levemente, la WVP, a pesar de que la cantidad de agua contenida en la película decrece notoriamente (Perez-Gago y Krochta 2000).

Con el objetivo de bajar WVP en las películas emulsionadas a valores similares a los obtenidos en películas bicapa, se buscaron otras alternativas para su obtención. Por un lado se realizó un postcurado de la película por 90 minutos a 80°C, mientras que por otra parte se sometió la emulsión (antes del secado) a un enfriamiento en un baño de agua-hielo (0°C) para inducir la cristalización rápida y, por ende, la formación de cristales pequeños. En la Figura 2 se observa que ambos tratamientos provocan un aumento en la tensión a la rotura respecto de la película patrón (siendo éste más importante para las películas formadas con las emulsiones enfriadas en hielo) y una disminución de la elongación, similar para ambas películas. Como se ve en la Tabla 2, el tratamiento a 80°C disminuyó más de tres veces la WVP de las películas, sin variar su contenido acuoso, respecto a la película tomada como referencia. Sin embargo, en las películas tratadas a 0°C, los valores de WVP no disminuyeron tanto como se esperaba, condiciéndose con el contenido de agua hallado en las mismas, el cual aumenta respecto de la película patrón.

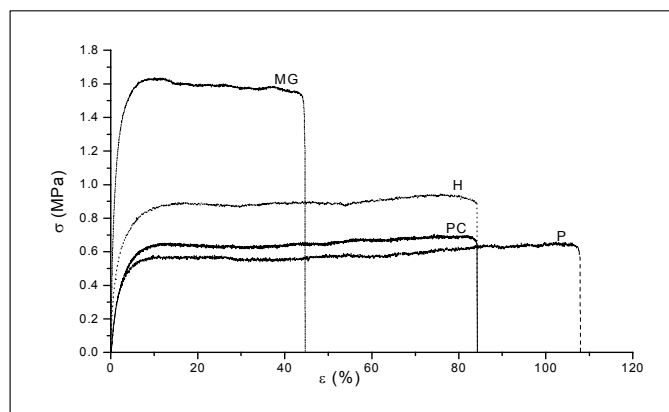


Figura 2: Curvas tensión – deformación de las películas emulsionadas proteínas de soja – cera de abejas, con 7,5%P/V de cera, y diferentes tratamientos de formación del film. ----- Película formada y secada en condiciones normales (2,5%P/V de glicerol). (P) ____ Película con tratamiento térmico de postcurado, a 80°C por 90 minutos. (PC) Película formada a partir de una emulsión previamente enfriada en hielo. (H) ...-- Película formada con 1,25% de glicerol. (MG)

Tabla 2: Caracterización de películas emulsionadas a partir de proteínas de soja con 7,5%P/V de cera de abejas y 2,5%P/V de glicerol (P), formadas a partir de una emulsión previamente enfriada en hielo (H), sometidas a un tratamiento térmico de postcurado a 80°C-90 minutos (PC), y formadas con 1,25% de glicerol (MG).

Película	WVP (gr/(Pa*s*m))	Contenido de agua (%)
P	$2,35 \cdot 10^{-10} \pm 3,22 \cdot 10^{-11}$	$20,30 \pm 0,85$
H	$1,49 \cdot 10^{-10} \pm 1,46 \cdot 10^{-11}$	$22,20 \pm 0,96$
PC	$6,39 \cdot 10^{-11} \pm 9,58 \cdot 10^{-13}$	$20,46 \pm 1,33$
MG	$1,58 \cdot 10^{-10} \pm 1,28 \cdot 10^{-11}$	$13,95 \pm 0,67$

CONCLUSIONES

Con las condiciones de procesamiento estudiadas se lograron obtener películas emulsionadas en base a proteínas de soja-cera de abejas homogéneas. Se observó que al aumentar el contenido de cera en la formulación disminuye ligeramente WVP y el contenido de agua, pero aumenta la opacidad y se empobrecen sus propiedades mecánicas. Se logró mejorar significativamente WVP con el tratamiento de postcurado en películas con un 7,5%P/V de cera, haciendo descender su valor más de tres veces, en relación con la película sin tratar.

BIBLIOGRAFÍA

- ASTM D644-94. 1994.** En Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. 1-2.
ASTM E96-80. 1989. En Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. 745-754.
ASTM D882-91. 1991. En Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. 182-190.

- Martin–Polo, M, Voilley, A, Blond, G, Colas, B, Mesnier, M y Floquet, N. 1992.** J. Agriculture and Food Chemistry. 40. 413-418.
- Shellhammer, Krochta, J. 1997.** J. Food Science. 62. 2. 390-394.
- Debeaufort, F y Martin–Polo, M. 1993.** J. Food Science. Vol. 58. 426-429, 434.
- Kamper, S y Fennema, O. 1985.** J. Food Science. 50. 382-384.
- Krochta, J. 1990.** En McCarthy, M, Saleeb, F y Whan, P (eds). Food Emulsions: Theory and practice. AICHE. New York, USA.
- Gennadios, A, Brandenburg, A, Weller, C y Testin, R. 1993.** J. Agric. and Food Chemistry. 41.1835-1839.
- Gennadios, A, McHugh, T, Weller, C y Krochta, J. 1994a.** En Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. Krochta, J, Baldwin, E y Nisperos-Carriedo, M (eds). Lancaster, USA. PA: Technomic Publishing Company, Inc. 201-277.
- Gennadios, A, Weller, C y Gooding, C. 1994b.** J. Food Engineering. 21. 395-409.
- Krochta, J. 1997.** En Food Proteins and Their Applications. Damodaran, S y Paraf, A (eds). Marcel Dekker, Inc. New Cork. 529-549.
- Hagenmaier, R. 1997.** J. Agric. and Food Chemistry. 45. 349-352.
- Quezada Gallo, J, Debeaufort, F, Callegarin, F y Voilley, A. 2000. J. Membral Science. 180. 37-46.
- Perez-Gago, M y Krochta, J. 2000.** J. Agric. and Food Chemistry. 48. 7. 2687-2692.
- Perez-Gago, M. y Krochta, J. 2001.** J. Agric. and Food Chemistry. 49. 2. 996-1002.
- Kester, J y Fennema, O. 1986. Food Technology. 40. 12. 47-58.

DESARROLLO DE UN ALIMENTO NUTRITIVO EN VERSIÓN CROCANTE Y FLEXIBLE

FIORENTINI CECILIA²; GIANNUZZI, LEDA² y GINER, SERGIO A.^{1,2,3}

¹ Investigador CICPBA. Lugar de trabajo ²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA)-Universidad Nacional de La Plata-CONICET. Calle 47 y 116 (B1900 AJJ) La Plata. TE/FAX: 0221 425 48 53. E- mail: saginer@ing.unlp.edu.ar. ³ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN

Se desarrollaron dos productos deshidratados nutricionalmente equilibrados, uno crocante (C) y otro flexible (F), nutricionalmente equilibrados. Como fuente principal de proteínas se utilizó el concentrado proteico (80%) de suero de queso, WPC 80, con bajo contenido de lactosa (7%). Para la formulación C, se empleó clara de huevo para generar una estructura porosa, que fue deshidratada hasta una aw de 0,25 para obtener textura crocante, vítrea, organolépticamente atractiva. La formulación flexible, fue adicionada con puré de manzana y azúcar, para formar un gel tipo azúcar-ácido-pectina al alcanzar la aw final de 0.70. Ambas formulaciones fueron diseñadas sobre la base de la contribución relativa de energía por los tres macro nutrientes principales: carbohidratos, 60%; proteínas, 15% y lípidos, 25%, siendo de 403 kcal el aporte energético de la formulación crocante y de 347 kcal para la flexible por 100 g de producto terminado. Las diferencias se deben principalmente al contenido de agua.

Palabras claves: alimento deshidratado, nutricionalmente equilibrado, nuevos alimentos.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop two dehydrated products nutritionally balanced, one crispy (C), the other, flexible (F). It was used as main protein source, whey protein concentrate (80%), WPC 80, with low lactose content (7%). In formulation C, egg white was used to create a porous structure that was dehydrated up to aw = 0.25 to obtain a crispy, porous, glassy texture with organoleptic appeal. The flexible formulation was developed by adding applesauce plus sucrose to form a pectin-acid-sugar gel on reaching aw = 0.7. Both formulations were designed based on the relative contribution of energy by the three main macronutrients: carbohydrates, 60%; proteins, 15% and lipids, 25%. The crispy product provides 403 kcal/100 g, while the flexible, 347 kcal/100g. Differences are mainly attributed to the different final water content.

INTRODUCCIÓN

Las formulaciones que poseen una composición nutricional equilibrada y que resulten organolépticamente aceptables y almacenables sin cadena de frío resultan de interés social. Un alimento nutricionalmente equilibrado cumple con el criterio que para una ingesta diaria de 2000 kcal, el 50-60% del aporte energético deba cubrirse con carbohidratos, 10 -15% por proteínas y 25 -35% por los lípidos (López y Suárez, 2000).

Las proteínas del concentrado de proteínas de suero de queso así como las de la clara de huevo presentan un alto valor biológico. El WPC 35 Y WPC 40 que son habituales en el mercado, presentan alto contenido en lactosa (Fennema, 1996) de difícil asimilación, y los hace poco apropiados como alimento social. Recientemente, se han presentado WPC con un 80% de proteínas (WPC 80) que sólo contienen 7% de lactosa, y son adecuados. A su vez, las frutas como las manzanas constituyen un importante aporte de vitaminas, minerales y fibra para el desarrollo de un nuevo alimento. Las formulaciones flexibles requieren de una gelificación durante el secado. El mecanismo usado aquí emplea pectinas con azúcar en medio ácido, que estabiliza un gel atractivo a bajos contenidos acuosos. En el caso de la formulación crocante, el objetivo es estabilizar una estructura porosa a bajos niveles de a_w

El objetivo de este trabajo fue desarrollar dos productos deshidratados, en dos texturas diferentes, nutricionalmente equilibrados, cada uno de una sola pieza, para ser utilizados por instituciones de asistencia social directa, sin necesidad de requerir cadena de frío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de los productos la selección de los ingredientes se basó en el valor biológico de la fuente de proteínas: I) concentrado de proteínas de suero de queso (WPC 80), y II) clara de huevo. Otros ingredientes utilizados fueron: puré de manzanas, almidón de maíz, azúcar y aceite de girasol de alto oleico, que aportan carbohidratos rápidamente asimilables, fibras, vitaminas, minerales, y ácidos grasos esenciales.

Cálculo de las masas de los ingredientes para las formulaciones

Partiendo de un requerimiento energético de hidratos de carbono (50-60% de la energía necesaria), proteínas (10-15%) y lípidos (25-35%). Para una dieta de 2000 kcal (8400 kJ) y conociendo los aportes energéticos nominales de estos macro nutrientes (4 kcal, 4 kcal y 9 kcal por gramo, respectivamente), las cantidades necesarias se calculan en 300 g de carbohidratos, 75 g de proteínas y 55 g de lípidos (FAO/OMS, 2003). Como los macro nutrientes no se presentan puros, los masas de los ingredientes que los contienen se

calculan mediante balances de materia de componentes aplicados a estos macro nutrientes, siguiendo un método general (Himmelblau, 1998).

Siendo tres las incógnitas, se obtiene siempre un sistema de tres ecuaciones lineales, que fue codificado y resuelto en lenguaje Matlab 6.1.

$$m_{I1} X_{HCl1} + m_{I2} X_{HCl2} + m_{I3} X_{HCl3} = 300$$

$$m_{I1} X_{PI1} + m_{I2} X_{PI2} + m_{I3} X_{PI3} = 75$$

$$m_{I1} X_{LI1} + m_{I2} X_{LI2} + m_{I3} X_{LI3} = 55$$

donde m_{I1} , m_{I2} y m_{I3} son las masas de los ingredientes utilizados para la formulación, mientras que X_{HCl} , X_{PI} , X_{LI} son las fracciones másicas (sobre base húmeda) de los macro nutrientes en cada uno de los ingredientes utilizados (Gebhardt, 2002). Este procedimiento fue empleado para las formulaciones flexible y crocante y los resultados se muestran en los diagramas de las Figuras 1 y 2.

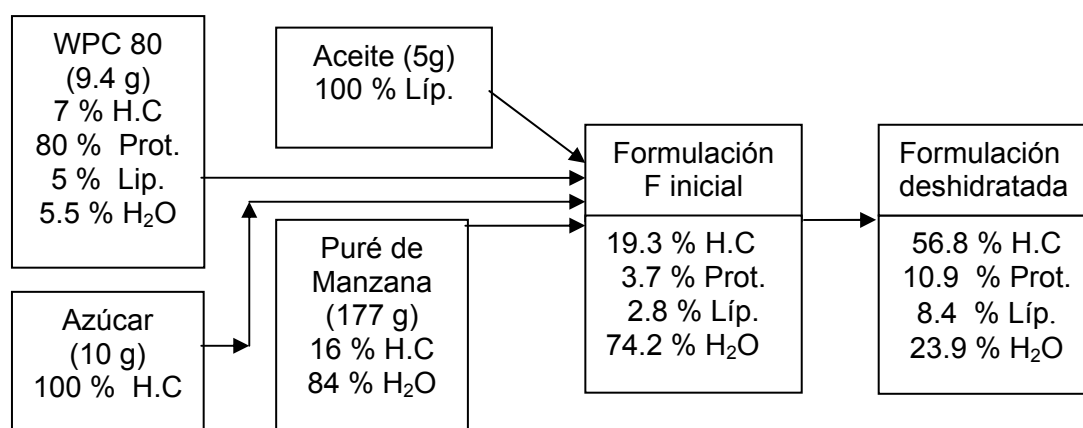


Figura 1: Composición de cada uno de los ingredientes para la formulación Flexible.

Preparación de las formulaciones y deshidratación:

Se ensayaron dos formulaciones: una crocante (C) y otra flexible (F). Para la primera se espumó la clara con aire empleando una homogeneizadora de 400 W, hasta lograr el punto nieve (5-6 min.). Luego se mezcló con el resto de los ingredientes (ver Fig. 1 y 2): WPC 80, almidón de maíz y azúcar, previamente homogeneizados con agua y aceite. Para la elaboración de la formulación F se utilizó puré de manzana (var. Granny Smith) escaldado, al que se le incorporó WPC 80, azúcar y aceite en las proporciones ya indicadas. La formulación inicial F fue ubicada en placas de Petri (de 14 cm de diámetro) abiertas, con rocío vegetal en la base para evitar adherencias durante el secado. El

secado se realizó en estufa de convección forzada, con temperatura controlada automáticamente a 60 °C. La forma final resulta en un laminado de geometría circular. Las muestras iniciales de la formulación C se preformaron aproximadamente cónicas, más pequeñas, para reducir el tiempo de secado. Las muestras se deshidrataron hasta obtener los contenidos de humedad predeterminados, sea para lograr estabilidad microbiana (formulación F) o conferir crocancia (formulación C).

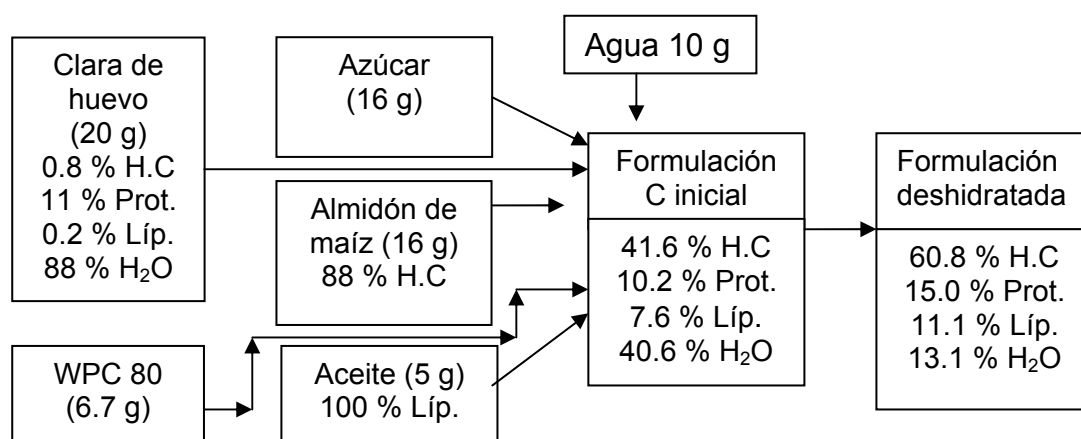


Figura 2: Composición de cada uno de los ingredientes para la formulación Crocante.

En función del tiempo de deshidratación se midió la humedad en base seca al tiempo t (W), conociendo la masa a ese tiempo (m), por balanza de precisión, y la masa y humedad iniciales (m_0 y W_0 , respectivamente), por diferencia de pesada. La expresión

siguiente parte de considerar la masa seca constante $W = \frac{m}{m_0}(1 + W_0) - 1$

La actividad acuosa se midió luego de 24 h (para permitir equilibrar la humedad en la muestra) sobre la muestra deshidratada en un equipo de Aqualab 3 TE. El contenido de humedad inicial se determinó a 105°C hasta peso constante en balanza analítica. Durante los dos meses de almacenamiento del producto en envase hermético a temperatura ambiente se realizaron determinaciones de color cada 15 días a ambas formulaciones midiendo los parámetros triestímulo L^* , a^* y b^* de la escala CIE utilizando un Colorímetro. La variación del color fue estudiada mediante el parámetro de cambio de color total

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} .$$

donde ΔL^* , Δa^* , Δb^* son las diferencias de los parámetros L , a y b , respecto de los valores iniciales respectivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3 y 4 muestra las fotos de los productos logrados en versión crocante y flexible, respectivamente. La formulación C logró estabilizar una estructura porosa, ya que la velocidad de encogimiento se redujo al final del proceso debido a la forma rígida que toma el producto. Esto favorece la estabilización de la estructura porosa antes de producirse el colapso estructural. El producto de la Figura 4 es el resultado de la gelificación azúcar-ácido pectina (Moreno Semhan y col., 2004) que se produce aún en presencia del concentrado de proteínas de suero, lo cual constituye un desarrollo original para este trabajo de deshidratación a 60 °C.



Figura 3: Alimento crocante



Figura 4: Alimento flexible.

En la Tabla 1 y 2 se presenta la distribución del aporte calórico de los nutrientes de cada una de las formulaciones, logrado en base a los criterios descritos en Materiales y Métodos. La formulación crocante presenta un aporte energético de 403 kcal (1685 kJ) por 100 g de producto terminado, mientras que la misma masa de formulación flexible, 347 kcal (1450 kJ). Las diferencias obedecen mayormente a los diferentes contenidos de humedad finales, que fueron de 0.31 (F) y 0.15 dec., b.s. (C).

Tabla 1: Distribución calórica cada 100 g de la formulación Crocante.

	H.Carbono	Proteínas	Lípidos
kcal /nutr	243.96	60.06	99.67
%	60.43	14.88	24.69

Tabla 2: Distribución calórica cada 100 g de la formulación Flexible.

	H.Carbono	Proteínas	Lípidos
kcal /nutr	227.37	43.86	75.46
%	65.52	12.65	21.77

Curvas de secado

La Figura 5 muestra las curvas de secado de las formulaciones F y C cuyos tiempos de secado se extendieron por 9 h y 3 h.

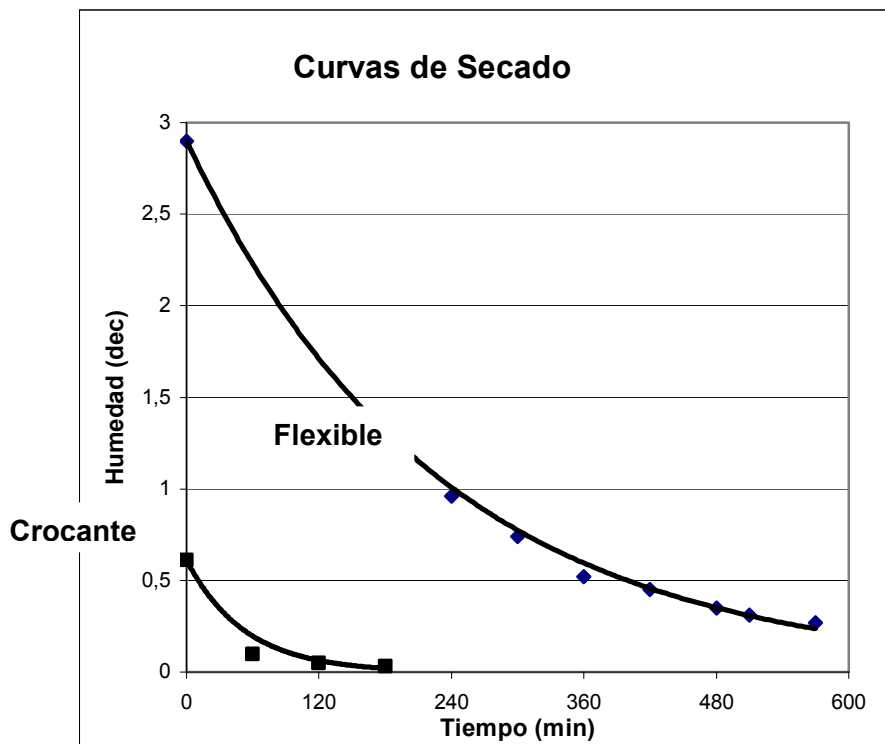


Figura 5: Curvas de secado de la formulación Flexible y Crocante a 60°C. Datos experimentales y predicciones de expresiones cinéticas difusivas.

Se observa un secado a velocidad decreciente, que fue interpretado por las cinéticas simplificadas siguientes, derivadas de la solución analítica para difusión de materia no estacionaria.

$$W = W_0 \exp(-k_s t)$$

Para la formulación crocante, k_s , coeficiente cinético, fue de 0.0189 min^{-1} , con un $W_0 = 0.61$ dec., b.s. El coeficiente de determinación, r^2 fue de 0.865. En el caso de la flexible, $k_s = 0.0044 \text{ min}^{-1}$ para un $W_0 = 2.9$ dec., b.s. Dado que k_s compone efectos difusivos y geométricos, los valores indican que las piezas de la formulación C secan efectivamente más rápido, posiblemente por su estructura porosa y su menor tamaño relativo a la dimensión característica de la formulación C. En estas condiciones partiendo de dimensiones iniciales de 6 mm para el laminado flexible y 8 mm (promedio) para la formulación a deshidratar hasta crocancia, el encogimiento determina dimensiones finales aproximadas de 2 y 6 mm, respectivamente.

Las correlaciones preliminares obtenidas no incluyen información sorcional por inexistencia de datos al presente para esta formulación. Los productos C y F presentaron valores de a_w de 0.25 y 0.67. El producto crocante está en la zona de estabilidad máxima (Fennema, 1996).

Calidad en el almacenamiento

Las determinaciones de color en el laminado flexible deshidratado, mostraron cambios de 10 unidades ($\Delta E = 10$) a los 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20 °C) Figura 6. Esto puede deberse a las reacciones de pardeamiento no enzimático del puré de manzana dado que el pardeamiento enzimático se considera inhibido por el escaldado. El oscurecimiento observado determina la vida útil del producto desde un punto de vista organoléptico, puesto que el alimento mantuvo su estabilidad microbiana. La determinación de color de la formulación C mediante el parámetro ΔE , mostró una variación de color de 3 unidades luego de 60 días, indicando un buen mantenimiento del color, lo que coincide con la observación visual.

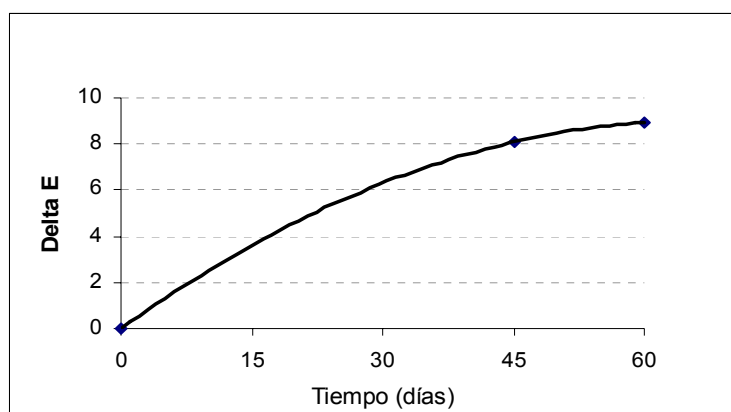


Figura 6: Variación de color de la Formulación F mediante el parámetro ΔE durante el almacenamiento.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron productos nutricionalmente equilibrados en los macro nutrientes principales, de acuerdo al criterio FAO/OMS, con textura flexible por la gelificación azúcar-ácido-pectina, incorporando proteínas de suero de queso con bajo contenido de lactosa, a $a_w = 0,67$. También se obtuvo una formulación crocante, que con un $a_w = 0,25$ estabiliza una estructura porosa promovida por la combinación de proteínas de suero de queso y clara de huevo emulsionada a punto nieve antes de deshidratar a 60°C. Ambas formulaciones incorporan aceite de girasol y pueden utilizarse como alimento de emergencia por instituciones de ayuda social directa dado que pueden almacenarse sin cadena de frío.

Los productos presentaron un aspecto aceptable y en cuanto a sus características organolépticas un sabor y aroma agradable. Siendo para el crocante similar al de la leche y para el flexible al de la manzana.

Los trabajos deben continuar para preservar el color inicial de la formulación flexible durante un mayor tiempo de almacenamiento.

BIBLIOGRAFIA

FAO/OMS (2003) . Valores diarios de Referencia para dietas.

Fennema O. R. (1996), Food Chemistry, Third Ed. Marcel Dekker, Inc. NY.

Gebhardt, S. E. and Thomas R. G. (2002) Nutritive Value of Foods. USDA A.R.S. Home and garden Bulletin 72. Nutrient data laboratory Beltsville, ML.

Himmelblau, D. (1998) Balances de materia y energía, Prentice Hall, Cuarta Edición.

López L.B., Suárez M.M. (2000) Fundamentos de la Nutrición Normal, El Ateneo.

Moreno Semhan, D.; Albertario, M.E. and Giner, S.A. (2004) .Dehydration of Apple and Tomato Purees into Flexible Laminates. Heat and Mass Transfer Studies and Product Characteristics. *Drying 2004* – Proceedings of the 14th IDS (IDS 2004) São Paulo, Brazil, vol. C, pp. 1751-1758

AGRADECIMIENTOS

-A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por la financiación del Proyecto PICT 2002 09-12196.

-A la Universidad Nacional de La Plata, que financió el proyecto de Extensión Universitaria “Desarrollo de Alimentos Deshidratados Nutricionalmente Equilibrados.

-A la Comisión de Investigaciones Científicas, CICPBA, por el respaldo permanente.

Al CIDCA y al CONICET, por el apoyo brindado.

CONSERVACIÓN DE LAMINADOS DESHIDRATADO Y SEMIDESHIDRATADOS DE MANZANA MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FACTORES COMBINADOS.

LEIVA DIAZ EVANGELINA²; GIANNUZZI LEDA² y GINER SERGIO A.^{1,2,3}

¹Investigador CICIPBA. Lugar de trabajo ²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Universidad Nacional de La Plata-CONICET. Calle 47 y 116, (1900). La Plata. TE: 0221 425-4853. E-mail: saginer@ing.unlp.edu.ar. ³Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN

Se evaluó la calidad de los laminados deshidratados y semideshidratados de manzana (color, análisis microbiológicos) durante el almacenamiento a 25 y 10°C con y sin agregado de sorbato de potasio. El laminado semideshidratado se secó durante 330 minutos hasta humedad de 0.6 decimal en base seca (dec. b.s.), siendo su vida útil de 10 y 30 días a 25 y 10°C respectivamente. Al agregar el conservante la vida útil se extendió hasta 30 y 60 días a 25 y 10°C respectivamente. La adición de conservante y el almacenamiento refrigerado en forma conjunta extendió la vida útil del producto cuatro veces respecto del preparado sin conservante y almacenado a temperatura ambiente. El laminado deshidratado, sin conservante, se secó durante 500 minutos hasta una humedad final de 0,26 dec.b.s. Su vida útil fue de 180 días a temperatura ambiente y 270 días bajo refrigeración. Los productos tuvieron muy buena aceptabilidad por el panel sensorial.

Palabras claves: deshidratados, semideshidratados, factores combinados, manzanas, sorbato de potasio, refrigeración

ABSTRACT

In this work, the quality of dehydrated and partially dehydrated apple "laminates" was evaluated (color, microbiological tests) during storage at 10 and 25°C with and without preservative (potassium sorbate) addition. The partially dehydrated laminate took 330 min to dry up to final moisture of 0.6 decimal dry basis (dec. d.b.), its shelf life being of 10 days at 25°C and of 30 days at 10°C, respectively. On adding the preservative, shelf life extended to 30 days at 25°C and 60 days at 10°C. Combined factors as preservative addition and refrigerated storage stretched shelf life four times compared with the untreated product. Concerning the dehydrated laminate, it was dried for 500 min up to final moisture of 0.26 dec.d.b, being its shelf life of 180 days at room temperature and of 270

days in refrigerated storage. All products scored high in acceptability tests by no trained consumers.

Keywords: Dehydrated laminated, apple, partially dehydrated laminates, food drying

INTRODUCCIÓN

Los principales métodos de conservación de alimentos, están basados en su efecto sobre los microorganismos. Existen tecnologías de factores combinados o de barreras (Efecto Hurdle) cuya base está constituida por una combinación de factores que actúan sinérgicamente y evitan la aplicación de un solo factor en forma severa, mejorando la calidad. Entre los factores, el sorbato de potasio ha sido utilizado en la industria de los alimentos como antimicrobiano no tóxico. La combinación de factores como la eliminación parcial de agua en un producto de fruta, almacenamiento refrigerado, conservantes y acidificación, es una tecnología poco estudiada (Alzamora, 1997).

El proceso tecnológico descrito aquí permite obtener un producto flexible en forma de láminas deshidratado o semideshidratado. El primero puede ser almacenado a temperatura ambiente sin presentar riesgos para el consumidor.

La obtención de alimentos laminados por deshidratación es novedosa en nuestro país. Utiliza la deshidratación como factor de preservación y etapa de formación del producto y expande las posibilidades del sistema de secado con aire caliente para crear nuevas estructuras de alimento, basadas en la gelificación azúcar-ácido-pectina.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de factores combinados sobre la calidad de los laminados deshidratados y semideshidratados de manzanas a 25°C y 10°C con y sin agregado de sorbato de potasio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó puré de manzanas con 18% azúcar y 3% jugo de limón (Bardoni y col, 2005) con y sin agregado de 500 ppm. de sorbato de potasio en la formulación inicial (CAA, 2004).

Para ello las manzanas (Granny Smith) fueron lavadas, cortadas en cubos, y escaldadas durante 8 minutos. Se adicionó y homogeneizó el resto de los ingredientes y se secó la preparación semifluida a 60°C en bandejas con un espesor inicial de 6 mm, utilizando una estufa de convección forzada, hasta el punto de gelificación. Se obtuvieron tres productos: laminados deshidratados (LD), laminados semideshidratados con Sorbato de Potasio (LSDS) y laminados semideshidratados sin Sorbato de Potasio (LSD). Posteriormente los laminados se envasaron en películas de polietileno.

Caracterización de los productos finales. Se determinó humedad, a_w y el pH en las muestras al inicio y durante la deshidratación. Como complemento de la caracterización de los mismos se realizó un análisis de textura y un análisis sensorial.

Contenido de humedad. Se determinó a 105°C en estufa atmosférica.

Actividad acuosa. Se utilizó un equipo Aqualab 3TE de punto de rocío.

pH. Se midió con un electrodo de pH modelo 50215 Hach, Loveland, USA

Análisis sensorial

Test triangular de diferencia. Cuarenta panelistas no entrenados evaluaron diferencias de sabor por presencia o ausencia de sorbato de potasio.

Test de preferencia. Cuarenta panelistas evaluaron preferencias por aspecto general, color, sabor y textura en los deshidratados y semi. Se utilizó una escala hedónica de cinco puntos. Los panelistas seleccionaron luego una de las dos muestras por comparación directa. Se realizó el ensayo estadístico de Fischer y la t de Student para comparación de medias de los atributos evaluados en las dos muestras.

Textura. Se realizó un ensayo de compresión en dos ciclos con un texturómetro TXT-2a. Se midió dureza, adhesividad, gomosidad, elasticidad y masticabilidad.

Color. Se determinaron en LD, LSDS y LSD durante el almacenamiento a 10° C y 25° C, con un colorímetro Minolta CR-300 los parámetros L*: luminosidad, a* y b*, cromaticidad. Se utilizó la función $\Delta E = ((\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2})$ para cuantificar las variaciones respecto del estado inicial.

Ensayos microbiológicos y vida útil. Durante el almacenamiento, se tomaron 8 g de muestras de laminados y se homogeneizaron con 80 ml. de peptona 0,1% en Stomacher durante 60 segundos. Se sembraron diluciones seriadas por duplicado en placas de YGC, para recuento de hongos y levaduras (5 días a 30°C). También se determinó la presencia o ausencia de patógenos: *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* al final del almacenamiento, según métodos de la AOAC (1984). La vida útil se definió como el tiempo requerido para que el recuento de hongos y levaduras alcance valores de 10^6 UFC/g, con ausencia de patógenos o que la variación de color ΔE alcance un valor de 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se definió como laminado deshidratado aquel con $a_w = 0,7$, humedad = 0,27 b.s. o 21,4% b.h. y semideshidratado aquel con 0,6 b.s. o 37,5% b.h y $a_w = 0.85$. Se obtuvieron productos gelificados con suficiente resistencia mecánica y estructura flexible.

Curvas de secado. La Fig. 1 muestra la curva de secado para el producto laminado deshidratado de manzana, que tiene lugar en el período de velocidad decreciente. Se interpretó con $W(t) = W_0 \exp(-k \cdot t)$; donde $W(t)$ es la humedad dec., b.s. al tiempo t ; k es el coeficiente de secado del producto y W_0 es la humedad inicial. El tiempo de secado fue de 500 minutos.

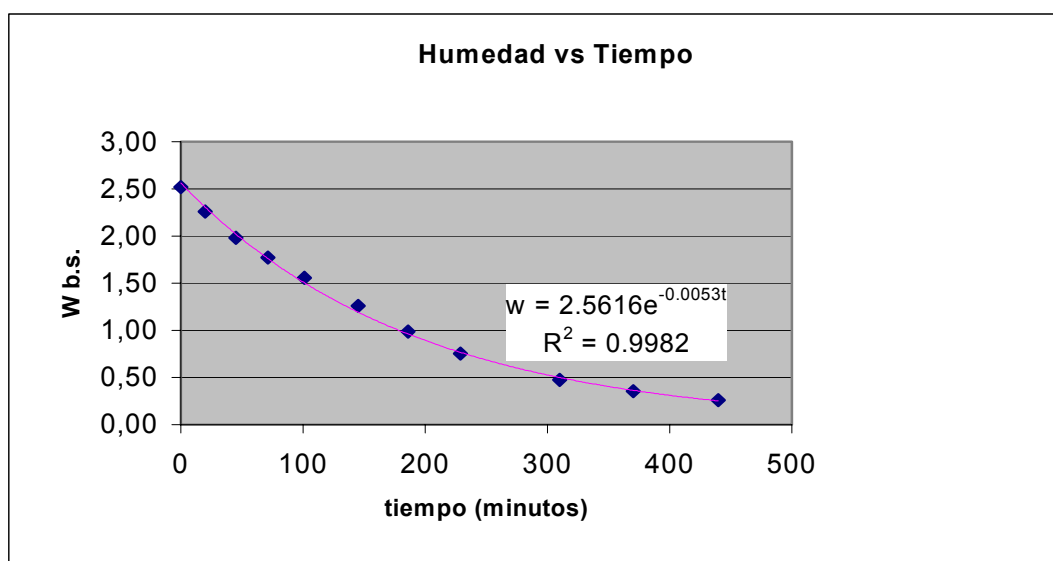


Fig.1. Curva de secado del producto Laminado Deshidratado

En la Fig. 2 se representó la humedad de la muestra en función del tiempo, para semideshidratados. Aquí, el tiempo de secado fue de 330 minutos, bastante más corto que para laminados deshidratados. La ecuación utilizada fue la misma y los parámetros se indican en el gráfico. No se utilizaron datos sorcionales en la ecuación debido a la ausencia de datos experimentales.

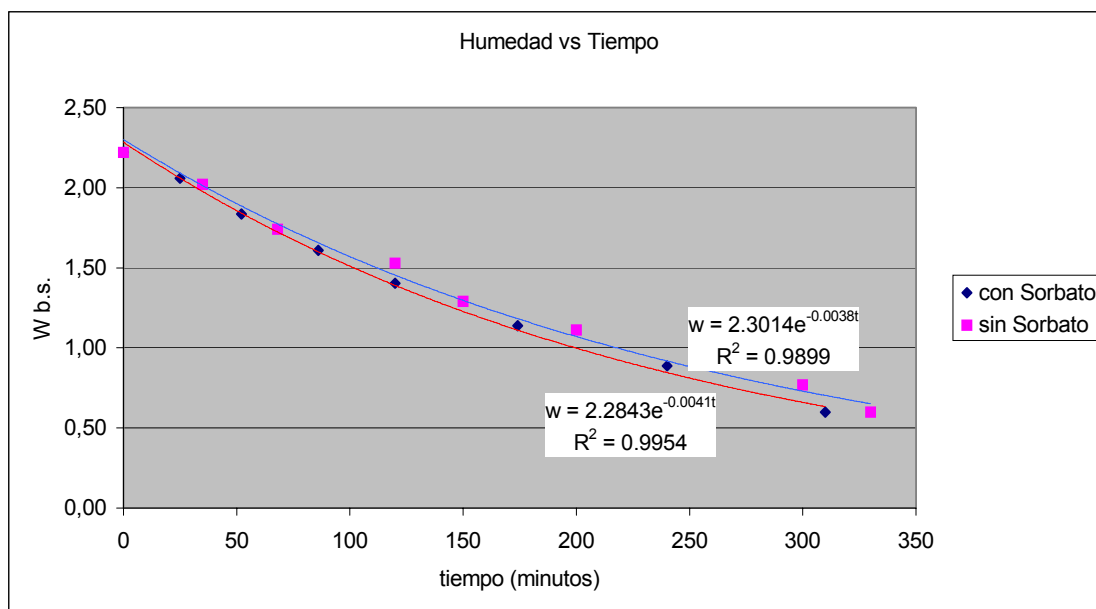


Fig. 2. Curvas de secado correspondientes a laminados semideshidratados de Manzanas con y sin agregado de sorbato de potasio

En la Tabla 1 se indican los valores de pH, a_w y Humedad en base seca, de los distintos productos finales: LD, LSDS y LSD. Los dos productos semideshidratados tuvieron a_w similar (0,85) que impide el desarrollo de patógenos, si bien no limita hongos y levaduras. El a_w del deshidratado fue menor a 0,7, para estabilidad microbiana.

Tabla 1. PH, a_w y Humedad en base seca para laminado deshidratado (L.D.), Laminado Semideshidratado con sorbato de potasio (LSDS) y Laminado Semideshidratado sin sorbato de potasio (LSD)

Producto	pH	a_w	Humedad (bs)
LSDS	3.15	0.853 a 25,4°C	0.6048
LSD	3.20	0.854 a 25,6°C	0.6028
LD	3.40	0.692 a 25,5°C	0.2697

Textura de los laminados. En la Tabla 2, los valores de dureza del laminado deshidratado fueron mayores que la de los semideshidratados, posiblemente por su menor contenido

de agua. El deshidratado presentó mayor gomosidad, adhesividad y masticabilidad. Las elasticidades no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Panel sensorial. (Fig. 3) El test triangular de diferencia no dió significativo al 95%, ($p = 1/3$) para las muestras de semideshidratados con y sin conservante.

Tabla 2. Perfil de textura para los laminados deshidratados y semideshidratados de fruta.

Producto final	Dureza (N)	Adhesividad (N*s)	Elasticidad (mm)	Cohesividad	Gomosidad (N)	Masticabilidad (N*mm)
L. D.	14.587	-2.597	0.112	1.525	22.342	2.536
LSD y LSDS	2.144	-0.026	0.111	1.242	2.677	0.301



Fig. 3. Foto del panel sensorial

El test de preferencia se realizó solamente con LD (Fig. 4) y LSD porque no se detectaron diferencias al adicionar conservante.



Fig. 4. Laminado deshidratado de manzana

En las Tablas 3 y 4 se observa el puntaje obtenido para los diferentes atributos y su desviación estándar. En el análisis estadístico de los datos no se observan diferencias significativas en cuanto a las preferencias por el color, el sabor, la textura o el aspecto general en las muestras (con un nivel de confianza de 95%). A pesar de la alta aceptabilidad de ambos, el 60% de los panelistas eligió los LSD.

En los laminados deshidratados, las preferencias se centraron en el sabor, color y la textura y en los semideshidratados predominó el sabor, luego la textura y por último el aspecto general.

Tabla 3. Valores de los atributos para el laminado semideshidratado

	ASPECTO GRAL	SABOR	COLOR	TEXTURA
Media	3.78	4.25	3.84	3.97
Desviación Estándar	0.66	0.67	0.77	0.90
Media Gral		3.96		

Tabla 4. Valores de los atributos para el laminado deshidratado

	ASPECTO GRAL	SABOR	COLOR	TEXTURA
Media	4.06	3.97	4.13	4.00
Desviación Estándar	0.76	0.74	0.83	0.92
Media Gral			4.04	

Almacenamiento de los laminados

Análisis del color superficial. Tomando el valor de ΔE como indicador en LD, LSD y LSDS, el pardeamiento no enzimático se acentúa con el tiempo, siendo mas pronunciado para los laminados almacenados a temperatura ambiente. A temperatura ambiente, la variación de color fue ligeramente mayor en el LSDS (con sorbato) comparada con la de LSD, pero bajo refrigeración no hubo diferencias.

Mediante ANOVA aplicado al diseño trifactorial con replicados, se concluyó que la temperatura y los días de almacenamiento influyen significativamente en la variación de a^* y b^* ($p < 0,05$) y sólo los días de almacenamiento en el aumento de L^* ($p < 0,05$).

Análisis microbiológico y vida útil. La vida útil de los laminados semideshidratados sin sorbato de potasio, fue de 10 y 30 días a 25 y 10°C. Los recuentos de hongos y levaduras fueron menores a 10^6 UFC/g. Para los laminados semideshidratados con sorbato de potasio, la vida útil fue de 30 y 60 días a 25 y 10°C. En el caso del producto deshidratado

bajo refrigeración la vida útil fue de 180 días a temperatura ambiente y 270 días con refrigeración. Los recuentos de hongos y levaduras fueron entre 10^2 y 10^3 UFC/g.

No se observó desarrollo de patógenos al final del almacenamiento en ningún caso

CONCLUSIONES

La deshidratación con aire caliente durante 330 minutos logró obtener un laminado semideshidratado con una humedad final de 0.6 dec., b.s. y $a_w = 0,85$ siendo su vida útil sin agregado de conservante de 30 días bajo refrigeración y de 10 días a temperatura ambiente. El producto con sorbato de potasio duró 30 días a temperatura ambiente (T_{amb}) y 60 días refrigerado. La aplicación conjunta de conservante y almacenamiento refrigerado extendió la vida útil del producto cuatro veces.

El secado con aire caliente por 500 min produjo un laminado deshidratado de 0.26 dec. b.s. de humedad y $a_w = 0,7$. Su vida útil fue de 180 días a T_{amb} y 270 días con refrigeración, sin conservante.

Los panelistas no detectaron el conservante en semideshidratados. Laminados deshidratados y semideshidratados tuvieron alta aceptabilidad por panel sensorial.

AGRADECIMIENTOS

-A la Dra. Alicia Chaves, por sus sugerencias y asistencia en el análisis estadístico.

-A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por la financiación del Proyecto PICT 2002 09-12196.

-A la Comisión de Investigaciones Científicas, CICPBA, por el respaldo permanente.

-Al CIDCA y al CONICET por el apoyo brindado.

BIBLIOGRAFÍA

Alzamora, S. M. *Preservación I: Alimentos conservados por factores combinados*, CYTED: Temas en tecnología de alimentos, Vol. 1, pp. 45 - 88, Instituto Politécnico Nacional, 1997.

AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*, 14th Edn. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Bardoni, N.; Giannuzzi, L. y Giner, S.A. (2005) *Development of apple pectic gels (laminates) by air dehydration*. *Enviado J. Food Eng.*

Código Alimentario Argentino actualizado, *Alimentos azucarados*, Cap. X, De la Canal y asociados, 2004

FORMACION DE GELES PECTICOS DE MANZANA (LAMINADOS) POR DESHIDRATACION CON AIRE CALIENTE: PARAMETROS DE CARACTERIZACION

LEIVA DIAZ², E. ; MARTINO², V.P.; GIANNUZZI², L. y GINER^{1,2,3}, S.A.

¹Investigador CICPBA. Lugar de trabajo ²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). Universidad Nacional de La Plata-CONICET. Calle 47 y 116, (1900). La Plata. TE: 0221 425-4853. E-mail: saginer@ing.unlp.edu.ar. ³Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN

Se estudiaron propiedades del laminado deshidratado de manzana. El producto se obtiene a partir de un puré de manzanas peladas, escaldadas y luego homogeneizadas con 18%p/p de sacarosa añadida y 3% de jugo de limón. Se preforma como lámina de 6 mm de espesor inicial y se deshidrata a 60°C en estufa de circulación forzada, gelificándose mientras se seca. La a_w final fue de 0,7, con una humedad de 0,25 en base seca y un espesor final de 2mm, luego de 500min. Se midió la densidad en el rango de humedades y se interpretó con un modelo donde la disminución de volumen del sólido se asumió igual al volumen de agua removida. Se determinaron isothermas sorcionales, observándose un incremento exponencial de la humedad al crecer a_w . La presencia de azúcares revirtió la dependencia esperable de las isothermas con la temperatura. La difusividad efectiva (D_{eff}) del agua dependió inversamente del espesor (d) del laminado al cuadrado.

Palabras claves: deshidratados, geles pécticos, densidad, isothermas, difusividad, laminados de manzana

ABSTRACT

Physical properties of dehydrated apple laminates were studied. The product is developed from peeled apple puree, blanched and then homogenized with 18%w/w added sucrose and 3% lemon juice. The formulation is shaped as a layer 6 mm thick and dehydrated at 60°C in mechanical circulation oven, while the product gel. Final a_w was 0,7, with a moisture content of 0.25 dry basis and final thickness of 2mm. The drying time was 500min. Density was measured in the moisture range and the data was predicted with a model assuming that shrinkage (volume reduction in the product) was equal to the volume of water removed. Sorption isotherms were determined, to observe that moisture increases exponentially for increasing a_w . Presence of sugars reverted the expected trend

of sorption data with temperature. The effective diffusivity of water (D_{eff}) was considered to depend on the reciprocal of laminate thickness squared.

Keywords: dehydrated laminates, pectic gels, apple, density, sorption isotherms, effective diffusivity

INTRODUCCIÓN

La obtención de alimentos en forma de láminas flexibles mediante deshidratación es un método novedoso. La caracterización de los parámetros físico-químicos en alimentos recientemente desarrollados es una herramienta muy importante, porque revela información útil para predecir cambios en la estabilidad del producto y desarrollar mejoras en la formulación, secado, envasado y almacenamiento (Ayranci y col., 1990).

El análisis de los procesos que influyen en la estabilidad física, bioquímica y microbiológica de los alimentos, los cuales determinan su calidad, está basada ampliamente en las isothermas de sorción de cada producto, que relacionan el contenido de humedad con la a_w (Tsami y col., 1990). Esto es especialmente útil en alimentos azucarados, donde la funcionalidad de las isothermas está poco estudiada.

El objetivo del trabajo fue determinar y modelar la densidad en función de la humedad, las isothermas de sorción del producto a varias temperaturas e interpretar curvas de secado para evaluar la difusividad efectiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se preseleccionó una formulación con 18% p/p de sacarosa añadida y un pH de 3,5, que se logra con el agregado de 3% de jugo de limón. La humedad inicial fue de W_0 2,29 decimal en base seca (dec. b.s.), con $a_w = 0,967$. Las manzanas (Granny Smith) fueron lavadas, cortadas en cubos, escaldadas durante 8 minutos y homogeneizadas con el resto de los ingredientes. Al inicio y durante cada corrida de secado se extrajeron muestras para determinar las distintas propiedades físico-químicas en función de los valores de humedad a medida que se incrementó el tiempo de secado.

Contenido de humedad y pH

Se utilizó la técnica de determinación de sólidos totales en frutas y productos a base de frutas de la AOAC (1980, 22.013). Las muestras (peso inicial 5-10g.), preparadas según técnica 22.008 (c) fueron ubicadas en forma de película sobre papel de aluminio y se secaron a 70°C bajo presión menor o igual a 100 mm. de Hg (13,3 KPa) hasta peso constante. Las medidas del pH se realizaron usando un electrodo de pH modelo 50215 Hach, Loveland, USA.

Densidad

El proceso de gelificación pectina-azúcar-ácido implica la formación de una red tridimensional continua que retiene la solución azucarada concentrada. Los geles de pectinas fuertemente metoxiladas se forman por enlaces entre grupos ácidos o hidroxilos de cadenas adyacentes. Estos enlaces son débiles y los geles de este tipo se caracterizan por su gran plasticidad. El producto cambia de una forma fluida, pasando por un estado pastoso, a una textura sólida flexible, resultando poco apropiado para la utilización del método picnométrico. Las densidades se calcularon determinando la masa en balanza de precisión y el volumen por medición del espesor promedio de 6 mediciones por calibre en distintos sectores del laminado. El área de la base del laminado se determinó también aunque, a diferencia del espesor, su encogimiento superficial es muy pequeño.

La densidad de muestras de baja humedad se determinó por picnometría de sólidos, utilizando mezcla de xilenos. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Actividad acuosa.

Se utilizó un equipo Aqualab 3TE. Porciones de 2 g de alimento se ubicaron en la cámara de medida. Un ventilador interno circula el aire para reducir el tiempo de equilibrio. Un higrómetro óptico de condensación, calentado o enfriado por una celda Peltier, según la demanda de la medición, mide el punto de rocío del aire y utiliza la temperatura de la cámara determinada por un sensor infrarrojo para calcular automáticamente la humedad relativa (h_r). En el equilibrio, este valor coincide con la a_w de la muestra.

Isotermas de sorción del laminado deshidratado. Preparación de las muestras.

Para determinar una isoterma de sorción, se debe contar con muestras en un rango lo más completo posible de a_w . Para esto, se partió de la formulación inicial de humedad 2,3 b.s. y se generaron varias muestras de menor humedad por deshidratación parcial a 60°C. Se permitió la estabilización del gradiente de humedad guardando las muestras en recipientes herméticos 48 h antes de la determinación de a_w . Las actividades acuosas se midieron a 18, 25 y 38°C.

Determinación de la cinética de secado

Las experiencias conducentes a determinar parámetros de transporte del laminado, como contribución para conocer su estructura, fueron realizadas en una estufa de circulación forzada de interior de acero inoxidable. Las corridas se realizaron a 60°C, con una velocidad de aire aproximada de 0,3 m/s y una humedad absoluta de aire de 0,01 kg/kg. Las experiencias se realizaron por duplicado.

Los pesos de la muestra en función del tiempo se determinaron extrayendo la muestra a intervalos, y pesándola en una balanza de precisión (resolución 0,1 g). Conociendo la humedad (por estufa) y masas iniciales, m_0 y W_0 , las humedades al tiempo t (W) fueron calculadas en base a las masas determinadas a ese tiempo (m) con: $W = \left(\frac{1+W_0}{m_0} \right) m - 1$.

(Bardoni y col., 2005)

Las humedades de equilibrio dinámicas (W_e), asíntotas inferiores de las curvas de secado, se evaluaron con la curva experimental de acuerdo a (Tolaba y col., 1988), obteniéndose $W_e = 0.0419$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de secado.

El gráfico de la Fig. 1 muestra la curva de secado de humedad adimensional (W_{ad}) vs tiempo (minutos) para el laminado deshidratado de manzana.

Se observa un secado a velocidad decreciente que fue interpretado por la siguiente cinética, derivada de la solución analítica de difusión de materia no estacionaria,

$$W_{ad} = \frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = \exp(-kt)$$

donde W es la humedad en base seca en un tiempo t ; k es el coeficiente cinético que depende de efectos difusivos y geométricos y W_0 es la humedad inicial del puré a deshidratar. Los coeficientes obtenidos por regresión no lineal por cuadrados mínimos fueron $k = 0,00423 \text{ min}^{-1}$ ó $7,05 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, con $r^2 = 0,995$. De acuerdo a la formulación de placa plana, $k = \pi^2 D_{\text{eff}}/4d^2$. Dado d , espesor del laminado, no se mantiene constante durante el secado por el encogimiento volumétrico, y teniendo en cuenta la buena predicción de la ecuación, se considera que la constancia surge del cociente D_{eff}/d^2 . Así, $D_{\text{eff}} = 4kd^2/\pi^2$, por lo cual la difusividad inicial se puede calcular con el espesor inicial del laminado, $d_0 = 0,006 \text{ m}$, dando $1,02861 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, mientras que al final, con un espesor de laminado de $0,002 \text{ m}$ resulta $1.1429 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Luego de 500 minutos de secado se obtuvo un laminado flexible, microbiológicamente estable, con una humedad de 0.27 en base seca, un pH de 3,40 y un $a_w = 0.692$ a $25,5^\circ\text{C}$.

Densidad

Se determinó el valor de la densidad a distintos contenidos de humedad de la muestra, según se observa en la Fig. 2. Se propuso un modelo de donde la reducción de volumen por encogimiento se corresponde con el volumen de agua evaporada

$$\rho = \frac{\rho_s(1+W)}{1 + \frac{\rho_s}{\rho_w}W}$$

ρ_w es la densidad del agua = 997,296 kg/m³ (a 24°C); W es la humedad en base seca de la muestra, ms la masa del sólido deshidratado hasta peso constante, ρ es la densidad para una humedad W. El símbolo ρ_s representa la densidad del sólido a W = 0, cuyo valor fue de 1382 kg/m³, determinado por picnometría. Para comprobar la predicción del modelo, el mismo fue usado como ecuación de ajuste, en el parámetro ρ_s . Se obtuvo un valor de 1410 kg/m³, con un $r^2 = 0.952$. Esto demuestra que las suposiciones del modelo son correctas. La densidad del material se incrementó al reducirse la humedad, desde 1084 kg/m³ en la formulación sin deshidratar hasta el valor de ρ_s de 1382 kg/m³ que corresponde a la materia seca con la estructura en máximo encogimiento.

Isotermas de sorción

Se determinaron las isotermas de sorción (Fig. 3), y se observó un incremento exponencial de la humedad al crecer a_w con isoterma no sigmoide, propia de alimentos azucarados. Normalmente, la humedad disminuye a medida que aumenta la temperatura para una dada actividad acuosa. Aquí esa tendencia se observa a altos contenidos de agua, donde todo el azúcar está disuelto a todas las temperaturas. En la zona de menores a_w puede haber cristalización de agua, y se presentan dos tendencias opuestas: la sorción, que decrece con la temperatura, y la solubilidad del azúcar, que aumenta, y por tanto su capacidad de retener agua. Esto revierte el comportamiento, haciendo que en la práctica, podamos considerar que no existe un efecto práctico de la temperatura en la isoterma.

La ecuación de GAB se ajustó a los datos en su forma cuadrática.

$$a_w^2(W k^2 - W C k^2) + a_w(-2W k + W C k - W_m C k) + W = 0$$

donde la raíz que presenta un signo negativo precediendo al discriminante es la única que arroja resultados con sentido físico ($a_w > 0$). Los parámetros de ajuste fueron: humedad de monocapa, $W_m=0,1031$ mientras que $C = 3,598$ y $k = 0,9746$, con un $r^2 = 0,989$.

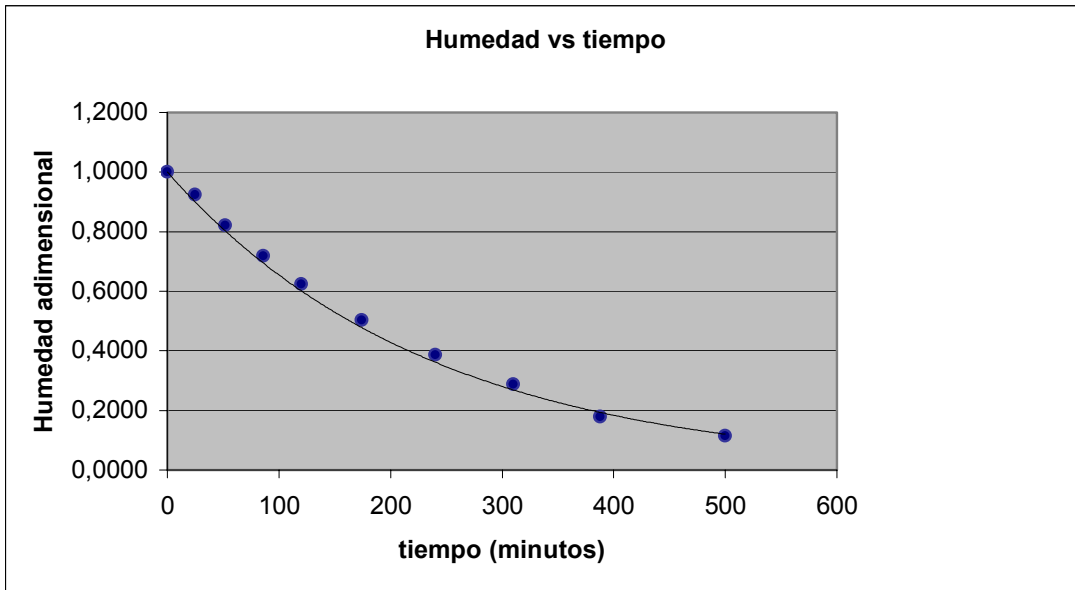


Fig.1. Curva de secado del Laminado Deshidratado

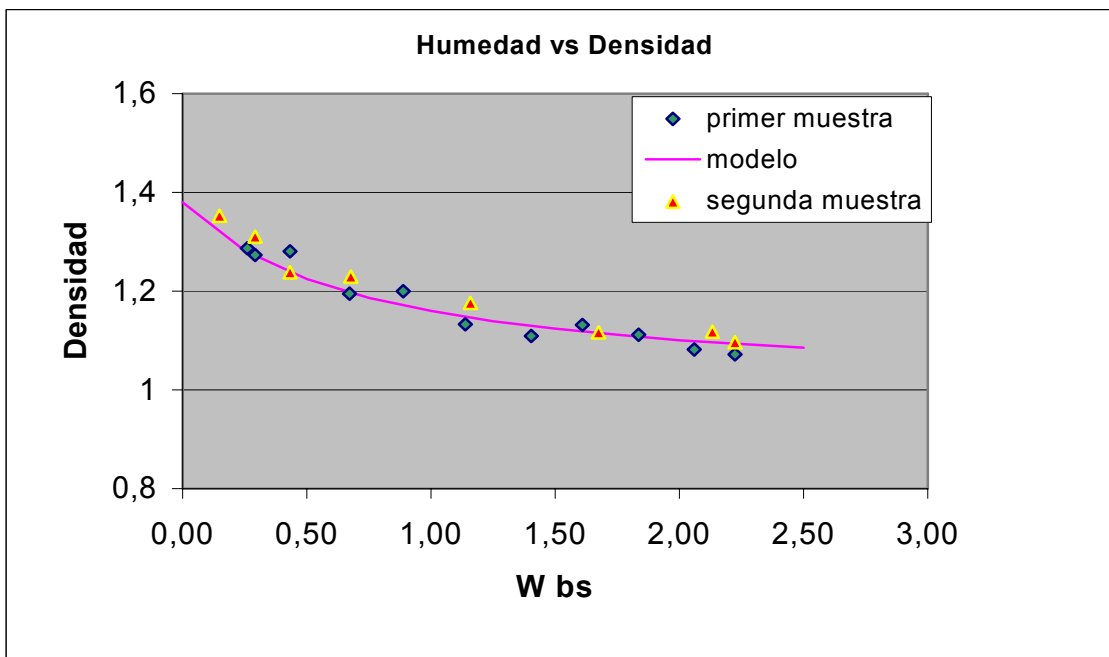


Fig. 2. Valores de densidad en función de la humedad en base seca para el laminado deshidratado

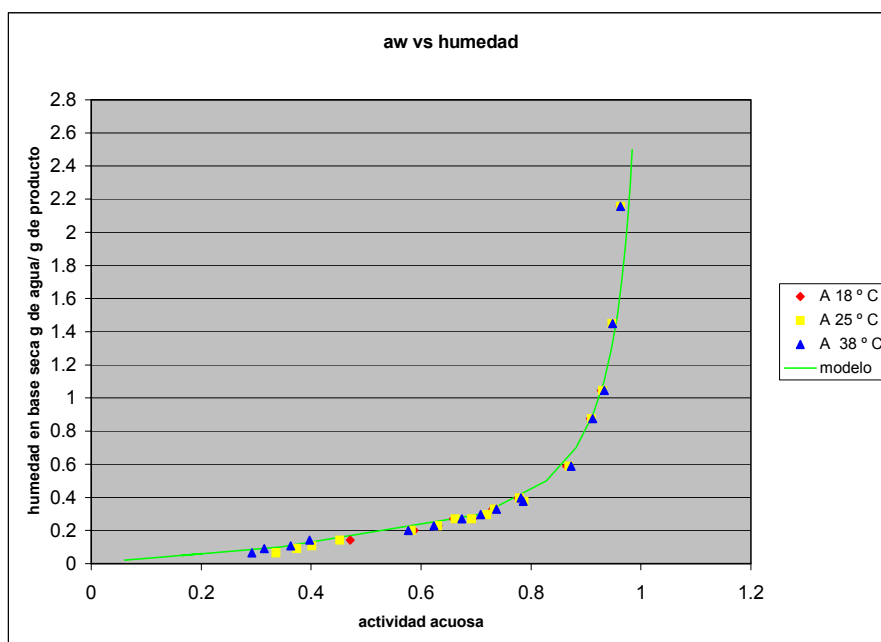


Fig. 3. a_w en función del contenido de humedad para el producto Laminado Deshidratado a 18°C, 25°C y 38°C.



Fig. 4. Foto del laminado deshidratado de manzana

CONCLUSIONES

La ventaja de los laminados con respecto a los dulces es su más suave tratamiento térmico, estando en mejores condiciones de retener vitaminas y color natural. La a_w es de estabilidad microbiana de 0,7 y la humedad retenida es de alrededor de 0,25 b.s. La isoterma de sorción fue de tipo exponencial, y la temperatura no ejerce efecto por la mayor solubilidad del azúcar. La ecuación de GAB interpretó muy bien el equilibrio sorcional. La densidad del laminado se incrementa al reducirse la humedad, lo que se predijo correctamente con un modelo que asume el encogimiento proporcional al volumen de agua evaporada. La cinética de secado fue predicha con precisión utilizando un modelo difusivo analítico, donde se consideró que el cociente de la difusividad y el espesor al cuadrado se mantuvo constante durante el secado

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (1980) Official Methods of Analysis, 13th Edn. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Ayranci E., Ayranci G. y Dogantan Z.(1990) Moisture Sorption Isotherms of Dried Apricot, Fig and Raisin at 20°C and 36°C. Journal of Food Science, Vol. 55, N°6, 1591-1593.

Bardoni N., Giannuzzi L., y Giner S.A. (2005) *Development of apple pectic gels (laminates) by air dehydration.* Enviado J. Food Engineering.

Tolaba, M.P.; Viollaz, P.E. and Suárez, C. (1988) . *A mathematical model to predict the temperature of maize kernels during drying.* Journal of Food Engineering, 8(1),pp1-16

Tsami, E., Marinos-Kouris, D. y Maroulis Z.B. (1990) *Water Sorption Isotherms of Raisins, Currants, Figs, Prunes and Apricots.* Journal of Food Science, Vol. 55, N° 6, pp 1594-1597.

AGRADECIMIENTOS

-A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por la financiación del Proyecto PICT 2002 09-12196.

-A la Comisión de Investigaciones Científicas, CICPBA, por el respaldo permanente.

-Al CIDCA y al CONICET por el apoyo brindado.

EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE PANES Y PASTAS ELABORADOS CON HARINAS DE TRIGO Y AMARANTO

DYNER L¹, PELLEGRINO N¹, GIACOMINO S¹, MAMBRÍN C¹, PIÑEIRO A¹, DRAGO S², TOSI E³, GONZÁLEZ R², VALENCIA ME¹.

¹Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956, Buenos Aires. Tel/Fax: 4964-8242/3, ²Instituto de Tecnología de Alimentos, UNL, Santa Fe. ³UTN - Rosario, Santa Fe. ldyner@ffyb.uba.ar

RESUMEN:

En el presente trabajo se evaluó el contenido y disponibilidad de Fe, Zn y Ca en panes y fideos 100% trigo y en productos elaborados con un 20% de reemplazo de harina de trigo (HT) por harina integral de amaranto (HIA). Se evaluaron lisina disponible y UPN (Utilización Proteica Neta) como indicadores de calidad proteica. Como promotores de biodisponibilidad mineral se utilizaron ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) y fitasa. Se estableció el aporte potencial (AP) de cada mineral: el máximo APFe se obtuvo en panes 80:20 con AC y fitasa (0,54mg%). En los fideos, el máximo efecto se observó con AC (0,07mg%). El APCa fue máximo en los fideos 80:20 con AC (16,72mg%). El mayor APZn se evidenció en el pan 80:20 con AC y fitasas (0,40mg%). En los panes 80:20 con AC y fitasa se observó un incremento sustancial de lisina disponible y del valor biológico de la proteína. La introducción de la HIA en productos panificados fermentados con agregado de AC y fitasas permite obtener importantes ventajas nutricionales.

Palabras clave: dializabilidad, hierro, calcio, zinc, Lisina, UPN

ABSTRACT:

In the present paper we evaluated the content and availability of Fe, Zn and Ca in bread and pasta 100% wheat and products obtained by replacing 20% wheat flour (HT) with whole amaranth flour (HIA). Available lysine and NPU as indicators of protein quality were also evaluated. Ascorbic acid (AA), citric acid (AC) and fitase were used to promote mineral bioavailability. The potential contribution (AP) of each mineral was established: a maximum APFe in 80:20 bread with AC and fitase (0,54mg%) was obtained; in pasta, the maximum effect was observed with AC (0,07mg%). The APCa was maximum in 80:20 pasta with AC (16,72mg%). The greatest APZn was found in 80:20 bread with AC and fitase (0,40mg%). In 80:20 bread with AC and fitase an increase of available lysine and biological value compared to 100% wheat products was observed. The introduction of the

HIA in fermented baked products with addition of AC and fitase allows to obtain nutritional advantages.

Key words: availability, iron, calcium, zinc, Lysine, NPU.

INTRODUCCIÓN

El amaranto se cultiva en América desde hace unos 4000 años. Con un contenido de proteína cercano al 16%, el grano del amaranto se compara muy favorablemente con el trigo (12-14%), arroz (7-10%), maíz (9-10%) y otros cereales de consumo habitual. Su proteína es excepcional en cuanto a su calidad por su alto contenido de lisina. El amaranto es, por lo tanto, un complemento nutricional óptimo para los cereales convencionales deficientes en lisina (1-5).

El grano de amaranto es lenticular, con un diámetro de sólo 1 mm; el embrión es anular y circunda externamente todo el perispermo. Su pequeño tamaño determina la molienda integral para la obtención de harinas. Los minerales aportados por el grano son cuantitativamente importantes (6). Sin embargo, dado que la harina se obtiene por molienda integral, esto resulta en la presencia de fitatos lo que hace necesario evaluar la real biodisponibilidad de los minerales de interés nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas y productos analizados

Harina de amaranto (*Amaranthus cruentus*) obtenida por molienda integral (HIA).

Productos: pan y pastas (fideos secos) elaborados con mezcla de harina de trigo y de amaranto (80:20) y productos 100% trigo.

Para estudiar el efecto de la formulación se agregaron como promotores de la biodisponibilidad mineral: ácido ascórbico (AA) 10 (control), 410 y 820 ppm (relación molar Fe:AA 1:7,5 y 1:15 respectivamente), ácido cítrico (AC) 0,33% y fitasa (F) 100 ppm.

Disponibilidad mineral in vitro y cuantificación de minerales:

La dializabilidad de Fe, Ca y Zn (DFe%, DCa% y DZn%) como indicadores de la biodisponibilidad potencial de cada mineral se determinó con el método de Miller et al (7), modificado por Wolfgor et al (8). Los minerales se cuantificaron por absorción atómica (9,10). Se estableció el aporte potencial de cada mineral (AP) en los distintos productos teniendo en cuenta el contenido de cada mineral y su dializabilidad.

$$APFe = ([Fe] \times DFe\%)/100 \quad APCa = ([Ca] \times DCa\%)/100 \quad APZn = ([Zn] \times DZn\%)/100$$

Lisina disponible:

El contenido de lisina disponible se determinó con el método de Carpenter (11) modificado por Booth (12).

Evaluación biológica de la calidad proteica:

Se utilizó el método de UPN (Utilización Proteica Neta) (13) trabajando con ratas cepa Wistar de ambos sexos, de 23 días de edad con un peso de 35-50 gramos. Se determinó el Valor Biológico (VB) como la relación UPN / Digestibilidad.

Análisis estadístico:

Para el estudio estadístico se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) de un criterio y para las comparaciones a posteriori se utilizó el Test de Tukey con un $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1) Disponibilidad de minerales y efecto de los promotores de biodisponibilidad

♦ *Dializabilidad del Hierro (DFe%)*

La DFe% resultó despreciable en la HIA y muy baja en la mezcla HT: HIA (Tabla 1). El proceso de fermentación panaria incrementó significativamente la DFe% respecto de la mezcla HT:HIA. Se logró el máximo incremento en la DFe% mediante el agregado de AC y fitasas; para ésta combinación de promotores se halló la mayor diferencia significativa en la DFe% respecto de los demás productos, a excepción del pan 100% trigo. La DFe% en los fideos 80:20 fue muy baja y mejoró significativamente con AC (Tabla 2). Sin embargo, la DFe% de los fideos 100% trigo fue significativamente superior a la de los fideos mezcla.

Tabla 1: %Dializabilidad de Fe, Ca y Zn en materias primas y panes

	% Dializabilidad		
	Fe	Ca	Zn
Harina de trigo	9,88 ± 0,70 ^e	44,09 ± 1,01 ^f	10,05 ± 0,53 ^{c,d,e}
Harina integral de amaranto	0,61 ± 0,05 ^a	7,25 ± 0,60 ^b	1,32 ± 0,25 ^a
HT:HIA (80:20)	3,35 ± 0,33 ^b	4,01 ± 0,20 ^a	4,97 ± 0,58 ^b
Pan 100% trigo	15,15 ± 0,70 ^g	40,39 ± 0,80 ^e	13,81 ± 1,46 ^f
Pan 80:20	6,77 ± 1,02 ^c	17,37 ± 1,08 ^c	8,28 ± 1,43 ^c
Pan 80:20 + F	7,47 ± 1,43 ^{c,d}	15,85 ± 1,20 ^c	8,92 ± 0,94 ^{c,d}
Pan 80:20 + AC	13,07 ± 1,77 ^f	20,49 ± 2,14 ^d	19,31 ± 1,27 ^g
Pan 80:20 + F+ AC	16,88 ± 1,69 ^g	22,30 ± 1,21 ^d	21,42 ± 0,84 ^g
Pan 80:20 + 410 ppm AA	6,61 ± 1,08 ^c	20,65 ± 2,28 ^d	9,77 ± 0,91 ^{c,d,e}
Pan 80:20 + F + 410 ppm AA	7,52 ± 1,59 ^{c,d}	21,34 ± 1,53 ^d	9,99 ± 1,17 ^{c,d,e}
Pan 80:20 + 820 ppm AA	8,83 ± 0,40 ^{d,e}	20,56 ± 1,49 ^d	11,22 ± 1,58 ^e
Pan 80:20 + F + 820 ppm AA	10,14 ± 1,28 ^e	20,67 ± 1,52 ^d	10,58 ± 2,58 ^{d,e}

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2: %Dializabilidad de Fe, Ca y Zn en materias primas y fideos

	% Dializabilidad		
	Fe	Ca	Zn
Harina de trigo	9,88 ± 0,70 ^f	44,09 ± 1,01 ^f	10,05 ± 0,53 ^c
Harina integral de amaranto	0,61 ± 0,05 ^a	7,25 ± 0,60 ^b	1,32 ± 0,25 ^a
HT:HIA (80:20)	3,35 ± 0,33 ^d	4,01 ± 0,20 ^a	4,97 ± 0,58 ^b
Fideo 100% trigo	4,59 ± 0,82 ^e	41,31 ± 2,10 ^e	12,72 ± 1,29 ^d
Fideo 80:20	0,98 ± 0,19 ^{a,b}	28,21 ± 1,56 ^c	4,85 ± 0,74 ^b
Fideo 80:20 + AC	2,71 ± 0,35 ^d	34,23 ± 1,36 ^d	10,27 ± 1,37 ^c
Fideo 80:20 + 410 ppm AA	1,08 ± 0,09 ^{a,b,c}	28,34 ± 1,36 ^c	4,99 ± 0,11 ^b
Fideo 80:20 + F + 410 ppm AA	1,21 ± 0,13 ^{a,b,c}	27,79 ± 1,28 ^c	4,95 ± 0,14 ^b
Fideo 80:20 + 820 ppm AA	1,39 ± 0,31 ^{b,c}	27,96 ± 1,81 ^c	4,98 ± 0,51 ^b
Fideo 80:20 + F + 820 ppm AA	1,76 ± 0,09 ^c	28,12 ± 1,53 ^c	5,07 ± 0,28 ^b

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

♦ **Dializabilidad del Calcio (DCa%)**

La mayor DCa% en los panes 80:20 se evidenció con la combinación de AC y fitasa (Tabla 1), pero no se hallaron diferencias significativas para los efectos de los distintos promotores. La máxima DCa% se evidenció en el pan 100% trigo. El proceso de fermentación del pan incrementó significativamente la DCa% respecto de lo observado para la mezcla 80:20 de las harinas de trigo y amaranto. La DCa% en los fideos 80:20 disminuyó significativamente con respecto a los fideos 100% trigo (Tabla 2) debido a la fibra aportada por la HIA y la ausencia de fermentación. La mayor DCa% en los fideos 80:20 se observó en la formulación que incluyó AC.

♦ **Dializabilidad del Zinc (DZn%)**

La DZn% fue baja en la HIA (Tabla 1). El proceso de fermentación del pan incrementó significativamente la DZn% respecto de lo observado en la mezcla HT:HIA (80:20). Se logró mejorar significativamente la DZn% respecto del pan 100% trigo mediante la incorporación de AC y [AC y fitasas] en la formulación. La DZn% de los fideos 100% trigo (Tabla 2) fue significativamente superior a la de los fideos 80:20. En los fideos 80:20 la DZn% aumentó significativamente al incorporar AC a la formulación. La utilización de AA no generó un efecto significativamente superior al observado en los fideos 80:20.

♦ **Aporte Potencial de Hierro (APFe)**

El APFe para la HIA se incrementó un 25% en la mezcla 80:20 (Tabla 3). Se observó un incremento significativo del APFe debido a la fermentación panaria. El máximo incremento en el APFe se obtuvo para el pan 80:20 que incluyó AC y fitasa como promotores; en esta formulación el APFe fue significativamente superior al de los panes mezcla y 100% trigo. El APFe en los fideos fue muy inferior al de los panes (Tabla 4). Para la formulación que

incluyó AC se obtuvo un APFe significativamente superior a los fideos elaborados con HIA y HT; su aporte potencial fue un 90% mayor al de los fideos 100% trigo.

Tabla 3: Aporte potencial de Fe, Ca y Zn en materias primas y panes

	Aporte potencial (mg/100gr)		
	Fe	Ca	Zn
Harina de trigo	0,067 ± 0,005 ^a	8,138 ± 0,186 ^{b,c}	0,098 ± 0,005 ^b
Harina integral de amaranto	0,073 ± 0,006 ^a	14,935 ± 1,232 ^g	0,044 ± 0,008 ^a
HT:HIA (80:20)	0,094 ± 0,009 ^{a,b}	1,947 ± 0,095 ^a	0,081 ± 0,009 ^{a,b}
Pan 100% trigo	0,136 ± 0,006 ^b	7,574 ± 0,150 ^b	0,148 ± 0,016 ^c
Pan 80:20	0,219 ± 0,033 ^{c,d}	8,735 ± 0,545 ^{b,c,d}	0,155 ± 0,027 ^{c,d}
Pan 80:20 + F	0,243 ± 0,046 ^{c,d}	8,074 ± 0,611 ^{b,c}	0,164 ± 0,017 ^{c,d}
Pan 80:20 + AC	0,378 ± 0,051 ^f	10,431 ± 1,092 ^f	0,346 ± 0,023 ^f
Pan 80:20 + F + AC	0,547 ± 0,055 ^g	10,630 ± 0,577 ^f	0,401 ± 0,016 ^g
Pan 80:20 + 410 ppm AA	0,204 ± 0,033 ^c	9,128 ± 1,008 ^{c,d,e}	0,179 ± 0,017 ^{c,d,e}
Pan 80:20 + F + 410 ppm AA	0,235 ± 0,050 ^{c,d}	9,516 ± 0,631 ^{d,e,f}	0,182 ± 0,021 ^{c,d,e}
Pan 80:20 + 820 ppm AA	0,271 ± 0,012 ^{d,e}	10,042 ± 0,729 ^{e,f}	0,205 ± 0,029 ^e
Pan 80:20 + F + 820 ppm AA	0,306 ± 0,039 ^e	10,349 ± 0,760 ^{e,f}	0,188 ± 0,046 ^{d,e}

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05).

♦ **Aporte Potencial de Calcio (APCa)**

El APCa de la HIA fue significativamente superior a la HT (Tabla 3). El efecto de la fermentación panaria elevó significativamente el APCa respecto de la mezcla HT:HIA (80:20). El reemplazo del 20% de HT por HIA en los panes elevó un 15% el APCa respecto del pan 100% trigo. El máximo APCa se obtuvo para el pan 80:20 con AC y fitasa. La incorporación de los promotores en la formulación evidenció diferencias significativas en el APCa respecto del pan 80:20.

En los fideos 80:20 el APCa fue muy superior al observado en los fideos 100% trigo (Tabla 4). El APCa del fideo 80:20 con AC fue significativamente superior al fideo 100% trigo y a las distintas formulaciones de fideos.

Tabla 4: Aporte potencial de Fe, Ca y Zn en materias primas y fideos

	Aporte potencial (mg/100gr)		
	Fe	Ca	Zn
Harina de trigo	0,067 ± 0,005 ^c	8,138 ± 0,186 ^b	0,098 ± 0,005 ^d
Harina integral de amaranto	0,073 ± 0,006 ^c	14,935 ± 1,232 ^d	0,044 ± 0,008 ^a
HT:HIA (80:20)	0,094 ± 0,009 ^d	1,947 ± 0,095 ^a	0,081 ± 0,009 ^{b,c}
Fideo 100% trigo	0,037 ± 0,007 ^{a,b}	7,180 ± 0,366 ^b	0,130 ± 0,013 ^e
Fideo 80:20	0,027 ± 0,005 ^a	13,838 ± 0,767 ^{c,d}	0,082 ± 0,013 ^{b,c,d}
Fideo 80:20 + AC	0,071 ± 0,009 ^c	16,717 ± 0,665 ^e	0,173 ± 0,023 ^f
Fideo 80:20 + 410 ppm AA	0,030 ± 0,002 ^a	13,926 ± 0,668 ^{c,d}	0,074 ± 0,002 ^b
Fideo 80:20 + F+ 410 ppm AA	0,033 ± 0,003 ^a	14,084 ± 0,649 ^{c,d}	0,092 ± 0,003 ^{c,d}
Fideo 80:20 + 820 ppm AA	0,037 ± 0,008 ^{a,b}	13,488 ± 0,875 ^c	0,075 ± 0,008 ^{b,c}
Fideo 80:20 + F + 820 ppm AA	0,047 ± 0,002 ^b	13,896 ± 0,761 ^{c,d}	0,086 ± 0,005 ^{b,c,d}

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05).

♦ **Aporte Potencial de Zinc (APZn)**

El efecto de la fermentación elevó significativamente el APZn del pan respecto de la mezcla HT:HIA (80:20) (Tabla 3).

El máximo efecto de los promotores de absorción se evidenció con la combinación AC+fitasas; el APZn se incrementó un 160% respecto del pan 80:20. En los fideos el APZn fue muy bajo (Tabla 4). El máximo efecto se logró con el agregado de AC a la formulación; significativamente superior al fideo 100% trigo y a las diferentes formulaciones ensayadas.

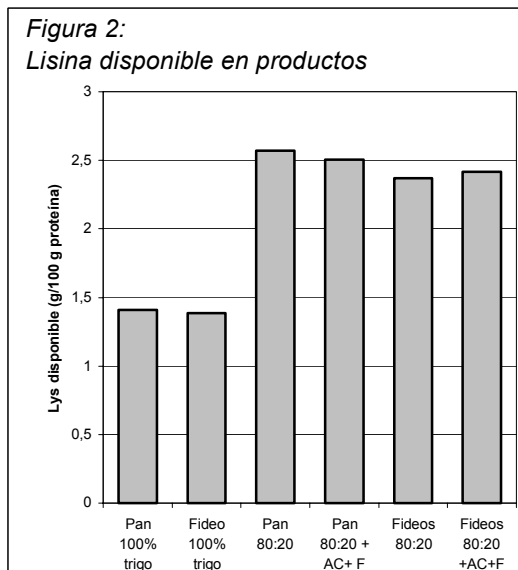
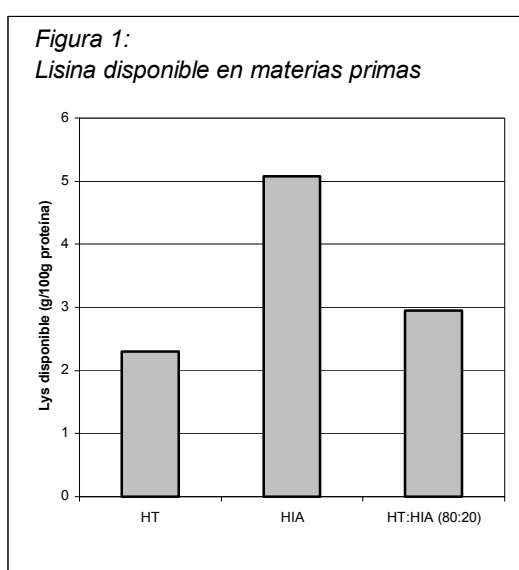
El escaso efecto del AA en la disponibilidad y aporte potencial de Fe y Zn se debería a la degradación del promotor durante el amasado, horneado y almacenamiento de los productos.

2) Evaluación de la calidad proteica de la HIA y de los productos elaborados

♦ **Evaluación química de la calidad proteica**

El contenido de lisina disponible en la HIA fue significativamente superior [(5,082 +/- 0,273) g de lisina/100 g de proteína] al de la HT [(2,300 +/- 0,191) g de lisina/100 g de proteína] ($p < 0,05$) (Figura 1).

La determinación de la lisina disponible se realizó sólo en los productos con mayor aporte potencial de minerales. Un reemplazo del 20% de la HT por HIA incrementó significativamente el contenido de lisina disponible en la mezcla de harinas con respecto a la HT. La incorporación de HIA mejoró significativamente la calidad proteica de los productos respecto de sus homólogos sin amaranto ($p < 0,05$) (Figura 2).



La disminución de la lisina disponible en los productos respecto de las materias primas se debería a la reacción de Maillard que acompaña al procesamiento térmico de los productos.

♦ **Evaluación biológica de la calidad proteica**

El VB de los panes mezcla (Tabla 5) fue significativamente superior al pan 100% trigo. Si bien la calidad proteica de los fideos 80:20 no fue significativamente diferente a la del fideo 100% trigo, el VB de los fideos 80:20 con AC y fitasa fue significativamente superior al fideo 100% trigo. Esto podría deberse a que la incorporación de la fitasa exógena elevaría la liberación de fósforo y por ende disminuiría la interacción fitatos-proteína, incrementando el VB.

Tabla 5: Valor Biológico de los productos

	VB
Pan 100% trigo	57,4 +/- 2,5 ^c
Pan 80:20	68,5 +/- 4,0 ^d
Pan 80:20 + F + AC	68,4 +/- 4,6 ^d
Fideos 100% trigo	45,3 +/- 3,5 ^a
Fideos 80:20	48,4 +/- 2,7 ^{a,b}
Fideos 80:20 + F + AC	51,8 +/- 6,0 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES:

La introducción de la HIA en los productos panificados fermentados con el agregado de AC y fitasas permite obtener ciertas ventajas nutricionales:

- ♦ Dado que el requerimiento de Fe es de 1 mg/día (14), se considera relevante destacar que 100 g del pan 80:20 con AC y fitasa cubren el 50% de esos requerimientos.
- ♦ Considerando que el requerimiento de Zn es de 4 mg/día (14), 100 g del pan 80:20 con AC y fitasas cubren un 10% de las recomendaciones mencionadas.
- ♦ Teniendo en cuenta que las recomendaciones para el Ca son de 800 mg/día (15), se concluye que los productos evaluados no resultan buenos aportadores de calcio.
- ♦ La utilización de la HIA en pastas requeriría mejorar la formulación de los productos para optimizar su aporte mineral.
- ♦ La incorporación de HIA mejoró la calidad proteica de los productos elaborados con la mezcla HT:HIA respecto de sus homólogos sin amaranto.

BIBLIOGRAFÍA:

Teutónico RA, Knorr D. Amaranth: Composition, Properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology* 1985; 39(4): 49-61.

Bertoni MH. Amarantos graníferos y hortícolas cultivados. Un aporte sobre su composición química, valor nutritivo y utilización. *An Soc Cient Argent* 1997, 227:5-20.

Tapia, Mario E. (1990). *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación.* FAO, Santiago de Chile: 113-116; 130-134.

Moreno, Rafael (1993). *Valor Nutritivo y usos en alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica.* FAO, Santiago de Chile:107-111.

Becerra, Rosalba. “El amaranto: Nuevas tecnologías para un antiguo cultivo” [en línea]. *Boletín Biodiversitas.* Mayo de 2000. Disponible en: www.conabio.gob.mx/biodivesitas/amaranto/html> [consulta: 30 de julio de 2002].

Bertoni MH, Gómez RG, Cattaneo P, Covas G. Estudios sobre semillas de especies americanas de amaranthus – II – Harinas de extracción de *A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. Mantegazzianus*. *An. Asoc Quim Argent* 1984; 72(6): 597-605.

Miller DD, Schricker B, Rasmussen R, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981; 34:2248-2256.

Wolfgor R, Drago S, Rodríguez V, Pellegrino N, Valencia M. In vitro measurement of availability of fortification iron. *Food Res. Int.* 2002; 35:85-90.

Calcio, Hierro y Zinc: Perkin-Elmer Corp. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Norwalk CI, 1971.

Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edition. Washington DC, USA. Association of Official Analytical Chemists: 3, 2000.

Carpenter KJ. The estimation of available lysine in animal protein foods. *Biochem. J.* 1960; 77:604.

Booth VH. Problems in the determination of FDNB-available Lysine. *J.Sci Food Agric.* 1971; 22:658.

Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Group. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Roma, 1990.

Dietary references intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, iodine, iron, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Standing committee on the scientific evaluation of dietary references intakes, Food and Nutrition Board & Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Washington DC, 2001.

Dietary references intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Standing committee on the scientific evaluation of dietary references intakes, Food and Nutrition Board & Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Washington DC, 2001.

*Parcialmente financiado por PICTR 0110 y UBACyT B807 / B071

ALIMENTOS PROBIOTICOS NOVEDOSOS UTILIZANDO CEPAS LÁCTICAS SELECCIONADAS

¹MOLINA, Verónica C.; ¹TARANTO, María P.; ¹Torino, María I., ^{1,2}FONT DE VALDEZ, Graciela

¹Centro de Referencia para Lactobacilos (Cerela-Conicet), Chacabuco 145, S.M. Tucumán (4.000), Tucumán, Argentina. Tel: 381-4310465, Fax: 381-4005600. ptaranto@cerela.org.ar

²Cátedra de Microbiología Superior, Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Ayacucho 491, S.M. Tucumán (4.000), Tucumán, Argentina.

RESUMEN

La búsqueda constante de alimentos funcionales alternativos por parte de la industria condujo a evaluar la viabilidad de cepas lácticas probióticas para el diseño de nuevos alimentos tipo "golosinas". Sobre una masa ligante de caramelo (medio base) con diferentes grados de acidez (pH 3.5 y 5.0) se incorporaron cepas de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* como biomasa húmeda o liofilizado, almacenándose el producto a 25°C y 4°C. La viabilidad de las cepas incorporadas, se evaluó determinando las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) luego de 7 y 14 días de almacenamiento a 25°C y 4°C. La incorporación de los microorganismos como biomasa húmeda permitió una distribución homogénea; el pH 5.0 y 4°C de temperatura de almacenamiento permitieron prolongar la viabilidad de las cepas probióticas, sin detectarse cambios físicos u organolépticos en el producto final.

Palabras claves: *Lactobacillus*, probióticos, alimentos funcionales, golosinas

ABSTRACT

The constant search of alternatives functional food by the industry lead to evaluate the viability of probiotic acid lactic bacteria (LAB) for designing probiotics "candies". *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* and *Streptococcus thermophilus* strains were added as wet and freeze-dried biomass to a caramel gummy with different acidity (pH 3.5 and 5.0). The strain viability was evaluated by determining the colony forming units (CFU/ml) after 7 and 14 days of storage at 25°C and 4°C. The strain addition as wet biomass allowed a homogeny distribution; the pH 5.0 and 4°C as storage temperature, allowed to extend the strain viability, without any physical and sensorial changes on the final product.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotic, functional food, candy

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales integran un segmento de impactante crecimiento y constituyen la nueva tendencia del mercado. En efecto, la búsqueda de un estado de salud óptimo naturalmente mantenido, los avances tecnológicos y los cambios reglamentarios de diversos países en relación con la composición y elaboración de alimentos, promovieron el desarrollo de este tipo de productos donde las bacterias lácticas (BL) son protagonistas esenciales. Entre los principales beneficios atribuidos a estos microorganismos, se incluyen aquellos que resultan de su permanencia viable en el intestino del huésped, los cuales se conocen como efectos probióticos. De estas propiedades benéficas, se destacan: estimulación del sistema inmune, estabilización de la mucosa intestinal, prevención de diarreas asociadas a virus y bacterias, entre otros (Fuller, 1989; Kailasapath y Rybka, 1997; Perdigón y col., 2000; Ouwehand y col., 2002).

El uso de BL como cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos, asoció inicialmente los probióticos con productos lácteos, aunque la versatilidad de este grupo de microorganismos permite su adaptación a diversas materias primas. Es así como en el mercado pueden encontrarse alimentos funcionales probióticos presentados como helados, chocolates, productos de panificación y derivados de soja (De Vuyst, 2000).

La óptima adaptación de las BL a la materia prima, requiere evaluar factores que afectan el desarrollo microbiano en la materia prima y/o en el alimento y que pueden clasificarse en intrínsecos y extrínsecos (Mossel e Ingram, 1975). Los intrínsecos son predominantemente químicos e incluyen: concentración y disponibilidad de nutrientes, pH, potencial redox, capacidad buffer y actividad de agua. Los parámetros extrínsecos son aquellas peculiaridades del ambiente de almacenamiento, que influyen tanto en los alimentos como en los microorganismos que aquellos contienen. Los que tienen mayor importancia para el desarrollo de los microorganismos presentes son: la temperatura, la humedad relativa del ambiente y la presencia y concentración de gases (Jay, 1992).

En el presente trabajo se evaluó la viabilidad de cepas probióticas en una masa de caramelo, tras su incorporación como biomasa húmeda o liofilizado y posterior almacenamiento bajo diferentes ambientes. Los resultados obtenidos permitirán diseñar de alimentos azucarados (tipo *productos de confitería*; Capítulo X, Código Alimentario Argentino) con características funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

2a. Microorganismos y medios de cultivo

Se utilizaron cepas de BL CRL pertenecientes a la colección de cultivo de CERELA que se seleccionaron por sus propiedades probióticas de estimular el sistema inmune y sintetizar vitamina B₁₂: *Lactobacillus (Lb.) casei* CRL 208, *Lb. casei* CRL 75, *Streptococcus (St.) thermophilus* CRL 805 y *St. thermophilus* CRL 806 y *Lb. reuteri* CRL 1098 (Taranto y col., 2003a; Le Blanc y col., 2004). Los ensayos se realizaron a partir de cultivos puros de cada microorganismo crecido en MRS (De Man y col., 1960) o Laptg (Ribaud y col., 1961) durante 16 hs a 37 °C (fase estacionaria).

2b. Preparación del inóculo

Los inóculos de BL se prepararon a partir de cultivos en fase estacionaria (10⁸ UFC/ml) para evaluar su utilización como:

a) Biomasa húmeda: las células cosechadas por centrifugación (10.000 x g, 5 min) se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril, se resuspendieron en el mínimo volumen (10 veces concentrado) y se agregaron al medio base en condiciones de esterilidad.

b) Liofilizado: las células obtenidas en a) se resuspendieron en leche descremada reconstituida al 10% (p/v) con sacarosa como protector (10%, p/v), se fraccionaron en viales (0.5 ml c/u) que se congelaron a -20°C y se liofilizaron durante 16 hs a 0.3 mbar en un liofilizador tipo camara LYOVAC GT 2 (Leybold Koln Germany).

2c. Medio experimental: masa ligante

Se utilizó una base de caramelo denominada "masa ligante" compuesta por: azúcares (sacarosa y glucosa), aceite vegetal, aromatizantes (esencias artificiales), acidulante (ácido cítrico), espesantes (almidón, gelatina, goma arábica), emulsionante (lecitina), antioxidante (butilhidroxitolueno -BHT-) y colorantes (INS120: rojo carmín; INS101: riboflavina), estandarizada en el laboratorio.

El proceso de elaboración de la masa ligante comprendió las siguientes etapas: a) preparación del almíbar base; b) preparación de la goma base o base de masticación; c) mezcla de ambos componentes de la masa y d) aireación de la masa (los detalles del procedimiento mencionado se encuentran protegidos por el compromiso mutuo de confidencialidad con la empresa MEPRONOA S.R.L.)

El pH de la masa ligante se ajustó a 3.5 (pH original de la preparación) y 5.0, modificando la cantidad de acidulante agregado.

2d. Incorporación de BL a la masa ligante y condiciones de almacenamiento

Las BL se adicionaron asépticamente a la masa de caramelo durante la etapa de aireación (etapa c) como biomasa húmeda y/o liofilizadas, obtenidas según se describe en el apartado 2b.

Una vez incorporados los microorganismos, las masas ligantes (caramelos) de pH 3.5 y 5.0 se almacenaron a 25°C y/o 4°C, en placas estériles o envasadas bajo vacío.

Como controles se utilizaron las correspondientes preparaciones de masa ligante sin inocular.

2e. Análisis microbiológico

Se realizaron recuentos microbiológicos en las muestras de caramelo obtenidas en el apartado 2d a diferentes tiempos: 0 (BL recientemente incorporadas) 4 y 7 días de almacenamiento para la masa de pH 3.5 y a los 0, 7 y 14 días para la masa ligante de pH 5.0. Para ello, se tomó 1 gr de cada muestra pesada en condiciones de asepsia, se disolvió en 10 ml de solución fisiológica estéril y se determinó el número de células viables (UFC/ml) en diluciones sucesivas plaqueadas en MRS agar e incubadas a 37°C durante 48 hs (Clark y col., 1978).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La modalidad de incorporación de las BL a la masa de caramelo pH 3.5 y la temperatura de almacenamiento, se evaluaron utilizando la cepa productora de vitamina B₁₂ *Lb. reuteri* CRL 1098, debido a su comprobada resistencia a condiciones extremas (Taranto y col., 2003b) (Tabla 1). Cuando el microorganismo se incorporó como biomasa húmeda, se mantuvo viable hasta el final del período evaluado (7 días) a 4 °C, mientras que a 25 °C se observó una significativa disminución de la viabilidad al día 4 de almacenamiento. Estos resultados coinciden con los informados para la conservación de bebidas de soja fermentadas con BL y Bifidobacterias (Wang y col., 2003). La adición de *Lb. reuteri* CRL 1098 como liofilizado no resultó adecuada ya que la viabilidad cayó significativamente a 4 y 25 °C (Tabla 1). Es importante resaltar que las células húmedas se diseminaron homogéneamente en la masa mientras que aquellas liofilizadas dieron lugar a la formación de grumos, resultando en una distribución heterogénea. El bajo pH de la masa ligante (pH 3.5) no presentó variaciones durante los 7 días de almacenamiento, siendo la acidez del caramelo el factor principal asociado a la pérdida de viabilidad producida en todas las condiciones (Tabla 1).

Considerando que los mejores resultados se obtuvieron cuando los microorganismos se adicionaron como biomasa húmeda y cuando se almacenaron a 4 °C, se seleccionó dicha modalidad de adición y temperatura de almacenamiento para los ensayos posteriores.

El efecto del pH sobre la viabilidad de las cepas probióticas, se evaluó adicionando cada una de las cepas seleccionadas a la masa de caramelo ajustada a pH 5.0. Como se observa en la Tabla 2 (columna izquierda) todas las cepas mantuvieron o aumentaron su viabilidad durante el período de almacenamiento. Del mismo modo, los recuentos bacterianos en caramelos de pH 5.0 almacenados bajo vacío, se mantuvieron iguales o ligeramente menores al día 0, hasta el final del período de almacenamiento (Tabla 2, columna derecha). Estos resultados demostrarían el efecto limitante de la acidez sobre la sobrevivencia bacteriana.

Tabla 1. Viabilidad de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 en caramelo a pH 3.5, según la modalidad de inoculación* y la temperatura de almacenamiento en placas estériles.

Inóculo*	Viabilidad (UFC/ml)					
	4 C			25 C		
	Día 0	Día 4	Día 7	Día 0	Día 4	Día 7
Control	ND**	ND	ND	ND	ND	ND
1	1 10 ⁵	1 10 ⁴	1 10 ³	1 10 ⁵	4 10 ²	ND
2	6 10 ³	15	9	6 10 ³	4	ND

*Inóculos 1 y 2: *Lb. reuteri* agregado como biomasa húmeda o como liofilizado, respectivamente. Control: caramelo sin inocular.

** ND: No detectado

Esta condición de pH (pH 5.0) favoreció ligeramente el desarrollo de contaminantes, los cuales se eliminaron totalmente empleando 14 días de almacenamiento bajo vacío (Tabla 2). Si bien esta microbiota contaminante no presenta características deteriorantes, en este momento está en proceso la identificación de la misma a fin de extremar las condiciones para su eliminación. Una alternativa sería disminuir la actividad de agua (A_w) aumentando los °Brix del jarabe base compuesto por glucosa y sacarosa. Actualmente se está evaluando el comportamiento de las cepas probióticas a condiciones extremas de presión osmótica, encontrándose que las mismas son altamente resistentes a valores de hasta 80°Brix (datos no mostrados). Si bien el envasado al vacío por sí mismo no constituye un método de conservación, influye considerablemente sobre la clase e intensidad de las proliferaciones bacterianas debido al ambiente microaeróbico creado por la exclusión del oxígeno (Prandal, 1994).

Es importante resaltar que la presencia de BL en el caramelo no produjo alteraciones sobre las características sensoriales (aspecto, consistencia y sabor) en ninguna de las condiciones ensayadas.

Tabla 2. Viabilidad de las cepas probióticas inoculadas como biomasa húmeda en caramelos con pH 5.0 y almacenados en placas estériles o bajo vacío a 4 C.

Cepas	Viabilidad (UFC/ml)					
	Placas estériles			Bajo vacío		
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 0	Día 7	Día 14
Control	32	7	18	32	3	ND
<i>Lb. reuteri</i> CRL 1098	6 10 ⁴	3 10 ⁵	2 10 ⁵	1 10 ⁶	5 10 ⁵	8 10 ⁵
<i>Lb. casei</i> CRL 75	7 10 ⁵	1 10 ⁶	1 10 ⁶	6 10 ⁴	2 10 ⁵	1 10 ⁵
<i>Lb. casei</i> CRL 208	1 10 ⁶	2 10 ⁶	2 10 ⁶	5 10 ³	1 10 ⁴	1 10 ⁴
<i>St. thermophilus</i> CRL 805	5 10 ³	2 10 ³	2 10 ⁴	4 10 ⁴	9 10 ⁴	2 10 ⁴
<i>St. thermophilus</i> CRL 806	4 10 ⁴	6 10 ⁴	1 10 ⁵	7 10 ⁵	4 10 ⁵	5 10 ⁵

ND: No detectado

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los microorganismos probióticos seleccionados y adicionados a la masa de caramelo, mantienen su viabilidad cuando se incorporan como biomasa húmeda y se almacenan a 4 °C, en tanto que el envasado bajo vacío previene la proliferación de contaminantes. Actualmente se están evaluando condiciones que disminuyan la A_w a fin de favorecer la estabilidad del producto final. Los resultados mostrados en este trabajo, aunque preliminares, constituyen la primera etapa hacia el diseño de productos de confitería conteniendo BL probióticas con características funcionales.

BIBLIOGRAFIA

- Clark, W, Brazis, AR, Fowler, JL, Johns, CK and Nelson, FE. (1978)** Standard plate counts methods. *En* Standard methods for the examination of dairy products. 14th ed. Marth, E. M. (ed) American Public Health Association.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo X: Alimentos Azucarados: tipo *productos de confitería*. Junio de 2004. 767 al 818. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>

- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960)** A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol. 23: 130-135.
- De Vuyst, L (2000)** Technology aspects related to the application of functional starter cultures. Food Technol. Biotechnol. 38: 105-112.
- Fuller, R (1989)** A review: Probiotics in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- Jay, JM (1992)** Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia, S A.
- Kailasapathy, K and Rybka, S (1997)** *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. their therapeutic potentially survival in yogurt. Austral. J. Dairy Technol. 52: 28-33.
- LeBlanc, JG, Garro, M, Savoy, G and Font, G (2004)** A Novel Functional Soy-Based Food Fermented by Lactic Acid Bacteria. Effect of Heat Treatment". J Food Sci 69: M246-M250.
- Mossel, DAA and Ingram, M (1975)** The physiology of the microbial spoilage of foods. J. Appl. Bacteriol, 18: 237.
- Ouwehand, AC, Salminen, S and Isolauri, E (2002)** Probiotics: an overview of beneficial effects. Ant. Van leeuw. 82: 297-289.
- Perdigón, G, Medina, M, Vintini, E and Valdez, JC (2000)** Intestinal pathway of internalization of acid lactic bacteria and gut mucosal immunostimulation. Int. J. Immunopat. Pharmacol. 13: 141-150.
- Prandal, O; Fischer, A; Schmidhofer, T and Sinell, H (1994)** Tecnología e higiene de la carne. Editorial Acribia. Zaragoza, Espana
- Raibaud P, Caulet M, Galpin JV, Mocquot G (1961)** Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant groups. J Appl Bacteriol 24: 285-291
- Taranto, MP, Vera, JL, Font de Valdez, G, Hugenholtz, J, and Sesma, F (2003a)** *Lactobacillus reuteri* CRL1098 Produces Cobalamin. J. Bacteriol. 185: 5653-5647.
- Taranto, MP, Fernandez Murga ML, Lorca, G and Font de Valdez, G (2003b)** Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. J. Appl. Microbiol. 95: 86- 89.
- Wang YC, Yu RC, Chou CC. (2004).** Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. Int J Food Microbiol. 93:209-17.

INFLUENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE UNA MEZCLA DE PLASTIFICANTES EN EL COMPORTAMIENTO MECÁNICO Y LA MICROESTRUCTURA DE PELÍCULAS EMULSIONADAS DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CERA DE CANDELILLA

¹CASTILLO C.C., ¹LEONIDES Z.N.,²OSSES F.J., ¹MARTINEZ G. ,Y ¹PEDROZA I.R.

¹Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Iberoamericana, Prol. Paseo de la Reforma 880. Lomas de Santa Fe 01210, México D.F. ²Área de Tecnología de Alimentos, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosodia s/n 31006, Pamplona, España.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes mezclas de sorbitol y glicerol, en las propiedades mecánicas y la microestructura de una película comestible a base de proteínas de suero de leche/cera de candelilla. Se planteó un diseño de mezclas de dos componentes, utilizando 40% de plastificantes en diferentes proporciones. El mayor porcentaje de elongación fue para la película que contenía la mezcla 3:1 glicerol:sorbitol. El mayor valor de tensión máxima fue para las películas con sorbitol sin mezclar y las de 1:1 glicerol:sorbitol. El menor índice de ruptura fue para la película de la mezcla 3:1 glicerol:sorbitol y el módulo de elasticidad menor fue para la película 3:1 sorbitol:glicerol. La morfología microestructural de las películas varió en función del tipo de plastificante y sus proporciones en las diferentes mezclas evaluadas.

Palabras clave: proteínas aisladas de suero de leche, glicerol, sorbitol, cera de candelilla, microestructura, propiedades mecánicas.

ABSTRACT:

The objective was to evaluate the effect of different mixtures from sorbitol and glycerol in the mechanical properties and the microstructure of an edible film with whey proteins/candelilla wax. A design of mixtures of two components, using 40% of plasticizer in different proportions was considered. The greater elongation percentage was for the film that contained mixture 3:1 glycerol: sorbitol. The greater value of maxima tension was for the films with sorbitol without mixing and those of 1:1 glycerol:sorbitol; the smaller index of rupture was for the film of mixture 3:1 glicerol:sorbitol and the smaller modulus of elasticity was for film 3:1 sorbitol:glicerol. The microstructure of the films was varied due to the chemical characteristics of the plasticizer and the interactions between the components of the film.

Key Words: whey protein isolated, glycerol, sorbitol, candelilla wax, microstructure, mechanical properties.

INTRODUCCIÓN

La proteína aislada de suero lácteo (WPI) forma películas transparentes con una gran adherencia a las superficies hidrofílicas, con buenas propiedades de barrera respecto al oxígeno, aromas y aceites. Sin embargo su difusividad al vapor de agua es alta y se degradan mucho más fácilmente que otros tipos de materiales poliméricos (Chen 1995; Krotcha y de Mulder-Johnson, 1997; Kim y Ustunod, 2001; Chick y Hernández 2003). Para disminuir esta alta permeabilidad al vapor de agua se pueden incorporar lípidos, como la cera de candelilla. Estas películas compuestas se formulan para combinar las ventajas de los componentes lipídicos con las de los hidrocoloides y disminuir las desventajas de cada uno de ellos. Comúnmente, se adiciona un plastificante para la obtención de una película menos frágil, más flexible, maleable y eventualmente más dura y resistente, por efecto de la reducción de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas.

Dentro de los plastificantes, los más recurridos son el glicerol (G) y el sorbitol (S) (Anker y col, 1999; Anker y Stading, 2000). Fairley y col (1996) demostraron que películas a base de WPI en las que fue adicionado S como plastificante, eran más elásticas que las hechas utilizando G. Por otra parte McHugh y Krotcha (1994) concluyeron que se requiere mayor concentración de S que G para obtener propiedades tensiles similares.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del contenido de dos plastificantes como son glicerol y sorbitol, adicionados de forma conjunta, sobre las propiedades mecánicas y la microestructura de películas comestibles basadas en WPI y cera de candelilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de las películas se utilizó WPI (Land O'Lakes, Davisco Foods International Le Seur, MN); G grado reactivo al 87%, S grado alimenticio al 70% y cera de candelilla (p.f. 65.8°C, Bosques, 2003) (Droguería Comopolita México, D. F.). Carbonato de Potasio (Droguería Comopolita México, D. F.) para el acondicionamiento de las películas a 30% HR.

Formación de películas. Se prepararon soluciones acuosas de WPI al 5% (w/w) y se calentaron a 90° C durante 30 minutos en un baño de agua, para desnaturalizar las proteínas. La cera de candelilla (0.8 g) se fundió a 85° C y se adicionó a la solución

caliente de WPI, emulsificando a 10,000 rpm durante 3 min, manteniendo la temperatura a 80 °C. El plastificante fue añadido a la solución de proteína en una proporción del 40% con respecto al peso de los sólidos totales. Se prepararon 5 tipos de mezclas de plastificantes (cuadro 1). Las soluciones se desgasificaron al vacío y se vertieron sobre una superficie lisa cubierta por una película autoadherible de teflón, delimitada por aros de PVC de 10 cm de diámetro. Las soluciones se dejaron secar durante aproximadamente 18 horas a 23° C y 40% de humedad relativa sobre superficies niveladas para obtener películas de grosor homogéneo. Las películas fueron equilibradas dentro de campanas en las que la humedad relativa era mantenida constante a 30% por una solución saturada de carbonato de potasio.

Cuadro No. 1 Concentración de los plastificantes en la mezcla		
Tratamiento	% Sorbitol	% Glicerol
1	0	100
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0

Espesor de las películas. Se determinó en 10 puntos diferentes con un micrómetro Mitutoyo ID-F125 (precisión = 1 µm).

Actividad de agua. Se utilizó un determinador Aqualab 3TE (EUA).

Ensayo mecánico de tracción. Se utilizó el texturómetro Texture Analyzer TA-XTZi (USA), para la determinación de la tensión máxima, la elongación relativa, el índice de ruptura y el módulo de elasticidad.

Microestructura. Se determinó la topografía y la rugosidad de las películas con un microscopio de fuerza atómica (Nanoscope E Digital Instrument Santa Barbara California USA).

RESULTADOS

Durante la preparación de las emulsiones, pudo observarse un efecto en la estabilidad de las emulsiones, siendo mayor conforme aumentaba la concentración de G en la mezcla de plastificantes. La adición de plastificantes en concentración de 40%, permitió formar películas emulsionadas de WPI-cera de candelilla, maleables, a diferencia de lo informado por Pérez-Gago y Krochta (2000). En general, las películas tuvieron aspecto

blanquecino, como resultado de la cristalización de la cera, que se reacomoda para buscar una forma mas estable.

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas, se presentan en el cuadro 2.

Tratamiento	Espesor (mm)	% elongación	Tensión Máxima (N/mm ²)	Módulo de Elasticidad (N/mm ³)	Índice de Ruptura (N/mm)
1	0.121	9.251	2.171	23.471	71.024
2	0.112	10.451	1.384	13.239	37.212
3	0.110	9.714	2.673	27.514	75.754
4	0.102	7.190	2.159	30.023	76.858
5	0.120	2.571	2.704	105.150	314.661

Porcentaje de Elongación. En general, las películas con mayor contenido de glicerol tuvieron una mayor elongación, destacándose la de la mezcla 25S/75G, con el mayor valor, correspondiendo a un 12% por encima de la película con 100G (tratamiento 1).

Tensión máxima. Las películas cuyo plastificante fue S 100%, mostraron el mayor valor de tensión máxima. Las observaciones realizadas a nivel molecular en estas películas sugieren la formación de una bicapa entre la cera y la proteína, lo cual podría estar confiriendo mayor rigidez. Se ha señalado que durante el secado de las películas, es posible que ocurra una separación de la emulsión sobre todo si ésta no es suficientemente estable, afectando con ello tanto su morfología como sus propiedades (Pérez-Gago y Krochta, 2000).

Módulo de Elasticidad. La película 25S/75G es la que tuvo el menor módulo de elasticidad, lo cual indica la mayor flexibilidad a pesar de tener un elevado % de elongación. Esta combinación de propiedades da características mecánicas deseables para su aplicación en alimentos. A nivel molecular, el módulo de elasticidad se expresa según el ordenamiento entre las moléculas de proteína y cera.

Índice de Ruptura. Los valores obtenidos para esta propiedad siguen la misma tendencia que los obtenidos para la tensión máxima. Las películas más rígidas fueron 75S/25G y 100S, cuyos valores son mayores a los del resto de las películas ($p < 0.05$). Ello significa que se trata de películas muy resistentes al ser sometidas a una fuerza lineal, sin embargo no son resistentes a una fuerza de tensión. Esto a su vez, puede relacionarse con los arreglos moleculares, donde probablemente, la mayor concentración de S con su influencia en la estabilidad de las emulsiones, favorecería la separación de las mismas y la formación de bicapas, afectando la resistencia al esfuerzo aplicado.

McHugh y Krochta (1994) encontraron que el sorbitol fue más eficiente como plastificante que el glicerol en películas de proteína de suero de leche, mientras que en el presente estudio, la mezcla de 25S/75G parece favorecer las propiedades mecánicas de películas emulsionadas.

Actividad de agua. En el cuadro 3 se presentan los valores de A_w de las películas. Se observa que conforme aumenta la concentración de G, la actividad de agua es mayor. Esto se debe a que las películas con mayor concentración de glicerol tienden a formar con mayor facilidad puentes de hidrógeno, por su naturaleza higroscópica, además las partículas de grasa son más pequeñas y están distribuidas más homogéneamente a lo largo de la superficie de la película, lo cual permite que el G tenga mayor facilidad de expresar su afinidad por el agua, al mismo tiempo que la proteína y la cera están formando una emulsión.

Cuadro No. 3 Actividad de agua de las películas

Tratamiento	A_w
1	0.44
2	0.433
3	0.426
4	0.422
5	0.419

Microestructura. Al observar la película 100G al microscopio, se pudo apreciar cómo la proteína cubría los glóbulos de grasa que se formaron, siendo éstos de menor tamaño que en el resto de las películas; en la parte superior derecha de la figura 1, puede observarse el glóbulo de grasa más grande encontrado, cuyo diámetro fue de $4.026 \mu\text{m}$ mientras que los demás tuvieron un tamaño promedio aproximado de $2 \mu\text{m}$. También se observó que la distribución de los glóbulos fue prácticamente uniforme en toda la superficie de la película, confiriéndole la mayor rugosidad en comparación con las demás películas (cuadro 4).

Se observó que a mayor contenido de G, la rugosidad de la película se incrementaba (cuadro 4). La menor rugosidad obtenida correspondió a la película con S lo que podría explicarse por la separación de fases dando lugar a películas tipo bicapa, lo cual fue más evidente para la película con 100S y la de 75S/25G (figuras 4, 5 y 6).

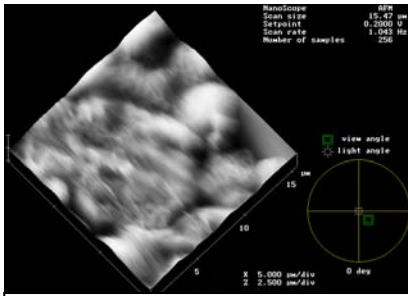


Figura 1 Observación 3D de película con 100% G

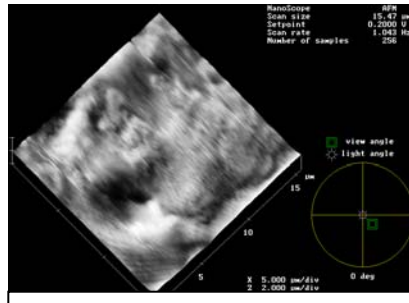


Figura 2. Observación 3D de película con 25% S y 75% G

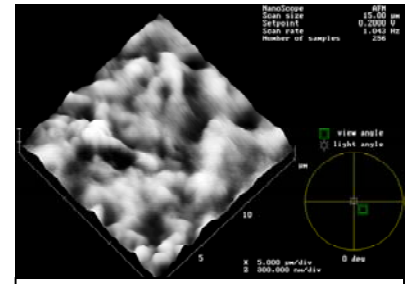


Figura 3. Observación 3D de película con 50% S y 50% G

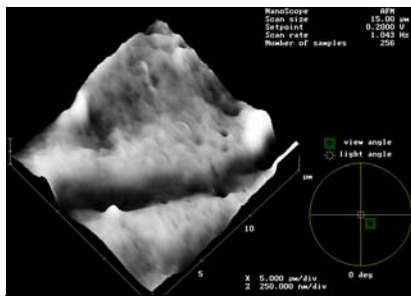


Figura 4. Observación 3D de película con 75% S y 25% G

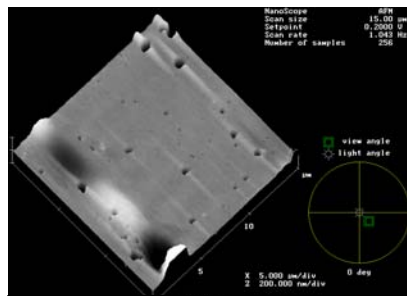


Figura 5. Observación 3D de película con 100% S

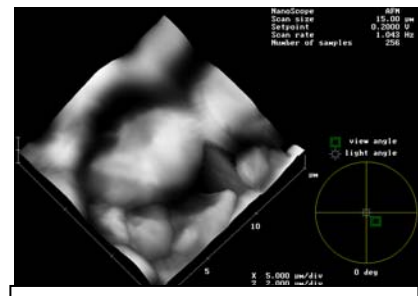


Figura 6. Segunda sección de análisis de película con 100% S

En la figura 5, que corresponde a la película elaborada con 100S como plastificante, se puede observar una película casi lisa en la mayoría de su superficie. En la parte inferior de la imagen se pueden distinguir claramente tres glóbulos de grasa de mayor tamaño a los presentes en las otras películas (zonas claras). También se observan porosidades. La aparición de grandes glóbulos de grasa, es una respuesta de la inestabilidad de la emulsión al cambio de temperatura, además de que el S en la concentración agregada resultó tener menor capacidad emulsificante.

Cuadro No. 4 Rugosidad de películas con mezcla de plastificantes

Mezcla de plastificantes	Rugosidad (nm)
100% Glicerol	232.96
75% Glicerol, 25% Sorbitol	146.34
50% Glicerol, 50% Sorbitol	52.003
25% Glicerol, 75% Sorbitol	20.315
100% Sorbitol	0

En algunos casos, la fracción grasa migró hacia los extremos de la película, generando un diferencial en el espesor de la misma. La figura 6 muestra una de las partes de mayor espesor de la película, en la cual aparecen glóbulos de grasa de gran tamaño, el mas

grande, con un diámetro de $9.4\mu\text{m}$; de acuerdo a lo observado, esta región de la película está conformada mayoritariamente de cera que se acumuló debido a que la emulsión perdió estabilidad más rápidamente durante el secado.

Las películas elaboradas con mayor concentración de sorbitol, presentan una doble capa en la cual, la parte inferior es la proteína y la parte superior la grasa solidificada por la diferencia de temperatura. Como se puede observar en las imágenes, la grasa cubre el gel de proteína que conforma la película. La película elaborada con 100S es la que presentó menor plasticidad (cuadro 2), fue más quebradiza, el color no fue homogéneo al igual que la textura. Cabe mencionar que el S puede migrar hacia la superficie de la película y cristalizar, mientras que el G no presenta este tipo de comportamiento (Osés y Maté, 2004).

La película elaborada con 75S/25G tuvo zonas más translúcidas, debido a que la distribución de la fase grasa no fue homogénea. En la figura 4 se puede observar zonas con mayor concentración de cera en la superficie, semejante a la estructura mostrada por la película con 100S (figura 6). De acuerdo a esto, se reafirma que las películas con mayor cantidad de S son menos homogéneas en la distribución de la cera y en el tamaño de los glóbulos de grasa. En la formulación en la que se encuentra la mezcla de plastificantes 50G/50S (figura 3), a pesar de que se observan los glóbulos de grasa, se ve una distribución más uniforme, es decir, los glóbulos de grasa que contiene son de tamaño similar y se encuentran distribuidos igualmente en toda la superficie de la película. En la película con 100G a pesar de que se observan glóbulos de grasa grandes, el tamaño promedio de éstos es más pequeño que en el de las otras películas.

CONCLUSIONES

Se observaron diferencias en las propiedades de las películas por efecto del tipo de plastificante así como la proporción de éstos en las mezclas.

De acuerdo con las propiedades mecánicas, se consideró que la mejor película fue la que incluyó plastificantes en una relación de 25Sorbitol/75Glicerol.

BIBLIOGRAFÍA

Anker M, Stading M y Hermansson A. Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents and glass transition temperatures of whey protein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1999. Pp 1878-1886.

- Anker M, Stading M.** Relationship between the microstructure and the mechanical barrier properties of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2000. Pp 3806-3816.
- Bosques-Molina E.** Desarrollo de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para la conservación de frutas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Biotecnología. 2003.
- Cick y Hernández R J.** Physical, thermal, and barrier characterization of casein –wax-based edible films. *Journal of Food Science* 67 (3), 2003. Pp 1073-1079.
- Chen H.** Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science* 78, 1995. Pp 2563-2583.
- Fairley P, Monahan F J, German B J y Krochta J M.** Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1996. Pp 438-443.
- Kim S-J y Ustunod Z.** Solubility and moisture sorption isotherms of whey protein based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2001. Pp 4388-4391.
- Krochta J M y de Mulder-Johnson C.** Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Journal of Food Technology* 51 (2), 1997. Pp 61-74.
- McHugh T H y Krotcha J M.** Sorbitol vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (4), 1994. Pp 841-845.
- Pérez-Gago M y Krochta J M.** Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2000. Pp 2687-2692.
- Osés F J y Maté J I.** Efecto del envejecimiento y el contenido de plastificante sobre las propiedades mecánicas de películas de proteína aislada de suero Lácteo. Universidad Pública de Navarra, Pamplona España. 2004. Informe técnico de investigación

ELABORACIÓN DE ANCHOAS DE SARDINA (*Sardinella aurita*) Y SU COMPORTAMIENTO DURANTE ALMACENAMIENTO REFRIGERADO

^{1,2}CABELLO, ANA M.; ² TRINIDAD, RODRÍGUEZ; ¹FIGUERA BERTHA E. & ¹VALLENILLA, OSMICAR M.

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola, Cumaná, Estado Sucre. Venezuela.

² Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Cumaná, Estado Sucre. Venezuela Mail: acabello@sucre.udo.edu.ve

RESUMEN

Este trabajo planteó evaluar fisicoquímica y microbiológicamente sardinas tipo “anchovada” y conocer su calidad como producto alimenticio. Las sardinas sometidas a un proceso de salado húmedo por 10 días, fueron apiladas, en una cubeta, colocando capas de sal y pescado. Finalmente se protegió, se colocó en refrigeración y curó por seis (6) meses. Se utilizaron métodos según normas COVENIN 2394-86 y métodos adoptados por la A.O.A.C para: pH, aw, proteína, grasa, humedad, ceniza, sal, N-BVT y TMA. Los análisis microbiológicos se realizaron según APHA. Los resultados indicaron un alto contenido proteico (21,09% - 21,91%). Parámetros como: pH (5,79 – 6,01), N-BVT (41,07 mg-N/100g) y TMA (3,67mg-TMA/100g) se encontraron por debajo de los límites máximos permitidos para productos similares. A los 180 días presentaron óptimas condiciones. Los análisis microbiológicos indicaron condiciones aceptables hasta los 120 días. Se recomienda, para prolongar aún más el tiempo de vida útil del producto utilizar algún preservante natural.

ABSTRACT

Physical, chemical and microbiological evaluations of anchovies sardines were made in order to assess its quality as food product. Sardines were salted in brine for 10 days, and then were piled in buckets, placing layers of salt and fish. Finally, the buckets were covered and stored under refrigeration for cure during six months. Analytical methods of COVENIN 2394-86 and A.O.A.C were used for: pH, aw, protein, fat, moisture, ash, salt, TBV-N and TMA. Microbiological analyses were performed according to APHA. Results showed a high protein content of the product (21,09% - 21,91%). Parameters like pH (5,79 – 6,01), TBV-N (41,07 mg-N/100g) and TMA (3,67mg-TMA/100g) were found to be bellow maximum allowed limits for similar products. After 180 days the product still showed

optimal conditions. However, microbiological analyses showed acceptable conditions until 120 days. In order to extend the useful life of the anchovies product, the use of a natural preservative agent is recommended.

INTRODUCCIÓN.

Venezuela país privilegiado por su situación geográfica, posee grandes recursos marinos alimenticios, constituyendo uno de los más importantes la sardina, la cual, es consumida tradicionalmente en forma de conserva y con buenas condiciones para ser procesada en otras formas. Este trabajo propone someter la sardina a un proceso de curado tipo anchovado considerado un producto delicado, de sabor agradable y sensible al manejo inapropiado. El hombre ha empleado diversos métodos para preservar pescado y de los más comunes es el salado. En presencia de la sal, la carne de ciertos pescados puede sufrir modificaciones tanto enzimáticas como fisicoquímicas y obtener por ese medio un estado especial denominado anchovado, en el cual la carne del pescado adquiere propiedades específicas degustativas y digestivas muy apreciadas por los consumidores (Huss, 1988).

Todo alimento que es sometido a un proceso de conservación debe ser evaluado estrictamente para comprobar su calidad e inocuidad. Es por ello que la palabra calidad es ampliamente usada y con mucho significado. Muy a menudo es sinónimo de apariencia, frescura, higiene y refiere el grado de deterioro que sufrió un alimento.

Vista la importancia de revisar parámetros relacionados con la calidad higiénico-sanitaria, del producto, se planteo como objetivo evaluar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la sardina tipo "anchoa" durante el tiempo de curado.

METODOLOGÍA

Las sardinas para la elaboración del producto anchovado, fueron suministradas por una empresa conservera de Cumaná y trasladadas, en cavas con hielo hasta el Laboratorio de Tecnología de Alimentos del INIA Sucre/ Nueva Esparta. Para prepara el producto anchovado el pescado fue descabezado, eviscerado, lavado y colocado en una salmuera saturada (25%) durante 10 días. Posteriormente se saco de la salmuera y se apilo en envases de plástico alternando camadas de sal y pescado (3Kg de sal por 10Kg de pescado cortado). Se presionó para facilitar la salida de agua y penetración de sal, se tapó y colocó en refrigeración dejándolo curar durante 6 meses.

Evaluación fisicoquímica: Se realizó cada quince días utilizando los siguientes métodos para: pH: COVENIN 1315-79, Aw: método hidrométrico adoptado por la AOAC

(13ra edición de 1980) y también proteína, humedad grasa, ceniza y sal. N-BVT: COVENIN 1948-82. Trimetilamina (TMA) por colorimetría, método recomendado por la AOAC (1980) y la norma COVENIN 1948-82.

Evaluación microbiológica: Se realizó mensualmente según la siguiente metodología: Índice de coliformes totales y fecales: COVENIN 1104-84. Recuento de mesófilos: COVENIN 902-87, Recuento de bacterias halófilas y recuento de levadura y mohos halófilos por métodos recomendados por APHA (Compendium of Methods for Microbiological Examination of Food), 1980.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conocimiento de las características fisicoquímicas y biológicas de los alimentos es de gran importancia, ya que permite poner en acción algunas técnicas de preservación para controlar las alteraciones microbiológicas, que pueden afectar la calidad de determinadas propiedades de los alimentos (Alais, *et al.* 1990; Areche, 1993). Como se mencionó en este trabajo se buscó información sobre el comportamiento de variables asociadas a la calidad del producto y como estas variaban en condiciones de almacenamiento. La Tabla 1 muestra los resultados de la evaluación fisicoquímica realizada a la sardina, tipo anchoa, durante el tiempo de curado. Se observa cambio de la fracción de proteína y ceniza, y un descenso de la humedad y la grasa. La presión ejercida en el proceso, de curado, facilitó la salida de agua y otros componentes, en este caso las grasas, por tanto hubo mayor concentración de los sólidos, sales minerales y proteínas. La sardina fresca contenía 0,61 % de sal, a los 15 días, sometida al proceso de salado se registró 13,7% de sal y a los 105 días registró un 17,8% de sal manteniéndose sin cambio hasta los 180 días.

El porcentaje de proteínas grasa, sal y humedad indican que es un alimento con un considerable valor energético. Estos resultados coinciden con los de Fuentes (1984) y Cabello *et al.* (1997) en sus estudios; sobre curado y salado de sardina anchovada y sardina salada respectivamente. Los niveles de N-BVT y TMA durante la evaluación de la sardina anchovada fueron aumentando progresivamente (Tabla 2), sin sobrepasar los límites permitidos para productos semejantes según las normas COVENIN 1948-82 de 75 mg-N/100g y 10-15 mg/100g TMA. Estos resultados aunados a los niveles de pH que estuvo entre 5,90 para cero (0) días y 5,58 para los 180 días y a valores de a_w que estuvieron entre 0,83 para cero (0) días y 0,82 para los 180 días indican que el producto examinado se mantuvo sin alteraciones ni cambios en su calidad manteniéndose apto para la comercialización y el consumo humano

TABLA 1.- Resultados promedios de la composición química de la sardina tipo anchoa durante el tiempo de curado.

Tiempo (días)	Proteína (%)	Grasa (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)
0	18,00	7,10	70,70	1,54
15	21,23	6,00	50,40	17,76
30	21,22	6,37	50,00	18,95
45	21,00	6,70	50,80	18,00
60	21,30	6,20	53,80	18,20
75	21,20	6,09	53,10	18,42
90	21,91	6,28	52,50	19,82
105	21,82	6,78	51,20	18,46
120	21,28	6,02	50,45	17,34
135	21,24	6,03	50,40	18,29
140	21,07	5,13	50,45	18,33
165	21,21	5,73	52,65	18,34
180	21,09	5,18	53,45	18,30

Los análisis microbiológicos (Tabla 3) revelan que la rápida penetración de la sal en el músculo del pescado impidió el desarrollo de la flora microbiana en el músculo del pescado durante los primeros meses de la evaluación, es decir mantuvo cierta resistencia en el alimento. A los 120 días de la evaluación observó un desarrollo de la flora bacteriana halófila, la cual fue aumentando ligeramente hasta el final de la evaluación, sin sobrepasar los límites permitidos para el consumo humano (COVENIN 1104-84-1984) de 10^{-4} ufc. Normalmente es necesario detectar bacterias que suponen entre 10^{-4} y 10^{-7} de la flora normal del alimento, flora ésta inocua. Se debe controlar la calidad de la sal de salado para evitar la incorporación de gérmenes alteradores que reducen la vida útil de este tipo de productos. El uso de sal contribuye a prolongar la vida útil mas allá de los cuatro meses sin embargo si se utilizara un preservante natural como el ácido cítrico podría disminuir o retardar más la aparición de la microflora halófila.

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista nutricional el alimento puede ser considerado de buena calidad, el cual se refleja en el porcentaje de proteína, grasa, ceniza y humedad alcanzados durante todo el proceso de anchovado.

Los valores de NBVT, TMA y pH reportados durante la evaluación indican que durante el proceso el alimento no sufrió alteraciones químicas que pudieran disminuir sus

condiciones organolépticas, por lo que puede ser considerado apto para el consumo humano. Además indican que la técnica de conservación ha sido aplicada adecuadamente.

TABLA 2. Resultados promedios de los parámetros químicos indicadores de calidad revisados durante el proceso de curado de la sardina tipo anchoa.

Tiempo (días)	N-BVT (mg-N/100g)	Trimetilamina (mg/100g)	Histamina (mg/100g)
0	15,00	1,09	0,02
15	28,00	1,17	0,13
30	32,90	1,37	0,22
45	33,61	2,38	0,22
60	33,62	2,50	0,23
75	33,90	2,51	0,25
90	34,11	2,56	0,25
105	35,70	2,56	0,57
120	38,90	2,81	0,61
135	39,20	3,41	0,65
150	39,20	3,42	0,81
165	40,02	3,51	0,97
180	41,07	3,67	1,02

TABLA 3. Resultados de los análisis microbiológicos de la sardina tipo anchoa durante el tiempo de curado.

Tiempo (días)	Aeróbios mesófilos UFC/g	Índice de coliformes totales NMP/g	Índice de coliformes fecales NMP/g	Bacterias halófilas UFC/g	Mohos y levaduras UFC/g
0	$8,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	< 3	ND	ND
30	ND	< 3	ND	< 10	< 10
60	ND	< 3	ND	< 10	< 10
90	ND	< 3	ND	< 10	< 10
120	ND	< 3	ND	$1,1 \times 10^2$	< 10
150	ND	< 3	ND	$1,9 \times 10^2$	< 10
180	ND	< 3	ND	$1,9 \times 10^2$	< 10

“ND”: No determinado, “< 3”: Ningún tubo positivo según la técnica y “<10”: Ninguna colonia en las placas según la técnica.

Los análisis microbiológicos mostraron que el alimento se mantuvo en condiciones aceptables hasta los primeros 120 días de la evaluación cuando se produjo un ligero desarrollo de la flora bacteriana halófila. Por lo que es recomendable utilizar algún preservante natural que prolongue aún más el tiempo de vida útil del alimento, o controlar la calidad de la sal.

Este producto puede ser alternativo al importado de la Unión Europea.

BIBLIOGRAFÍA

Alais, C. y Liden, G. 1990. Bioquímica de los Alimentos. Edición Masson, Zaragoza. 359 p.

AOAC, 1980. Official Methods of Analysis. 13th ed., Edith Mowissts W., Washington, D.C., U.S.A.

APHA, 1992. Compendium of Methods for Microbiological examination of Food, Third. Edith C Vanderzan, Washington, D.C., U.S.A. 1115 p.

COVENIN. 1979. Norma venezolana. 1315-79. Determinación de pH. Ministerio de Fomento. Caracas. 3 p.

COVENIN, 1982. Norma Venezolana. 1948-82. Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total en Pescados y Productos Marinos. Ministerio de Fomento, Caracas, 4 pp.

COVENIN, 1984 Norma Venezolana. 1104-84. Determinación del Número más Probables de Coliformes Fecales y *Echerichia coli*. Ministerio de Fomento, Caracas. 21 p.

COVENIN, 1987 Norma Venezolana. 902-87. Método para el Recuento de mohos y levaduras. Ministerio de Fomento, Caracas, 4 p.

Fuentes, E. 1984. Salado y curado de sardina (*Sardinella spp*) anchovada. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, 39 pp.

Huss, H. 1988. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de Calidad. Programa de Capacitación FAO/DANIDA En Tecnología Pesquera y Control de Calidad. Roma, 133 pp.

DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE PELICULAS DE QUITOSANO

ALMEIDA, A.¹, ARANCIBIA, M.¹, ALVARADO, J.¹, PINOTTI, A.², GARCIA, M. A. ² y ZARITZKY, N. ^{2,3}

¹Universidad Técnica de Ambato. Fac. Cs. e Ing. en Alimentos. Ecuador. ² CIDCA. Fac. Cs. Exactas, UNLP- CONICET. 47 y 116. La Plata. Argentina. ³ Fac. Ingeniería, UNLP. e-mail: zaritzky@ing.unlp.edu.ar, Tel/Fax 0221-4254853/4249287/4890741.

RESUMEN

A partir de exoesqueletos de camarones (*Penaeus vannamei*) provistos por una industria pesquera de Ecuador se extrajo quitina y se obtuvo quitosano. El quitosano se caracterizó determinándose su peso molecular, grado de desacetilación y contenido de cenizas. A partir de suspensiones de quitosano (1 - 1.5%), se obtuvieron películas por moldeo. La microestructura de las películas se analizó por microscopía diferencial de barrido y difracción de rayos X observándose que las estructuras desarrolladas eran muy estables, con bajo grado de cristalinidad. Se evaluaron las propiedades de barrera al CO₂ y vapor de agua, obteniéndose con las suspensiones filmogénicas al 1.5% los valores más bajos de permeabilidad al CO₂; los valores de permeabilidad al vapor de agua estuvieron en el rango $3.0-5.7 \times 10^{-11}$ (g/seg m Pa). Las propiedades mecánicas se determinaron mediante ensayos de tracción y punción observándose que la fuerza a la ruptura aumentó con la concentración de quitosano, mientras que la deformación a la ruptura se mantuvo constante.

Palabras claves: Quitosano, quitina, películas biodegradables, propiedades mecánicas, propiedades de barrera

ABSTRACT

Shrimps (*Penaeus vannamei*) from Ecuador were used to obtain chitin and chitosan. Chitosan was characterized by determining its molecular weight, deacetylation grade and ash content. Chitosan films were obtained by casting from suspensions of chitosan in concentrations ranging between 1-1.5%. Film microstructures were characterized by scanning electron microscopy and X -ray diffraction, showing stable structures, with a low degree of crystallinity. Barrier properties were evaluated; the films formulated with 1.5 % concentration in the filmogenic suspensions showed the lowest CO₂ permeability values. Water vapor permeability values ranged between $3.0-5.7 \times 10^{-11}$ (g/seg m Pa). Mechanical

properties were determined by tensile and puncture tests; breaking strength increased with chitosan concentration, while deformation remained constant.

INTRODUCCIÓN

La conservación del medio ambiente promueve el estudio de alternativas para poder reducir los desechos de envases de materiales de lenta degradación que son fuente de contaminación y reemplazarlos por otras materias primas, como proteínas y polisacáridos, que constituyen recursos renovables abundantes en la América Latina. La utilización de polímeros biodegradables a partir de desechos industriales para la obtención de envases y películas es una de las alternativas viables que no genera costo adicional. El quitosano es un subproducto de la industria pesquera con numerosas aplicaciones en distintas áreas, principalmente en medicina, tratamiento de aguas y efluentes, cosmética y medio ambiente. Por su capacidad filmogénica, biodegradabilidad y por ser el único polielectrolito catiónico natural es un hidrocoloide adecuado para la formulación de películas con características particulares. La posibilidad de controlar la formulación amplía las aplicaciones potenciales de estos biomateriales.

Los objetivos fueron: extraer quitina y obtener quitosano por desacetilación a partir de exoesqueletos de camarones provistos por una industria pesquera de Ecuador y desarrollar películas biodegradables a partir de dicho subproducto, caracterizando su microestructura y sus propiedades mecánicas y de barrera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de quitina:

Se trabajó con caparazones de camarón (*Penaeus vannamei*) secos y molidos en molino manual Corona. La quitina se extrajo tratando los caparazones con una solución 0.5% de NaOH a 80°C durante 30 minutos. La desproteinización se realizó por calentamiento durante 30 minutos con una solución 3% de NaOH a 80° C. La quitina así obtenida se lavó con abundante agua y se decoloró con una solución 3% de NaClO para remover trazas de carotenoides. Luego, las muestras se lavaron con abundante agua hasta pH 7 y posteriormente se secaron en estufa a 50° C durante 6 horas.

Obtención de quitosano:

La quitina obtenida se desacetiló con una solución al 50% de NaOH a 100° C durante 1 hora. Se lavó con abundante agua hasta pH 7 y posteriormente se secó en estufa a 50° C durante 6 horas.

Caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido

La humedad de la quitina y el quitosano se determinaron en una balanza Mettler LP 16-M, utilizando 4 a 5 g de muestra a 105 ° C. Las cenizas se cuantificaron por calcinación en mufla a 900° C (Muzzarelli, 1985).

Se determinó la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) mediante la utilización de un viscosímetro capilar Cannon y a partir de ésta se calculó el peso molecular (M_v) utilizando la ecuación de Mark Houwink.

$$[\eta]=K M_v^a$$

donde K y a son constantes que dependen del solvente y del polímero utilizado.

El grado de desacetilación (DD) se determinó por análisis elemental, relacionándolo con el porcentaje de nitrógeno (%N), después de determinar la proporción de material orgánico, usando la siguiente ecuación (Taboada y col., 2003):

$$(DD) (\%) = [(8.695 - \% N) / 1.799] * 100$$

donde 8.695 es el porcentaje de N en el quitosano totalmente desacetilado, 1.799 la diferencia entre 8.695 y 6.896 (porcentaje de N en la quitina totalmente acetilada), y %N es el porcentaje de N de la fracción orgánica del material analizado (Shepherd y col, 1997). El contenido de N se determinó según el método Microkjeldahl (AOAC 14,068. 1990).

Preparación de las películas:

Para la formulación de las películas se utilizaron suspensiones de quitosano solubilizado en una solución de ácido acético al 5% (v/v), seguida de filtración al vacío para eliminar los insolubles. La concentración de quitosano varió entre 1 y 1.5% (p/p).

Las películas se obtuvieron por moldeo de las suspensiones sobre placas de acrílico de 9 cm de diámetro, secándose en un cuarto termostático a 20°C. Una vez secas, las películas se removieron de las placas y se mantuvieron a 20°C y 65% de humedad relativa.

Caracterización de la microestructura

Las películas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) con un microscopio electrónico JEOL JSMP 100 (Japón). Las muestras se colocaron sobre portamuestras de bronce y se las recubrió con una capa de oro (40-50 nm).

El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico de espesores Elcometer A 300 FNP 23 (Inglaterra).

Los ensayos de difracción de rayos X de las películas se realizaron en un difractor Philips PW 1710 (Holanda) empleando radiación $K\alpha$ de Cu ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), 50 kV y 30 mA. Los barridos se realizaron entre $2\theta = 4^\circ$ y $2\theta = 60^\circ$ con un paso de $2\theta = 0.02^\circ$.

Propiedades de barrera

La permeabilidad al CO₂ se determinó en una celda de acero inoxidable especialmente diseñada por el método de acumulación como se describe en un trabajo previo (García y col., 2000). La composición gaseosa de cada compartimento de la celda se determinó en un cromatógrafo gaseoso Shimadzu CG6A equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna CTR I concéntrica (Alltech).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Mali y col., 2002) utilizando celdas de permeación de acrílico.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Inglaterra). Para los ensayos de punción se utilizó una sonda cilíndrica de 2mm de diámetro a una velocidad constante de 1 mm/s. De cada película se tomaron muestras de 3x3cm² y se realizaron al menos 4 medidas. Además se realizaron ensayos de tracción utilizando un sistema de pinzas de tensión A/TG; para estos ensayos se utilizaron probetas de 6cm de longitud y 0.7cm de ancho y se hicieron al menos 4 medidas de cada película.

Para ambos ensayos las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas automáticamente por el software Texture Expert Exceed. De las curvas de fuerza en función de la deformación se obtuvo la fuerza máxima a la ruptura (N), la deformación de las películas a la ruptura (mm), y el módulo de elasticidad (la pendiente inicial de la curva fuerza-deformación, N/mm). De acuerdo a la norma ASTM D882-91 (1996) se calcularon además: el factor de ruptura (fuerza máxima a la ruptura por unidad de espesor, N/μm) y el porcentaje de elongación a la ruptura (deformación dividido por la longitud inicial de la probeta y multiplicada por 100, %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del quitosano obtenido

El contenido de humedad de la quitina aislada fue de 8,79% con un porcentaje de cenizas del 1.58%. Para el quitosano obtenido el contenido de humedad fue de 4.52% y el de cenizas fue de 0.07%. El rendimiento para la obtención de quitina a partir de materia prima clasificada y seca fue del 34%, mientras que el rendimiento del proceso de obtención de quitosano a partir de quitina fue del 82.4% .

Los valores de las constantes K y a de la ecuación de Mark Houwink para el quitosano en solución de acetato de sodio 0.2 M y ácido acético 0.3 M fueron: K = 0.074 y a = 0.76. El

quitosano obtenido tuvo un peso molecular promedio de $M_v = 1.12 \cdot 10^6$ y una viscosidad intrínseca de $[\eta] = 509 \text{ ml/g}$.

El grado de desacetilación del quitosano obtenido fue de 94.5% mientras que el del quitosano comercial (Sigma) está comprendido entre 85 y 91%.

Microestructura

La microestructura de las películas se caracterizó por SEM observándose que las películas presentaban estructuras muy compactas como puede observarse en la Figura 1a. Las películas estudiadas presentaron espesores promedio de 9.3 μm , 15 μm y 18.1 μm para las suspensiones filmogénicas cuyas concentraciones eran 1, 1.25 y 1.5% respectivamente.

Por difracción de rayos X se observó que la estructura presentaba un bajo grado de cristalinidad y que era muy estable (Figura 1b). El porcentaje de cristalinidad de las películas varió entre 5.9 y 7.44%, aumentando este porcentaje con la concentración de quitosano.

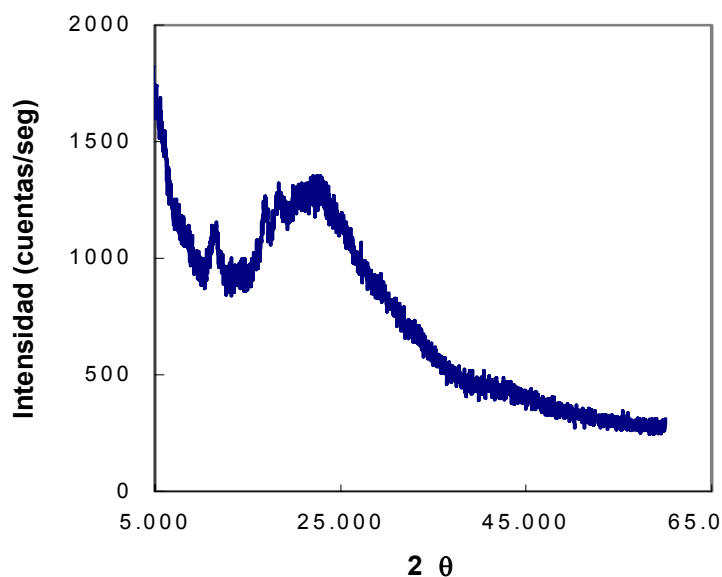
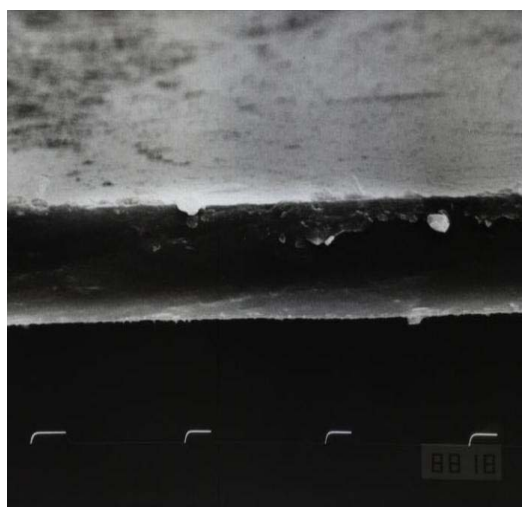


Figura 1: Microestructura de películas formuladas con 1.25% de quitosano a) micrografía obtenida al SEM (Magnificación: 10 μm entre marcas); b) espectro de difracción de rayos X.

Permeabilidad al vapor de agua y al CO₂

Los resultados obtenidos para los coeficientes de permeabilidad al vapor de agua se muestran en la Tabla 1. Se observó una disminución en los valores de permeabilidad al vapor de agua a medida que aumentaba la concentración de quitosano, lo que podría atribuirse a la formación de una matriz más compacta. Los valores de permeabilidad obtenidos para las películas de quitosano fueron menores que los reportados para

películas de almidón y del orden de los reportados para las películas de celulosa (Tabla 1). Sin embargo, estos valores de permeabilidad al vapor de agua fueron mucho mayores que los correspondientes a películas sintéticas como el polietileno de baja densidad, el polímero más utilizado para el envasado de productos alimenticios.

La permeabilidad al CO₂ varió entre 7.45 y 11.7×10⁻¹¹ (cm³/seg m Pa), para las películas formuladas con 1.5 y 1% de quitosano respectivamente. Películas sintéticas como el polietileno de baja densidad (LDPE) presentan valores de permeabilidad al CO₂ de 9.45 × 10⁻¹¹ (cm³/seg m Pa), similares a las obtenidas con las películas de quitosano.

Tabla 1: Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas biodegradables y sintéticas.

Formulación de la película	WVP (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	Referencia
Amilosa	3.8 × 10 ⁻¹⁰	Gennadios y col. 1994
Almidón de maíz plastificado con glicerol	2.57 × 10 ⁻¹⁰	García y col. 1998
Almidón de maíz plastificado con sorbitol	1.75 × 10 ⁻¹⁰	García y col. 1998
Metilcelulosa	8.70 × 10 ⁻¹¹	Donhowe y col. 1993
Quitosano 2%	3.66-4.80 × 10 ⁻¹¹	Wong y col.1992
Quitosano 1%	5.15 × 10 ⁻¹¹	Presente estudio
Quitosano 1.25%	4.5 × 10 ⁻¹¹	Presente estudio
Quitosano 1.5%	3.6 × 10 ⁻¹¹	Presente estudio
Celofán	8.4 × 10 ⁻¹¹	Shellhammer y col. 1997
PVDC (cloruro de polivinilideno)	2.22 × 10 ⁻¹³	Shellhammer y col. 1997
LPDE (polietileno de baja densidad)	9.14 × 10 ⁻¹³	Smith 1986
HDPE (polietileno de alta densidad)	2.31 × 10 ⁻¹³	Smith 1986

Propiedades mecánicas

Teniendo en cuenta los ensayos de tracción la resistencia a la ruptura aumentó con el aumento de la concentración de quitosano mientras que la deformación no presentó diferencias significativas (Figura 2). En los ensayos de punción se observó que tanto la fuerza a la ruptura como la deformación aumentaron con la concentración de quitosano (Figura 2).

Los valores de resistencia a la tracción obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los correspondientes a polímeros sintéticos como LDPE y HDPE, aunque estos materiales son más flexibles (valores de elongación mayores). Los valores obtenidos de deformación fueron similares a los reportados para el celofán, un polímero derivado de la celulosa ampliamente utilizado, aunque éste presenta mayor resistencia mecánica (Cunningham y col., 2002).

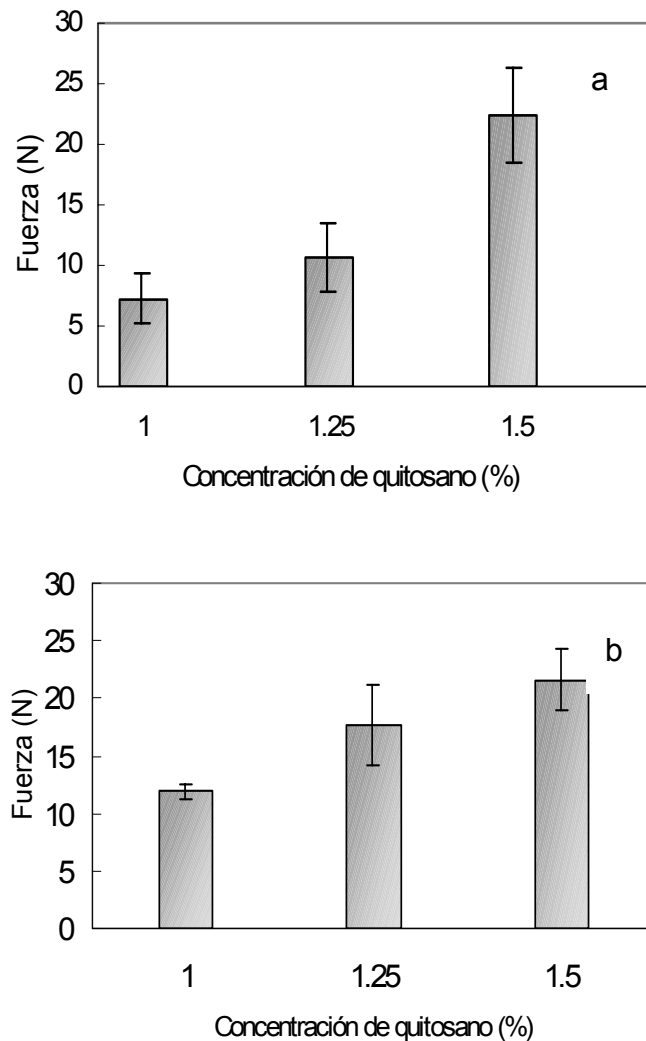


Figura 2: Fuerza a la ruptura de películas formuladas con concentraciones crecientes de quitosano a) ensayos de punción, b) ensayos de tracción

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemist. Official methods of analysis. 15th. ed., Heldrich, K. (Ed.). Washington, D.C.

ASTM (1996) Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882 - 91. *Annual book of ASTM*. Philadelphia, PA : American Society for Testing and Materials.

- Cunningham, P, Ogale, A, Dawson, P y Acton, J. (2000).** Tensile properties of soy proteins isolate films produced by thermal compaction technique. *J. Food Sci.* 65, 4, 668-671.
- Donhowe, Y. G. y Fennema, O. R. (1993).** The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical properties of methylcellulose films. *J. of Food Process. and Preserv.* 17, 247-257.
- García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2000).** Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52 (4), 118-124.
- Gennadios, A., Weller, C.L. y Gooding, C.H. (1994).** Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *J. Food Eng.* 21, 395-409.
- Mali, S.; Grossman, M.V.; García, M.A.; Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2002).** Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydr. Polym.* 50(4),379-386.
- Muzzarelli, R.A. y Rocchetti, R. (1985).** “Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry”. *Carbohydr. Polym.* 5: 461-472.
- Shellhammer, T.H. y Krochta, J.M.(1997).** Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type amount. *J. Food Sci.* 62, (2): 390-394.
- Shepherd, R. Reader, S. y Falshaw, A. (1997).** “Chitosan functional properties”. *Glycoconjugate Journal.* 14: 535-542.
- Smith, S.A. (1986).** Polyethylene, low density. En *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, Ed. M. Bakker, New York: John Wiley & Sons., pp.514-523.
- Taboada, E. Cabrera, G. y Cardenas, G. (2003).** “Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions”. *Journal of Chilean Chemical Society.* 48 (1) , p.7-12.
- Wong, D.W.S., Gastineau, F.A., Gregorski, K.S., Tillin, S.J. y Pavlath, A.E. (1992).** Chitosan-lipids films: microstructure and surface energy. *J. Agric. Food Chem.* 40, 540-544.

PELICULAS BIODEGRADABLES COMPUESTAS DE ALMIDON Y QUITOSANO: DESARROLLO Y CARACTERIZACION

¹PINOTTI, Adriana N., ¹GARCIA, María A. y ^{1,2}ZARITZKY, Noemí E.

¹ CIDCA. CONICET, Fac. Cs. Exactas. ² Fac. de Ingeniería, UNLP. 47 y 116, La Plata. e-mail: magarcia@quimica.unlp.edu.ar, impronta@arnet.com.ar, Tel/Fax 0221-4254853.

RESUMEN

Se desarrollaron películas flexibles biodegradables a partir de almidón de maíz y quitosano; se caracterizó su microestructura y se evaluaron sus propiedades mecánicas y de barrera. Por difracción de rayos X se observó que la estructura desarrollada en las películas era muy estable; la microestructura se caracterizó además por microscopía electrónica de barrido observándose que las películas presentaban superficies suaves, homogéneas y compactas. Las películas compuestas de almidón y quitosano plastificadas con glicerol tuvieron valores de permeabilidad al vapor de agua de $3.76-4.54 \times 10^{-11}$ g/seg m Pa, menores que los de las películas de un solo componente. El agregado de plastificante mejoró la flexibilidad y la integridad de las películas de almidón. En conclusión, con el agregado de quitosano si bien se obtienen matrices más rígidas se mejoran notablemente las propiedades de barrera.

Palabras claves: Películas biodegradables, almidón, quitosano, microestructura, propiedades mecánicas, propiedades de barrera.

ABSTRACT:

Biodegradable flexible films were developed from corn starch and chitosan; their microstructure, mechanical and barrier properties were evaluated. X ray diffraction test showed that the developed structure was stable; smooth surfaces, homogeneous and compact were observed from microstructure studies using SEM. Composite starch-chitosan films plasticized with glycerol had water vapor permeability values ranged between $3.76-4.54 \times 10^{-11}$ g/sec m Pa, lower than the one component films. The addition of plasticizer improved the flexibility and integrity of starch films. In conclusion, the addition of chitosan improved barrier properties leading to more rigid matrixes.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha aumentado el interés por el uso de polímeros biodegradables para el desarrollo de películas flexibles como posible solución a problemas de contaminación ambiental y manejo de residuos sólidos causados por los envases sintéticos (Petersen y col., 1999). Los materiales básicos para la formulación de matrices pueden ser: polisacáridos, proteínas y lípidos; cada uno tiene sus ventajas y desventajas por lo que la tendencia actual es combinarlos (Vojdani y Torres, 1990; Avena-Bustillos y col., 1997; García y col., 1998). Otro de los componentes importantes en las formulaciones de las películas son los plastificantes, los cuales ayudan a mantener su integridad y mejoran las propiedades mecánicas.

El quitosano, un subproducto de la industria pesquera derivado de la quitina es un hidrocoloide con buenas propiedades formadoras de películas, al igual que el almidón. El manejo de la formulación de las películas permite controlar las propiedades de barrera y mecánicas de las mismas a efectos de aumentar la eficiencia de los procesos de conservación de los alimentos envasados. La composición, microestructura y propiedades funcionales de películas formuladas con biopolímeros determinan sus posibles aplicaciones.

Los objetivos del presente trabajo fueron: desarrollar películas flexibles biodegradables a partir de almidón de maíz y quitosano, caracterizar su microestructura y evaluar sus propiedades mecánicas y de barrera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suspensiones de hidrocoloide: para la formulación de las películas se utilizaron suspensiones de:

- almidón comercial de maíz (Molinos Río de la Plata, Argentina) con 25% de amilosa gelatinizado térmicamente durante 30 minutos a 95°C. El plastificante, glicerol, se agregó a las suspensiones gelatinizadas. La concentración de almidón varió entre 3.5 y 6%(P/P) y la de plastificante entre 1 y 1.71% (P/P)
- quitosano (SIGMA, USA) al 1%(P/P) que se preparó según García y col. (2004) por solubilización en una solución de ácido acético al 1 % (v/v), seguida de filtración al vacío para eliminar los insolubles.

A partir de estas suspensiones se prepararon suspensiones mezcla de almidón gelatinizado (con y sin agregado de glicerol) y quitosano en una proporción 50:50(P/P).

Preparación de las películas: se obtuvieron por moldeo de las suspensiones sobre placas de acrílico de 10 x 20 cm, secándose en una estufa a 60°C. Una vez secas, las películas se

removieron fácilmente de las placas y se mantuvieron a 20°C y 65% de humedad relativa. Se formularon películas de almidón sin agregado de plastificante (A), películas de almidón con agregado de plastificante (A+G), y películas de quitosano (Q). A partir de las suspensiones mezcla se obtuvieron las películas compuestas, (películas A+Q y películas A+G+Q).

Caracterización fisicoquímica: el espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico de espesores Elcometer A 300 FNP 23 (England) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Los valores informados son el promedio de al menos 15 medidas. El contenido de humedad de las películas se determinó por secado en una estufa a 105°C hasta peso constante.

Caracterización de la microestructura: las películas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio electrónico JEOL JSMP 100 (Japón), previamente se las colocó sobre portamuestras de bronce y se las recubrió con una capa de oro (40-50 nm). Los ensayos de difracción de rayos X de las películas se realizaron en un difractómetro Philips PW 1710 (Holanda) empleando radiación $K\alpha$ de Cu ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), 50 kV y 30 mA. Los barridos se realizaron entre $2\theta = 4^\circ$ y $2\theta = 60^\circ$ con un paso de $2\theta = 0.02^\circ$.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP): se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Mali y col., 2002). Las muestras se colocaron en celdas de permeación de acrílico que tenían un área expuesta de 0.00181 m^2 las cuales se almacenaron a 20°C en un desecador. Se mantuvo un gradiente de 75% de humedad relativa (RH) a través de las películas colocando sílica gel anhidra en la celda (0% RH), y una solución saturada de NaCl en el desecador (75% RH). Este gradiente correspondía a una fuerza impulsora de 1753.55 Pa, expresada como presión parcial de vapor de agua. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica con una precisión de 0.0001g en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y de la pendiente se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) teniendo en cuenta el área expuesta en ($\text{g s}^{-1}\text{ m}^{-2}$). Luego se calculó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) en ($\text{g Pa}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{ m}^{-1}$) multiplicando la WVTR por el espesor de la película y dividiéndolo por la fuerza impulsora.

Propiedades mecánicas: se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Inglaterra) mediante ensayos de tracción con un sistema de pinzas de tensión A/TG. Para los ensayos se utilizaron probetas de 6cm de longitud y 0.7cm de ancho obtenidas de las películas; los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas automáticamente por el

software Texture Expert Exceed instalado en una PC conectada al equipo. De las curvas de fuerza en función de la deformación se obtuvo la fuerza máxima a la ruptura (N), la deformación de las películas a la ruptura (mm), y el módulo de elasticidad (N/mm), según la norma ASTM D882-91 (1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microestructura

Por microscopía electrónica de barrido se observó que todas las películas presentaban superficies suaves, homogéneas y compactas (Fig. 1). Las películas de quitosano tenían espesores de $14\mu\text{m}$ mientras que el espesor de las películas de almidón varió entre 70 y $111\mu\text{m}$. Las películas compuestas presentaron valores de espesor intermedios, observándose que a mayores concentraciones de almidón se obtenían películas de mayor espesor.

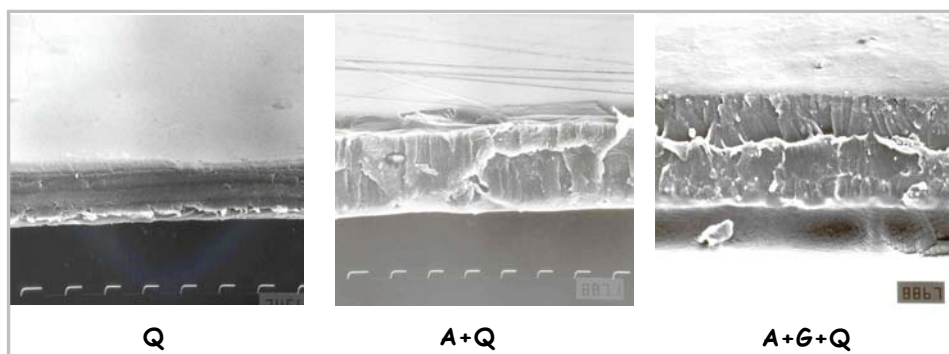


Figura 1: Micrografías de cortes transversales de películas de quitosano (Q), de almidón y quitosano (A+Q) y plastificadas con glicerol (A+G+Q). Escala: $10\mu\text{m}$ entre marcas.

Los difractogramas de rayos X de las películas indicaron que éstos presentaban una estructura amorfo-cristalina, muy estable, con un bajo grado de cristalinidad. Las películas de quitosano presentaron una estructura más amorfa y las compuestas un patrón de difracción similar al de las películas de almidón (Fig. 2). El agregado de glicerol no modificó significativamente el patrón de difracción de las películas de almidón.

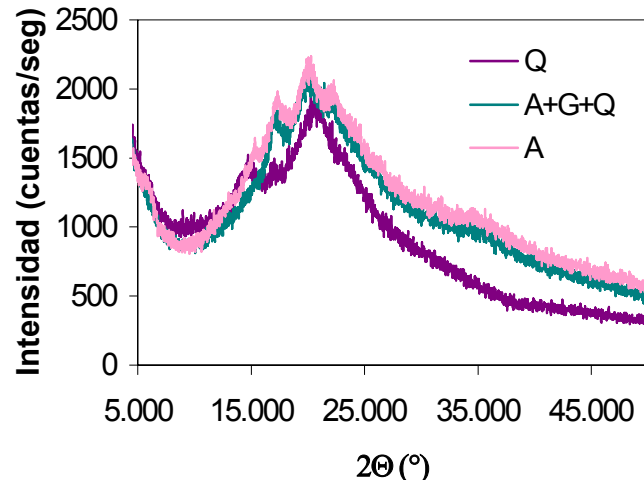


Figura 2: Diffractogramas de películas de almidón (A), quitosano (Q) y de películas compuestas de almidón y quitosano (1:1) plastificadas con glicerol (A+G+Q).

Permeabilidad al vapor de agua

Las películas de almidón con quitosano presentaron valores de WVP en el rango de $8.29-11.7 \times 10^{-11}$ ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$) y las de quitosano de 5.04×10^{-11} ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$). Las películas compuestas de almidón y quitosano plastificadas con glicerol tuvieron valores de WVP de $3.76-4.54 \times 10^{-11}$ ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$), menores que las de almidón, observándose un efecto sinérgico en las mezclas de almidón-quitosano (Fig. 3). Estos valores de permeabilidad al vapor de agua son un orden de magnitud más bajos que los correspondientes a algunas películas de proteínas y aún más bajos que los reportados en la literatura para películas de otros polisacáridos (Krochta y col., 1997; García y col. 2000; Mali y col., 2002).

Con respecto a los polímeros sintéticos, las películas compuestas tienen valores similares a las de celofán, aunque mayores que los del polietileno de baja densidad (LDPE), uno de los polímeros más comúnmente utilizado para envases en la industria alimentaria (Smith, 1986).

Propiedades mecánicas

Las películas de quitosano fueron rígidas y quebradizas, ya que presentaban valores de módulo elástico altos y baja deformación a la ruptura (Fig., 4). El agregado de plastificante mejoró la flexibilidad y la integridad de las películas de almidón. Se observó una disminución de la fuerza a la ruptura en las películas formuladas con quitosano y glicerol respecto a las de almidón; la mayor deformación en la ruptura se obtuvo en las películas preparadas con almidón y glicerol (Fig., 4). Las películas compuestas presentaban valores de elongación mayores y módulos elásticos menores que las de quitosano. Los

plastificantes al interferir con la asociación de las cadenas poliméricas facilitan su deslizamiento por lo que aumentan la flexibilidad de las películas.

Los polímeros sintéticos como LDPE y HDPE tienen altos valores de elongación pero valores similares de resistencia a la tracción, mientras que el celofán presenta valores similares de elongación que los obtenidos con polímeros naturales pero mayor resistencia mecánica (Cunningham y col., 2000).

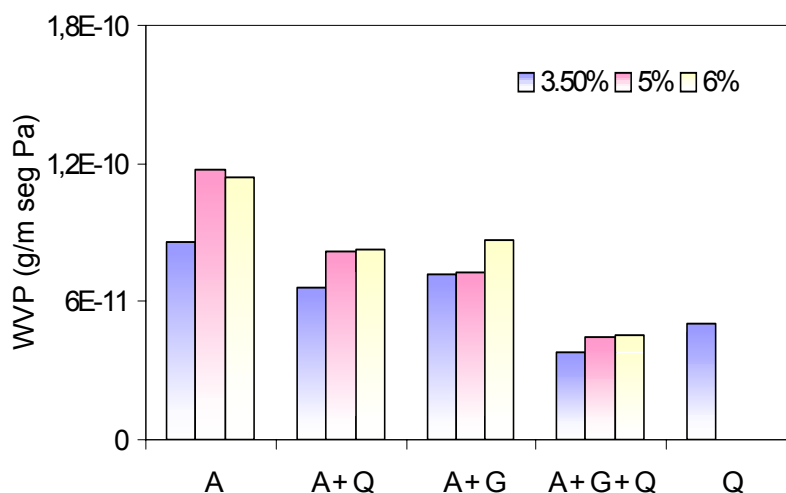


Figura 3: Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas compuestas de Q: 1% de quitosano , A: almidón (3.5, 5 y 6%), A + G: almidón plastificadas con glicerol y A + G + Q : almidón y quitosano (1:1P/P) plastificadas con glicerol

CONCLUSIONES

Las propiedades de las películas compuestas no mostró un efecto simplemente aditivo de los componentes individuales, sino que indican que existe una interacción entre almidón y quitosano. En conclusión, con el agregado de quitosano si bien se obtienen matrices más rígidas se mejoran notablemente las propiedades de barrera al vapor de agua, lo que amplía las posibilidades de aplicación de las películas de almidón-quitosano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero provisto por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) proyecto PICT 09-11212/02, la Universidad Nacional de La Plata y el CONICET.

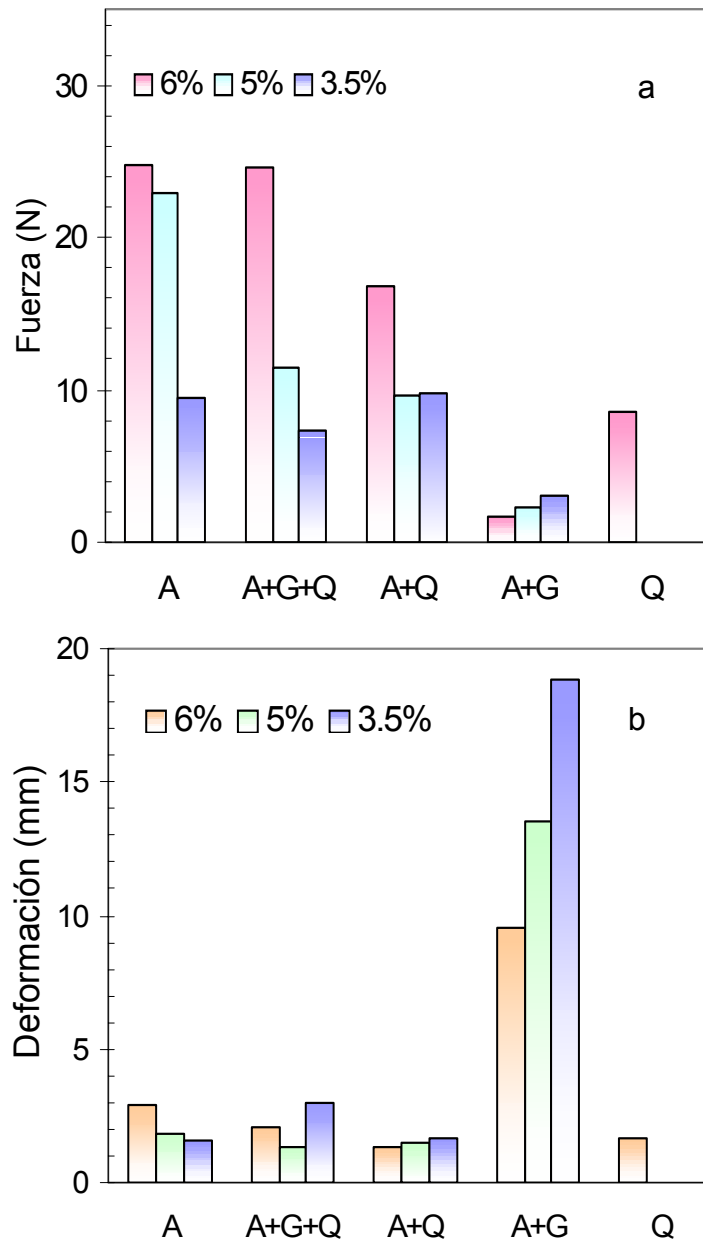


Figura 4: Propiedades mecánicas de películas compuestas de Q: 1% de quitosano , A: almidón (3.5, 5 y 6%), A + G: almidón plastificadas con glicerol y A + G + Q: almidón y quitosano (1:1P/P) plastificadas con glicerol. a) fuerza y b) deformación a la ruptura.

BIBLIOGRAFÍA

- ASTM (1996)** Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882 - 91. *Annual book of ASTM*. Philadelphia, PA : American Society for Testing and Materials.
- Avena-Bustillos, R.J.; Krochta, J.M.; Saltveit, M.E., 1997.** "Water vapor resistance of red delicious apples and celery stics coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride films. *J. Food Sci.* 62, (2), 351-354.

- Cunningham, P., Ogale, A., Dawson, P. & Acton, J. (2000).** Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science*, 65 (4), 668-671.
- García, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (1998)** “Plasticizer effect on starch-based coatings applied to strawberries (*Fragaria×ananassa*).” *J. Agric. Food Chem.* 46, 3758-3767.
- García, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2000).** Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52 (4), 118-124.
- García, M.A.; Pinotti, A.; Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2004).** Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydr. Polym.*, 56 (3), 339-345.
- Krochta, J.M. & De Mulder-Johnson, C.(1997).** Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61-77.
- Mali, S.; Grossman, M.V.; García, M.A.; Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2002).** Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydr. Polym.*, 50 (4),379-386.
- Petersen, K.; Nielsen, P.V.; Bertelsen, G.; Lawther, M.; Olsen, M.B.; Nilsson, N.H.;
- Mortensen, G., 1999,** “Potential of biobased materials for food packaging.” *Trends in Food Science & Technology*, 10, 52-68.
- Smith, S.A. (1986).** Polyethylene, low density. In M. Bakker, *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, (pp.514-523). New York: John Wiley & Sons.
- Vodjani, F., Torres, J. A., 1990,** “Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropylcellulose coatings: effect of fatty acids”. *J. Food Sci.* 55, 841-846.

PELICULAS ACTIVAS DE METILCELULOSA Y QUITOSANO: CAMBIOS EN LA MICROESTRUCTURA Y EN LAS PROPIEDADES MECANICAS Y DE BARRERA INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE UN CAMPO ELECTRICO

^{1,2} MARTINO, Miriam, ¹GARCIA, María A., ¹PINOTTI, Adriana y ^{1,2} ZARITZKY, Noemí

¹ CIDCA. CONICET, Fac. Cs. Exactas. ² Fac. de Ingeniería, UNLP. 47 y 116, La Plata. e-mail: magarcia@quimica.unlp.edu.ar, mmartino@ing.unlp.edu.ar, Tel/Fax 0221-4254853.

RESUMEN

Se desarrollaron películas biodegradables compuestas de quitosano y metilcelulosa y se analizó el efecto de las condiciones de obtención sobre la microestructura y las propiedades de barrera y mecánicas de las películas. Las películas se obtuvieron por moldeo y se secaron a 60°C (películas control) y a 60°C con aplicación de un campo eléctrico de 12 V (películas orientadas). Las películas orientadas presentaron valores de permeabilidad al vapor de agua menores que las control. Las propiedades de barrera se correlacionaron con los cambios observados en los patrones de difracción de las películas ya que durante el secado bajo un campo eléctrico las cadenas de quitosano, polímero catiónico, se orientan. Las películas de quitosano control fueron rígidas y quebradizas; su flexibilidad aumentó con el contenido de metilcelulosa. Las películas de quitosano orientadas fueron más resistentes ya que presentaron valores de fuerza a la ruptura y deformación mayores que las películas control.

Palabras claves: Películas activas, metilcelulosa, quitosano, microestructura, propiedades mecánicas, propiedades de barrera

ABSTRACT

Biodegradable films of chitosan and methylcellulose were developed. The effect of preparation conditions on the microstructure, barrier and mechanical properties were analyzed. Films were obtained by casting and dried at 60°C with and without an electrical field of 12 V (orientated and control films, respectively). Orientated films showed water permeability values lower than control ones. Barrier properties of control and orientated films were correlated with X-ray diffraction patterns, the differences were attributed to the possibility of the cationic chains of chitosan to be reoriented under an electrical field. Chitosan control films were rigid and brittle, flexibility increased with methylcellulose

content. Chitosan orientated films were more resistant than control ones, showing breaking force and deformation values higher than control films.

INTRODUCCIÓN

Existe una tendencia creciente a desarrollar películas activas con propiedades adicionales a las tradicionales de embalaje a partir de biopolímeros, a efectos de disminuir problemas de contaminación ambiental. El quitosano y la metilcelulosa son hidrocoloides compatibles con capacidad de formar películas adecuadas para el envasado de productos alimenticios (García y col., 2004).

Las propiedades de las películas biodegradables dependen del tipo de material utilizado, de su obtención y de su aplicación (Krochta y De Mulder Johnston, 1997). La incorporación de agentes específicos a la formulación modifica la funcionalidad de las películas transformándolas en películas activas, éste es un concepto innovador que se puede definir, según la Comunidad Europea, como un tipo de envase que cambia su condición de “extender la vida útil del producto” a “mejorar la seguridad y propiedades sensoriales del producto manteniendo su calidad”, (Vermeiren y col., 1999).

Los objetivos propuestos fueron: desarrollar películas biodegradables compuestas y analizar el efecto de las condiciones de obtención de las mismas sobre la microestructura y las propiedades mecánicas y de barrera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suspensiones de hidrocoloide:

Para la formulación de las películas se utilizaron suspensiones de metilcelulosa (MC, Colorcorn, Argentina) al 1% (p/p) y de quitosano (SIGMA, USA) al 1 y 2% (p/p) que se prepararon como se describe en un trabajo previo (García y col., 2004) por solubilización en una solución de ácido acético al 1 % (v/v), seguida de filtración al vacío para eliminar los insolubles. A partir de estas suspensiones se prepararon suspensiones mezcla de MC y quitosano con las siguientes proporciones MC:Q: 25:75, 50:50, 75:25 (p/p).

Preparación de las películas:

Las películas se obtuvieron por moldeo de las suspensiones sobre placas de acrílico de 10 x 20 cm y se secaron a 60°C (películas control) y a 60°C con aplicación de un campo eléctrico de 12 V (películas orientadas). Una vez secas, las películas se removieron fácilmente de las placas y se mantuvieron a 20°C y 65% de humedad relativa.

El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico de espesores Elcometer A 300 FNP 23 (Inglaterra) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Los valores informados son el promedio de al menos 15 medidas.

El contenido de humedad de las películas se determinó por secado en una estufa a 105°C hasta peso constante.

Caracterización de la microestructura:

Las películas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio electrónico JEOL JSMP 100 (Japón), previamente se las colocó sobre portamuestras de bronce y se las recubrió con una capa de oro.

Los ensayos de difracción de rayos X de las películas se realizaron en un difractómetro Philips PW 1710 (Holanda) empleando radiación $K\alpha$ de Cu ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), 50 kV y 30 mA. Los barridos se realizaron entre $2\theta = 4^\circ$ y $2\theta = 60^\circ$ con un paso de $2\theta = 0.02^\circ$.

Permeabilidad al vapor de agua:

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Mali y col., 2002). Las muestras se colocaron en celdas de permeación de acrílico que tenían un área expuesta de 0.00181 m^2 las cuales se almacenaron a 20°C en un desecador. Se mantuvo un gradiente de 75% de humedad relativa (RH) a través de las películas colocando sílica gel anhidra en la celda (0% RH), y una solución saturada de NaCl en el desecador (75% RH). Este gradiente correspondía a una fuerza impulsora de 1753.55 Pa, expresada como presión parcial de vapor de agua. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica con una precisión de 0.0001g y este cambio se graficó en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y de la pendiente se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR, $\text{g s}^{-1}\text{ m}^{-2}$), teniendo en cuenta el área expuesta en. Luego se calculó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) en $\text{g Pa}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{ m}^{-1}$ multiplicando la WVTR por el espesor de la película y dividiéndolo por la fuerza impulsora.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Inglaterra) mediante ensayos de tracción utilizando un sistema de pinzas de tensión A/TG. De las películas se obtuvieron probetas de 6cm de longitud y 0.7cm de ancho y se hicieron al menos 4 medidas de cada muestra.

Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas automáticamente por el software Texture Expert Exceed instalado en una PC conectada al equipo. De las curvas de fuerza en función de la deformación se obtuvo la fuerza máxima a la ruptura (N), la deformación de las películas a la ruptura (mm), y el módulo de

elasticidad (la pendiente de la curva fuerza-deformación, N/mm). De acuerdo a la norma ASTM D882-91 (1996) se calcularon además: el factor de ruptura (fuerza máxima a la ruptura por unidad de espesor, N/ μm), el porcentaje de elongación a la ruptura (deformación dividido por la longitud inicial de la probeta y multiplicada por 100, %) y la resistencia a la tracción (MPa) como la fuerza por área transversal (espesor x ancho de la probeta).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microestructura

Por microscopía electrónica de barrido se observó que presentaban superficies suaves y compactas. Sin embargo las superficies de las películas orientadas resultaron más homogéneas que las películas control.

Los difractogramas de rayos X de las películas indicaron que éstas presentaban una estructura amorfo-cristalina, con un bajo grado de cristalinidad. Las películas control de quitosano presentaron una estructura amorfa, observándose un ligero aumento del grado de cristalinidad en los patrones de las películas orientadas de quitosano (Fig.1).

WVP

Los valores de WVP estuvieron comprendidos entre $7.76 \pm 0.07 \times 10^{-11}$ (g/seg m Pa) para las películas de quitosano y $5.32 \pm 0.42 \times 10^{-11}$ para las de metilcelulosa; para las películas compuestas se obtuvieron valores intermedios. Las películas orientadas presentaron valores de WVP menores que las control (Fig.2). Las propiedades de barrera se correlacionaron con los cambios observados en los patrones de difracción de las películas ya que durante el secado bajo un campo eléctrico las cadenas de quitosano se orientan por ser un polímero catiónico. Estos valores de permeabilidad al vapor de agua son un orden de magnitud más bajos que los correspondientes a algunas películas de proteínas y aún más bajos que los reportados en la literatura para películas de otros polisacáridos (Krochta y col., 1997; García y col., 2000; Mali y col., 2002).

Propiedades mecánicas

Tanto en los ensayos de tracción como en los de punción se observó la misma tendencia en los parámetros de las propiedades mecánicas analizadas. Las películas de quitosano control fueron rígidas y quebradizas; su flexibilidad aumentó con el contenido de metilcelulosa. Las películas compuestas formuladas con quitosano al 2% presentaron valores de módulo elástico y elongación mayores que las formuladas con quitosano al 1%. Las películas de quitosano orientadas fueron más resistentes ya que presentaron valores de módulo elástico (Fig.3) y deformación mayores que las películas control.

Los polímeros sintéticos como LDPE y HDPE tienen altos valores de elongación pero valores similares de resistencia a la tracción, mientras que el celofán presenta valores similares de elongación que los obtenidos con polímeros naturales pero mayor resistencia mecánica (Cunningham y col., 2000).

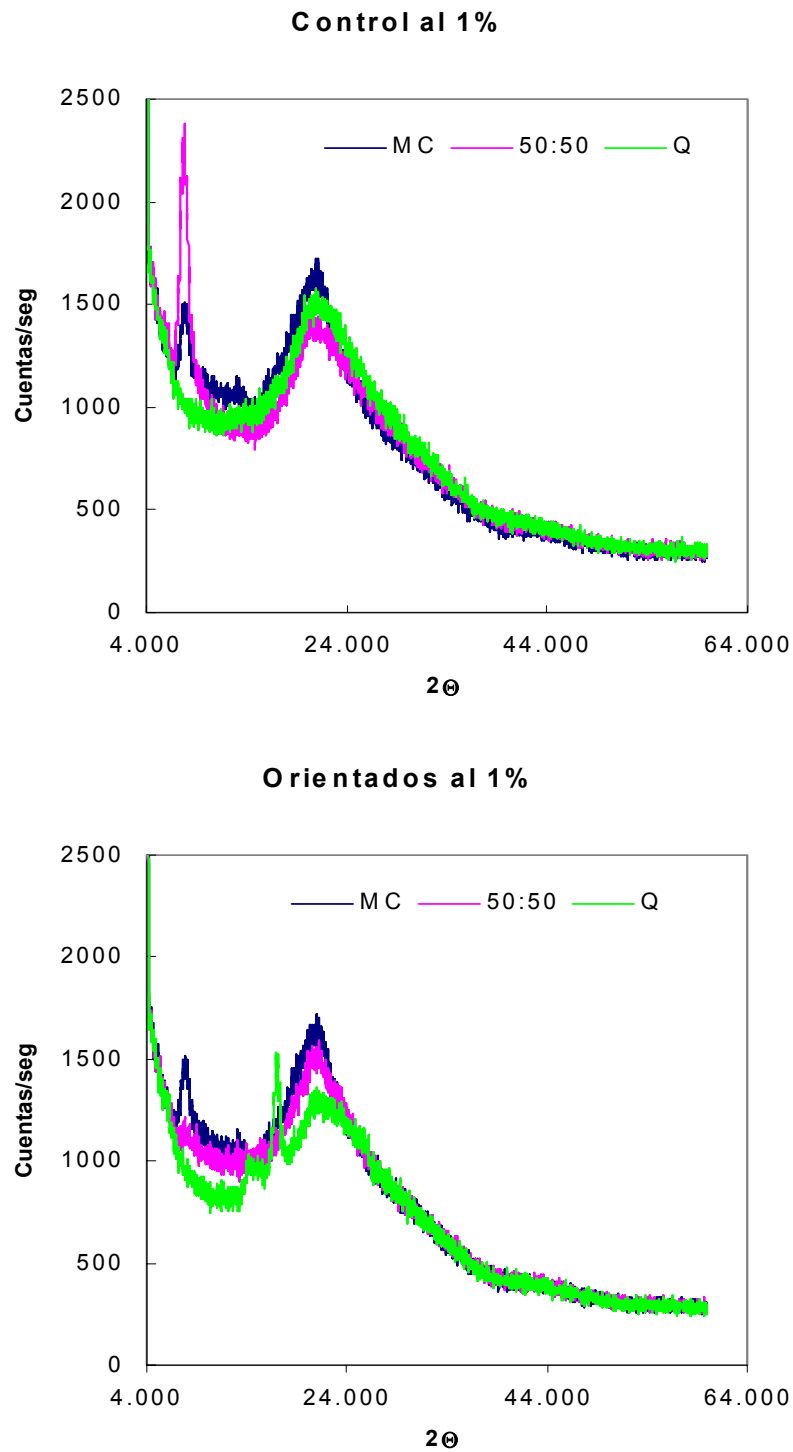


Figura 1: Diffractogramas de películas de metilcelulosa (MC) y quitosano (Q) al 1% y de películas compuestas MC:Q en una proporción 50:50; efecto de las condiciones de secado.

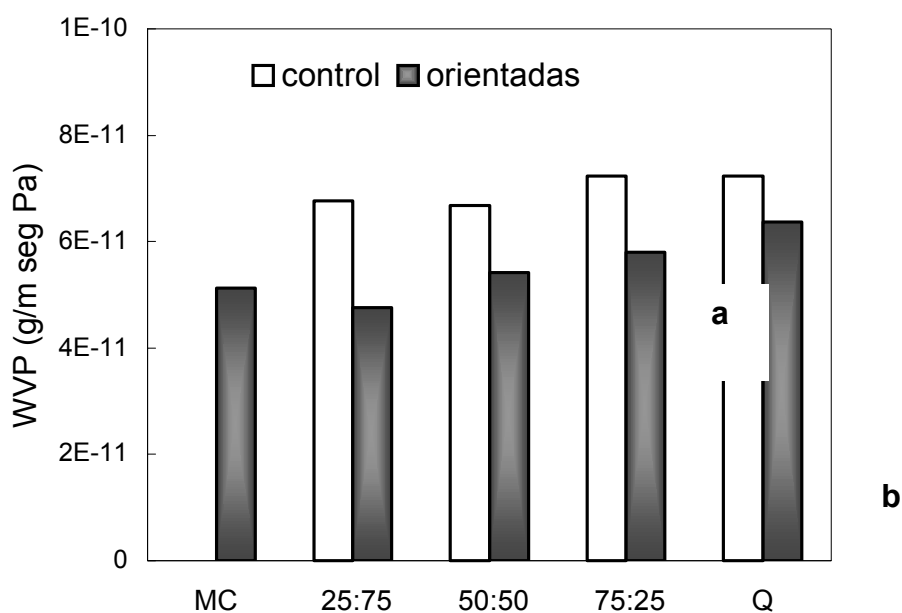


Figura 2: Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas compuestas de metilcelulosa al 1% (MC), quitosano al 2% (Q) y sus mezclas.

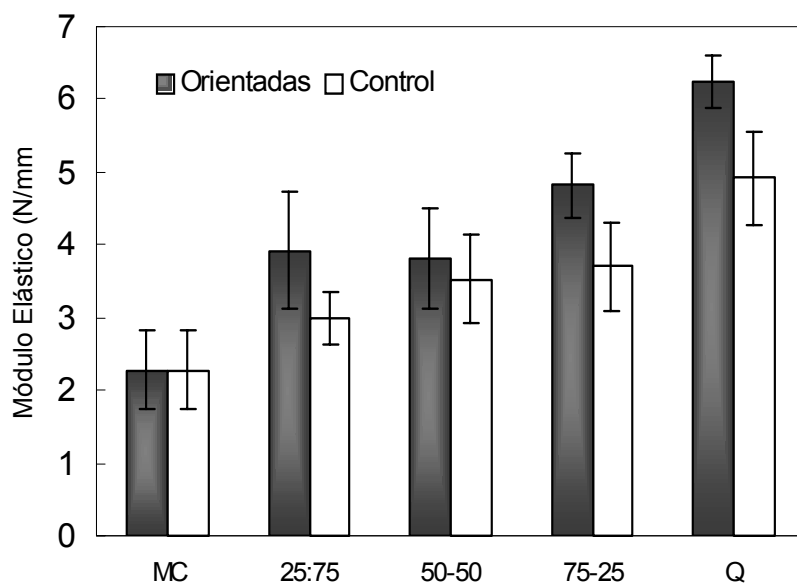
CONCLUSIONES

Las propiedades mecánicas de las películas compuestas mejoraron al aumentar la proporción de MC sin afectar las propiedades de barrera.

El secado bajo un campo eléctrico permite que las cadenas de quitosano se orienten, lo que se evidencia en los cambios observados en los patrones de difracción de rayos X.

Estos cambios en la estructura se correlacionan con la disminución de la WVP y el aumento en la resistencia mecánica de las películas respecto a las control.

Figura 3: Efecto de las condiciones de obtención en el módulo elástico de películas compuestas de metilcelulosa al 1% (MC), quitosano al 2% (Q) y sus mezclas.



AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero provisto por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) proyectos PICT 09-11211/02, PICT 09-11212/02, Universidad Nacional de La Plata y CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

ASTM (1996) Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882 - 91. *Annual book of ASTM*. Philadelphia, PA : American Society for Testing and Materials.

Cunningham, P., Ogale, A., Dawson, P. y Acton, J. (2000). Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science*, 65 (4), 668-671.

García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2000). Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52 (4), 118-124.

García, M.A.; Pinotti, A.; Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydr. Polym.*, 56 (3), 339-345.

Krochta, J.M. y De Mulder-Johnson, C.(1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61-77.

Mali, S.; Grossman, M.V.; García, M.A.; Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydr. Polym.*, 50 (4),379-386.

Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; van Beest, M.; de Kruijf, N.; Debevere, J. (1999) Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Sci. & Technol.* 10, 77-86.

BIODISTRIBUCIÓN DE FITOESTRÓGENOS EN POLLOS ALIMENTADOS CON SOJA.

SPOTORNO, Viviana G., ROJAS, Dante E., LLADÓ Elba E.

Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA, c.c 77 (B1708WAB) Morón, Buenos Aires, Argentina, Tel. +54-11-4621 0446/0457, vspotorno@cnia.inta.gov.ar

RESUMEN.

El consumo de soja se ha relacionado con una baja incidencia de ciertos tipos de cáncer y disminución del colesterol en sangre. Estos efectos benéficos son debidos a isoflavonas presentes en la soja, Genistein y Daidzein, que poseen actividad estrogénica débil, por lo que se los denomina fitoestrógenos. En la Argentina el 35% de la fuente proteica y energética del alimento de los pollos proviene del poroto de soja. Este trabajo describe la biodistribución en el pollo de Daidzein y Genistein provenientes de la soja.

Se analizaron muestras de hígado, riñón, testículos, cerebro, pulmones, corazón, pechuga y muslo de pollos alimentados en base a soja. La cuantificación se realizó por HPLC con detección U.V. La eficiencia de la extracción se evaluó con muestras fortificadas. La mayor concentración fue la hallada en testículo e hígado. En tejidos comestibles las cantidades deberían considerarse para el cálculo del consumo humano total de fitoestrógenos.

ABSTRACT.

Soy consumption has been associated with lesser risk of some types of cancers and serum cholesterol reduction. Soy isoflavones, meanly Genistein and Daidzein are known to be exhibit those heath beneficial effects. They are also called phytoestrogens because they present weak estrogenic activity. In Argentina, soy represents 35% of the protein and energy in chicken diet. In this work we describe the biodistribution of Daidzein and Genistein from soy, in chicken.

Samples from liver, kidney, testis, brain, lung, heart, breast and leg were analysed from chicken fed with soy-based formula. Phytoestrogens were quantified by HPLC-UV detection. Extraction performance was evaluated by using spiked samples. The highest concentration was found in testis and liver. In edible tissue the amounts should be considered in the total phytoestrogen human consumption.

Palabras clave: Genistein, Daidzein, fitoestrógenos, biodistribución, pollos.

INTRODUCCIÓN.

Las isoflavonas presentes en la soja han cobrado especial interés en los últimos tiempos debido a sus efectos benéficos para la salud. El consumo de soja se ha relacionado con una baja incidencia de ciertos tipos de cáncer y disminución del colesterol en sangre (1,2,3). Genistein y Daidzein (G y D) son las principales isoflavonas presentes en granos de soja, y se encuentran en concentraciones mayores a 3mg/g (Figura 1)(4). Estas sustancias poseen actividad estrogénica débil, por lo que se las denomina fitoestrógenos y se las relaciona con efectos hormonales agonistas y antagonistas (5). En la soja se encuentran principalmente conjugadas como β -D-glucósidos, que son metabolizados por la flora intestinal antes de su absorción como agliconas. Sin bien la forma libre es la considerada más activa biológicamente, en plasma y orina de humanos, se encontraron mayoritariamente conjugados como glucurónidos o sulfatos (6).

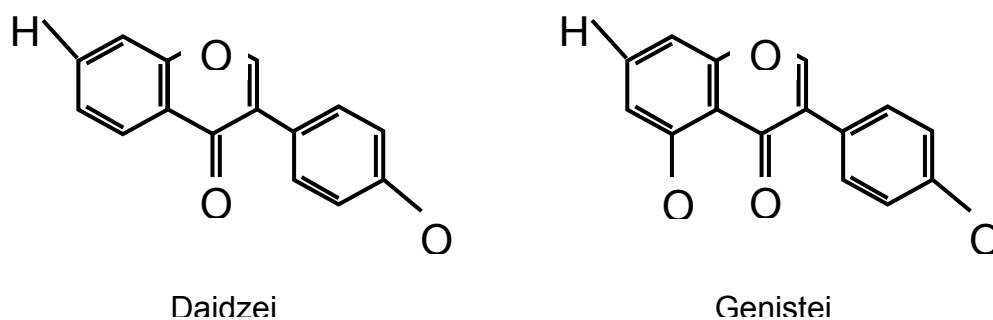


Figura 1. Estructuras químicas de Daidzein y Genistein

En la Argentina el 35% de la fuente proteica y energética del alimento de los pollos proviene del poroto de soja. En trabajos anteriores ya hemos mostrado la concentración residual de estos compuestos en pechuga (7). Para hacer una evaluación del metabolismo y la actividad farmacológica de Daidzein y Genistein en el pollo, es importante conocer la biodistribución en sus órganos. Este trabajo describe la biodistribución de dichas sustancias en pollos alimentados con una dieta típica con soja, con una técnica desarrollada para el análisis en diferentes tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales. Pollos machos de la línea Ross fueron alimentados en las distintas etapas de su crecimiento con una dieta típica, formulada con todos los requerimientos nutricionales, utilizando 35% de soja. La alimentación promedio por animal durante el período inicial (día 1 a 21) fue de 1kg, el período de crecimiento (día 22 a 35) fue de 2kg, y el período de terminación (día 36 a 49) de 3kg. Se faenaron a los 52 días y muestras de hígado, riñón,

testículos, cerebro, pulmones, corazón, pechuga y muslo fueron separadas y guardadas a -20°C hasta su análisis.

Patrones. Se preparan soluciones patrón de G y D en concentraciones de 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , $2,5 \times 10^{-5}$, $1,25 \times 10^{-5}$, 5×10^{-6} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} M, en ácido acético 10%:acetonitrilo (77:23).

Cuantificación por HPLC. Se utiliza un HPLC Hewlett Packard 1050, con bomba cuaternaria, desgasificador por vacío y detector por absorción U.V. variable a 260nm. La cromatografía se realiza por columna de C18 150x4,6mm (Hipersil ODS $3\mu\text{m}$), y guardacolumna del mismo material. La fase móvil consiste en un gradiente de A: ácido acético 10% y B: acetonitrilo, según: (77:23) de 0 a 2 minutos, (30:70) de 10 a 12 minutos, a flujo constante de 0,8ml/min.

Análisis de las dietas. Alícuotas de los alimentos de los animales en las distintas etapas de crecimiento, fueron analizados en sus componentes de G y D por la técnica que se describe a continuación. A 0,1g de muestra, se agrega 1ml de HCl 1M y 4ml de etanol. Se mezcla por rotación durante 30 minutos y se somete a ultrasonido por 10 minutos. Luego se refluja a 96°C en baño de agua durante 2 horas. La muestra se deja enfriar, se centrifuga a 1200 g por 10 minutos a 4°C , y se filtra por papel. El extracto se lleva a volumen de 10 ml con agua y ácido acético (9+1), y se analiza por HPLC.

Extracción y purificación en tejidos. Se pica y se pesa aproximadamente 3g de tejido, y se homogeneiza con Ultraturrax con 2ml de buffer citrato 25mM, pH= 5. Para liberar los conjugados, se agrega enzima β -glucuronidasa tipo H-1 Helix pomatia (Sigma) con actividad sulfatasa, disuelta en 200ul del mismo buffer a una concentración final de 2mg/ml y se incuba toda la noche a 37°C . Las agliconas se extraen con 2ml de etanol absoluto, y 10 minutos en un baño de ultrasonido. Se separa el sobrenadante por centrifugación a 1430 g por 20 minutos a 4°C . La extracción se repite por agregado de 2ml de buffer y 2ml de etanol al precipitado. Los extractos se juntan y se filtran por lana de vidrio, se saturan con 50mg de NaCl y se lavan 3 veces por pasaje de 1,5ml de hexano que se descarta. Los fitoestrógenos se purifican por pasaje en cartuchos de extracción en fase sólida OASIS HLB (Waters) de 500mg, con lavados de 4ml de agua y elusión con 4ml de metanol. Las muestras finalmente se evaporan en corriente de aire a 50°C y se resuspenden en fase móvil para su inyección en HPLC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuantificación por HPLC. Se construyeron curvas de calibración con patrones que se utilizaron para la cuantificación de muestras. Por regresión lineal se trazaron rectas cuyos

límites de detección y coeficientes de correlación resultaron: $0,97 \times 10^{-6}M$ $R^2= 0,993$ para G y $1,51 \times 10^{-6}M$ $R^2= 0,989$ para D.

Análisis de Daidzein y Genistein en la dietas y en tejidos. Las raciones de todas las fases del crecimiento de los animales fueron analizadas en su contenido de Daidzein y Genistein. En ellas se encontró ($82,7 \pm 6,5$) $\mu\text{g/g}$ de D y ($35,7 \pm 2,3$) $\mu\text{g/g}$ de G, cuantificadas como agliconas totales.

Los tejidos analizados en este estudio fueron elegidos por su respuesta hormonal a estos compuestos, por su captación descrita en estudios previos en otras especies, o por su uso comestible (8). La eficiencia del método de extracción y cuantificación en tejidos fue evaluada con muestras fortificadas de pechuga, hígado y muslo, a niveles de concentración 4,23 -2,12-1,06 $\mu\text{g/g}$ para D y 4,5-2,25-1,125 $\mu\text{g/g}$ para G. Las recuperaciones para la extracción se calcularon en 71,5 % para Daidzein y 54,0 % para Genistein. Esta técnica posee límites de detección de: 0,024 μg para D y 0,016 μg para G por gramo.

En las extracciones de tejidos con mayor contenido graso (muslo) fueron necesarios lavados extras con hexano para facilitar las etapas posteriores, mientras en tejidos donde la cantidad de material era muy reducida (testículos, cerebro), este paso fue obviado para evitar pérdidas. Las determinaciones fueron hechas por duplicado o triplicado de acuerdo a la disponibilidad del material. Cromatogramas típicos de patrones, y muestras de tejidos y dietas se muestran en la figura 2.

Distribución en tejidos. En la tabla 1 se transcriben las concentraciones de Daidzein y Genistein encontradas en los tejidos analizados. En el gráfico de la figura 3 se presentan las concentraciones promedio de cada órgano.

En testículo la concentración de estos compuestos resulta ser la más alta, de los órganos analizados. Esto podría relacionarse con la afinidad de G y D por receptores hormonales (1, 3). Sin embargo, la desviación estándar de la medición es elevada. Esto, posiblemente es debido a que la cantidad de tejido obtenido es escasa, dificultando el análisis. La muestra proviene de animales de 52 días de edad, sexualmente inmaduros, por lo que el tamaño de los testículos es pequeño.

La concentración en hígado es la segunda en importancia y podría estar relacionada con la función metabólica hepática. Al interponer en el análisis la reacción enzimática de desconjugación, no fue posible discriminar si se encuentran como glucurónidos, sulfatos o agliconas libres, que daría mayor información sobre esta etapa del metabolismo.

Las concentraciones halladas en cerebro y en riñones son las terceras en importancia. La presencia de G y D en cerebro indicaría que estas isoflavonas penetran la barrera

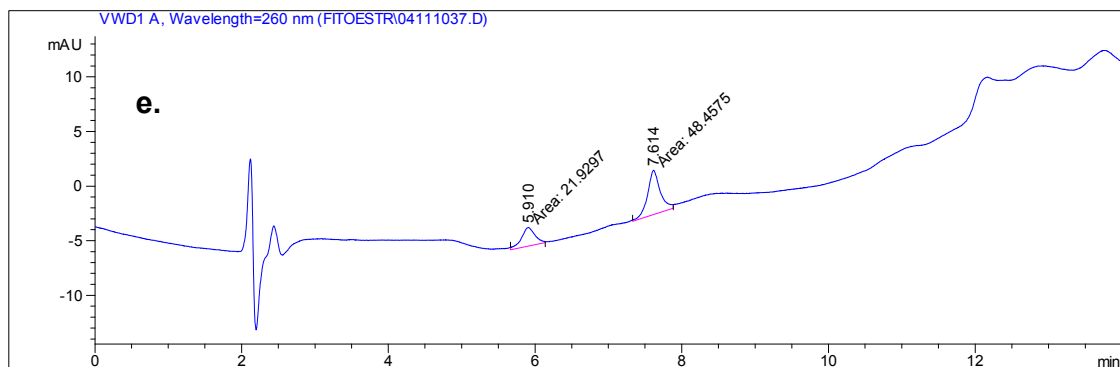
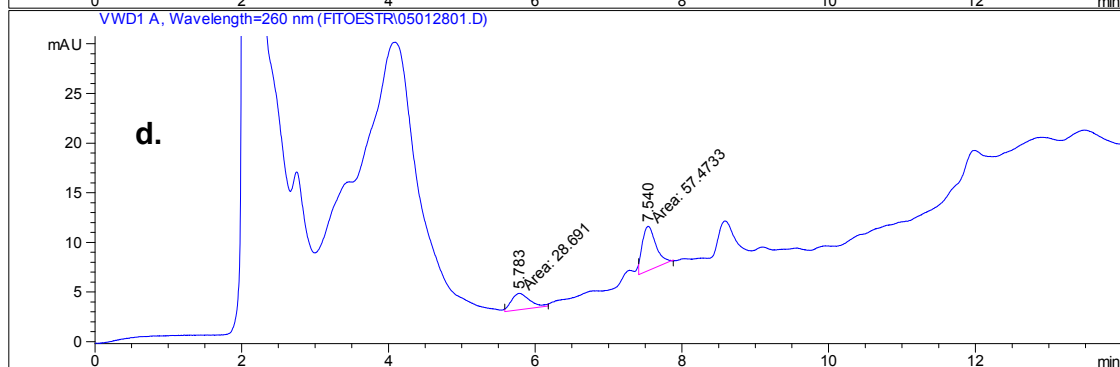
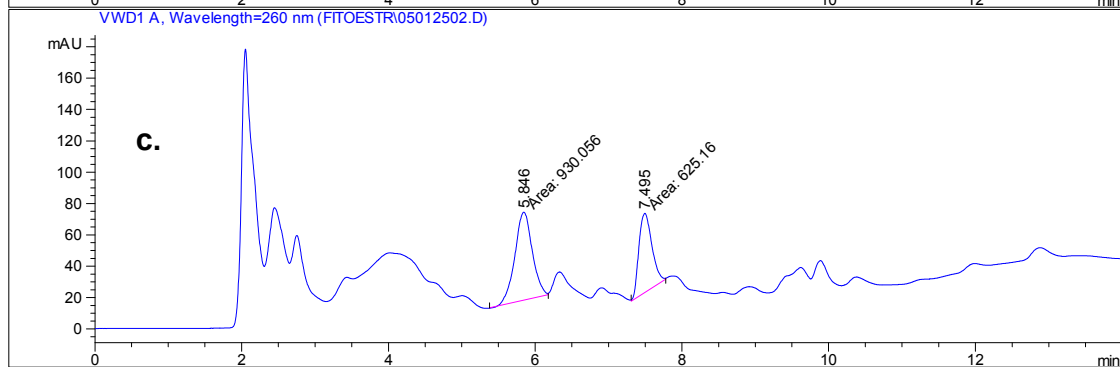
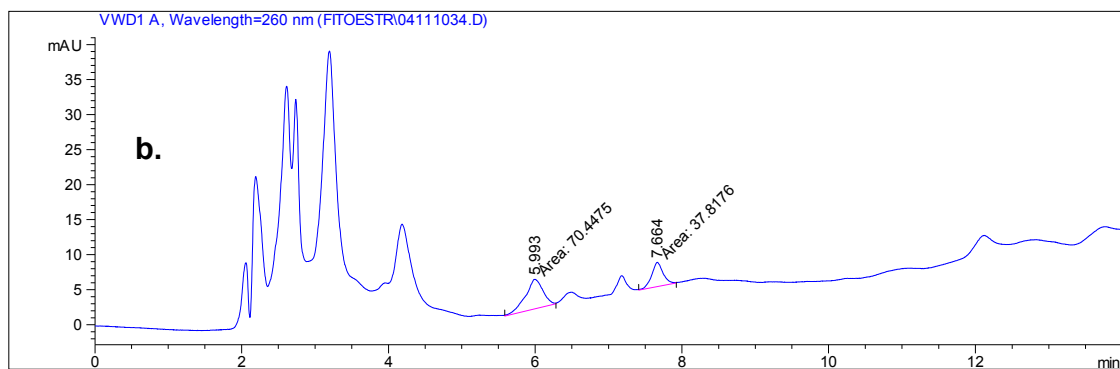
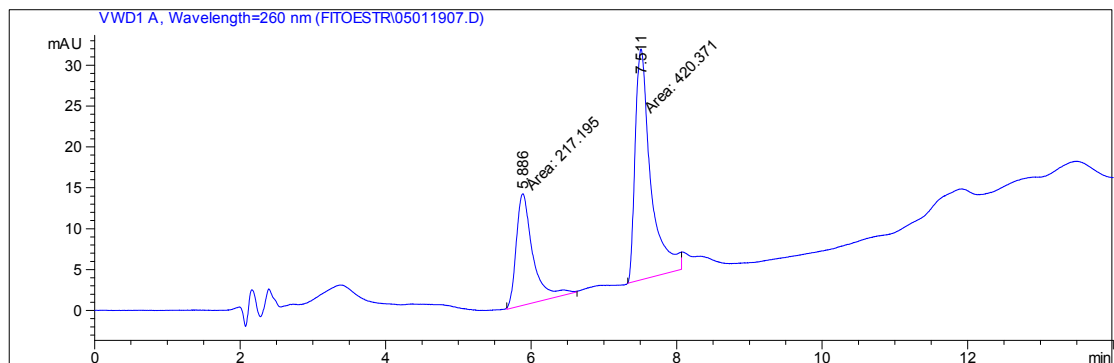


Figura 2. Cromatogramas de G y D 10^{-5} M (a), alimento para pollos (b), hígado (c) y pechuga de pollo (d), G y D 10^{-6} M (e).

hematoencefálica del pollo. Una concentración apreciable en riñón estaría en concordancia con la vía urinaria como medio de excreción.

El análisis de cortes comestibles rindió en pechuga D: 0,041 µg/g y G: 0,027 µg/g, en muslo D: 0,037 µg/g y G: 0,012 µg/g. Si bien resultan cantidades relativamente menores que en otros órganos, son relevantes en la estimación de la ingesta humana de estos fitoestrógenos

Tabla 1. Concentraciones promedio de G y D en tejidos de pollos.

	Daidzein µg/g	Genistein µg/g
Testículo	0,394 ± 0,123	0,293 ± 0,113
Cerebro	0,082 ± 0,020	0,074 ± 0,022
Pulmón	0,041 ± 0,013	0,028 ± 0,005
Hígado	0,325 ± 0,119	0,187 ± 0,026
Riñones	0,057 ± 0,013	0,049 ± 0,018
Corazón	0,029 ± 0,004	0,018 ± 0,001
Pechuga	0,041 ± 0,006	0,027 ± 0,003
Muslo	0,037 ± 0,012	0,022 ± 0,001

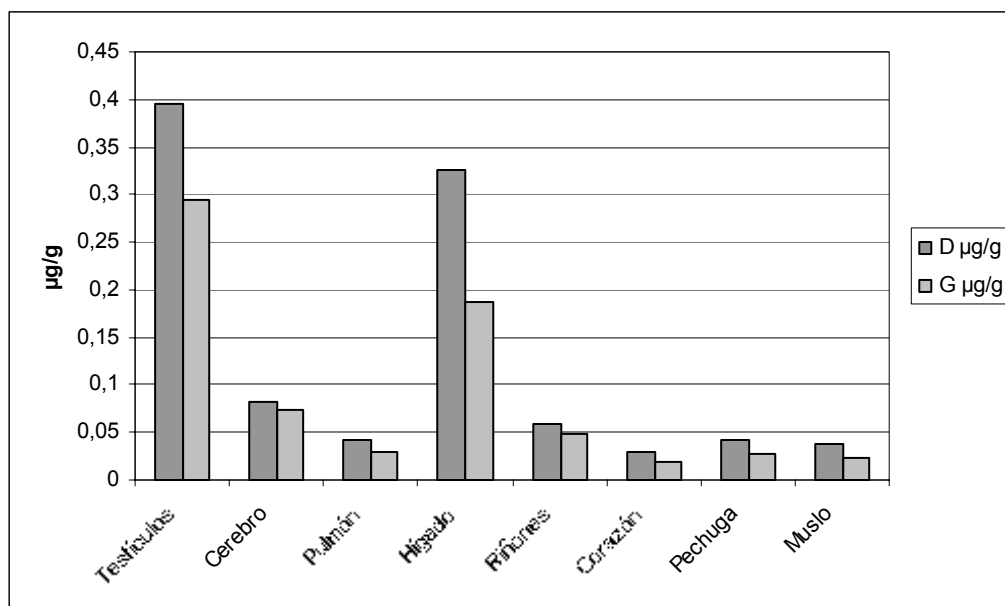


Figura 3. Gráfico de concentraciones de G y D en tejidos de pollo.

CONCLUSIONES.

Este estudio describe la distribución de Daidzein y Genistein en tejidos de pollos, debida a una alimentación típica de producción. Hasta donde sabemos, no existen estudios similares en estos animales, si bien se registra un trabajo hecho en ratas (8).

Es posible determinar y cuantificar Daidzein y Genistein por el método descrito en este trabajo, a niveles suficientemente sensibles como para detectarlos en tejidos de baja captación.

Si bien, por su naturaleza fenólica, las isoflavonas son candidatos a una rápida transformación a sulfatos o glucurónidos, en este estudio la muestra se hidroliza enzimáticamente por lo cual sólo se detectan como agliconas(6). Esto permite aumentar la sensibilidad del método, pero impide la completa descripción de la biodistribución de estos conjugados.

La eliminación de Daidzein y Genistein por orina se ha estudiado exhaustivamente en humanos y roedores (1,10). En riñón de pollo hemos encontrado concentraciones apreciables de estos compuestos lo que podría sugerir la importancia de esta vía de excreción.

Las mayores concentraciones fueron encontradas en testículo e hígado. Chang et al, quien describe la distribución de Genistein en ratas (8), también encuentra concentraciones elevadas en testículo, posiblemente debido a la actividad hormonal de estos compuestos. Sin embargo la concentración en hígado de ratas es relativamente menor a la que encontramos en pollos. Esto marca una primera diferencia en la biodistribución entre ratas y pollos, atribuible a la diferencias entre especies o a la forma de administración (como Genistein aglicona en las ratas o como componente integral de la soja, glicosido y aglicona en pollos).

En tejidos comestibles las concentraciones halladas son pequeñas en relación a alimentos en base a soja. Según el trabajo de Maggiolini et al. a las concentraciones de fitoestrógenos que se alcanzan con una dieta típica japonesa (alta en soja), se puede esperar una actividad principalmente antitumorgénica. En contraste, con una exposición prolongada de niveles por debajo de 1 μ M (aproximadamente 100 mg de isoflavonas diarias) se pueden esperar efectos estrogénicos (5). Si bien el consumo humano de carne de pollo nos aportaría varios órdenes por debajo de estas cantidades, no se debería descartar del cálculo del consumo total de fitoestrógenos.

BIBLIOGRAFÍA.

Brown N.M., Setchell K.D.R. *Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones.* Laboratory Investigation. (2001) 81(5):735-747

Coward L., Barnes N., Setchell K.D.R., Barnes S. *Genistein, Daidzein, and their β -glucosid conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets.* J. Agric. Food Chem. (1993) 41:1961-1967

Tikkanen M.J., Vihma V., Jauhiainen M., Hockerstedt A., Helisten H., Kaamanen M. *Lipoprotein-associated estrogens.* Cardiovascular Research (2002) 56:184-188

Wang H.J., Murphy P.A. *Isoflavone content in commercial soybean foods.* J. Agric. Food Chem. (1994) 42:1666-1673

Maggiolini M., Bonofiglio D., Marsico S., Panno M.L., Cenni B., Picard D., Ando S. *Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells.* Mol. Pharmacol. (2001) 60:595-602

Hendrich S. *Bioavailability of isoflavones. Review.* J. Chrom. B (2002) 777:203-210

Spotorno V.G., Argondizza M.F. *Detección residual de fitoestrógenos en carne de pollo.* Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, 2004.

Chang, H.C., Churchwell M. I., Delclos K.B., Newbold R.R., Doerge D. R. *Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed sprague-dawley rats.* J. Nutr. (2000) 130(8):1963-1970

J. Skafianos L. Coward, M. Kirk, S Branes. *Intestinal Uptake and Excretion of Isoflavone Genistein in Rats.* J. Nutr. (1997) 127:1260-1268

Xu X., Wang H.J., Murphy P.A., Hendrich S. *Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women.* J. Nutr. (2000) 130:798-801

AGRADECIMIENTOS.

Queremos agradecer a Ing. Susana Rondelli e Ing. Oscar Martínez de la Universidad Nacional de Luján, por los animales para este experimento, y a la Dra. Pilar Teresa García por su orientación científica en este tema.

EDULCORANTES NO CALÓRICOS EN BEBIDAS ANALCOHÓLICAS: ROTULADO Y ESTIMACIÓN TEÓRICA DE LA INGESTA DIARIA POTENCIAL (IDP) EN NIÑOS Y ADOLESCENTES.

CARNEVALI DE FALKE, Susana; DEGROSSI, María C.

Instituto Universitario de Ciencias de la Salud – Fundación H.A.Barceló. Padre Carranza 1475 – (1682) Villa Bosch – Buenos Aires. Tel/Fax: 4751-3875 ascarnevali@yahoo.com.ar / cdebal@fibertel.com.ar

RESUMEN

Se evaluó en 33 bebidas analcohólicas el cumplimiento con el Código Alimentario Argentino en el rotulado, información sobre niveles y tipo de edulcorantes no-calóricos que contenían. Se realizó una estimación teórica orientativa de la Ingesta Diaria Potencial (IDP) de estos aditivos en poblaciones infanto-juveniles (2 a 17 años). La mezcla sacarina-ciclamato fue la más usual (58%), no conteniendo el 21% de las bebidas estos edulcorantes. En niños de 2 a 6 años se estima un alto consumo de sacarina (120% IDA en algunos jugos concentrados) y de ciclamato (118% IDA en jugos en polvo, 111% en concentrados para diluir y 129% en gaseosas segundas marcas). En ninguno de los grupos etéreos, la IDP estimada de acesulfame-K, aspartame y sucralosa, superó la IDA. El 30% de los productos presentó información confusa respecto a su condición de dietética. Es prioritario fomentar la educación del consumidor y realizar estudios de dieta total para conocer la situación real.

Palabras claves: edulcorantes no-calóricos, Ingesta Diaria Admitida, niños, adolescentes, consumidor.

ABSTRACT

The label of 33 soft drinks were reviewed to determine the labeling fulfillment to the Argentine Food Code legislation and the information of level and type of artificial sweeteners. A theoretic orientative estimation of their daily intakes was made in children and teenagers populations (2 to 17 years old). The mixture saccharin-cyclamate was the most frequent (58%) , while 21% of the drinks did not contend any of these sweeteners. In children between 2 and six year, a high intake of saccharine (120% ADI in some concentrated juices) and of cyclamate (118% ADI in power juices, 111% in concentrates juices and 129% in second trade soft drinks). In any of the aged groups the estimated PDI of acesulfame-K, aspartame and sucralose was higher than the ADI. The information with

respect to the dietetic condition was confused in the 30% of the studied products. It is of priority importance to increase the education of the consumer and to develop total diet studies to know the real situation.

Key words: artificial sweeteners, Acceptable Daily Intake, children, teenagers, consumer.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las autoridades sanitarias a nivel mundial señalaron los efectos del alto consumo de azúcar y su impacto en el estado nutricional, el desarrollo de la obesidad y de otras patologías, observándose como consecuencia, nuevas tendencias en materia de salud y alimentación lo que condujo a un incremento del consumo de alimentos y bebidas endulzados artificialmente. Antes reservados a un sector de la población con patologías de base o afecciones crónicas, los edulcorantes abarcan un importante sector en el moderno mercado de los alimentos de bajas calorías^(1,13,16,21). Su incorporación en reemplazo del azúcar, proporciona a la industria un ahorro de hasta el 75% de los costos de inversión⁽¹⁹⁾. En nuestro país en el período 87/98, la tasa de crecimiento de estos aditivos octuplicó a la de los edulcorantes calóricos y los productos bajas calorías absorben cerca del 15% de los gastos en alimentos envasados, participando las gaseosas y jugos un 15,8% en la facturación total de esos productos^(20, 22). Sin embargo, existe una creciente inquietud por el nivel de consumo de estos aditivos en los niños por la posibilidad de exceder la Ingesta Diaria Admisible (IDA). Este hecho está relacionado a un requerimiento nutricional, expresado en relación al peso corporal, en lactantes y niños, 2-5 veces mayor que el de los adultos, a una dieta menos variada y preferencias marcadas por cierto tipo de alimentos^(3,7). Esta preocupación condujo a varios autores a estudiar la relación entre la IDA y el consumo de alimentos y bebidas endulzados artificialmente en poblaciones infanto- juveniles^(2, 11, 12,14). Dado que las bebidas analcohólicas en particular, son utilizadas frecuentemente en niños pequeños, administradas en el biberón o consumidas entre comidas, el objetivo de este trabajo fue determinar la información que se brinda al consumidor en el etiquetado de distintas bebidas de consumo masivo respecto al contenido en edulcorantes no nutritivos utilizados y establecer si existe peligro de sobrepasar la IDA correspondiente, en poblaciones de niños y adolescentes, realizando para ello una estimación teórica orientativa de la ingesta diaria potencial (IDP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante mayo a julio de 2004 en la Cátedra de Microbiología General y de Alimentos del IUCS Fundación Barceló, se realizó un estudio descriptivo observacional, que abarcó

todas las bebidas analcohólicas comprendidas por el Código Alimentario Argentino (CAA)⁽⁵⁾ con edulcorantes no calóricos en su composición. La muestra (33 productos), estimada de acuerdo a estudios previos en nuestro país, consistió en: 10 jugos en polvo para preparar (en sobre), 10 jugos concentrados para diluir, 10 gaseosas, y 3 jugos listos para el consumo. De éstos, 2 eran bebidas a base de soja sabor frutal en su versión light y 1 la variedad light de un jugo de frutas. De aquellos productos que presentaban distintos sabores se seleccionó aquel que presentaba la mayor cantidad de edulcorante de manera de situarse en el peor caso. Se realizó la estimación teórica orientativa, de la IDP para cada edulcorante y producto analizado, siguiendo recomendaciones de Codex⁽⁶⁾ y otras fuentes autorizadas^(10,15,17,18) como: $IDP = C \times Ip/PC$, donde **C** es la concentración del edulcorante en el producto (mg/100ml.), **Ip** es la cantidad de producto ingerido (ingesta media del producto) ml/día y **PC** es el peso corporal en kg. El consumo diario se estimó a partir de los datos proporcionados por la Asociación Española de Pediatría⁽⁸⁾ y de la Asociación de Dietistas Americanos⁽¹⁾, utilizándose los siguientes valores: 400, 500, 650 y 750 ml/día para los períodos 2 a 6, 7 a 10, 11 a 14 y 15 a 17 años, respectivamente. Para estos grupos etáreos el peso corporal estimado fue: 20, 30, 40 y 60 kg respectivamente, utilizando los datos del trabajo de Garnier-Sagne *et al.*⁽¹²⁾, las recomendaciones de la OMS⁽¹⁸⁾, las tablas de peso corporal de la Sociedad Argentina de Pediatría⁽²³⁾ y la de crecimiento de CDC⁽⁴⁾. Las IDA adoptadas para el presente trabajo fueron las establecidas por el CAA: sacarina 0-2.5 mg/kg/día, ciclamato 0-11 mg/kg/día, sucralosa 0-15 mg/kg/día, aspartame 0-40 mg/kg/día. Para el acesulfame-K se utilizó la proporcionada por la JECFA (0-15 mg/kg/día)⁽⁹⁾. El rotulado se verificó de acuerdo a lo dispuesto por el CAA en los artículos 996 a 1009 inclusive y 1345, 1348, 1349 y 1370. Para el aspartame, además, los requisitos de rotulación establecidos en el Art.1398.30.1⁽⁵⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las bebidas investigadas cumplieron con la legislación vigente en cuanto a la expresión de la concentración de edulcorante en el rótulo. Sin embargo el 30% de los productos contiene información confusa. Muchas no expresan manifiestamente su condición de dietéticas y el nombre de los edulcorantes no es claro, dificultando en ocasiones, el diseño de la etiqueta la lectura de los componentes de la bebida. En dos productos en sus versiones light y común, esta última no indicaba notoriamente su condición dietética aún cuando contenía edulcorantes en su composición. En la mayoría de los productos se encontraron mezclas de edulcorantes, siendo sacarina/ciclamato la más utilizada (58%), tanto en jugos en polvo (7/10), concentrados para diluir (7/10) y

gaseosas (5/10). Se trató en todos los casos de productos económicos (segundas marcas). Todos los datos correspondientes a las ingestas teóricas estimadas pueden observarse en las tablas I a IV. La ingesta media estimada de ciclamato en el grupo de 2-6 años supera la IDA para las bebidas estudiadas que lo contienen. En el grupo de 7-14 años, su ingesta media estimada en jugos en polvo para preparar y jugos concentrados para diluir, se aproxima a la IDA o la sobrepasa si se considera el consumo de la bebida con mayor concentración de este edulcorante. En el caso de bebidas gaseosas con ciclamato, la ingesta media estimada sobrepasa la IDA. Finalmente, el grupo de 15-17 años la sobrepasa en el caso de consumir la bebida que tiene su mayor concentración. Figueroa⁽¹¹⁾ refiere que el 3,2% de la población estudiada excedió la IDA para este edulcorante, cuya fuente principal fueron las bebidas analcohólicas. Por su parte, Arcella et al.⁽²⁾ en Italia en un grupo de estudiantes de 17 años, grandes consumidores de productos bajas calorías, comprobó que la ingesta de ciclamato no superó la IDA de 7mg/kg/día (Comité Científico de Alimentos de la Unión Europea). Respecto a sacarina, los resultados obtenidos coinciden con otros estudios^(2,11,12,14), aunque es necesario destacar, que en algunos jugos para diluir la ingesta máxima, para los más pequeños (2-6 años), es 120% de la IDA. Esto también fue observado por Ilback et al.⁽¹⁴⁾ en el consumo de jugos de fruta en niños pequeños (0-5 años), si bien la IDA adoptada por este autor fue de 5mg/kg/día. En ninguna de las bebidas analizadas la IDP sobrepasó la IDA para acesulfame-K, aspartame y sucralosa. En gaseosas las concentraciones de aspartame son mucho menores que la máxima permitida por el CAA. Para este aditivo los resultados obtenidos coinciden con los observados por otros autores^(2,11,12). Respecto al acesulfame-K, Ilback et al.⁽¹⁴⁾ señalan que la ingesta supera ampliamente la IDA en niños diabéticos y Garnier-Sagne et al.⁽¹²⁾ encuentran un alto consumo en niños (2-6 años) diabéticos insulino-dependientes. Se debe destacar que además de tratarse de poblaciones con alto consumo de edulcorantes, en estos dos trabajos los cálculos se realizaron con la concentración máxima de edulcorante permitida por la legislación respectiva para las bebidas dietéticas (350mg/l), mucho mayor que la observada en los rótulos de los productos aquí estudiados. No se encontraron en bibliografía estudios para sucralosa.

Tabla I – Ingesta teórica estimada de edulcorantes en jugos en polvo para preparar

Grupo etáreo		Sacarina		Ciclamato		Acesulfame-K ^a		Aspartame		Sucralosa ^a	
		IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA
2-6 años	Media ^b	1,2	48	13,0	118	3	20	3,4	9	0,4	3
	DS	0,45	18	4,84	44	-	-	1,4	4	-	-
	Máximo ^c	1,8	72	18	164	-	-	4,4	11	-	-
7-10 años	Media ^b	1,0	40	10,9	99	2,5	17	2,8	7	0,3	2
	DS	0,38	15	4,03	37	-	-	1,2	3	-	-
	Máximo ^c	1,5	60	15	136	-	-	3,7	9	-	-
11-14 años	Media ^b	1,0	40	10,6	96	2,4	16	2,8	7	0,3	2
	DS	0,37	9	3,93	31	-	-	1,1	3	-	-
	Máximo	1,5	60	14,6	133	-	-	3,6	9	-	-
15-17 años	Media ^b	0,8	32	8,1	74	1,9	13	2,1	5	0,2	1
	DS	0,28	7	3,03	28	-	-	0,9	2	-	-
	Máximo ^c	1,1	44	11,3	103	-	-	2,8	7	-	-

Tabla II– Ingesta teórica estimada de edulcorantes en jugos concentrados para diluir

Grupo etáreo		Sacarina		Ciclamato		Acesulfame-K ^a		Aspartame		Sucralosa	
		IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA
2-6 años	Media ^b	1,9	76	12,2	111	1,6	11	1,1	3	-	-
	DS	0,61	24	4,1	37	-	-	0,49	1	-	-
	Máximo ^c	3	120	16,8	153	-	-	1,6	4	-	-
7-10 años	Media ^b	1,6	64	10,1	92	1,3	9	0,9	2	-	-
	DS	0,51	20	3,4	31	-	-	0,40	1	-	-
	Máximo ^c	2,3	92	14	127	-	-	1,3	3	-	-
11-14 años	Media ^b	1,5	60	9,9	90	1,3	9	0,9	2	-	-
	DS	0,49	20	3,3	30	-	-	0,39	1	-	-
	Máximo ^c	2,3	92	13,7	125	-	-	1,3	3	-	-
15-17 años	Media ^b	1,2	48	7,6	69	1	7	0,7	2	-	-
	DS	0,38	15	2,5	23	-	-	0,30	1	-	-
	Máximo ^c	1,8	72	10,5	95	-	-	1	3	-	-

*expresado en mg/kg/día

^asólo uno de los productos contenían este edulcorante.

^b El valor medio corresponde a la ingesta de una bebida analcohólica (de acuerdo al consumo medio para cada grupo etáreo) con una cantidad de edulcorante equivalente al valor medio obtenido en las muestras analizadas

^c El valor máximo se refiere a la ingesta potencial de la bebida que contenía la mayor concentración del edulcorante en ese rubro.

Tabla III – Ingesta teórica estimada de edulcorantes en bebidas gaseosas

		Sacarina		Ciclamato		Acesulfame-K		Aspartame		Sucralosa ^a	
Grupo etáreo		IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA
2-6 años	Media ^b	1,1	44	14,2	129	1,3	9	3,0	8	2,7	18
	DS	0,68	27	5,4	49	0,75	5	2,68	7	-	-
	Máximo ^c	2	80	20	182	2,2	15	6	15	-	-
7-10 años	Media ^b	0,9	36	11,8	107	1,1	7	2,5	6	2,3	15
	DS	0,57	23	4,5	41	0,63	4	2,24	6	-	-
	Máximo ^c	1,7	68	16,7	152	1,9	13	5	13	-	-
11-14 años	Media ^b	0,9	36	11,5	104	1,1	7	2,4	6	2,2	15
	DS	0,55	22	4,4	40	0,61	4	2,18	5	-	-
	Máximo ^c	1,6	64	16,3	148	1,8	12	4,9	12	-	-
15-17 años	Media ^b	0,7	28	8,9	81	0,8	5	1,9	5	1,7	11
	DS	0,43	17	3,4	31	0,47	3	1,68	4	-	-
	Máximo ^c	1,3	52	12,5	114	1,4	9	3,8	10	-	-

Tabla IV – Ingesta teórica estimada de edulcorantes en jugos listos para consumo

		Sacarina		Ciclamato		Acesulfame-K		Aspartame ^a		Sucralosa	
Grupo etéreo		IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA	IDP*	%IDA
2-6 años	Media ^b	-	-	-	-	1,4	9	6,0	15	3,3	22
	DS	-	-	-	-	1,2	8	-	-	0,7	5
	Máximo ^c	-	-	-	-	2,2	15	-	-	3,8	25
7-10 años	Media ^b	-	-	-	-	1,1	7	5,0	13	2,8	19
	DS	-	-	-	-	1	7	-	-	0,6	4
	Máximo ^c	-	-	-	-	1,8	12	-	-	3,2	21
11-14 años	Media ^b	-	-	-	-	1,1	7	4,9	12	2,7	18
	DS	-	-	-	-	0,98	7	-	-	0,6	4
	Máximo ^c	-	-	-	-	1,8	12	-	-	3,1	21
15-17 años	Media ^b	-	-	-	-	0,8	5	3,8	10	2,1	14
	DS	-	-	-	-	0,75	5	-	-	0,4	3
	Máximo ^c	-	-	-	-	1,4	9	-	-	2,4	16

*expresado en mg/kg/día

^asólo uno de los productos contenían este edulcorante.

^b El valor medio corresponde a la ingesta de una bebida alcohólica (de acuerdo al consumo medio para cada grupo etéreo) con una cantidad de edulcorante equivalente al valor medio obtenido en las muestras analizadas

^c El valor máximo se refiere a la ingesta potencial de la bebida que contenía la mayor concentración del edulcorante en ese rubro.

CONCLUSIONES

El rotulado de los alimentos, factor esencial de información al consumidor, debe brindarle a éste la opción de comparar y elegir sus alimentos, de acuerdo a su interés y necesidades⁽²⁴⁾. Este punto es de vital importancia, sobre todo a la hora de seleccionar bebidas para los más pequeños, pues muchas veces se recurre a las más económicas o de segunda línea que, en ciertos casos, contienen la mayor concentración de edulcorantes. Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que en muchas de las etiquetas de bebidas de consumo masivo el carácter dietético y su contenido en edulcorantes no surge de la primera lectura del rótulo. Por lo tanto, es prioritario fomentar

la educación del consumidor. Establecer nexos entre consumidores, industria, autoridades y profesionales de la salud ayudaría a que el rótulo de un alimento constituya una verdadera fuente de información y su lectura sea una práctica habitual, ayudando a que la población pueda tomar sus propias decisiones a la hora de escoger los alimentos que consume, evitando elecciones erróneas.

Habiéndose observado que el riesgo de sobrepasar la IDA para ciclamato es alto en niños y adolescentes en caso de consumir bebidas analcohólicas que lo contienen, en concentraciones iguales o cercanas al máximo permitido por el CAA y considerando que existen otras posibles fuentes de edulcorantes no calóricos en la dieta, es necesario realizar estudios de dieta total para conocer la situación real. Se podrá, entonces, establecer estrategias de gestión que respondan y equilibren las necesidades de la industria con la salud de los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

American Dietetic Association. "Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners". Journal of the American Dietetic Association.2004; 104:255-275.

Arcella,D., Le Donne,C., Piccinelli,R., Leclercq,C. "Dietary estimated intake of intense sweeteners by Italian teenagers. Present levels and projections derived from the INRAN-RM-2001 food survey". Food and Chemical Toxicology. 2004;42:677-685.

Benford, D. "The Aceptable Daily Intake: a Tool for Ensuring Food Safty". ILSI Europe Concise monographseries. Bélgica. 2000.

Center for Disease Control. [en línea] 2000 CDC Growth Charts: United States. <www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/growthcharts/clinical_charts.htm> [Consulta: Julio2004].

Código Alimentario Argentino. [en línea] Disponible en:www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Marco_Regulatorio/CAA.asp>[Consulta: Julio2004].

Codex Alimentarius. "Guidelines for simple evaluation of Food Aditive Intake". CA/GL 03-1989.

Comité de Nutrición de la Asociación Argentina de Pediatría[en línea. "Agua para la sed". <<http://www.zonapediatrica.com/mod-htmlpages-display-pid-329.html>>[Consulta: Julio 2004].

Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. "Consumo de zumos de frutas y de bebidas refrescantes por niños y adolescentes en España. Implicaciones para la salud de su mal uso y abuso". Anales de Pediatría 2003;58(6):584-93

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives[en línea]. "Summary of Evaluations /1956-2003)". ILSI Press International Life Sciences Institutes.2004 <<http://jecfa.ilsa.org/>>[Consulta: Mayo2004].

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives."Guidelines for the preparation of working papers on intake of food additives for the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneve, January 2001.

Figueroa,M.D. "Consumo de edulcorantes no nutritivos y productos dietéticos en niños diabéticos y/u obesos". Informe sin publicar. Hospital de Pediatría Prof. Dr. J. P. Garrahan y Hospital Gral. de Agudos P. Piñero.

Garnier-Sagne,I., Leblanc,J.C., Verger,Ph. "Calculation of the intake of three intense sweeteners in young insulin-dependent diabetics". Food and Chemical Toxicology. 2001; 39: 745-749.

Gross,L.S., Li,L., Ford,E.S., Liu,S. "Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment". American Journal Clinical Nutrition. 2004;79:774-9.

Ilback,N.G., Alzin,M., Jahrl,S., Enghardt-Barbieri.H., Busk,L. "Estimated intake of the artificial sweeteners acesulfame-K, aspartame, cyclamate and saccharin in a group of Swedish diabetics". Food Additives & Contaminants. 2003 Feb;20(2):99-114.

IPCS [en línea] "Health Criteria 210. Environmental Principles for the assessment of Risks to Human Health form exposure to chemicals". International Programme on Chemical Safety

<<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm#SectionNumber:5.1>> [consulta: Julio 2004]

Krebs-Smith,S.M. "Choose Beverages and Foods to Moderate Your Intake of Sugars: Measurement Requires Quantification". Journal of Nutrition. 2001; 131: 527S–535S.

OECD "Occupational and Consumer Exposure Assessments". Environment Monograph No. 70, OECD, 1993)

OMS (1987) Environmental Health Criteria 70: Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food, Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 174 págs.

Resnick,S.L., Somoza,C.F., Pacin,A.M., Alzamora,S.M."Los edulcorantes que bebemos".Énfasis alimentación. 2002; 4:76-82.

Revista Mercado. 1999; 985: 137-142.

Saris,W.H.M. “Sugars, energy metabolism, and body weight control”. American Journal Clinical Nutrition. 2003;78(suppl): 850S–7S.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos[en línea] “Análisis de la cadena de edulcorantes”. Disponible en: www.sagpya.mecon.gov.ar/0-azucar/edulco/Edulcorantes.htm>[consulta: Julio 2004]

Sociedad Argentina de Pediatría [en línea] . Gráficas para la evaluación del crecimiento.<<http://www.sap.org.ar/profesionales/percentilos/index.htm#>> [consulta: Julio 2004]

Uicich, R. “Rotulado nutricional de alimentos ¿es útil?.CESNI Archivos digitales.Septiembre 2003.

Van der Heijden, A. “Sweetness:the biological, behavioural and social aspects”. ILSI Europe Concise monographseries. Bélgica. 1995.

DETERMINACION DE MICROORGANISMOS INDICADORES EN ALIMENTOS DEL COMEDOR UNIVERSITARIO DE SALTA

BUTTAZZONI, R.; RABUS P., GÓMEZ DE DÍAZ, R. V. y DI CARLO B.M.

Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Exactas, Consejo de Investigación, Buenos Aires 177-4400 Salta. Argentina. E-mail: charo@unsa.edu.ar.

RESUMEN

El servicio de Alimentos es un proceso potencialmente peligroso por la transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), provocando daños en la salud de los consumidores.

Se determinaron los microorganismos indicadores de contaminación, tales como mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en comidas servidas en el Comedor de la Universidad Nacional de Salta con la finalidad de determinar el grado de contaminación microbiológica y el cumplimiento de las normas de higiene y buenas prácticas de manipulación durante la elaboración y servido de los alimentos.

El muestreo fué aleatorio, recolectándose muestras de los alimentos en condiciones estériles durante tres meses, que consistió en 1)kuppi, 2)ensalada rusa, 3)arroz primavera,4)milanesa, 5)ensalada mixta, 6)bife a la criolla, 7)fideo con tuco, 8)fideo perejilado, 9)lasagna y 10)salpicón. Las muestras se procesaron según normas y técnicas microbiológicas del ICMSF (2000).

La contaminación microbiológica presente en las muestras de comidas presentaron valores dentro de los límites normales para la comidas con carne, no así en aquellas que contenían verduras tales como perejil, tomate, papa, zanahoria, chaucha y aderezos como mayonesa o condimentos, con recuentos de mesófilos totales de 10^6 UFC/g en ensaladas mixtas de verduras, presencia de *E. coli* en ensaladas y fideos, mohos y levaduras con valores desde 1,1 a $7 \cdot 10^3$ UFC/g en las ensaladas de verduras y los fideos con perejil y tuco.

Los resultados microbiológicos demuestran deficiente manejo de las verduras crudas durante la preparación de comidas, lo que implica la necesidad de capacitación de los manipuladores.

Palabras Claves: comedor, microorganismos, indicadores, contaminación.

ABSTRACT

The service of foods is a potentially dangerous process by the transmission of diseases transmitted by foods (ETA), causing damages in the health of the consumers. The indicator microorganisms of contamination were determined, such as total mesophile aerobic bacterias, total coliform bacterias, fungi, yeasts, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella spp* in meals served in the dining room of the National University of Salta with the purpose of determining the degree of microbiological contamination and the fulfillment of the hygiene norms and good practices of manipulation during the elaboration and served as foods. The foods were randomly sampled in sterile conditions during three months, that consisted of 1)kuppi, 2)russian salad, 3) spring rice 4)fried meat overflowed with bread 5)mixed salad, 6)steak with sauce and potato, 7)vermicelli with sauce 8) vermicelli with parsley 9) paste with vegetable, meat and sauce 10) salad with vegetables and meat. The samples processed according to norms and microbiological techniques of the ICMSF (2000).

The microbiological contamination present in the samples of meals presented values within the normal limits for the meals with meat, not thus in which they contained vegetables such as parsley, tomato, potato, carrot, bean and dressings like mayonnaise or condiments, with counts of total mesophiles of 10^6 UFC/g in mixed salads of vegetables, presence of *E. coli* in salads and vermicelli, fungi and yeasts with values from 1.1 to $7,10^3$ UFC/g in the vegetable salads and vermicelli with parsley and sauce. The microbiological results demonstrate deficient hygienic handling of crude vegetables during the preparation of meals, which implies the necessity of education of the manipulators.

INTRODUCCION

El servicio de Alimentos es un proceso potencialmente peligroso por la transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), provocando daños en la salud de los comensales.

Se determinaron los microorganismos indicadores de contaminación, tales como mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en comidas servidas en el Comedor de la Universidad Nacional de Salta con la finalidad de determinar el grado de contaminación microbiológica y el cumplimiento de las normas de higiene y buenas prácticas de manipulación durante la elaboración y servido de los alimentos. En un estudio anterior se aplicó la norma IRAM 14.201 (2001) para determinar el cumplimiento de las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) durante la elaboración y servicio de alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Control de Proveedores de Insumos

Para todos los métodos se utilizó Medios de cultivos deshidratados y preparados de dos Laboratorios reconocidos y que tienen certificados que han implementado y aplican un Sistema de Calidad para el área de Diseño y fabricación de reactivos para diagnóstico y medios de cultivo para microbiología clínica e industrial vigente al momento de la adquisición de dichos insumos.

b) Trituración y homogeneización de alimentos

Las muestras corresponden a comidas elaboradas que tienen estado sólido por lo que fue necesario someterlos previamente a una suspensión, utilizando diluyente estéril (agua peptonada).

La pesada de la muestra se realizó en recipiente estéril, previa tara del mismo.

La trituración es muy importante en la preparación de la muestra para su análisis ya que hay que evitar la destrucción de los gérmenes por rotura de su membrana o por su calentamiento excesivo y además es necesario una mezcla homogénea para lograr la distribución equilibrada de los gérmenes y sus toxinas. Se utilizó un Vástago eléctrico provisto de una hélice en su extremo, que se introduce en la mezcla a triturar contenida en un envase de vidrio esterilizable.

c) Preparación de las diluciones decimales

Se preparó a partir de la muestra con la finalidad de obtener diluciones progresivas de la muestra, para poder realizar recuentos microbianos posteriores utilizando como diluyente: agua peptonada.

d) Descripción general de la metodología en la Investigación en el Comedor Universitario de la Universidad Nacional de Salta.

Funciona desde 1989 y se concesiona por licitación cada dos años, donde se expenden diariamente cerca de 300 bandejas de menú económico, que consiste en entrada, plato principal, postre y pan.

El muestreo fue aleatorio, recolectándose 10 muestras de los alimentos de alto riesgo - de acuerdo a las normativas de catering aéreo -durante tres meses, en condiciones estériles durante tres meses, que consistió en 1)kuppi, 2)ensalada rusa, 3)arroz primavera,4)milanesa, 5)ensalada mixta, 6)bife a la criolla, 7)fideo con tuco, 8)fideo perejilado, 9)lasagna y 10)salpicón. Las muestras se procesaron según normas y técnicas microbiológicas del ICMSF (2000).

El recuento de mesófilos aerobios totales se efectuó en agar para recuento en placa a 30° C durante 48 horas de incubación.

Se aplicó el método del NMP (Número Más Probable) para determinar los coliformes totales en caldo BRILA (verde brillante bilis lactosa) a 37°C durante 24 a 48 horas. Para las cepas de *E. coli* se aislaron los tubos positivos de NMP y se sembró en agar eosina azul de metileno (EMB) según Levine a 45°C por 24 horas y se hizo la identificación bioquímica de las mismas.

En la determinación de *Salmonella spp.* se realizó un enriquecimiento selectivo en caldo verde brillante a 37° C por 24 horas, luego en caldo selenito y se sembró en agar salmonella shigella durante 24 horas a 37°C. *Staphylococcus aureus* se determinó en agar Baird Parker por 24-48 horas a 37° C y se confirmó con la prueba de la coagulasa.

Mohos y levaduras se determinaron por siembra en agar glucosa 4% Sabouraud a 30° C por 5 días.

RESULTADOS

El cumplimiento de las BPM se determinó en un trabajo anterior mediante la aplicación de la norma IRAM 14.201(2001), resultando un grado de cumplimiento de 76,61% de conformidades con la norma, siendo mayor el número de no conformidades en la parte edilicia del 68,96%, esto debido a que la infraestructura original respondía a las necesidades de una biblioteca y se determinó que el personal no recibió ningún tipo de capacitación para el manejo higiénico durante la elaboración de los alimentos

La contaminación microbiológica presente en las muestras de comidas presentaron valores dentro de los límites normales para la comidas con carne, no así en aquellas que contenían verduras tales como perejil, tomate, papa, zanahoria, chaucha y aderezos como mayonesa o condimentos, como se puede observar en la Tabla 1.

Se observa que el recuento de mesófilos aerobios totales en las muestras 2, 5 y 7 es superior a los límites tolerables según APHA (2001) para comidas preparadas, presencia de *E. coli* en la ensalada de verduras y en las preparaciones con fideos.

El recuento de Mohos y levaduras en muestras 2, 5 y 7 supera el límite de 1.10^3 UFC/ g son las preparaciones con verduras, lo que indica una deficiente aplicación de buenas prácticas de higiene en el lavado de verduras durante el proceso de elaboración de las comidas.

Asimismo el uso de aderezos como mayonesa y condimentos pueden producir contaminaciones por un mal estado de conservación y la presencia de *S. Aureus* en el fideo con tuco indica una deficiente higiene del personal en el manipuleo de los alimentos.

Además se determinó el porcentaje de cumplimiento de la Normativas Microbiológicas que alcanzan el valor de 75% como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Recuento de Microorganismos Indicadores

Muestra	Mesófilos Aerobios Totales (UFC/g)	Coliformes Totales (NMP/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)	<i>Staphylo- Coccus aureus</i> (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
1	$5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$	0	0	0
2	$3 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$	0	$4,0 \cdot 10^{-2}$
3	$4 \cdot 10^3$	$9,3 \cdot 10^1$	0	0	0
4	$8 \cdot 10^3$	0	$1 \cdot 10^2$	0	0
5	$>1 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$	$7 \cdot 10^3$	0	0
6	$1,2 \cdot 10^4$	0	$1 \cdot 10^2$	0	0
7	$1,8 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$
8	$6 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	0	$2,4 \cdot 10^2$
9	$8 \cdot 10^3$	0	0	0	0
10	$1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	0	0
Límites tolerables	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	0

Salmonella spp: ausencia en 25 gramos en todas las muestras de alimentos

Tabla 2 : muestras que cumplen las normativas microbiológicas vigentes

Determinación de	Número de Muestras del Comedor	Valores de referencia UFC/g
Mesófilos aerobios totales	5	$1 \cdot 10^4$
Coliformes totales	8	$1 \cdot 10^3$
Mohos y levaduras	6	$1 \cdot 10^3$
<i>Stafilococcus aureus</i> coagulasa positiva	9	$1 \cdot 10^2$
E. coli	7	0
<i>Salmonella</i> ssp	10	Ausencia en 25 g de muestra
Totales que cumplen	45 de 60	
% de muestras que cumplen	75%	

Determinaciones microbiológicas totales =60 Muestras recolectadas =10

CONCLUSIÓN

La contaminación microbiológica presente en las muestras de comidas presentaron valores dentro de los límites normales para la comidas con carne, no así en aquellas que contenían verduras tales como perejil, tomate, papa, zanahoria, chaucha y aderezos como mayonesa o condimentos, con recuentos de mesófilos totales de 10^6 UFC/g en ensaladas mixtas de verduras, presencia de *E. coli* en ensaladas y fideos, hongos y levaduras con valores desde 1,1 a $7 \cdot 10^3$ UFC/g en las ensaladas de verduras y los fideos con perejil y tuco.

Los resultados microbiológicos demuestran deficiente manejo de las verduras crudas durante la preparación de comidas, lo que implica la necesidad de capacitación de los manipuladores.

BIBLIOGRAFIA

American Public Health Association Inc. (APHA). Microbiological Examination of Foods. 4nd. Ed. Washington. 2001.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos, Vol. 1 y 2. Ed. Acribia. España. 2000.

IRAM. Norma IRAM 14201 (Esquema A1)- Industria de alimentos- Buenas Prácticas de Higiene y de Elaboración. Agosto 2001.

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIOS Y BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA EN ALIMENTOS ELABORADOS EN EL SERVICIO GASTRONÓMICO CONCESIONADOS DE UN KIOSCO UNIVERSITARIO

BUTTAZZONI, Ricardo (1); RABUS Patricia.(1); GÓMEZ DE DÍAZ, Rosario (1) ;
DI CARLO Berta M. (1) y SALOMÓN Raquel L.(2)

Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, (1) Facultad de Ciencias Exactas,
(2)Facultad de Ingeniería. Buenos Aires 177-4400 Salta. Argentina.
E-mail: charo@unsa.edu.ar

RESUMEN

La determinación de microorganismos indicadores como aerobios mesófilos totales, coliformes totales, mohos y levaduras son indicios de la aplicación de las buenas prácticas de manufactura (BPM) en la elaboración y servicio de alimentos.

Se determinó el recuento de éstos microorganismos indicadores según técnicas del ICMSF (2000), además de la presencia o ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y recuento de *Staphylococcus aureus* en el muestreo aleatorio de minutas como empanadas, tartas y sandwiches que se expenden en un kiosco ubicado dentro de la Universidad Nacional de Salta.

Se aplicó la norma IRAM 14.201(2001) con la finalidad de determinar el grado de cumplimiento de las BPM durante la elaboración y servido de los alimentos en el kiosco.

Las determinaciones microbiológicas están dentro de los límites tolerables para las empanadas y tartas, no así en el caso de los sandwiches de miga que registraron aerobios mesófilos totales de $1,2 \cdot 10^4$ a $1,5 \cdot 10^5$ UCF/g y coliformes totales de $1,1 \cdot 10^3$ UCF/g para el de jamón y queso.

El servicio de comidas elaboradas en el kiosco de la Universidad Nacional de Salta presenta un grado de cumplimiento del 48,8 % de conformidades respecto de la Norma IRAM 14.201(2001). Presentando el mayor número de no conformidades en la zona edilicia (58,44 %), lo que se debe a que el espacio es insuficiente lo que lleva a una deficiente higiene en el local con 41,18 % de no conformidades.

Los resultados microbiológicos y de BPM, demuestran la necesidad de capacitación de los manipuladores en el manejo higiénico de los alimentos y la adecuación edilicia a las normativas.

Palabras Claves: kiosco, microorganismos, indicadores, contaminación.

ABSTRACT

The determination of indicator microorganisms of contamination like total mesophiles aerobes, total coliforms, fungi and yeasts have sanitary significance of the application of the good practices of manufacture (BPM) in the elaboration and service of foods. The count of these indicator microorganisms was determined according to techniques of the ICMSF (2000), moreover to the presence or absence of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and count of *Staphylococcus aureus*. The foods were randomly sampled in sterile conditions during three months such as like meat-pies, cakes and sandwiches from kiosk located within the National University of Salta.

The Norm IRAM 14.201(2001) was applied for the determining the degree of performance of the BPM during the elaboration and served as foods in kiosk. The microbiological determinations are within the tolerable limits for meat-pies and cakes, not thus in the case of the sandwiches that registered total mesophiles aerobes of $1,2 \cdot 10^4$ to $1,5 \cdot 10^5$ UCF/g and total coliforms of $1,1 \cdot 10^3$ UCF/g for the one of ham and cheese. The service of meals in kiosk of the

National University of Salta, presents a degree of performance of 48.8 % conformities respect to Norm IRAM 14.201(2001).

Displaying the greater number of nonconformities in the building zone (58.44%), which must to that the space is insufficient what takes to a deficient hygiene in the premises with 41.18 % of nonconformities. The microbiological results and of BPM, demonstrate to the necessity of education of the manipulators in the hygienic handling of foods and the building adjustment to the norms.

INTRODUCCION

La determinación de microorganismos indicadores como aerobios mesófilos totales, coliformes totales, mohos y levaduras son indicios de la aplicación de las buenas prácticas de manufactura (BPM) e higiene en la elaboración y servido de alimentos. La Norma IRAM 14201(2001) regula la aplicación de BPM en el servicio de alimentos, siendo de aplicación en comedores, hospitales y servicios de expendio de comidas minorista.

Se determinó el recuento de éstos microorganismos indicadores en las comidas elaboradas de alto riesgo, de acuerdo a la clasificación de catering aéreo de OPS 1994, además de recuento de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y de *Staphylococcus aureus* en el muestreo aleatorio de comidas que se elaboran y expenden en un kiosco ubicado dentro de la Universidad Nacional de Salta.

Se aplicó la norma IRAM 14201(2001) con la finalidad de determinar su grado de cumplimiento, ya que la misma asegura la aplicación de las buenas prácticas de manipulación (BPM) durante la elaboración y servido de los alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El kiosco universitario prepara y expende diariamente alrededor de 200 minutas que consisten en empanadas, sandwiches y tartas de verdura, choclo y jamón con queso.

Se realizaron 120 determinaciones microbiológicas a 10 muestras durante tres meses, para conocer la calidad higienico-sanitaria de las comidas elaboradas en el kiosco universitario. Se procesaron según técnicas y procedimientos del ICMSF (2000).

- a) Control de Proveedores de Insumos

Para todos los métodos se utilizó Medios de cultivos deshidratados y preparados de dos Laboratorios reconocidos y que tienen certificados que han implementado y aplican un Sistema de Calidad para el área de Diseño y fabricación de reactivos para diagnóstico y medios de cultivo para microbiología clínica e industrial vigente al momento de la adquisición de dichos insumos.

-b) Trituración y homogeneización de alimentos

Las muestras corresponden a comidas elaboradas que tienen estado sólido por lo que fue necesario someterlos previamente a una suspensión, utilizando diluyente estéril (agua peptonada).

La pesada de la muestra se realizó en recipiente estéril, previa tara del mismo.

La trituración es muy importante en la preparación de la muestra para su análisis ya que hay que evitar la destrucción de los gérmenes por rotura de su membrana o por su calentamiento excesivo y además es necesario una mezcla homogénea para lograr la distribución equilibrada de los gérmenes y sus toxinas. Se utilizó un Vástago eléctrico provisto de una hélice en su extremo, que se introduce en la mezcla a triturar contenida en un envase de vidrio esterilizable.

-c) Preparación de las diluciones decimales

Se preparó a partir de la muestra con la finalidad de obtener diluciones progresivas de la muestra, para poder realizar recuentos microbianos posteriores utilizando como diluyente: agua peptonada.

Se aplicó el método del NMP (Número Más Probable) para determinar los coliformes totales en caldo BRILA (verde brillante bilis lactosa) a 37° C durante 24 a 48 horas. Para las cepas de *E. coli* se aislaron los tubos positivos de NMP y se sembró en agar eosina

azul de metileno (EMB) según Levine a 45° C por 24 horas y se hizo la identificación bioquímica de las mismas.

En la determinación de *Salmonella spp.* se realizó un enriquecimiento selectivo en caldo verde brillante a 37° C por 24 horas, luego en caldo selenito y se sembró en agar salmonella shigella durante 24 horas a 37° C. *Staphylococcus aureus* se determinó en agar Baird Parker por 24-48 horas a 37° C y se confirmó con la prueba de la coagulasa. Mohos y levaduras se determinaron por siembra en agar glucosa 4% Sabouraud a 30° C por 5 días. Se elaboró un check-list de acuerdo a la norma IRAM 14.201(2001) que comprende la infraestructura del comedor, los requisitos de higiene del establecimiento, requisitos sanitarios y de higiene del personal y requisitos de higiene durante la elaboración y servido de los alimentos.

RESULTADOS

Las determinaciones microbiológicas están dentro de los límites tolerables según APHA (2001), para las empanadas y tartas, no así en el caso de los sandwiches de miga que registraron aerobios mesófilos totales de $1,2 \cdot 10^4$ a $1,5 \cdot 10^5$ UCF/g y coliformes totales de $1,1 \cdot 10^3$ UCF/g para el de jamón y queso.

En la Tabla 1, se muestran los resultados microbiológicos para las muestras: 1) empanada de carne, 2) tarta de choclo, 3) milanesa, 4) tarta de verdura, 5) empanada de pollo, 6) hamburguesa de pollo, 7) tarta de choclo, 8) sandwich imperial, 9) empanada de queso y 10) sandwich de jamón y queso.

Estos resultados indican falta de higiene en la elaboración de los sandwiches y por lo tanto es prioritaria la educación del personal en la manipulación correcta e higiénica de los alimentos.

En cuanto al cumplimiento de Norma IRAM 14.201(2001) respecto al edificio en general, las construcciones son sólidas y habilitadas de acuerdo a la legislación vigente. El kiosco presenta una ubicación adecuada, con suministro suficiente de gas y agua.

La puertas y ventanas están en buen estado, orientadas al Este y al Oeste, la puerta se mantiene cerrada, no permitiendo la entrada de animales. Las paredes son lisas e impermeables, de fácil limpieza y desinfección. La unión de la pared con el techo no es abovedada sino en ángulo recto

Los suelos son de baldosas, de fácil limpieza, resistentes a los golpes y a los agentes de limpieza. Los pisos no tienen una pendiente hacia los desagües y sólo existe uno, con rejilla, que resultan suficiente para el kiosco que posee 2 m de ancho y 5 m de largo, siendo el espacio insuficiente para la limpieza. Las zonas sucias y limpias no están

separadas física o funcionalmente. Existe una sola pileta con agua fría para el lavado de utensilios, materias primas y manos.

Tabla 1. Recuento de Microorganismos Indicadores

Muestra	Mesófilos Aerobios Totales (UFC/g)	Coliformes Totales (NMP/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella spp</i> (en 25 g)
1	1. 10 ³	0	0	0	0	ausencia
2	3. 10 ³	0	0	0	0	ausencia
3	2. 10 ³	0	0	0	0	ausencia
4	4. 10 ³	0	0	0	0	ausencia
5	6. 10 ²	0	0	0	0	ausencia
6	1. 10 ³	3. 10 ²	0	0	0	ausencia
7	2. 10 ³	0	0	0	0	ausencia
8	1,2. 10 ⁴	10	0	0	0	ausencia
9	5. 10 ³	0	0	0	0	ausencia
10	1,5. 10 ⁵	1,1. 10 ³	9. 10 ²	1. 10 ²	0	ausencia
Límite tolerable	1. 10 ⁴	1. 10 ³	1. 10 ³	1. 10 ²	0	ausencia

El sistema de atención de los comensales es de autoservicio, donde el consumidor recoge la minuta, vaso y servilleta. No existen vestuarios, ni baños, ni lavamanos para el personal. En cuanto a la iluminación el suministro eléctrico es adecuado y suficiente, los tubos fluorescentes no están protegidos para evitar la caída de materiales por roturas y la ventilación es insuficiente.

La evacuación de efluentes es eficaz, desembocando en el sistema de cloacas local, los desechos y residuos se colocan en bolsas de polietileno sin tapa, las cuales se almacenan en contenedores dentro del kiosco.

Existen dos equipos de refrigeración y un freezer, cuyas temperaturas no se controlan periódicamente. El personal utiliza uniforme que consiste en un delantal.

En cuanto a los requisitos de higiene del establecimiento los edificios, equipos, utensilios y demás instalaciones no están en buenas condiciones de limpieza y no existe un programa de limpieza y desinfección. Existe un programa de control de plagas con productos y técnicas autorizados por autoridad sanitaria. El personal tiene control de su estado de salud, usan cosméticos, joyas, mastican chicles y no hay registros de capacitación del personal.

Con respecto a los requisitos de higiene en la elaboración, se controla el rotulado, fecha de vencimiento y envase de las materias primas que se almacenan en condiciones

adecuadas, separando crudos de cocidos. La división en porciones es higiénica y se usan envases descartables que se cubren con film o papel.

Para el grado de cumplimiento de la Norma IRAM 14.201(2001) se determinó los ítems que se cumplen en el servicio de alimentos , que se muestra en la Tabla2.

Tabla 2 : muestras que cumplen las normativas microbiologicas vigentes

Determinaciones de	Número de Muestras Kiosco	Valores de referencia UFC/g
Mesófilos aerobios totales	8	$1. 10^4$
Coliformes totales	9	$1. 10^3$
Mohos y levaduras	10	$1. 10^3$
<i>Stafilococcus aureus</i> coagulasa positiva	10	$1. 10^2$
<i>E. coli</i>	10	0
<i>Salmonella</i> ssp	10	Ausencia en 25 g de muestra
Totales que cumplen	57 de 60	
% de muestras que cumplen	95%	

Determinaciones microbiológicas totales =120 Muestras recolectas = 20

CONCLUSIONES

Las determinaciones microbiológicas en las comidas elaboradas in situ, están dentro de los límites tolerables para las empanadas y tartas, no así en el caso de los sandwiches de miga que registraron aerobios mesófilos totales de $1,2 10^4$ a $1,5. 10^5$ UCF/g y coliformes totales de $1,1. 10^3$ UCF/gr para el de jamón y queso.

El servicio de comidas en kiosco de la Universidad Nacional de Salta presenta un grado de cumplimiento del 48,8 % de conformidades respecto de la Norma IRAM 14.201 (2001). Presentando el mayor número de no conformidades en la zona edilicia (58,44 %), lo que se debe a que el espacio es insuficiente lo que produce una deficiente higiene en el establecimiento con 41,18 % de no conformidades.

Los requisitos de higiene en la elaboración representan el 33,33 % de las no conformidades, aunque el personal no recibió capacitación y que se encuentra que es prioritaria dados los resultados microbiológicos.

Tabla 3. Cumplimiento de la Norma IRAM 14201 (2001)

REQUISITOS	Cumple	No cumple	Total
CONSTRUCCIONES			
1.Edificio en general	13	12	25
2.Separación de áreas	2	3	5
3.Zonas de manipulación de los alimentos	3	5	8
4.Iluminación y ventilación	4	3	7
5.Abastecimiento de agua	4	2	6
6.Evacuación de efluentes y desechos	1	2	3
7.Refrigeración	3	2	5
8.Vestuarios y cuartos de aseo para el personal	1	4	5
9.Equipos y utensilios	1	12	13
REQUISITOS DE HIGIENE DEL ESTABLECIMIENTO:			
1.Mantenimiento	-	1	1
2.Limpieza y desinfección-lavado	3	2	5
3. Programa de control de higiene	-	2	2
4.Almacenamiento y eliminación de residuos	2	1	3
5.Ausencia de animales domésticos	-	1	1
6.Lucha contra las plagas	3	-	3
7.Almacenamiento de sustancias peligrosas	1	-	1
8.Elementos ajenos al servicio de alimentos	1	-	1
	1	3	4
REQ.SANITARIOS Y DE HIGIENE DEL PERSONAL			
REQUISITOS DE HIGIENE EN LA ELABORACIÓN			
1.Recepción y almacenamiento de las materias primas	2	-	2
2.Prevenición de contaminación cruzada	1	2	3
3.Descongelación	-	3	3
4.Proceso de cocción	2	1	3
5.División en porciones	4	-	4
6.Enfriamiento y condiciones de almacenamiento	2	1	3
7.Congelación y condiciones de almacenamiento	1	2	3
8.Recalentamiento y servicio	4	-	4
9.Sistema de identificación y control de calidad	2	-	4
TOTALES EN NUMEROS	61	64	125
TOTALES EN PORCENTAJE	48,80	51,2	100

BIBLIOGRAFIA

American Public Health Association Inc. (APHA). Microbiological Examination of Foods. 4th. Ed. Washington. 2001.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos, Vol. 1 y 2. Ed. Acribia. España. 2000.

IRAM. Norma IRAM 14201 (Esquema A1)- Industria de alimentos- Buenas Prácticas de Higiene y de Elaboración. Agosto 2001.

Organización Panamericana de la Salud. Manejo Higiénico de los Alimentos, Catering Aéreo. OPS/HCV/94.13, 1994.

EVALUACIÓN DE SEGURIDAD ALIMENTARIA EN COMEDORES COMUNITARIOS DE PARANA.

SPIZZO¹, Silvana R., MAZZA², Griselda del H., ALASINO², María C.

1 Cátedra de Bromatología y Nutrición Alimentaria. 2 Cátedra de Microbiología de los Alimentos UTN Facultad Regional Paraná, Almafuerite 1033. Paraná. E.Ríos. Argentina.Tel./Fax 0343-4243054 academico@frp.utn.edu.ar

RESUMEN

Se evaluó la seguridad alimentaria de los comedores comunitarios a través del estudio del estado nutricional de los niños; de las condiciones higiénico-sanitarias mediante análisis microbiológicos y la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Para valorar el estado nutricional se utilizaron los parámetros antropométricos peso y talla para la edad por sexo, se determinó el IMC/edad cronológica (NCHS-CDC, 2000) y las Guías para la Evaluación del Crecimiento de la SAP (Lejarraga H. y Orfila J., 1987). Se registró un 7% de sobrepeso, 33% desnutrición y un 60% de niños eutróficos. Para la evaluación de ambiente, manos y utensilios se realizaron recuentos de aerobios mesófilos totales, coliformes, mohos y levaduras y en comidas preparadas, además de los mencionados enterobacterias, según técnicas recomendadas por la APHA, 1992. Se encontraron valores no aceptables para alimentos y para manipuladores valores objetables. La aplicación de BPM se evaluó mediante planillas preestablecidas. Se evidenció correlación entre el no cumplimiento de las mismas y los valores microbiológicos hallados.

Palabras claves: seguridad alimentaria, evaluación nutricional, buenas prácticas de manufactura en comedores, comedores comunitarios, higiene alimentaria.

ABSTRACT

It was evaluated the communitarian lunchrooms nourishment security trough the study of the nutritional state of the children, the hygienic conditions by means of microbiological analyses and the application of GMP. In order to value the nutritional state they were used the anthropometric parameters weight and height for the age by sex. The chronological IMC/edad was determined and the growth according to Guides of the SAP was evaluated. It was registered a 7% of overweight, 33% undernourishment and a 60% of normal weight children. It was analyzed in atmosphere, hands and utensils count of total mesophilics aerobics, coliform, yeast and mold and in prepared meals, in addition to mentioned

enterobacteriaceae, according to techniques recommended by the APHA, 1992. The application of BPM was evaluated by means of pre-established lists. It existed correlation between the no fulfillment of the BPM and the microbiological values found.

INTRODUCCIÓN.

El 16,2 % de la población de nuestra región se encuentra bajo la línea de la indigencia y el 41,2 % bajo la línea de la pobreza (INDEC, 2004), es por ello que existe un importante número de personas que asisten a comedores comunitarios.

La seguridad alimentaria influye en el crecimiento, desarrollo y bienestar de los individuos. El estado nutricional dependerá fundamentalmente de la interacción de la potencialidad genética con los factores condicionantes ambientales imperantes en la comunidad (Valiente, 1982). La utilización biológica inadecuada de los alimentos está asociada a la mala salud, falta de higiene personal y de los alimentos, pobre saneamiento, prestación de cuidados deficientes, insuficiente calidad e inocuidad alimentaria.

En los sectores de menores recursos, la diarrea es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, especialmente en los niños. Las enfermedades gastrointestinales originan menor ingestión de alimentos, mala absorción y pérdida de nutrientes en heces favoreciendo la desnutrición en personas susceptibles lo que origina una mayor predisposición a otras enfermedades.

Los alimentos pueden vehiculizar microorganismos patógenos o sus toxinas, pudiendo causar brotes de origen alimentario. En Argentina los comedores estuvieron involucrados en un 25 % del total de los brotes ocurridos entre los años 2001 y 2002 (SIRVETA, 2002). En los comedores comunitarios confluyen factores de riesgo como son preparación, almacenamiento y servicio de grandes volúmenes de comida, junto a la falta de recursos e insuficiente capacitación del personal en lo referente a la seguridad alimentaria.

Debido a la estrecha relación que existe entre el aprovechamiento de los alimentos y las condiciones de higiene y saneamiento con que se los prepara, resulta prioritario evaluar los aspectos más relevantes de la seguridad alimentaria. Se propuso estudiar en forma conjunta la aplicación de las BPM, las condiciones higiénico sanitarias y el estado nutricional de los niños que a ellos asisten a fin de detectar problemas nutricionales e implementar estrategias para minimizar el riesgo de aparición de ETAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinaron las condiciones higiénico – sanitarias en los comedores I y II mediante el análisis microbiológico de las comidas preparadas. La toma de muestra se llevó a cabo en

el mismo momento de su consumo. Se adoptó la categoría 6 del plan de muestreo de la ICMSF, teniendo en cuenta que las condiciones de manejo de los alimentos podían incrementar el peligro de contaminación debido que suele transcurrir un tiempo entre su preparación y servicio, además que dichas comidas suelen ser transportadas a los hogares en forma de vianda. La categoría 6 se encuadra en un plan de muestreo por atributos de tres clases para análisis cuantitativos definidos por los valores n , donde representa el número de unidades de muestreo a analizar, en este caso su valor es 5; c es la máxima cantidad de unidades de muestreo en los que se puede obtener un resultado insatisfactorio, en este caso es 1, M son recuentos que superiores a este valor son inaceptables y si al menos en una unidad se obtiene un resultado superior el lote es rechazado, y m delimita una calidad satisfactoria ($\leq m$) de otra marginalmente aceptable ($> m$ y $\leq M$). Las comidas analizadas fueron guisados. Se registró la temperatura al final de la cocción y en el momento de la toma de muestra, además del tiempo transcurrido desde su preparación. De acuerdo al plan de muestreo del lote -comida preparada- se tomaron 5 muestras de 100 g. recolectadas en recipientes estériles convenientemente rotulados en distintos puntos de la comida preparada. inmediatamente se acondicionaron a 4°C y se transportaron al laboratorio para su análisis.

De cada una de las unidades de muestreo en condiciones de asepsia se pesaron 10 g. a los cuales se le adicionaron 90 ml de solución de peptona estéril al 0.1% p/v (Britania) y se procedió a su homogenización. Se realizaron las diluciones correspondientes hasta el orden de 10^{-6} para proceder a realizar los recuentos. Se sembraron en profundidad placas por duplicado para el recuento de AMT. Luego se incubaron a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 24 – 48 hs. Para la determinación de coliformes totales se utilizó el medio RVBL (Britania), se sembraron en profundidad las diluciones por duplicado en condiciones de asepsia. Se incubaron a $35-37^{\circ}\text{C}$ - 24 hs. Para el recuento de Enterobacterias el medio utilizado fue RVBG (Britania) y se procedió de la misma manera que para el caso de coliformes totales explicado en el párrafo precedente.

Se evaluó la higiene de utensilios, manos y ambiente: la toma de muestra de olla, tabla, cuchillo y heladera se realizó mediante hisopado húmedo de superficies (5 cmX 5 cm).

Se realizó recuento de AMT, coliformes y mohos y levaduras. Se procedió a la determinación de AMT y coliformes totales de la misma forma que en el análisis de las comidas preparadas. Para los recuentos de mohos y levaduras se utilizó el medio Agar Sabouraud (Britania) sembrando en profundidad placas por duplicado. Se incubaron a 25°C por 3-5 días.

La toma de muestra de las manos de los responsables de cocina se realizó mediante hisopado húmedo. Se efectuaron determinaciones microbiológicas nombradas con anterioridad. Para evaluar el grado de contaminación del ambiente se realizó el recuento de AMT, mohos y levaduras. Se utilizó el método de sedimentación en placas.

Las placas para el recuento de AMT se incubaron a 35-37 ° C durante 24-48 hs. y para levaduras y mohos a 25 ° C durante 3-5 días, respectivamente.

Se realizó la evaluación de las BPM mediante un estudio de tipo descriptivo, basado en el registro, observación en el lugar y entrevistas al personal de comedores.

Con respecto a los establecimientos se tuvo en cuenta el emplazamiento del edificio, estructura, conservación, desagües, provisión de agua potable, control de plagas, iluminación, ventilación, protección contra moscas e insectos, disposición de los residuos, características de los equipos, utensilios y superficies en contacto con los alimentos, etc. Con respecto a la materia prima y alimentos utilizados para la elaboración se evaluó el período de aptitud, rótulos e identificación, correcta conservación y rotación, tiempo de exposición a temperaturas de riesgo, peligro de contaminación cruzada, etc.

En cuanto a las prácticas realizadas por el personal se tuvieron en cuenta cómo realizaban los procedimientos de elaboración, fraccionamiento, conservación y servicio de las comidas, así como el correcto lavado de manos y su frecuencia, vestimenta y presentación adecuada, posibles contaminaciones cruzadas, etc. Cada aspecto evaluado fue volcado en las planillas correspondientes y calificado según criterio: Bueno, Regular e Insuficiente.

En la valoración del estado nutricional se estudió un grupo 42 de niños asistentes a 3 comedores comunitarios, 17 varones y 25 mujeres con edades comprendidas entre 2 y 16 años. Se les determinó el peso (P) (kg.) y la estatura (H) (cm.).

Para el diagnóstico nutricional se tuvieron en cuenta el IMC para la edad, según sexo, clasificándolos en percentiles con la referencia CDC – NCHS, 2000. La evaluación del crecimiento fue realizada en base a las Guías de la SAP según Peso/Edad por sexo (Lejarraga H. y Orfilia J., 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Las comidas preparadas se clasificaron según el plan de muestreo realizado en tres grados de calidad: "aceptable", "medianamente aceptable" y "rechazable" de acuerdo con los criterios microbiológicos adoptados (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedios de la determinación microbiológica de la comida lista para consumo correspondientes a los comedores comunitario I y II.

COMEDOR COMUNITARIO I	Log X₁ (UFC/g)	LogX₂ (UFC/g)	Log X₃ (UFC/g)	Log X₄ (UFC/g)	(UFC/g)
Aerobios Mesófilos Totales	3.70	3.81	3.96	3.26	
Enterobacterias	2.99	3.04	3.43	2.96	
Coliformes	2.86	2.99	3.23	2.89	
COMEDOR COMUNITARIO II					
Aerobios Mesófilos Totales	4.52	4.08	4.99	4.18	
Enterobacterias	4.08	4.10	4.12	4.11	
Coliformes	4.23	4.19	4.26	4.20	

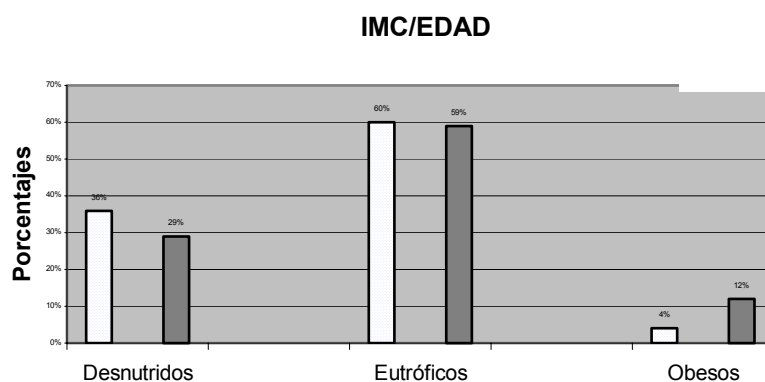
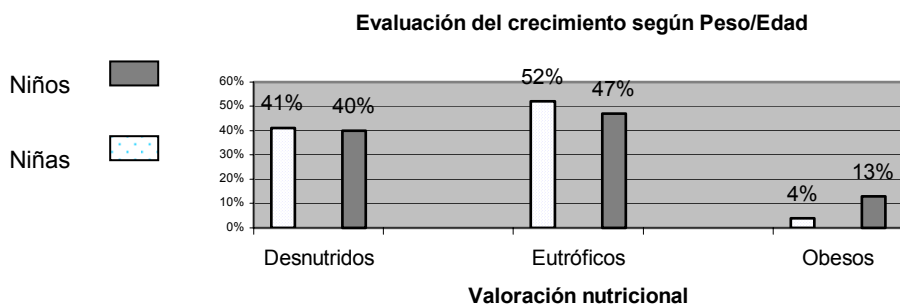
Se tomaron como referentes los recomendados en el DECRETO SUPREMO N° 977 del Ministerio de Salud de Chile, 1997, cuyos valores de m y M para el recuento de aerobios mesófilos totales (AMT) corresponden a $5 \cdot 10^4$ UFC/g y a $5 \cdot 10^5$ UFC/g, y con respecto a coliformes y enterobacterias entre 10^3 UFC/g y 10^4 UFC/g. De acuerdo a los criterios citados, las comidas evaluadas presentaron una clasificación de aceptable y medianamente aceptable para AMT; y en lo referido a enterobacterias y coliformes aceptables e inaceptables respectivamente.

Tabla 2. Valores promedios de la determinación microbiológica en las superficies de utensilios y equipo, manos y ambiente correspondientes a los comedores comunitario I y II.

COMEDOR COMUNITARIO I	Olla (UFC/cm ²)	Tabla (UFC/cm ²)	Cuchillos (UFC/cm ²)	Heladera (UFC/cm ²)	Log UFC/ manos
Aerobios Mesófilos Totales	4	5	4	3	4.48
Mohos y levaduras	<1	<1	<1	<1	2.72
COMEDOR COMUNITARIO II					
Aerobios Mesófilos Totales	99	>10	>10	3	4.60
Mohos y levaduras	1	2	1	1	2.92

Para efectuar la valoración microbiológica de los utensilios, heladera y ambiente se adoptó como referencia lo recomendado por ZSCHALER,1975 que clasifica según las denominaciones “muy bueno”, “bueno”, “suficiente”, “objetable” y “malo” según la evaluación microbiológica determinada. Los valores objetables son aquellos que superan los suficientes (≤ 200 gérmenes totales y ≤ 20 para hongos). El *comedor I* presentó en superficies una calificación de suficiente y en ambiente de objetable para el caso de los hongos y de suficiente para los gérmenes totales. El *comedor II* presentó en todos los casos una calificación de objetable, a excepción de el recuento de AMT en la heladera que fue “suficiente”. Los valores obtenidos en las manos de los manipuladores indicaron una calificación de “objetable” en ambos casos.

Evaluación nutricional: mediante el IMC/edad se diagnosticaron en las niñas un 36% de desnutridas, 60% de eutróficas y un 4% de niñas con sobrepeso. En niños, los valores fueron de 29%, 59% y 12% respectivamente. Según las curvas de crecimiento se observó en niñas un 41% de desnutrición, 52% de peso normal y 4% con sobrepeso. Para niños los valores fueron de un 40%, 47% y 13% respectivamente.



CONCLUSIONES:

Si bien los valores de AMT se encuentran dentro de los valores aceptables, desde el punto de vista higiénico – sanitario, el recuento de enterobacterias y coliformes es más relevante ya que indica la posibilidad de tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al mismo, frecuentemente originado a partir de materias primas, equipos sucios o manejo no higiénico. Se evidencia la necesidad de hacer un control más estricto durante la elaboración y manejo de los alimentos. Además el personal de los comedores presentaba escasos conocimientos sobre seguridad alimentaria, necesarios para llevar a cabo procedimientos adecuados en la preparación y servicio de comidas destinadas a un grupo de riesgo. En lo concerniente a aplicación de las BPM se demostraron notables diferencias entre los distintos comedores, principalmente por la falta de infraestructura adecuada.

El estudio nutricional aporta datos preocupantes por el gran porcentaje de niños desnutridos, al respecto, es notoria la diferencia que existe entre los distintos comedores. Esto se debe a que el comedor con mayor tasa de desnutrición surge como respuesta a la preocupante situación nutricional de los niños del barrio. Al respecto, se están implementando estrategias tendientes a revertir dicha situación con el asesoramiento de profesionales en nutrición.

BIBLIOGRAFÍA:

APHA American Public Health Association (1992) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Carl Vanderzant and Don F. Splittstoesser, Washington D.C.

Campos Díaz J., y col. (2003) Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de Tenerife. Rev. Esp. de Salud Pública 77:749-760 N° 6.

CDC/NCHS (2000) CDC Growth Charts: United States. www.cdc.gov/growthcharts

Feng. P. (1998) FDA-BAM (Bacteriological Analytical Manual) 8th Edit. www.cfsan.fda.gov

Gerhard Wildbrett (2000). Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. En Introducción pp.1-16 Kiermeier F. y Mrozek H. Tabla 1.13 pp. 18 Zschaler 1975. Ed. Acribia.

Gotthelf S., Jubany L. (2002) Evolución del perímetro cefálico en niños desnutridos de bajo nivel socioeconómico durante el tratamiento de recuperación nutricional. Archivos Argentinos de pediatría 2002; 100 (3).

INDEC (2004) Incidencia de la pobreza e indigencia en el total urbano eph y por región estadística – Primer semestre 2004. Encuesta permanente de Hogares Continua.

Iriarte M., Orlando F. (2003) Evaluación del conocimiento sobre bpm de alimentos del personal de cocina de los hoteles cinco estrellas, Isla Margarita Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. INHRR V. 34 N° 1. Venezuela.

Lejarraga H. Y Orfila J. Archivos Argentinos de pediatría (1987) 85:209-222.

Ministerio de Salud de Chile. DECRETO SUPREMO N° 977 (Publicado en el Diario Oficial de 13 de mayo de 1997).

Moisés Hernández y Col. (1997) Evaluación nutricional de escolares de primaria y su posible relación con el desarrollo intelectual . Revista Cubana Alimentaria Nutr. 11(1): 35-39.

O'Donnell (1998) Una visión sobre de la problemática nutricional de niños argentinos, extraído de hoy y mañana salud y calidad de vida en la niñez argentina. CESNI.

SIRVETA - Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los alimentos. INPPAZ OPS/OMS.

The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2000). Microorganismos de los Alimentos I. Sus significados y métodos de enumeración 2° Ed. Zaragoza. Edit. Acribia.

Valiente S., Boj T., Espinosa F. (1982) “Enseñanza de Nutrición en Agricultura” Un enfoque multidisciplinario. FAO.

Zchaler, R. (1975) “Auswirkungen ungunenden Reinigens un Desinfizierens auf Fertigprodukte, In: VDI-Gesellschaft fur Verfaherenstechnik u. Chemieingenieurwesen, Dusseldorf,8HRSG.): Symposium ubre Reinigen und Desinfizierren lebensmittelverarbeitender Anlagen, Kap. 4-1, S. 1-8.

ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS EN 210 DONANTES DE SANGRE EN LA CIUDAD DE MAR DEL PLATA

MOTTA, Estela ⁽¹⁾, CIANCIO BOVIER, Emilia ⁽²⁾, PACIN, Ana ^(2,3), RESNIK, Silvia ^(3,4)
VILLA, Daniel ⁽⁵⁾

Universidad de Mar del Plata (1), CIM-UNLu (2), CIC de la Provincia de Bs.As (3)FCEyN-UBA (4) ,
Dirección Sistemas UNLu (5)

Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina
CP 6700 Teléfono-FAX: 02323 436940; anaxto@speedy.com.ar

RESUMEN

Ocratoxina A (OTA), es una micotoxina hallada con frecuencia en alimentos. El objetivo del trabajo es identificar y cuantificar la ingesta de alimentos que con frecuencia presentan contaminación por OTA, y asociar posteriormente el consumo de los mismos con la presencia de esta micotoxina en plasma. Se realizó una encuesta alimenticia a 210 donantes de sangre que concurren al Centro Regional de Hemoterapia de Mar del Plata, para recoger información sobre la frecuencia de consumo y las cantidades ingeridas. Se determinaron los valores medios, mediana y desviaciones estándar de los alimentos consumidos. Considerando aquellos capaces de aportar OTA, los resultados de la encuesta muestran que diariamente la población consume 84 % de alimentos panificados, 65 % de galletas, 26 % café y 20.6 % de vino. Semanalmente consumen 83 % de fideos, 45 % y 46 % fiambres crudos y cocidos respectivamente y 17 % de café.

ABSTRACT

Ocratoxina A (OTA), is a mycotoxin often founded in foods. The purpose of this work is to identify and to quantify those foods that usually present contamination for OTA at worldwide, and associate, in the future, their consumption by people, with the presence of OTA in plasma. It was accomplished a poll about foods consumption to 210 blood's donors, who had concurred to the Regional Hemotherapy Center of Mar del Plata, to collect information on foods frequency and the ingested quantities. It was determined the mean and medium values, and the standard deviations of foods consumption. Taking into account those foods which could supply OTA, the results of the survey showed that population daily consumption was 84% of breadstuffs, 65% of cookies, 26% coffee and 20.6% of wine. Weekly they consume 83% of noodles, 73 % of poultry, 45% and 46% raw cold cuts and cooked respectively and 17 %of coffee.

Palabras claves: ocratoxina A, encuesta alimenticia, estimación de exposición

INTRODUCCION

La ocratoxina A (OTA), micotoxina carcinogénica en ratones, posee actividad nefrotóxica, inmunotóxica y teratogénica [Kuiper-Goodman & Scott, 1989]. La OTA ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer en el grupo 2 B, posible sustancia carcinogénica en humanos.

OTA fue hallada como contaminante de cereales: trigo, centeno, maíz, cebada y avena [Trucksess y col., 1999] [Jorgensen y col., 1996]; otros alimentos, como diversas especies de habas y legumbres, café, cacao y frutas secas han sido también halladas contaminadas por OTA. La contaminación secundaria ocurre, como consecuencia de la acumulación de metabolitos tóxicos, en carne, vísceras y subproductos (salchichas, huevos) de animales alimentados con cereales contaminados por OTA, y que son ingeridos por la población, ya que los mecanismos habituales de cocción no la degradan totalmente [Hult y col., 1992] [Patel y col., 1997].

Por esta razón, si bien muchas de las operaciones relacionadas con el procesamiento de alimentos disminuyen el grado de contaminación por ocratoxina A, no la destruyen completamente y por eso es posible hallar OTA en café, productos derivados del cacao, especias, vino y cerveza [Krogh.,1987] [JECFA,2001] [.Boudra y col.,1995,].

La estimación de la exposición se basa, entre otros conocimientos, en la medición de fuentes conocidas de ocratoxina A en la dieta. En la Argentina, los niveles hallados de contaminación de vino por OTA fueron nulos o muy bajos [Pacin y col., 2004] [Rosa y col.,2004], esporádicamente se detectó OTA con bajos niveles en alimentos balanceados en Córdoba. Un estudio del .Joint Food Safety and Standards Group, realizado en muestras de maíz que ingresaron al puerto de Gran Bretaña entre 1998 y 1999 indica que de las 37 muestras provenientes de la Argentina solamente una muestra presentaba niveles de contaminación entre 0.1 a 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [Food surveillance, information shets 1998-1999.]. La baja o nula ocurrencia puede estar relacionada con una reducción durante la elaboración de ciertos alimentos o con la escasa presencia de hongos productores en esta región.

El objetivo del trabajo es identificar y cuantificar aquellos alimentos que a nivel mundial presentan contaminación por OA para asociar posteriormente el consumo de los mismos, con la presencia de OTA en plasma de dadores de sangre.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó una encuesta alimenticia a 210 donantes de sangre (150 hombres y 60 mujeres) que concurren durante el mes de febrero al Centro Regional de Hemoterapia de la ciudad de Mar del Plata, por medio de un formulario que permite recoger información sobre la frecuencia de consumo y las cantidades ingeridas. En la encuesta se consignó la edad, peso, talla y estado sanitario. Se encuestó sobre 43 tipos de alimentos, de éstos se incluyeron 18 alimentos que se consideraron importantes como fuente de contaminación por OTA. Entre ellos cerveza, vino, café, polenta, mezcla de cereales, carne de ave, otras carnes, avena, legumbres, frutas secas, pasta de maní, fiambres crudos, fiambres cocidos, panificados, galletas, fideos secos, chocolate, riñón de cerdo. El tamaño de la porción de los diferentes alimentos fue convertido a peso teniendo en cuenta las porciones estándares.

Análisis estadístico: Se determinaron los valores medios, mediana y desviaciones estándar (DS) de los alimentos consumidos. Para el análisis de las cantidades, se consideró la ingesta mensual para cada ítem, convirtiendo las frecuencias de consumo: diaria=30, semanal=4.25, mensual=1, esporádico=0.25 y nunca=0.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

El peso medio de los encuestados fue de 77.4 Kg. (DS: 15.38), altura media 170.3. (DS: 8.68) y edad media 38.1 años (DS: 11.99). Teniendo en cuenta aquellos alimentos que son considerados a nivel mundial como fuente de contaminación de OTA, los resultados de la encuesta muestran que el 84 % de la población consume diariamente alimentos panificados, el 65 % galletas, el 26 % café y el 20.6 % vino. Y semanalmente el 83% consume fideos, el 73% aves de corral, el 45% y el 46 % fiambres crudos y fiambres cocidos respectivamente y el 17% consume café (tablas1-3).

Las cantidades mensuales ingeridas de alimentos capaces de estar contaminados por OTA, podrían agruparse en productos manufacturados con cereales: panificados 7,35 kg (DS: 4,24) y galletas 2,51 kg (DS: 2,04), y vino cuyo consumo es de 2,64 lt (DS: 4,5 l); seguidos carne de aves de corral (1,3 kg DS:1,98), fideos (969.88 g DS:1007.5), soja(397.97 g DS:788.2), carne de cerdo(365.19 g, DS: 783.4),fiambres ya sea crudos (330.99 g DS: 559.8) o cocidos(362.9 g DS: 641.8), harina de maíz (264.62 g DS: 532.9) que no tuvo un consumo importante, probablemente debido a que la encuesta se realizó en verano y café (206.68 g DS: 490.6).

La cantidad de otros alimentos es escasa como para ser tenida en cuenta, como vía de exposición.

Tabla I: Frecuencia de consumo de alimentos en 210 donantes de sangre

ALIMENTO	DIARIO		SEMANAL		MENSUAL		ALGUNAS VECES		NUNCA	
	*N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Te	192	94.1	5	2.5	0	0.0	0	0.0	7	3.4
Productos panificados	174	84.5	25	12.1	2	1.0	4	1.9	1	0.5
Azúcar	160	78	3	1.5	0	0.0	4	2.0	38	18.5
Vegetales crudos	135	65.9	57	27.8	3	1.5	1	0.5	9	4.4
Galletas	134	65.0	35	17.0	2	1.0	15	7.3	20	9.7
Frutas Frescas	129	62.9	55	26.8	7	3.4	5	2.4	9	4.4
Frutas enlatadas	107	52.2	49	23.9	10	4.9	19	9.3	20	9.8
Jugos	105	51.2	42	20.5	7	3.4	11	5.4	40	19.5
Carne de vaca	96	47.6	97	47.1	7	3.4	2	1.0	2	1.0
Leche y subproductos	82	39.8	62	30.1	23	11.2	13	6.3	26	12.6
Vegetales cocidos	74	35.4	86	41.7	14	6.8	2	1.0	30	14.6
Mermelada	71	34.6	53	25.9	6	2.9	19	9.3	56	27.3

* N°= Número de personas

Tabla II: Frecuencia de consumo de alimentos en los 210 donantes de sangre

ALIMENTO	DIARIO		SEMANAL		MENSUAL		A VECES		NUNCA	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Jugo de frutas	67	33,3	29	14,4	5	2,5	12	6,0	88	43,8
Todo tipo de quesos	58	28,2	120	58,3	8	3,9	11	5,3	9	4,4
Café	53	26,2	35	17,3	9	4,5	34	16,8	71	35,1
Dulces	43	21,1	49	24,0	10	4,9	46	22,5	56	27,5
Vinos	42	20,6	40	19,6	4	2,0	11	5,4	107	52,5
Soja	32	15,6	38	18,5	19	9,3	14	6,8	102	49,8
Dulce de Leche	29	14,2	45	22,1	21	10,3	38	18,6	71	34,8
Edulcorantes	27	13,2	4	2,0	0	0,0	0	0,0	173	84,8
Cereales	24	11,8	29	14,2	11	5,4	21	10,3	119	58,3
Cerveza	20	9,8	72	35,1	10	4,9	21	10,2	82	40,0
Fiambre cocido	19	9,2	95	46,1	38	18,4	32	15,5	22	10,7
Fiambre crudo	17	8,3	92	45,1	34	16,7	27	13,2	34	16,7
Aves de corral	17	8,3	150	72,8	18	8,7	8	3,9	13	6,3
Snacks salados	16	7,9	76	37,6	30	14,9	40	19,8	40	19,8
Tallarines	15	7,3	170	82,5	7	3,4	4	1,9	10	4,9

* N°= Número de personas

CONCLUSIONES

Basados en la información sobre alimentos que son considerados a nivel mundial como fuente de contaminación de OTA, la exposición de la población encuestada podría ocurrir debido al consumo de productos panificados, vino, galletas, y en menor cantidad carne de aves, fideos; otros alimentos como fiambres, carne de cerdo, café, no se consideran relevantes en su aporte a la exposición, y el consumo de riñón de cerdo es nulo por lo que tampoco contribuiría a la exposición de OTA.

La importancia de continuar llevando a cabo encuestas de este tipo radica en la posibilidad de estimar la exposición de la población a intoxicaciones a través de consumo

de alimentos contaminados, así como identificar aquellos alimentos sobre los que se debería analizar la presencia de OTA.

Tabla III: Frecuencia de consumo de alimentos en los 210 donantes de sangre

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		A veces		Nunca	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Chocolate	12	5,9	53	25,9	16	7,8	28	13,7	96	46,8
Huevos	11	5,4	157	77,3	10	4,9	16	7,9	9	4,4
Arroz y derivados	10	4,9	151	73,3	16	7,8	13	6,3	16	7,8
Pastelería	8	3,9	51	25,1	48	23,6	63	31,0	33	16,3
Frutas desecadas	7	3,4	18	8,8	11	5,4	15	7,3	154	75,1
Frutas secas	6	3,0	10	5,0	10	5,0	43	21,4	132	65,7
Bebidas dietéticas	5	2,4	3	1,5	1	0,5	5	2,4	191	93,2
Avena y derivados	5	2,4	8	3,9	10	4,9	8	3,9	175	85,0
Porotos, lentejas, garbanzos	4	2,0	41	20,2	32	15,8	41	20,2	85	41,9
Sopas	4	1,9	14	6,8	11	5,8	11	5,3	165	80,1
Pasta de maní	1	0,5	19	9,4	25	12,4	32	15,8	125	61,9
Bebidas alcohólicas	1	0,5	6	3,0	0	0,0	1	0,5	195	96,1
Polenta y productos derivados del maíz	1	0,5	57	27,8	36	17,6	44	21,5	67	32,7
Otras carnes	1	0,5	64	31,1	66	32,0	37	18	38	18,4
Carne de cerdo	0	0,0	21	10,2	37	18,0	67	32,5	81	39,3
Riñón de cerdo	0	0,0	0	0,0	3	1,5	16	8,0	181	90,5

* N°= Número de personas

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la CIC, UBA, UNLu, UNMdEP, INTA, Comunidad europea a través del Project Contract Number ICA4-CT-2002-10043; Pictor BID 1201/OC-AR PICTOR 2002-00012

BIBLIOGRAFIA

Boudra, H., Le Bars, P. & Le Bars, J. 1995 Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *App. Environ. Microbiol.* 61, 1156-1158.

Food surveillance, information sheets 1998-1999.
<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/survlist/1998surv.htm#nat>

Hult, K., Hokby, E., Sellyey, G., Rutqvist, L. & Gatenbeck, S. 1992 Ochratoxin A occurrence in slaughter-pigs in Sweden and its use as a tool for feed screening programs. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11,39-40.

JECFA, 2001, Safety evaluation of certain mycotoxins in food, prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Series 47 pp. 410-413.

Jorgensen, K., Rasmussen, G. & Thorup, I. 1996 Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Addit. Contam.*, 13. 95-104.

Krogh, P., 1987, Ochratoxin in food. *Mycotoxins in Food*, edited by Krogh, P. London: Academic Press, pp. 97-121.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. 1989. Risk assessment of mycotoxins Ochratoxin A. *Biomedical and environmental. Sciences*, 2. 179-248.

Pacin A., Resnik S., Vega M., Saelzer R., Ciancio Bovier E., Ríos G., and Martinez N. 2004. Occurrence of Ochratoxin A in wines in the Argentinean and Chilean markets. Enviado a publicar.

Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G.M. & Gleande, A.E. 1997 Survey of Ochratoxin A in UK retail coffee. *Food Addit. Contam.*, 14,217-222.

Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M. E., Dalcero, A. M., and Santana, D. M. N., 2004, Occurrence of Ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21, 358-364.

Trucksess, M.W., Giler, J., Young, K., White, K.D. & Page, S.W. 1999 Determination and survey of Ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. 1997 *J. AOAC Int.*, 82, 85-89.

PUNTOS CRITICOS EN LOMITOS DE CABALLA (*Scomber japonicus*) DISEÑADOS POR FACTORES COMBINADOS.

SÁNCHEZ Pascua⁽¹⁾, Gabriela.; CASALES⁽²⁾, María R., YEANNES^(2,3), María I.;

⁽¹⁾ CIC, ⁽²⁾ CONICET, ⁽³⁾ UNMDP

Preservación y Calidad de Alimentos. Departamento de Química. FCEyN. UNMDP. Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Argentina. E-mail: myeannes@mdp.edu.ar.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar los Peligros Potenciales y los Puntos Críticos de Control en el proceso de elaboración de lomititos de caballa (*Scomber japonicus*) desarrollados combinando factores de stress microbiano.

Los factores de conservación aplicados para modificar las características intrínsecas del producto fueron: inactivación enzimática por cocción, disminución de a_w por uso de cloruro de sodio y sustancias humectantes (glicerol), agregado de antimicótico (sorbato de potasio), condiciones de anaerobiosis, pasteurización y refrigeración.

De acuerdo al tipo de producto y los parámetros de proceso los Peligros Potenciales resultaron ser: *Clostridium spp.*, *Staphilococcus aureus* y producción de histamina.

La recepción de materia prima, la cocción, la infusión y el oreo son Puntos Críticos para este producto. El control de cada una de estas etapas es necesario para la estabilidad ya que cada una otorga una parte de la letalidad total al producto

Palabras claves: Puntos críticos - factores combinados - lomititos de caballa.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the Potential Hazards and the Critical Control Points in the manufacture process of mackerel chunks (*Scomber japonicus*) developed combining different factors.

The factors applied to modify the intrinsic characteristics of the product were: enzymatic inactivation by cooking, a_w decrease using Sodium Chloride and humectants (Glycerol), use of antimycotic (Potassium Sorbate), anaerobic conditions, pasteurization and refrigeration.

According to the product type and the process parameters the Potential Hazards were: *Clostridium spp.*, *Staphilococcus aureus* and histamine production.

Raw material receipt, cooked, soaked and drained were Critical Points for this product. The control of each one of these stages is necessary for the product stability since each one contribute with a part of the total lethality.

INTRODUCCION

Existe actualmente interés en el desarrollo de nuevos productos o productos alternativos más saludables donde sus propiedades se vean menos perjudicadas por tratamientos intensos. La combinación de diversos factores de conservación evita la utilización de un solo factor en forma abusiva utilizando la acción de varias barreras sobre los microorganismos, permitiendo mantener sus propiedades sensoriales y nutricionales (Alzamora y col, 2001).

La seguridad y/o vida útil de estos productos dependerá de la selección de factores y su intensidad, de la aplicación estricta de las Buenas Prácticas de Manufactura (BMP), Procedimientos Operaciones Estándares de Saneamiento (POES) y de la implementación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Este último es un sistema preventivo, que funciona adecuadamente si los anteriores están implementados. Su objetivo es identificar los peligros relacionados con la inocuidad y establecer estrategias para prevenir, eliminar o reducir su ocurrencia y garantizar la inocuidad de los alimentos (Codex Alimentarius, 1993). Los Peligros pueden ser identificados en todas las etapas del proceso y distribución y analizados de acuerdo a su severidad y riesgo.

Dentro de este Sistema se define como Punto Crítico de Control (PCC) aquella “etapa en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable” (Codex Alimentarius, 1993). Estos puntos deben ser cuidadosamente seleccionados de acuerdo al riesgo y severidad del peligro a controlar. Una estrategia para facilitar su identificación es mediante la aplicación de una secuencia de decisiones, utilizando herramientas como el “árbol de decisión” (Codex Alimentarius, 1993).

A fin de determinar los PCC en un proceso se deben identificar los peligros involucrados, dado que cada PCC puede ser útil para controlar uno o varios Peligros. Evaluar los peligros antes que un nuevo producto sea introducido en el mercado es de suma importancia, más aún si se desconoce el comportamiento de los microorganismos en el alimento en cuestión.

El objetivo de este trabajo fue determinar los Peligros Potenciales y los Puntos Críticos de Control en el proceso de elaboración de lomitos de caballa (*Scomber japonicus*) desarrollados combinando factores de stress microbiano.

MATERIALES Y METODOS

Se elaboraron lomitos de caballa (*Scomber japonicus*) por factores combinados de acuerdo a un desarrollo previo (Sánchez Pascua y col., 1994).

Los factores de conservación utilizados fueron: inactivación enzimática por cocción en solución de infusión, disminución de a_w manteniendo los troncos en la misma solución en refrigeración, uso de una sustancia conservante, condiciones de anaerobiosis por agregado de cobertura de aceite y eliminación de microorganismos por pasteurización (Sánchez Pascua y col., 1994). En la Figura 1 se esquematiza el proceso.

Los troncos (ejemplares eviscerados, descabezados y sin cola) fueron sometidos a cocción en la solución de infusión durante 20 minutos a 105 °C y luego se mantuvieron en refrigeración por 24 hs. dentro de la misma solución. La solución contiene glicerol, cloruro de sodio, sorbato de potasio y agua. Luego de extraídos los troncos de la solución se orearon en refrigeración durante 24 hs., se eliminó la piel, el músculo rojo y el espinazo. Los lomitos (constituidos por el músculo blanco) se fraccionaron y se envasaron en frascos de vidrio con cobertura de aceite vegetal. Todas estas operaciones se efectuaron manualmente. Los frascos se pasteurizaron a 90 °C durante 40 minutos.

Las características del producto final fueron determinadas de acuerdo a las siguientes técnicas: contenido de agua, AOAC Sec. 984.25 (1990), glicerol, AOCS (1959), cloruro de sodio, Kirk y col. (1996), sólidos del pescado por diferencia, pH, AOAC Sec. 981.12 (1990), a_w por gravimetría (Sánchez Pascua y col. 1994).

Las características fueron: 52,56 % de agua; 15,14 % de glicerol; 2,43 % de cloruro de sodio y 29,77 % de sólidos del pescado. El valor de pH fue 6,5 y la a_w 0,89.

Se evaluaron los peligros potenciales en la materia prima, y el efecto que cada etapa del proceso tiene sobre los mismos. Para definir si una etapa es un PCC se utilizó el árbol de decisión del CODEX (1993) para cada peligro potencial en cada una de las etapas del proceso.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dadas las características de la materia prima, los factores de stress microbiano utilizados y las del producto final, se consideraron los posibles peligros químicos y biológicos, teniendo en cuenta que previo a la implementación de un HACCP se deberían encontrar

operativos los sistemas de BPM y POES; con lo cual una gran variedad de peligros no son considerados. Existe la posibilidad que estos sistemas no sean estrictamente mantenidos por lo que la evaluación de los Peligros se realizó considerando las características intrínsecas del alimento y la estabilidad que otorgan las distintas barreras. En el análisis de los peligros potenciales de la materia prima se consideró la generación de histamina por pertenecer la caballa a la familia de los escómbridos peces con cantidades importantes de histidina libre, siendo los productos de esta especie los de mayor incidencia en brotes de histamina en productos pesqueros (ICMSF, 1983, Yeannes y Casales, 1991, Yeannes, 1995, Yeannes y Casales, 1995). Hay antecedentes de presencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus spp.* en la zona de captura y en esta especie, siendo estos microorganismos considerados como altamente formadores de histamina (Carvajal Carranza y col., 1991, ICMSF, 1983, Fuselli y col., 1994a; Fuselli y col., 1994b; Ramirez y col., 1994).

La presencia de metales pesados es otro peligro a considerar. Del análisis bibliográfico realizado se desprende que en las zonas de captura de esta especie los valores se encuentran dentro de los límites normales (Pérez y col., 1986; Marcovecchio, 1998; Marcovecchio y col., 1999).

Como peligros biológicos potenciales se consideraron *Clostridium spp.* y *Staphylococcus aureus*. Dado que el género *Clostridium* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y sus esporos pueden ingresar a los alimentos a través de las materias primas o por contaminación post-proceso debe ser considerado. Entre los anaerobios de mayor peligrosidad aislados en productos pesqueros se encuentra el *Clostridium perfringens* y el *Clostridium botulinum* (ICMSF, 1983, Carvajal Carranza y col., 1991). Si bien el *Clostridium botulinum* tipo E normalmente se relaciona con pescado (Carvajal Carranza y col., 1991, Adams y Moss, 1995), la presencia de los tipos A y B son considerados potencialmente un peligro por las posibilidades de contaminación (Troller, 1987; Beuchat, 1987; Hardman, 1989). La presencia de *Staphylococcus aureus*, en este producto podría deberse a contaminación por manipulación en las distintas operaciones, dado que se trata de un mesófilo cuyo hábitat es la piel y las mucosas, hallándose valores de 50 % (ICSMF, 1983; Notermans, 1983; Troller, 1987; Beuchat, 1987; Carvajal Carranza y col., 1991) y hasta 67 % (Ramírez y col. 2001). en individuos sanos

Del análisis del proceso y la aplicación del árbol de decisión se obtuvo que:

* **Recepción de materia prima:** El nivel de histamina presente en el pescado, ya sea en ésta etapa o en posteriores no podrá ser eliminada, por lo que su cuantificación en la

recepción permite tomar la decisión de aceptar o no el lote y determinar su trato posterior, por lo que esta etapa es un **Punto Crítico** para el control de histamina.

* **Descabezado, eviscerado y corte de cola:** Serie de cortes necesarios donde se puede producir contaminación por microorganismos deteriorantes, indicadores de higiene y patógenos propios del pescado. En esta etapa no se prevé su eliminación y/o reducción, por lo tanto no es un Punto Crítico.

***Cocción en la solución de infusión:** Fue diseñada para coagular proteínas, eliminar agua, favorecer la posterior eliminación de piel, músculo rojo y espinas, producir cambios texturales que faciliten la posterior deshidratación osmótica y penetración de la solución en el músculo en la etapa siguiente, para inactivar enzimas y disminuir el recuento de microorganismos (Sánchez Pascua y col., 1994). El tiempo y la temperatura de cocción utilizados eliminarían los microorganismos formadores de histamina. Para el *Cl. Perfringens* y el *S. aureus* produciría una disminución de la carga inicial de acuerdo al D (tiempo de reducción decimal) de estos microorganismos (Dillon y Griffith, 1996). La a_w del músculo al final de esta etapa es de 0.98 coincidentemente con experiencias previas (Sánchez Pascua y col., 1994). Esta etapa es un **Punto Crítico** para los microorganismos patógenos considerados y para la producción de histamina.

***Inmersión en la solución en condiciones de refrigeración:** En esta etapa se logra una rápida disminución de la a_w en las primeras horas. La a_w al final de la deshidratación osmótica es de 0,89 coincidentemente con trabajos previos (Sánchez Pascua y col., 1994), por lo que inhibiría el desarrollo y la producción de toxinas de los microorganismos mencionados como peligros potenciales (Notermans, 1983; Beuchat, 1987; Alzamora y col. 2001). Existen experiencias que demuestran que el glicerol para una misma a_w posee un efecto inhibitor mayor que otros solutos para el *S. aureus* y que el valor mínimo para el desarrollo y la producción de toxina es más alto que cuando se utilizan otros depresores de la a_w (Hardman, 1989). Esta etapa es un **Punto Crítico** para los peligros microbiológicos.

***Oreo en refrigeración:** La finalidad del mismo es favorecer el escurrido de la solución de infusión y dejar el tronco en condiciones para que la piel, espinas y músculo rojo puedan ser removidos fácilmente en la etapa posterior. En el caso de existir una contaminación, el oreo en refrigeración impediría el crecimiento de los microorganismos patógenos y la producción de sus toxinas. Esta etapa es un **Punto Crítico** para los peligros microbiológicos.

***Obtención de lomitos:** Las características intrínsecas del producto evitan el desarrollo de los microorganismos peligro y la producción de sus toxinas. Esta etapa no es un Punto Crítico.

***Envasado:** La utilización de cobertura de aceite crea condiciones de anaerobiosis que podría favorecer el crecimiento de microorganismos anaeróbicos pero las características intrínsecas del producto (a_w , pH, sorbato de potasio) impedirían su desarrollo (Troller, 1987; Mazzobre, 1999). Esta etapa no es un Punto Crítico.

***Pasteurización:** De acuerdo a las características intrínsecas del producto logradas por la combinación de factores utilizados para su estabilización, se considera que la necesidad de la etapa de pasteurización debería ser analizada y objeto de estudios experimentales.

CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis realizado se determinó que las etapas de recepción de materia prima, cocción, infusión en la solución bajo refrigeración y oreo en refrigeración son **Puntos Críticos de Control** para los lomitos de caballa, otorgando cada etapa una parte de la letalidad total del proceso.

La necesidad de la etapa de pasteurización no está aún determinada por lo que deberá ser estudiada.

BIBLIOGRAFIA

Adams, M., Moss M., 1995. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Alzamora, S. M.; Salvatori, D.; Guerrero, S.; Palou, E.; Lopez Malo, A; Dias, M. 2001. Curso "Microbiología Predictiva, HACCP, Factores en Combinación y Análisis Cuantitativo de Riesgos Aplicados a la Seguridad de los Alimentos". 2001. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed. Washington, D.C.

AOCS. 1959. Official and Tentative Methods. American Oil Chemist's Society. Champaign, IL, USA, Ea-6-51.

Beuchat, L.R. 1987. Influence of Water Activity on Sporulation, Germination, Outgrowth, and Toxin Production. Water Activity: Theory and Applications. Ed. Rocckland L.B. and Beuchat, L.R. IFT/Marcel Dekker, Inc, New York. USA.

Carvajal Carranza, G.; Ayala Galdos, M.; Sirvas Cornejo, S. 1991. Microbiología de Alimentos Marinos. SAGSA, Lima Perú

- Codex Alimentarius. 1993.** Directrices para la Aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP). Vol.1-supl.1
- Dillon, M., Griffith, C. 1996.** How to HACCP. 2nd Edition. Published by M. D. Associates.
- Fuselli, S.; Casales, M. R.; Fritz, R.; Yeannes, M. I. 1994 a)** Microbiological study of marination process of anchovy (*E. anchoíta*).
Lebensmittel- wissenschaft und technologie. 27, 214- 218.
- Fuselli, S; Casales, M. R.; Fritz, R; Yeannes, M. I. 1994 b)** Evaluación del proceso y del almacenamiento de marinados de anchoíta (*Engraulis anchoíta*)
Proceedings del VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1er. Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur. 6-9 de abril Buenos Aires. Argentina. Pag: 3 -5.
- Hardman, T.M. 1989.** Water and Food Quality. Elsevier Applied Science. London and New York.
- ICMSF 1983.** Microorganismos de los Alimentos Vol:1. Técnicas de Análisis Microbiológico. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Kira, R., Sawyer. R., Egan, H. 1996.** Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2nd Ed. Editorial Continental S.A. C.V. México.
- Marcovecchio, J.E. 1998.** Diagnóstico Regional sobre las Actividades Realizadas en Tierra que Afectan los Ambientes Marinos, Costeros Y Dulceacuícolas Asociados en el Atlántico Sudoccidental Superior. UNEP Techn. Rep.:97 pp
- Marcovecchio, J.; Tommasi, L.R.; Piriz, L.E.; Pucci, A.; Castro, J.D., Weber, R.R. 1999.** State of the Marine Environment in the South-West Atlantic Region. UNEP Regional Seas Report & Studies, Unep:68 pp.
- Mazzobre, M., Schebor, C., Berin, L.,Chirife, J. 1999.** Relevamiento del pH y la a_w de Conservas en Escabeche y otras Similares de Elaboración Artesanal/ Doméstica en Relación al Riesgo Potencial para el Crecimiento de *Cl. botulinum*. Dpto. de industrias FCE y N. UBA. Bs. As. Argentina. Disponible en: WWW.nutriinfo.com.ar
- Notermans, S., Heuvelman, C.J. 1983.** Combined Effect of Water Activity, pH and Sub-optimal Temperature on Growth and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science. 48:1832-1835.
- Pérez, A.; Moreno, V.J.; de Moreno, J.E.A, Malaspina, A.M. 1986.** Distribución Del Mercurio Total en Pescados y Mariscos del Mar Argentino. Revista Investigación y Desarrollo pesquero 6:103-115.
- Ramirez, E. E.; Ameztoy, I.; Yeannes, M. I.1994** Bacterias halófilas como formadoras de histamina..Proceedings del VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

1er. Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur. 6 al 9 de abril Buenos Aires. Argentina. Pag: 3- 5.

Ramírez; E.E., Ameztoy, I., Yeannes, M.I. 2001. Influencia de la aplicación de BPM en la calidad microbiológica de anchoíta (*Engraulis anchoíta*) salada- madurada y filetes de aceite. Consulta de Expertos de FAO. Punta del Este. Uruguay.

Sánchez Pascua, G.L., Casales, M.R.; Yeannes, M.I. 1994. Preliminary Development of Intermediate Moisture, Pasteurised Mackerel (*Scomber japonicus marplatensis*) Chunk. Journal of Science of Food and Agriculture. 64:199-204.

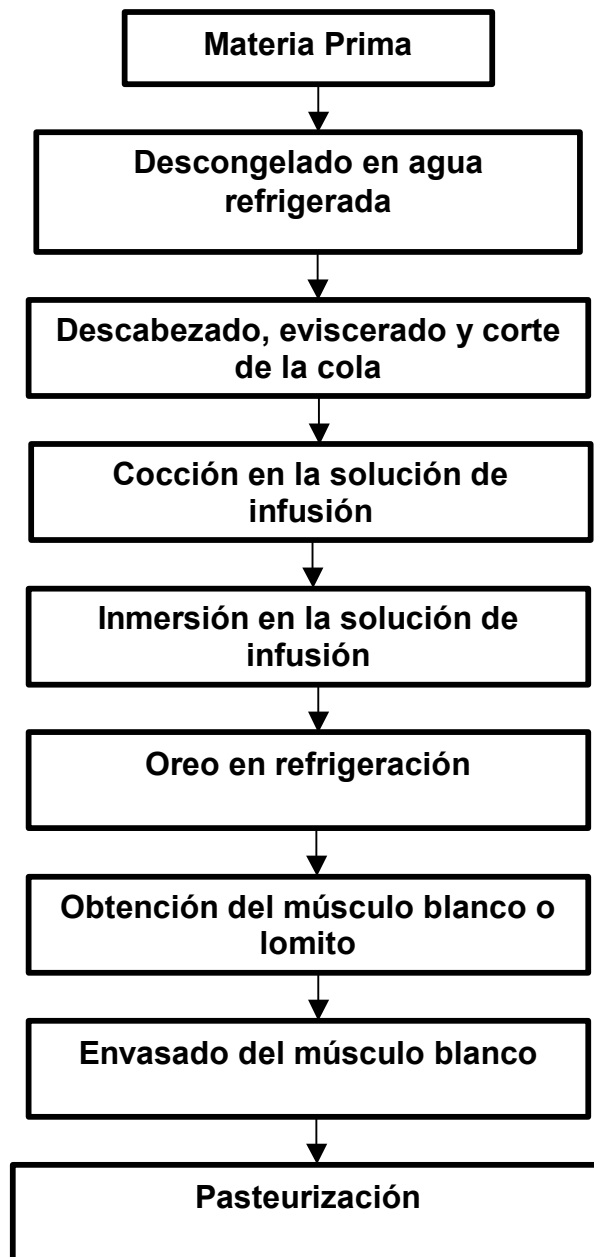
Troller, J.A. 1987. Adaptation and Growth of Microorganisms in Environments with Reduced Water Activity. Water Activity: Theory and Applications. Ed. Rocckland L.B. and Beuchat, L.R. IFT/Marcel Dekker, Inc, New York USA.

Yeannes, M.I., Casales, M.R. 1991. Presencia de Histamina en Conservas de Pescado. La industria cárnica Latinoamericana. 85:33-36.

Yeannes, M.I. 1995. Intoxicación por Histamina. En Toxicología de los Alimentos. Coordinador Alejandro Silvestre. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires Argentina. pp 144-149.

Yeannes, M.I., Casales, M.R. 1995. Influencia del proceso en el nivel de histamina en productos pesqueros. Alimentaria, Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos, 262:93-98.

Figura 1. Diagrama del proceso de lomitos de caballa obtenido por factores combinados.



Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005

TRABAJOS DEL X CONGRESO CYTAL

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías

“Apertura a nuevos procesos, productos e ideas: camino al futuro”

Realizado en Mar del Plata, Argentina del 18 al 20 de mayo de 2005



ASOCIACION ARGENTINA de TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

Filial Mar del Plata
aatamdq@gmail.com

AATA Central
Alsina 943. 4to Piso, oficina 406 (1088) Buenos Aires
TE/FAX: 54 11 4334 0155

Asociación afiliada a:



ITF- Institute of Food Technologists



IUFoST- Institutional Union of Food Science and Technologists



ALACCTA- Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



IAEF- International Association for Engineering and Food

ISBN: 987-22165- 1- 7.

Editado: Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina.
1er Edición. Volumen 1. Marzo de 2006.

TOMO IV

Tomo 4:

Ingeniería y precesamiento de alimentos

Ingredientes y aditivos

Metodología de análisis

INDICE

INGENIERÍA Y PRECESAMIENTO DE ALIMENTOS

-ANÁLISIS DE DIFUSIÓN MÚLTIPLE Y DE EQUILIBRIO EN EL PROCESO DE MARINACIÓN DE ANCHOÍTA (<i>ENGRAULIS ANCHOITA</i>)	1217
-EFECTO DE LA CONCENTRACION EN EL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE CLORURO DE SODIO EN TEJIDO CARNEO.....	1225
-ULTRAFILTRACIÓN DE EXTRACTO PECTÍNICO. INFLUENCIA DE VARIABLES OPERATIVAS EN EL FLUJO DE PERMEADO.....	1233
-EFECTO DEL AGREGADO DE AGENTES QUÍMICOS EN EL PROCESO DE ABSORCIÓN DE AGUA EN ARROZ.....	1240
-RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL ALMIDÓN OBTENIDO POR MOLIENDA HÚMEDA DE AMARANTO	1246
-MODELADO DEL PROCESO DE HORNEADO DE PRODUCTOS PANIFICADOS.....	1252
-MODELADO Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE COCCIÓN MEDIANTE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y ELEMENTOS FINITOS.....	1260
-MODELADO Y SIMULACIÓN DE LA DESCONGELACIÓN Y EL CALENTAMIENTO DE ALIMENTOS MEDIANTE MICROONDAS.....	1269
-CAMBIOS DE COLOR, VOLUMEN Y VITAMINA C DURANTE EL SECADO DE ANANÁ.....	1278
-VARIABILIDAD DE PROPIEDADES FÍSICAS DE HÍBRIDOS DE GIRASOL CULTIVADOS EN BALCARCE (ARGENTINA).....	1288
-EFECTO DE LA HUMEDAD SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES FISICAS DE UN HÍBRIDO DE GIRASOL DE CASCARA NEGRA.....	1296
-EFECTO DE TRATAMIENTOS FISICOS SOBRE LA CALIDAD DE ESPINACAS MINIMAMENTE PROCESADAS.....	1304
-BIO-NUTRIENTES ORGANICOS NATURALES A PARTIR DE CARNES ROJAS DE LOMBRICES EISENIA FOETIDA EN ALIMENTACIÓN AVIAR.....	1312
-ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE CALOR MEDIANTE FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA EN VARIABLE DISCRETA EN EL ENFRIAMIENTO DE PAPAS.....	1321
-EFFECT OF DIMENSIONS ON THE COOLING RATE OF CONDUCTIVE FOODS USING TRANSFER FUNCTIONS.....	1329
-MODELADO Y SIMULACIÓN DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES.....	1335
-APLICACIÓN DE CO ₂ CUASICRÍTICO EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITE DE AJO.....	1342
-COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE QUESO MOZZARELLA PREACIDIFICADO CON ÁCIDO LÁCTICO VERSUS ELABORACIÓN TRADICIONAL.....	1351
-EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO SOBRE EL COMPORTAMIENTO VISCOELÁSTICO DEL TEJIDO DE MANZANA.....	1357
-DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PENETRACIÓN DE SAL EN ENGRAULIS ANCHOÍTA DEL EFECTIVO PATAGÓNICO.....	1364

-COMPARACION DE COSTOS ENERGETICOS DEL SECADO DE MAIZ CON AIRE CALIENTE (SISTEMAS DE FLUJO CRUZADO Y MIXTO) Y AIRE NATURAL (ECO-SECADO). UN ESTUDIO POR SIMULACION.....	1372
-OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO EXTRAIDO DE ALGAS PARDAS (<i>Macrocystis pyrifera</i>).....	1381
-COMPARACIÓN DE TIEMPOS DE CONGELACION Y DESCONGELACION DE ALIMENTOS CALCULADOS UTILIZANDO METODOS NUMERICOS, APROXIMADOS Y DE REDES NEURONALES.....	1388
-COMPARISON OF THIN LAYER EQUATIONS FOR DRYING OF AMARANTH SEEDS.....	1396
-EFECTO DE LA CONCENTRACION Y LA TEMPERATURA SOBRE PROPIEDADES FISICAS DE EXTRACTOS ACUOSOS DE YERBA MATE.....	1405
-MODELADO DE LA COCCIÓN DE LASAGNA MEDIANTE ELEMENTOS FINITOS.....	1413
-THIN-LAYER DRYING OF AMARANTH GRAINS	1422

INGREDIENTES Y ADITIVOS

-OBTENCIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS A PARTIR DEL BAGAZO DE MALTA CERVECERO.....	1430
-EVALUACIÓN DEL DETERIORO DE ACEITE ESENCIAL (AE) DE CITRUS RETICULATA BLANCO.	1437
-POTENCIAL DE LOS FOSFATOS COMO NUEVOS ANTIMICROBIANOS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.....	1444
-COMPARACIÓN DE TECNICAS DE EVALUACIÓN DE HIDRÓLISIS DE WPC Y MODELADO CINETICO.....	1455
-EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN Y EMULSIFICACIÓN DE UN COSECADO DE SUERO LACTEO /LAMBDA CARRAGENINA.....	1463
-EFECTO DEL AGREGADO DE AISLADO DE SOJA SOBRE LAS PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CÁRNICAS.....	1470
-ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS TIPO MAILLARD SOBRE DIFERENTES SISTEMAS LIPÍDICOS.....	1477
-MICROCAPSULAS DE ACEITE ESENCIAL DE OREGANO (<i>ORIGANUM VULGARE SP HIRTUM</i>) UN POTENCIAL ADITIVO ALIMENTARIO ANTIMICROBIANO NATURAL.....	1486
-ESTABILIDAD Y REOLOGÍA DE MAYONESAS CON GOMAS ESPINA CORONA, XÁNTICA, GUAR Y GARROFÍN.....	1493
-EFECTO DE ALGUNOS POLIOLES SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE ZYGOSACCHAROMYCES BAILII EN SISTEMAS MODELO.....	1500
-EFECTIVIDAD DE PELICULAS COMESTIBLES CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE ZYGOSACCHAROMYCES BAILII.....	1508
-ENCAPSULACION DE ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>).....	1514
-ENCAPSULACION DE COMPONENTES ACTIVOS POR CO-CRISTALIZACION.....	1521
-EFECTO DE LA FORMULACION SOBRE LAS PROPIEDADES MECANICAS Y DIFUSIONALES DE UN SISTEMA DE ENCAPSULACION COLORANTE-ALGINATO DE CALCIO.....	1528
-EFECTO DE LOS HIDROCOLOIDES SOBRE LA CALIDAD DE LOS PANES OBTENIDOS POR DIFERENTES METODOLOGÍAS DE PANIFICACIÓN.....	1536

METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

-EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE GLIADINAS MEDIANTE RP-HPLC.....	1543
-APLICACIÓN DE SDS-PAGE A LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATERIAS PRIMAS PROTEICAS Y ALIMENTOS PROCESADOS.....	1551
-PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NIVALENOL (NIV) Y DEOXINIVALENOL (DON) EN HARINA DE MAÍZ.....	1559
-ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FENOLES PROVENIENTES DE HARINA DE GIRASOL POR ESPECTROSCOPIA UV Y RP-HPLC.....	1565
-LA TEXTURA DEL QUESO GOYA. COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO SENSORIAL Y MÉTODOS REOLÓGICOS.....	1571

-

ANÁLISIS DE DIFUSIÓN MÚLTIPLE Y DE EQUILIBRIO EN EL PROCESO DE MARINACIÓN DE ANCHOÍTA (*ENGRAULIS ANCHOITA*)

CASALES⁽¹⁾, M.R., YEANNES^(1,2), M.I.

(1) CONICET (2) Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. Preservación y Calidad de Alimentos. Dpto. de Química Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNMDP Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Prov. Buenos Aires. Argentina. TE: 54 0223 475-6167. Fax: 54 0223 475-3150. E-mail: myeannes@mdp.edu.ar

RESUMEN

La marinación consiste en la inmersión del alimento en soluciones de ácidos orgánicos y sal a fin de obtener productos con pH inferior a 4,5. Estos productos ven disminuida su vida útil por el desmejoramiento de la textura, motivo por el cual se incorpora sorbitol como plastificante.

Las diferencias en los contenidos de sal, ácido y sorbitol entre el alimento y el medio generan una fuerza impulsora causando desplazamiento de los mismos hacia el alimento y expulsión de agua. Se estudiaron las condiciones de equilibrio y la difusión simultánea de ácido acético, sorbitol y sal durante la marinación de anchoíta (*E. anchoíta*). Se determinó que el tiempo que involucra el equilibrio para todos los compuestos es de 6 horas. Los resultados obtenidos indican que la difusión de ácido acético, sorbitol y sal en el filete de anchoíta puede ser explicada por la ley de Fick. La determinación de los coeficientes de difusión se realizó a 20°C. El coeficiente de difusión (D) para ácido acético fue de $5,48 \times 10^{-6}$ cm²/seg., para el sorbitol fue de $6,14 \times 10^{-6}$ cm²/seg. y para la sal fue de $2,03 \times 10^{-6}$ cm²/seg. Los coeficientes obtenidos para ácido acético y sal, en esta nueva formulación con agregado de sorbitol resultaron ser del mismo orden de los obtenidos por otros autores para el arenque elaborado con la marinación tradicional.

Palabras clave: marinados - anchoíta – difusión múltiple

ABSTRACT

The marinating consists on the immersion of food in solutions of organic acids and salts to obtain products with inferior pH at 4.5. These products are diminished in their shelf life fundamentally by changes of the texture, reason for which it was incorporates sorbitol like plastificante. The differences in the contents of salt, acid and sorbitol between the raw material and the solution generate a force impellent causing displacement of the same

ones toward the food and expulsion of water. The equilibrium conditions and the simultaneous diffusion of acetic acid, sorbitol and salt were studied during the anchovy marinating (*E. Anchovy*). It was determined that the time that involves the equilibrium for all the compounds is of 6 hours. The obtained results indicate that the diffusion of acetic acid, sorbitol and salt in the anchovy fillet can be explained by the law of Fick. The determination of the diffusion coefficients was carried out at 20°C. The diffusion coefficient (D) for acetic acid it was of $5.48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg.}$, for the sorbitol it was of $6.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ and for the salt it was of $2.03 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ The coefficients obtained for acetic acid and salt, in this new formulation with sorbitol were the same order of those obtained by other authors for the herring elaborated with the traditional marinating solution.

Key words: marinating, anchovy, multiple diffusion

INTRODUCCION

Los marinados son preservas ácidas. La inmersión del pescado en soluciones de ácido acético y la sal retrasa la acción de bacterias y enzimas, resultando un producto con un pH inferior a 4,5, con un flavor característico y una extendida pero limitada vida útil. El desmejoramiento de la textura disminuye la vida útil de los marinados por lo cual en este trabajo se incorporó sorbitol como plastificante. Las diferencias en los contenidos de ácido, sorbitol y sal entre el alimento y la solución de marinación producen el desplazamiento de los mismos hacia el alimento y de agua hacia la solución.

El diseño del proceso de marinación requiere del conocimiento de los cambios que ocurren en el alimento durante la inmersión en una solución con alto contenido de ácido, sorbitol y sal.

En la bibliografía existen algunos datos sobre la cinética de la penetración de sal en carnes y pescados (Zugarramurdi y Lupín, 1980, Deng, 1977; Favetto y col. , 1981, Rodger y col. , 1984). Específicamente en anchoíta hay estudios sobre el salado vía seca y vía húmeda (Zugarramurdi y Lupín, 1977).

En lo referente a la penetración de ácido en carnes y pescado la bibliografía es escasa, en pescado hay algunos estudios sobre la difusión de ácido acético en el músculo de arenque (Rodger y col. , 1984).

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar las condiciones de equilibrio y la difusión simultánea de ácido acético, sorbitol y cloruro de sodio en el proceso de marinación de *Engraulis anchoíta*.

MATERIALES Y METODOS

Materia Prima

Para la elaboración de los marinados se utilizó anchoíta (*Engraulis anchoita*) congelada capturada en el mes de Septiembre y almacenada dos meses a -30°C .

Las medidas del filete fueron: $9,69\pm 0,29$ cm de longitud x $1,88\pm 0,07$ cm de ancho y $0,61\pm 0,02$ cm de espesor. Se utilizaron los valores promedio de las diferentes mediciones. La composición química de los filetes que se colocaron en la solución de marinación fue: 74,32% de agua, 4,15% de lípidos, 16,30% de proteínas, 3,44% de cenizas y 3,08% de cloruro de sodio.

Etapa de marinación

La solución de marinación estaba compuesta por 3,44% v/v de ácido acético, 11,4% p/v de sal y 24% p/v de sorbitol. Se usó una relación de solución: pescado de 10:1. La marinación se llevó a cabo en recipientes cerrados a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Al comienzo de la etapa de marinación y cada 0,5 hs se determinó, en el filete y en la solución de marinación, pH, contenidos de agua, cloruro de sodio, sorbitol y ácido acético.

Análisis físico-químicos

El contenido de agua se determinó por la técnica de AOAC (1990 sección 984.25). Los lípidos se determinaron de acuerdo a AOAC (1990 sección 922.06), las proteínas según AOAC (1993, sección 920.152) y las cenizas por calcinación (AOAC, 1993, sección 945.46). Para la determinación de cloruro de sodio se utilizó el método de Mohr adaptado a alimentos (Kirk, 1996). El contenido de ácido se determinó por titulación con hidróxido de sodio (Pearson, 1970). El contenido de sorbitol se determinó mediante una técnica colorimétrica utilizando una enzima para la oxidación del sorbitol (Bergmeyer y col., 1974). El pH se obtuvo con un pHmetro (Instrumental Parsec, Vega VI) (AOAC, 1990, sección 981.12).

Todas estas determinaciones se hicieron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

El equilibrio entre el contenido de sorbitol, sal y ácido acético se alcanza cuando las concentraciones en la solución de marinación y en filete de anchoíta son iguales. A fin de determinar el tiempo de equilibrio para cada uno de estos compuestos se calcularon los coeficientes de distribución de acuerdo a la siguiente definición:

$K(\text{sal}) = \frac{[\text{moles de cloruro de sodio/masa de agua}]}{[\text{moles de cloruro de sodio/masa de agua}]}$ (en el filete)

$[\text{moles de cloruro de sodio/masa de agua}]$ (en la solución)

$K(\text{ácido}) = \frac{[\text{moles de ácido acético/masa de agua}]}{[\text{moles de ácido acético/masa de agua}]}$ (en el filete)

[moles de ácido acético/masa de agua] (en la solución)

$K(\text{sorbitol}) = \frac{\text{[moles de sorbitol/masa de agua] (en el filete)}}{\text{[moles de sorbitol/masa de agua] (en la solución)}}$

[moles de sorbitol/masa de agua] (en la solución)

Los valores de K obtenidos en el equilibrio fueron 1,01 para sal, 1,02 para ácido acético y 1,20 para sorbitol y los tiempos de equilibrio fueron 4 hs para sal y 6 hs para ácido acético y sorbitol respectivamente.

Durante la etapa de marinación el filete de anchoíta pierde agua y gana sorbitol, ácido acético y sal. Los contenidos de estos compuestos se expresan por 100 g de sólidos del pescado.

Del Valle y Nickerson (1967b), Zugarramurdi y Lupín (1977), (1980), Rodger y col. (1984) demostraron que la penetración de cloruro de sodio y ácido acético puede ser explicada por la ley de Fick para difusión en estado no estacionario.

La difusión de sorbitol, cloruro de sodio y ácido acético en el filete de anchoíta puede considerarse como difusión en una placa plana de espesor $2l$. Para $t=0$ la región $-l < x < l$ está a una concentración uniforme C_0 y se pone en contacto con una solución de concentración constante C_1 . Dado que la relación espesor/tamaño es 0,06 ($< 0,1$) la ecuación de difusión puede considerarse como unidireccional y se expresa (Bird y col. 1964; Crank 1975; Turhan y Kaletunc 1992):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial(D\partial C/\partial x)}{\partial x}$$

El término de flujo convectivo se ha tomado como cero dado que en este proceso intervienen sólidos. C es la concentración al tiempo t para el eje x, y D el coeficiente de difusión. Si el coeficiente de difusión es constante la ecuación se expresa:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

La solución de esta ecuación esta dada por:

$$M_t/M_\infty = 2 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2}$$

Siendo M_t la cantidad total de soluto que ha penetrado en el filete al tiempo t y M_∞ la cantidad correspondiente a tiempo infinito, l es $\frac{1}{2}$ del espesor.

Se utilizó un volumen de solución suficientemente grande de modo que la cantidad de soluto que penetra en el filete es una fracción despreciable del volumen total y la concentración de la solución puede considerarse constante.

La Figura 1, 2 y 3 muestran M_t/M_∞ versus $t^{1/2}$ como puede observarse para tiempos de inmersión cortos M_t es proporcional a $t^{1/2}$. Los valores del coeficiente de difusión a 20°C pueden determinarse a partir de las rectas obtenidas.

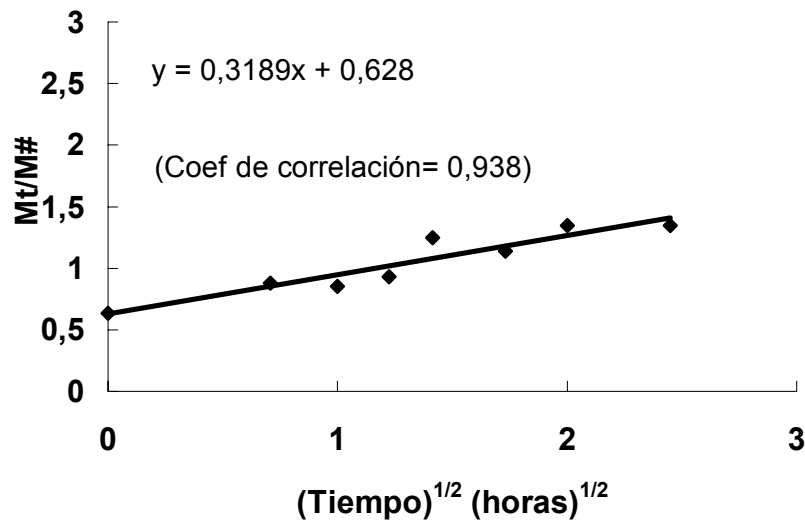


Figura 1: Difusión de cloruro de sodio durante la etapa de marinación.

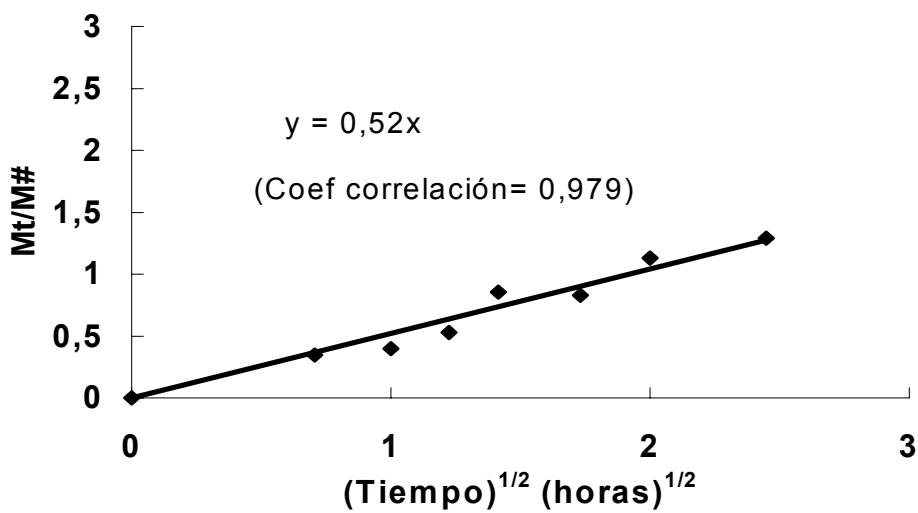


Figura 2: Difusión de ácido acético durante la etapa de marinación

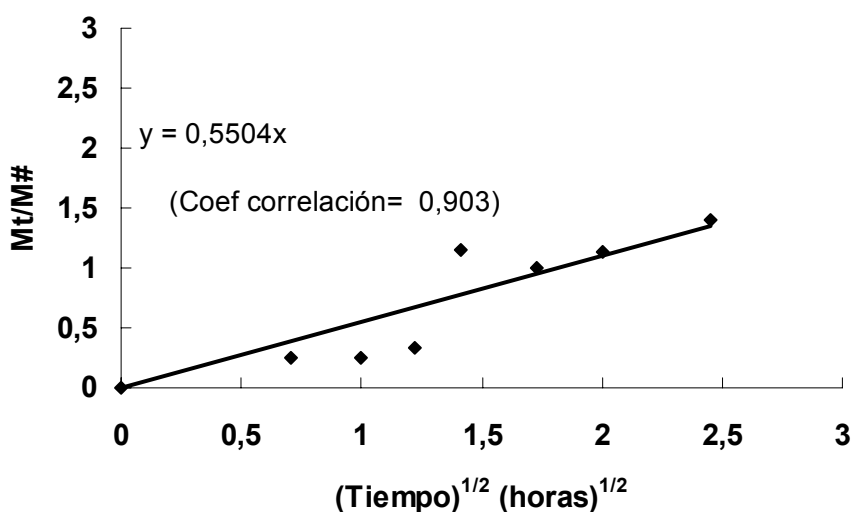


Figura 3: Difusión de sorbitol durante la etapa de marinación

El valor de D para cloruro de sodio fue $2,03 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ y el coeficiente de correlación (r) de 0,938 ($p < 0,001$). Para ácido acético valor de D fue $5,48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ y el coeficiente de correlación (r) de 0,979 ($p < 0,001$). Los valores obtenidos para sorbitol fueron de $6,14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ y 0,903 ($p < 0,001$) para D y r respectivamente.

Capaccioni y col. (2004) para anchoíta marinada a la misma temperatura y con la formulación tradicional obtuvieron coeficientes D de $2,22 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$ y $5,07 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ para cloruro de sodio y ácido acético respectivamente.

Rodger y col. (1984) obtuvieron los coeficientes D para la difusión simultánea de ácido y sal para arenque marinado a 20°C , los valores fueron $1,57 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ y $2,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$ para sal y ácido acético respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los obtenidos en este trabajo para anchoíta marinada.

CONCLUSIONES

Los valores de K obtenidos, cercanos a la unidad, indican que se alcanza el equilibrio entre los contenidos de cloruro de sodio, ácido acético y sorbitol en el filete de anchoíta y en la solución de marinación.

La penetración de cloruro de sodio, ácido acético y sorbitol durante la marinación de filete de anchoíta puede ser explicada por la ley de Fick dados los altos coeficientes de correlación obtenidos al graficar M_t/M_∞ versus $t^{1/2}$.

De las rectas obtenidas se determinaron los coeficientes de difusión a 20°C para la difusión simultánea de cloruro de sodio, ácido acético y sorbitol.

Los coeficientes de difusión del cloruro de sodio y del ácido acético a 20°C para anchoíta fueron similares a los obtenidos por otros autores para arenque marinado en forma tradicional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subsidiado por Universidad Nacional de Mar del Plata. Poryecto 15/E243

BIBLIOGRAFIA

AOAC 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. 15th Ed. Washington, D.C.

AOAC 1993. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. 16th Ed. Washington, D.C.

Bergmeyer, H. U., Gruber, W., Gutmann, I. 1974. En : *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd ed., vol. 3, p. 1323-1330, Verlag Chemie, Weinheim. Academic Press, Inc., New York, London

Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. 1964. Fenómenos de Transporte. Ed. Reverté S.A. Barcelona. España.

Casales, M.R., Capaccioni, M.E., Yeannes, M.I. 2004 Diffusional analysis of acid and salt in marinated fillet of *Engraulis anchoita*.

Crank, J. 1975. *The Mathematics of Diffusion*. 2nd. Ed. Clarendon Press. Oxford.

Del Valle, F.R., Nickerson, J.T.R. 1967 b. Studies on salting and drying of fish. II- Dynamics aspects of the salting of fish. J. food Sci. 32:218.

Deng, J.C. 1977. Effect of freezing and frozen storage on salt penetration into fish muscle immersed in brine. J. Food Sci. 42(2):348-351.

Favetto, G., Chirife, J., Bartholomai, G.B. 1981 a study of water activity lowering in meat during immersion-cooling in sodium chloride-glycerol solutions. I. Equilibrium considerations and diffusional analysis of solute uptake. J. Fd. Technol. 16:609-619.

KIRK, R.; Sawyer, R.; Egan H. 1996. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2nd Ed. Editorial Continental S.A. C. V. México.

Pearson, D. 1970. *Chemical Analysis of Foods*. Chemical Publishing, 6th. Ed. New York.

Rodger, G., Hastings, R., Cryne, C., Bailey, J. 1984. Diffusion properties of salt and acetic acid into herring and their subsequent effect on the muscle tissue. J. Food Sci. 49:714-720.

- Turhan M, Kaletung, g. 1992.** Modeling of salt diffusion in white cheese during long –term brining. *J.food Sci.* 57(5):1082-1085.
- Zugarramurdi, A., Lupín, H.M. 1977.** Studies on anchovy salting. II- Dynamics of the process. *Lat. am. j. chem eng. appl. chem.* 7:25-38.
- Zugarramurdi, A., Lupín, H.M. 1980.** A model to explain observed behavior in fish salting. *J. Food Sci.* 45(5):1305-1311.

EFECTO DE LA CONCENTRACION EN EL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE CLORURO DE SODIO EN TEJIDO CARNEO

¹GRAIVER, N., ¹PINOTTI, A., ¹CALIFANO, A. y ^{1,2}ZARITZKY, N.

¹ CIDCA. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP- CONICET. 47 y 116. La Plata. ² Facultad de Ingeniería, UNLP. natalia@quimica.unlp.edu.ar Tel/Fax 0221-4254853/ 4890741

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar la difusión de NaCl en tejido porcino (*Longissimus dorsi*) a 4 y 20°C. Se realizaron experimentos sumergiendo cilindros de tejido en soluciones individuales y en mezclas que incluían NaCl, KNO₃ y NaNO₂, determinándose experimentalmente la concentración de NaCl en el tejido en función del tiempo.

Se aplicó un modelo matemático de difusión radial no estacionaria para determinar los coeficientes de difusión de NaCl en el tejido (Dm). Dm aumentó con la concentración de NaCl; la presencia de nitrito y nitrato no afectaron significativamente al Dm. Se realizaron balances de materia para calcular las concentraciones de sal, agua y proteínas en el tejido. Se observó una ganancia de agua en el rango 5-200gNaCl/L, y una deshidratación para 330g/L. El incremento de Dm con la concentración de NaCl puede atribuirse al efecto de la sal en la microestructura del tejido observada por SEM y a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares analizadas por DSC.

Palabras claves: difusión de sales, curado, balances de materia, tejido porcino, DSC.

ABSTRACT

The objective was to study the diffusion of NaCl in pork tissue (*Longissimus dorsi*) at 4 and 20°C. The experiments were performed by immersion of tissue cylinders in brine solutions (NaCl, KNO₃ and NaNO₂). The NaCl concentrations in the tissue were determined experimentally as a function of the time.

To determine the diffusion coefficients of NaCl in the tissue (Dm), a radial transient diffusion mathematical model was adopted. Dm increased with NaCl concentration, the presence of nitrate and nitrite did not affect significantly Dm. Mass balances were used to calculate salt, water and NaCl concentrations in the tissue. Water up take was observed for solutions concentration ranged between 3-200gNaCl/L, and a loss of water was observed for 330g/L. The increase of Dm with NaCl concentration was attributed to the effect of the salt on the tissue microstructure observed by SEM and to denaturation of myofibril proteins analyzed by DSC.

INTRODUCCIÓN

La salazón y el curado son procedimientos para incrementar el período de conservación de la carne. Al tratar la carne con NaCl se produce una variación de la cantidad de agua en el tejido. El alto contenido salino limita el desarrollo microbiano y la actividad enzimática de la carne. Uno de los métodos industriales de curado de productos cárneos se realiza por inmersión en soluciones salinas; el grado de penetración de la sal depende del equilibrio entre la concentración de la misma en el interior de la pieza y la solución externa.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) determinar los coeficientes de difusión efectivos (D_m) de NaCl, en tejido porcino (*Longissimus dorsi*) a 4°C y 20°C a partir de mediciones de cloruro en función del tiempo, teniendo en cuenta las modificaciones en el contenido de agua del tejido, b) establecer el efecto de la concentración del NaCl sobre la microestructura del tejido (Microscopía Electrónica de Barrido SEM) y la desnaturalización de las proteínas miofibrilares (Calorimetría Diferencial de Barrido DSC), c) estudiar la influencia del NaCl sobre los cambios en el contenido de agua, la sal incorporada y las proteínas solubilizadas utilizando balances de materia.

MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los experimentos se utilizó carne porcina de músculo *Longissimus dorsi* sin grasa visible.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Los ensayos de DSC se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido (Polymer Laboratories, Rheometric Scientific, UK). Pequeñas piezas de carne fueron sumergidas en soluciones de NaCl: 5, 10, 20, 30, 40, y 50 g/L. Se empleó una velocidad de calentamiento en el DSC de 10°C/min en el rango de 20 a 110°C. De los termogramas se obtuvieron las temperaturas máximas correspondientes a las transiciones térmicas de las proteínas que permiten analizar su desnaturalización.

Microscopía electrónica de barrido: Se utilizó la técnica descrita por Pinotti y col. (2001) para la observación microscópica de las muestras por SEM (JEOL JSMP100, Japón)

Balances de materia: Se utilizaron muestras cilíndricas de músculo porcino (2 cm de largo x 1.5 cm de diámetro) determinándose el peso inicial de las mismas (M_0). Luego fueron sumergidas en soluciones de NaCl de diferentes concentraciones (10, 30, 70, 100, 140, 200, 330 g/L). Los tiempos de inmersión estuvieron entre 15 y 180 min; las muestras fueron pesadas nuevamente (M_1) y se secaron en estufa a vacío a 95°C hasta peso

constante (M_2). Se determinó la cantidad de NaCl presente en las muestras (m_{NaCl}) utilizando un electrodo selectivo de cloruro (Cole-Parmer 27502-12). Se determinó también la masa seca en muestras sin tratamiento ($m_{tejido\ seco\ 0}$). Las concentraciones de equilibrio de NaCl y el contenido de agua se obtuvieron por inmersión de las muestras en las distintas soluciones durante al menos 48 horas.

Capacidad de retención de agua (WHC): El efecto del NaCl sobre WHC para largos tiempos de contacto fue calculada como la variación entre el contenido de agua después de sumergir la muestra en la solución de NaCl (m_{agua}) y el contenido de agua inicial ($m_{agua\ 0}$) referido a este último valor.

$$WHC = \frac{m_{agua} - m_{agua0}}{m_{agua0}} \quad (1)$$

Coefficiente de difusión efectivo de NaCl en el tejido: Para determinar los coeficientes de difusión efectivos de NaCl, en el tejido se utilizó un sistema de difusión radial (unidireccional) en cilindros largos. Se seccionaron cilindros de 10 cm de largo y aproximadamente 1.5 cm de diámetro y se sumergieron en soluciones cuyas concentraciones se presentan en la Tabla 1. Las soluciones se agitaron fuertemente para asegurar una concentración constante de soluto en la interfase sólido-fluido. A distintos tiempos (15 -180 min) las muestras se retiraron de la solución de inmersión (por duplicado) y se eliminaron los extremos, para evitar los efectos de borde. Se midió el diámetro y se pesó cada muestra. El tejido cárneo fue homogeneizado con agua bidestilada a 90°C. El contenido de NaCl se determinó utilizando un electrodo selectivo para cloruro (Cole-Parmer 27502-12). Todas las experiencias se realizaron a 4°C (en cámara refrigerada) y a 20°C (en cuarto termostatizado). Las concentraciones de equilibrio de NaCl se obtuvieron por inmersión de las muestras en las distintas soluciones durante al menos 48 horas. Para cada corrida se determinó por duplicado la humedad del músculo a 95°C hasta peso constante.

Modelo matemático de difusión: El tejido muscular puede ser considerado como una matriz sólida y una fase acuosa a través de la cual difunde el soluto con una difusividad efectiva en la matriz (D_m). Se consideró un balance microscópico de materia para un cilindro infinito con difusión radial y condición de contorno de concentración constante en la interfase sólido-fluido. La masa total incorporada a un dado tiempo, se calculó integrando entre 0 y R, la solución analítica de la ecuación diferencial:

$$M(t) = M(\infty) \left(1 - \sum_{n=1}^{\infty} 4 \frac{\exp(-D_m \alpha_n^2 t)}{R^2 \alpha_n^2} \right) \quad (2)$$

donde $M(t)$ es la masa de soluto a tiempo t expresada como g de soluto / g de tejido cárneo; $M(\infty)$ es la máxima cantidad de soluto a tiempo infinito (corresponde a la concentración de sal en equilibrio con la solución externa); R es el radio y α_n son las n -raíces de la ecuación $J_0(R \alpha_n) = 0$, siendo J_0 la función de Bessel de orden cero.

Se determinaron los coeficientes de difusión de cloruro para distintas concentraciones de este soluto en las soluciones de inmersión. Se propusieron los valores de los coeficientes de difusión en la Ec. (2) y se calcularon los valores teóricos $M(t)$. El valor de difusividad se obtuvo por un procedimiento iterativo adoptando la mínima diferencia entre los valores teóricos y experimentales.

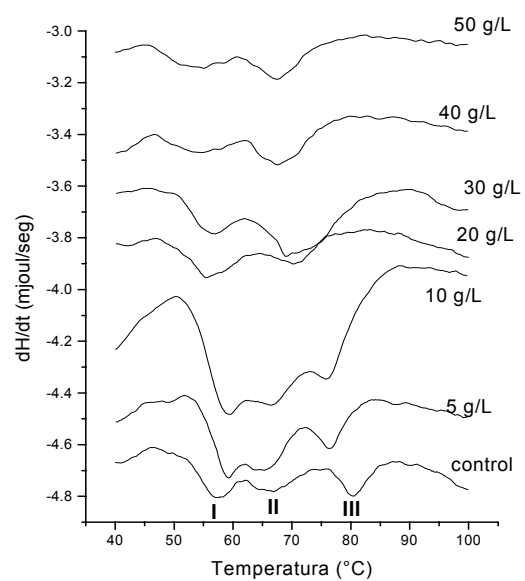


Fig. 1. Termogramas de músculo porcino *Longissimus dorsi* después de los distintos tratamientos con concentraciones crecientes de NaCl.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de DSC: Para establecer el efecto del NaCl en la desnaturalización proteica se analizaron termogramas obtenidos con DSC (Fig 1). En la muestra sin tratamiento se observaron tres picos con valores de T_{max} de 57.6°C, 66.2°C, y 80.3°C, correspondientes a miosina (I), miosina, proteínas sarcoplásmicas y colágeno (II) y actina (III). Similares resultados fueron reportados por Quinn y col. (1980).

Luego de sumergir las muestras en soluciones 5 y 10 g NaCl/L se observaron los tres picos, pero T_I aumentó a 59.2°C y T_{III} decreció hasta 77.4°C ($P < 0.05$) con respecto a las muestras control (Fig. 1). Cuando la concentración de NaCl fue incrementada (20-50 g/L) sólo se observaron dos picos en los termogramas. La temperatura máxima del primer pico

decreció desde 56.5 a 53.0°C y la del segundo desde 70.3 a 67.7°C en el rango de las concentraciones ensayadas. Los picos II y III se contrajeron en un solo pico que de acuerdo con los datos publicados por otros autores, corresponde principalmente a la transición térmica de la actina

Micrografías de SEM: Las modificaciones de la microestructura del tejido al aumentar la concentración salina se analizaron en las micrografías obtenidas con SEM de muestras de tejido sin tratamiento y tratadas con NaCl al 5, 140 y 330 g/L. La muestra tratada con NaCl 5 g/L evidenció una pequeña diferencia con respecto a la muestra control, la estructura de las miofibrillas parecía estar intacta. Las fibras en las muestras sometidas a NaCl 140 g/L mostraron hinchamiento, mientras que la concentración NaCl 330 g/L produjo fragmentación y deshidratación de las fibras, con una apariencia granular.

Balance de materia en el tejido cárneo durante la inmersión en NaCl: Los balances de materia fueron necesarios para cuantificar la cantidad de agua y sal incorporada y la solubilización proteica durante la inmersión en la solución de NaCl.

Inicialmente el tejido puede ser considerado formado por agua y materia seca (el contenido inicial de NaCl fue despreciable). Después de la inmersión en la solución de NaCl, la sal fue incorporada a la muestra y algunas sustancias proteicas solubles pasaron a la solución; esta cantidad fue calculada mediante la ecuación:

$$m_{\text{tejido solubilizado}} = m_{\text{tejido seco 0}} - m_{\text{tejido seco}} \quad (3)$$

El contenido medio de agua en las muestras sin tratamiento fue de 72 a 74 %.

La Fig. 2 muestra los valores experimentales de WHC (Ec. 1) en función de la concentración de NaCl bajo condiciones de equilibrio. El tejido cárneo tratado con concentraciones crecientes de NaCl mostró importantes modificaciones. Para concentraciones de NaCl en la solución entre 5 y 200 g/L el tejido ganó agua. La máxima cantidad de agua incorporada por el tejido fue observada para concentraciones de NaCl entre 70 y 100 g/L. Por encima de 200 g/L la capacidad de retención de agua descendió mostrando pérdida de agua a 330 g/L.

A bajas concentraciones de NaCl se produjo hinchamiento de las fibras y se observaron altos valores de capacidad de retención de agua; esto concuerda con los resultados obtenidos por Offer y Trinick (1983) y Belitz y Grosch (1997). El incremento en la capacidad de retención de agua puede ser atribuido a la expansión lateral de las miofibrillas que es acompañada por la solubilización de las proteínas. De acuerdo a Xiong y col. (2000), el incremento del agua ligada y la hidratación de las fibras musculares de la carne sometida a salado se atribuye al aumento de la repulsión electrostática entre los filamentos de las miofibrillas llevando a una expansión de la red para retener mayor

cantidad de agua.

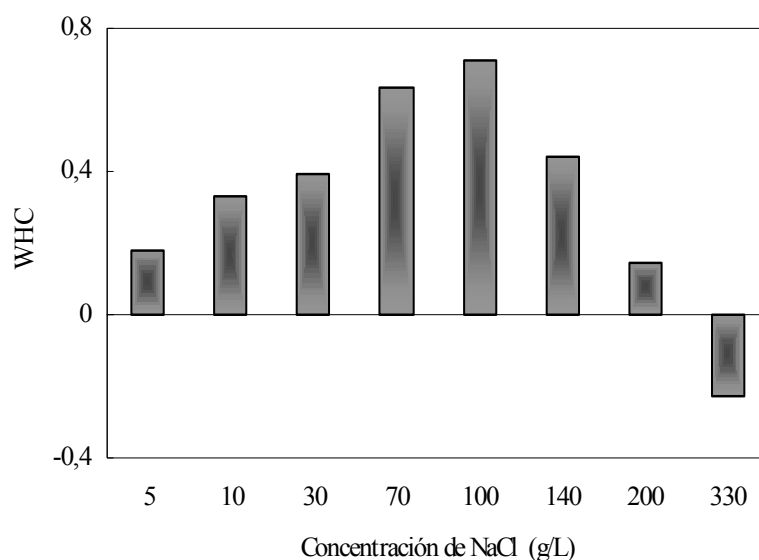


Fig. 2. Capacidad de retención de agua $WHC = ((m_{agua} - m_{agua 0}) / m_{agua 0})$ en función de la concentración externa de la solución para largos tiempos de contacto (condiciones de equilibrio).

La relación entre la cantidad de proteína solubilizada y el tejido seco inicial aumentó con el tiempo de inmersión. El mayor valor fue observado para una concentración de 70g/L NaCl en la solución para largos tiempos de contacto (Fig. 3a). La Fig. 3b muestra el efecto del tiempo de inmersión sobre la cantidad de proteína solubilizada para concentraciones de NaCl de 30 y 70 g/L. A 70 g/L la solubilización de proteína fue más rápida que a 30g/L alcanzando similares valores para largos tiempos de contacto.

Coefficiente de difusión en tejido cárneo: El tejido cárneo no puede ser considerado simplemente formado por una matriz insoluble y una fase acuosa a través de la cual difunden los solutos, ya que cierta cantidad de proteínas se solubilizan; además se produce una modificación en el contenido de agua en el tejido. Para determinar los coeficientes de difusión de NaCl, los valores de $M(t)$ y $M(\infty)$, expresados como g NaCl/g agua en el tejido (Ec. 2), fueron corregidos por el contenido de agua de cada muestra a cada tiempo y se calculó la cantidad de sal incorporada en forma adimensional $M^* = M(t) / M(\infty)$. Los valores obtenidos del coeficiente de difusión del NaCl en el tejido cárneo porcino a 4°C y a 20°C se muestran en la Tabla 1 para las diferentes concentraciones ensayadas. Como se puede observar el coeficiente de difusión aumenta con la concentración de NaCl. El aumento del coeficiente de difusión con la concentración salina puede ser atribuida al efecto del NaCl sobre la microestructura de las fibras como fue descrita en la sección de SEM; el NaCl deteriora la estructura de las fibras y facilita su

penetración a altas concentraciones.

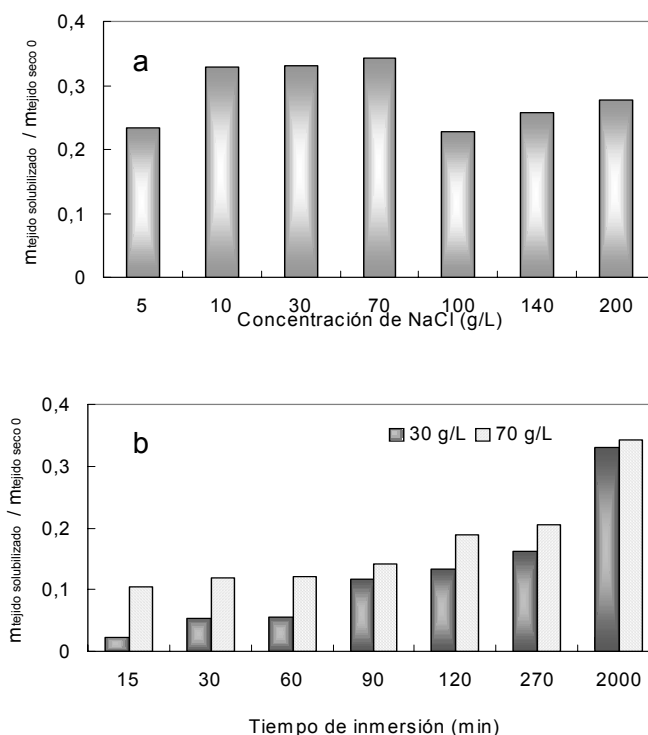


Fig. 3. Relación entre la cantidad de proteína solubilizada y el contenido de tejido seco a) como función de la concentración de NaCl para largos tiempos de contacto, b) como función del tiempo de inmersión para concentraciones de NaCl de 30 y 70 g/L.

Tabla1. Coeficiente de difusión efectiva del NaCl (D_m) en tejido cárnico porcino

Solución	$D_m \times 10^{10} \text{ (m}^2\text{/s)NaCl}$	
	4°C	20°C
NaCl 30g/l	0.6	1.6
NaCl 70g/l	1.1	1.8
NaCl 100g/l	1.7	1.9
NaCl 140g/l	1.8	2.1
NaCl 200g/l	5.0	6.3
NaCl 70g/l + NaNO ₂ 3g/l	1.1	1.7
NaCl 140g/l + NaNO ₂ 3g/l	1.9	2.2
NaCl 140g/l + KNO ₃ 2.5g/l	1.8	2.2

CONCLUSIONES

Las características estructurales del tejido porcino curado son afectadas por los cambios físicos y químicos en la fibra muscular. Las modificaciones fueron observadas mediante SEM cuando el tejido se trató con concentraciones crecientes de NaCl. Además, se redujo el número de picos observado en los termogramas de DSC y las temperaturas máximas se desplazaron a valores menores debido a la desnaturalización proteica. Los balances de materia permitieron determinar los cambios en el contenido de agua, la sal incorporada y la solubilización proteica. A bajas concentraciones de NaCl se produjo el hinchamiento de las fibras, con alta capacidad de retención de agua, localizándose el máximo de retención para concentraciones entre 70 y 100 g NaCl/L. A altas concentraciones de NaCl el fenómeno se revirtió, el volumen de las fibras musculares disminuyó, el tejido perdió su propia agua, produciéndose la precipitación de proteínas que causa la ruptura de la matriz. El incremento de Dm con la concentración de NaCl fue atribuido a los cambios en la estructura celular provocados por la penetración de la sal. También se analizó la importancia de considerar el contenido real de agua en el tejido sobre los valores de Dm.

BIBLIOGRAFIA

Belitz H D y Grosch W. 1997. Química de los alimentos. 2° edition. Ed. Acribia Zaragoza. España.

Offer G, Trinick J. 1983. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci* 8: 245-281.

Pinotti A, Graiver N, Califano A, Zaritzky N. 2001. Diffusion of nitrite and nitrate salts in pork tissue in the presence of sodium chloride. *J Food Sci* 67: 2165-2171.

Quinn J R, Raymond D P, Harwalkar V R. 1980. Differential scanning calorimetry of meat proteins as affected by processing treatment. *J Food Sci* 45: 1146-1149.

Xiong Y, Lou X, Harmon R, Wang C y Moody W. 2000. Salt-and pyrophosphate-induced structural changes in myofibrils from chicken red and white muscle. *J Sci Food Agric* 80: 1176-1182.

ULTRAFILTRACIÓN DE EXTRACTO PECTÍNICO. INFLUENCIA DE VARIABLES OPERATIVAS EN EL FLUJO DE PERMEADO.

STECHINA Damián E.⁽¹⁾, PAULETTI, Miguel S.⁽²⁾ y COUTAZ, Victor⁽³⁾

(1) Facultad de Ciencias de la Alimentación (U.N.E.R.) - Monseñor Tavella 1450 - 3200 Concordia, Provincia de Entre Ríos - E-mail: stechinad@fcal.uner.edu.ar - (2) Instituto de Tecnología de Alimentos (U.N.L.) - Ciudad Universitaria - 3000 Santa Fe E-mail: mpauleti@fiquis.unl.edu.ar - (3) INTEC - CONICET (U.N.L.). Gúemes 3450 - 3000 Santa Fe

RESUMEN

Los valores de flujo de permeado promedio (F_{Pp}) e instantáneo (F_{Pi}) son necesarios para optimizar procesos de membrana.

Usando un módulo de ultrafiltración de configuración plana, se analiza la influencia de las variables operativas en el F_{Pi} y F_{Pp} durante la concentración de extracto pectínico de limón. A temperatura constante el factor de concentración (F.C.) influye logarítmicamente en el F_{Pi} . El análisis de los resultados experimentales de un diseño estadístico rotacional centrado, indica que las variables con efectos más importantes en la variación del F_{Pp} son temperatura, las interacciones temperatura-F.C., temperatura-% de diafiltración y la función cuadrática del % de diafiltración ($p = 0,01$).

En el intervalo de las variables analizadas, el flujo de permeado promedio alcanzó un máximo de $43,87 \text{ kg/h}\cdot\text{m}^2$ para una temperatura de $53,4 \text{ }^\circ\text{C}$, con F.C. 8,67 y 121% de diafiltración. La optimización del proceso requiere el modelizado del flujo de permeado.

Palabras claves: Ultrafiltración - Extracto pectínico - cítrico.

INTRODUCCIÓN

En la década del 90 la producción de limón en Argentina superó el millón de toneladas (Anderson C. y Casafus C., 2002), destinándose las tres cuartas a industrialización.

La cáscara de limón o mesocarpio, que representa más del 40 % de la fruta, contiene básicamente sustancias pécticas, celulosa, carbohidratos solubles, flavonoides, aminoácidos y vitaminas. La pectina tiene un atractivo comercial fundamentado en sus propiedades reológicas que ha promovido el interés de industriales conserveros, lácteos y aún cosmetólogos (Pilgrim G. W.; Walter R. H. and Oakenfull D. G., 1991). La elaboración de pectina involucra los siguientes procesos: a) desgranamiento de la corteza y lixiviación; b) extracción ácida de pectina; c) concentración de extracto pectínico por evaporación. Otro método consiste en hacer uso de la ultrafiltración con el propósito de

concentrar solo la pectina; d) precipitación con solvente (Opcional); y e) secado de la pectina. El extracto pectínico concentrado se puede deshidratar por atomización y el precipitado en secador de bandeja o túnel .

La ultrafiltración se caracteriza por fraccionar en dos corrientes líquidas llamadas concentrado y permeado los componentes de una suspensión, emulsión o solución. (Cheryan M. 1986.)

Existen factores inherentes a la membrana y a la solución a procesar que influyen en el flujo de permeado. Entre los últimos podemos señalar la concentración, densidad y temperatura de la solución de alimentación; tamaño y forma de las moléculas retenidas; la presencia de otros solutos; el factor de concentración (F.C.) deseado; la viscosidad del concentrado y la afinidad química solución-membrana.

El objetivo de este trabajo es evaluar la influencia de la temperatura, F.C. y % de diafiltración en los flujos de permeado instantáneo y promedio

MATERIALES Y MÉTODOS

Material. Extracto pectínico obtenido en laboratorio por extracción ácida a pH, a temperatura y tiempo de contacto constantes en todas las experiencias realizadas. Su contenido en material insoluble es:

- ✓ Sólidos insolubles en alcohol promedio (B.S.): 0,2244.
- ✓ Ácido galacturónico promedio(B.S.): 0,1752.

Definiciones de las variables utilizadas. Las variables de esta experiencia son:

- ✓ Factor de Concentración (F.C.): Kilogramos de extracto pectínico a concentrar / Kilogramos de concentrado obtenido
- ✓ Diafiltración (%). La cantidad de agua agregada cuando se obtiene el F.C. establecido en el diseño, proporcional al concentrado obtenido, y posterior eliminación de igual masa de permeado con el propósito de purificar en macromoléculas el concentrado.
- ✓ Flujo de permeado promedio (F_{Pp}): Cociente entre la cantidad total de permeado (resultante de la concentración más la diafiltración) y el producto del tiempo total de proceso y el área de membrana. ($\text{kg} / (\text{hora} * \text{m}^2)$)
- ✓ Flujo de permeado instantáneo (F_{Pi}): Caudal de permeado por unidad de área de membrana. ($\text{m}^3 / (\text{hora} * \text{m}^2)$)

Ensayos experimentales. Con un modulo de ultrafiltración de configuración plana, montado con membranas de polímero sintético, con caudal de alimentación y temperatura constante, válvula de regulación de caudal de concentrado; con manómetros en cada extremo del paquete de membranas se concretó la experiencia tendiente a:

- ❖ Evaluar la influencia del F.C. y la temperatura de procesamiento en el F_{Pi} . Para ello se concentró extracto pectínico de limón, a distintas temperaturas (35°C, 42,5°C y 50°C).
- ❖ Evaluar la influencia de las variables de procesamiento en el F_{Pp} realizando las experiencias conforme al diseño estadístico seleccionado.

Análisis estadístico. Se adoptó un diseño estadístico rotacional centrado de 16 experiencias de concentración de extracto pectínico, (Montgomery D., 1991) con el objeto de evaluar la influencia de la temperatura de procesamiento, F.C. y % de diafiltración sobre el F_{Pp} . Los resultados fueron sometidos a análisis de regresión de variancia por medio del programa Statgraphics Plus Versión 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 ilustra la variación del F_{Pi} con el incremento del F.C. para las tres temperaturas seleccionadas. Para F.C. = 1, que corresponde al tiempo inicial de procesamiento, el F_{Pi} es 0,049 m/h a 50 °C, 0,035 m/h a 42,5 °C y 0,024 m/h a 35 °C, lo que indica que la disminución de la viscosidad a temperaturas más elevadas tiene una notable influencia en el F_{Pi} . En otro orden de cosas, la variación del F_{Pi} responde a una ley semilogarítmica, en concordancia a lo señalado con otros materiales por Alvarez Prada V. (1996) y Nuñez Lemos A. (1992)

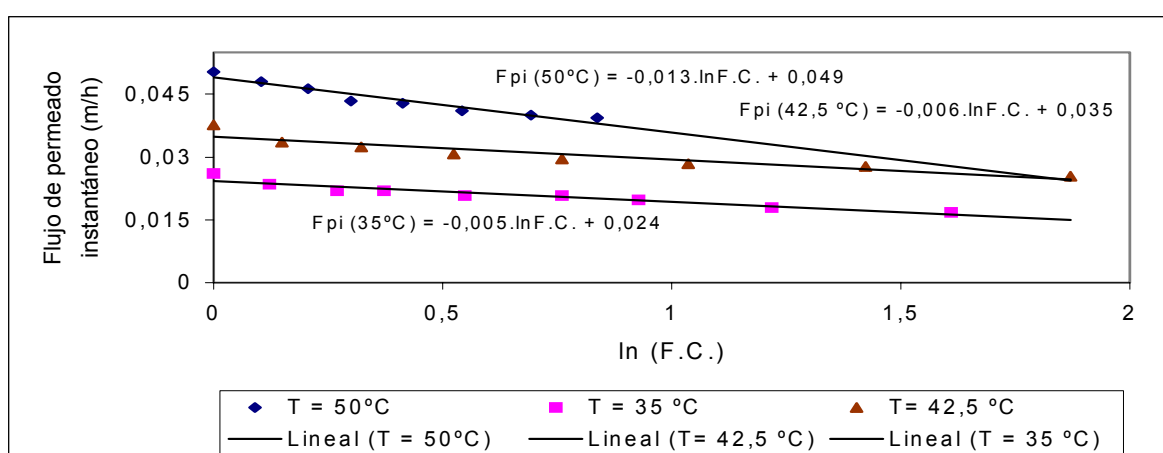


Figura 1. Variación del flujo de permeado instantáneo con el F.C.

La tabla 1 muestra los valores de las variables independientes codificadas conforme al diseño estadístico adoptado y los correspondientes parámetros de F_{Pp} .

Tabla 1. Diseño rotacional centrado y valores de respuesta

Exp. N°	Temperatura (°C) (A) ^(*)	F.C. (B) ^(*)	Diafiltración (%) (C) ^(*)	F _{Pp} (kg/(h*m ²))
1	35 (-1)	5 (-1)	30 (-1)	22,166
2	42,5 (0)	6,5 (0)	65 (0)	18,517
3	55 (1.68)	6,5 (0)	65 (0)	24,965
4	50 (1)	5 (-1)	30 (-1)	19,476
5	50 (1)	8 (1)	30 (-1)	21,391
6	35 (-1)	8 (1)	100 (1)	16,795
7	42,5 (0)	6,5 (0)	123,8 (1.68)	29,302
8	50 (1)	8 (1)	100 (1)	36,586
9	35 (-1)	8 (1)	30 (-1)	18,095
10	42,5 (0)	6,5 (0)	6,13 (-1.68)	22,234
11	42,5 (0)	3,97 (-1.68)	65 (0)	22,008
12	35 (-1)	5 (-1)	100 (1)	18,570
13	50 (1)	5 (-1)	100 (1)	23,034
14	42,5 (0)	6,5 (0)	65 (0)	18,423
15	42,5 (0)	9 (1.68)	65 (0)	17,491
16	30 (-1.68)	6,5 (0)	65 (0)	15,395

^(*) Entre paréntesis aparece el código de cada variable del diseño.

El análisis de regresión conduce a la siguiente superficie de respuesta ($R^2 = 0,93$):

$$F_{Pp} = 18,49 + 2,93A + 0,08B + 1,81C + 2,54AB + 2,83AC + 1,62BC + 0,55A^2 + 0,4B^2 + 2,53C^2$$

En esta expresión se visualiza que la variable más significativa es la temperatura (A) y las interacciones temperatura-F.C. (AB), temperatura-% de diafiltración (AC) y la función cuadrática del % de diafiltración (C^2).

El análisis de varianza indica que el F_{Pp} se incrementa el 36 % cuando la temperatura aumenta de 35 a 50 °. Sin embargo, de acuerdo al análisis factorial, el efecto de la temperatura depende de los niveles considerados para el F.C. y el % de diafiltración, ya que ambas interacciones resultaron significativas ($p = 0,01$). De tal forma, cuando la diafiltración fue de 65 % el F_{Pp} tuvo un comportamiento diferente en función de la temperatura del proceso. A 50 °C, si el F.C. se incrementa de 5 a 8 el F_{Pp} aumenta el 26

%, en tanto que a 35 °C, el aumento del F.C. de 5 a 8 conduce a una disminución de F_{Pp} del 26 %. Análogamente, para un incremento de la temperatura del proceso de 35 a 50 °C la influencia sobre el F_{Pp} fue diferente según el nivel del F.C. considerado. Para F.C.=8 el incremento del F_{Pp} , fue del 77 %, en tanto que para F.C.=5 sólo del orden del 4 %, pasando por un mínimo a 38,1 °C.

Este comportamiento se puede explicar, en parte, por la disminución de viscosidad del concentrado debida al aumento de temperatura del proceso, efecto tanto más importante cuanto mayor es el F.C. utilizado, y al ensuciamiento de la membrana por efecto de la concentración, disminuyendo el F_{Pp} . Ambos efectos son contrapuestos, y parece razonable que a temperaturas mayores predomine la disminución de viscosidad aumentando el F_{Pp} , en tanto que a las temperaturas más bajas predomine el efecto de ensuciamiento de la membrana al crecer el F.C. disminuyendo el F_{Pp} .

La sola influencia del % de diafiltración sobre el F_{Pp} , si bien es estadísticamente significativa al 1 %, en términos cuantitativos es escasa, oscilando el valor del F_{Pp} entre 18,49 kg/h*m² para un mínimo curiosamente ubicado a 65 % de diafiltración, y un máximo de 22,83 kg/h*m² obtenido con 100 % de diafiltración (figura 2)

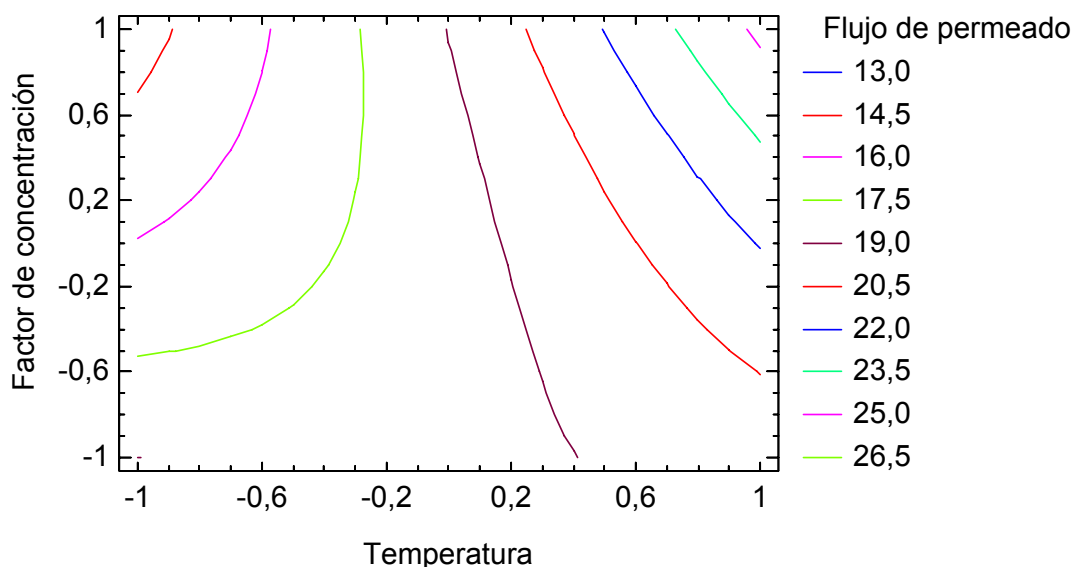


Figura 2. Contorno de superficie de respuesta para el F_{Pp} (kg/(h*m²)) en función del factor de concentración y la temperatura

Sin embargo, el efecto combinado del % de diafiltración con la temperatura o con el F.C. genera cambios cuantitativamente más importantes en el F_{Pp} . Para la zona central del espacio tecnológico investigado (F.C.=6,5), a 50 °C el F_{Pp} no se modificó significativamente sino hasta alcanzar más del 96 % de diafiltración, llegando a un

incremento del orden del 47 % en el F_{Pp} , para el 100 % de diafiltración. En cambio, a una temperatura de proceso de 35 °C, la variación del F_{Pp} fue relativamente menor, y presenta una disminución con el aumento del % de diafiltración de 19,66 kg/h*m² a 17,63 kg/h*m², pasando por un mínimo de 16 kg/h*m² para 93 % de diafiltración.

Para el máximo % de diafiltración (100 %), se observó que cuando la temperatura del proceso crece de 35 a 50 °C, el F_{Pp} aumentó en un 65 %. En cambio cuando el % de diafiltración utilizado fue del 30 %, el F_{Pp} se mantuvo aproximadamente constante en el orden de 19 kg/h*m² al crecer la temperatura de 35 a 50 °C. De acuerdo con la propia definición de flujo de permeado promedio, este valor debería crecer con el % de diafiltración y el F.C. La desviación a este comportamiento podría en parte estar relacionada con la modificación de la viscosidad ocasionada por la temperatura ya mencionada. Aparentemente a bajos % de diafiltración el aumento de temperatura no modifica sensiblemente la viscosidad del sistema (agua de diafiltración más concentrado), lo que si pudo ocurrir con una mayor dilución del concentrado como la que ocurrió con 100 % de diafiltración.

El F.C. no tuvo influencia significativa por si solo, a diferencia de su interacción con el % de diafiltración la cual alcanzó una elevada significación (1 y 5 %). En este aspecto la respuesta del F_{Pp} fue contrapuesta según en los extremos del intervalo del % de diafiltración investigado, creciendo con el F.C. cuando el % de diafiltración fue de 100 %, y decreciendo cuando la diafiltración fue del 30 %. Para F.C. elevada (F.C.=8) el flujo creció sensiblemente con el % de diafiltración.

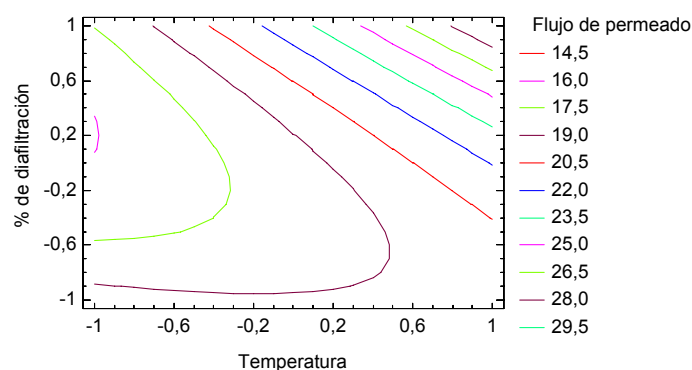


Figura 3. Contorno de superficie de respuesta para el F_{Pp} (kg/(h*m²)) en función de la temperatura y % de diafiltración.

CONCLUSIONES

- La ultrafiltración es una tecnología aplicable a la concentración de extracto pectínico de limón.
- El valor máximo del flujo promedio predicho es de 43,87 kg/(hora* m²) cuando la temperatura es 53,4 °C, el F.C. es 8,67 y % diafiltración es 121.

- Para avanzar en el estudio de optimización del proceso, es conveniente encarar el modelizado del flujo de permeado en la concentración de extracto pectínico, para las membranas y el equipo utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, C. Y CASAFUS C. 2002. “II Curso de Tecnología de Citrus. Facultad de Ciencias de la Alimentación. U.N.E.R.

ALVAREZ PRADA V. 1996. “Clarificación y concentración de zumo de manzana mediante microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa”. Tesis Doctoral – Universidad de Oviedo. España.

CHERYAN, M. 1986. “Ultrafiltration Handbook”. Technomic Publishing Company, Inc Informes técnicos de las firmas Pasilac, Alfa Laval, Rhone Poulenc, PCI RO Division, Wafilin, Babcock, SPEC y Aguas & Procesos.

MONTGOMERY D. C. 1991. “Diseño y Análisis de Experimentos” Grupo Editorial Iberoamérica.

NUÑEZ LEMOS, A. 1992. “Caracterización de membranas sintéticas de ultrafiltración fabricadas en el laboratorio para aplicaciones alimentarias”. Tesis doctoral – Universidad Politécnica de Valencia. España

PILGRIM, G. W.; WALTER, R. H. and OAKENFULL, D. G. 1991. Chapter 2: “Jams, Jellies, and Preserves”. En The chemistry and Technology of Pectins. Academic Press, Inc.

AGRADECIMIENTO

- ◆ A la SICTFRH de la U.N.E.R. por el apoyo financiero a las actividades programadas
- ◆ A las autoridades del I.N.T.I. - C.I.T.I.L. quienes nos facilitaron el equipo LAB DDS 20 Lab para la realización de las experiencias de ultrafiltración.
- ◆ A Nicolás Stechina por su colaboración en la ejecución experimental.

EFFECTO DEL AGREGADO DE AGENTES QUÍMICOS EN EL PROCESO DE ABSORCIÓN DE AGUA EN ARROZ

BELLO, Marcelo O.; TOLABA, Marcela P.; SUAREZ; Constantino

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Ciudad Universitaria, 1428, Buenos Aires, Argentina.
Tel/Fax: +54-11-4576-3366. E-mail: suarez@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto del agregado de ácidos y álcalis sobre la velocidad de absorción de agua del grano de arroz a 35°C y 55°C. En base a la segunda ley de Fick se obtuvieron por regresión los coeficientes de difusión. Se utilizaron distintos ácidos (ClH, CH₃COOH y PO₄H₃) y álcalis (NaOH y Na₂CO₃) en distintas concentraciones (0.1 - 1%). Las velocidades de absorción de agua en las soluciones acuosas ácidas a 25°C fueron mucho menores que para la maceración en agua pura (control). La difusividad efectiva para los granos macerados en NaOH a 55°C fue en promedio $6,77 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, valor que es 2,6 veces el del control en agua pura ($2,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). El NaOH resultó más efectivo que el Na₂CO₃, para este último la difusividad promedio a 55°C resultó $3,09 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Probablemente la presencia de álcali durante la maceración facilite la entrada de agua en al grano incrementando la permeabilidad de la cáscara causada por la solubilización de la sílice contenida en la cáscara del arroz.

Palabras Clave: arroz cáscara, arroz integral, arroz pulido, efecto de agentes químicos.

ABSTRACT

The effect of chemical agents during rice soaking at 35 and 55°C was investigated. Based on Fick's second law the diffusion coefficients were obtained by regression. Different acids (ClH, CH₃COOH y PO₄H₃) and alkalis (NaOH y Na₂CO₃) with different concentrations (0.1 - 1%) were used. The hydration rates in acid soaking at 25°C were much lower than those in plain water (control). Raw rice soaked in alkaline solutions gave, in contrast, more than fourfold increase in the diffusion coefficients with respect to the control. Absorption rates for raw rice soaked in NaOH concentrations were higher than those found in Na₂CO₃ concentrations. Probably, the presence of alkalis during the soaking facilitates the entrance of water in the grain, increasing the permeability of the hull caused by the solubilization of the silica within the rice hull.

INTRODUCCIÓN

La maceración durante el parbolizado de arroz es esencial dado que el agua es necesaria para una gelatinización adecuada (Bandyopadyay y Roy, 1978). Se requiere un contenido de humedad mínimo de 40–45% (b. seca) para alcanzar la gelatinización completa en el grano (Bhattacharya, 1985). La maceración realizada a temperatura ambiente provoca contaminación microbiana y afecta negativamente la calidad del arroz. Tradicionalmente se usan temperaturas de maceración cercanas pero menores a la gelatinización para evitar la rotura de la cáscara. Para reducir el tiempo de maceración se ha propuesto el uso de presión (Velupillai y Verna, 1982) o bien trabajar con el grano descascarado (Kar y col., 1999). Se sabe que en el maíz el uso de agentes químicos incrementan la permeabilidad del pericarpio (Haros y Suárez, 1999). Algunos autores han propuesto la maceración en medio ácido para obtener arroz enriquecido (Luh y Mickus, 1980). El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de ciertos agentes químicos sobre la absorción de agua durante la maceración de arroz a fin de reducir el tiempo de maceración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó arroz tipo largo fino (Gallo, variedad RP2) con un contenido de humedad de 11,5% (b. seca), el cual se almacenó a -18°C hasta su posterior uso. El radio promedio de la esfera equivalente, determinado por picnometría fue de 1.76 mm.

Ensayos de maceración

Las muestras, 25 gr de arroz en 75 ml de solución, se colocaron en un baño agitado de temperatura controlada ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y se pesaron a diferentes intervalos de tiempo en una balanza analítica (± 0.1 mg). Se realizaron experiencias a 35 y 55°C usando soluciones acuosas de HCl (0.1, 1.0 y 10 g/100ml), H_3PO_4 (0.1, 1.0 y 10 g/100ml), ácido acético (0.1, 1.0 y 10 g/100ml), NaOH (0.1; 0.3; 0.6 y 1 g/100g) y Na_2CO_3 (0.1 y 1 g/100g). El contenido de humedad del arroz se determinó según el método AOAC 925.10 (1996).

Determinación del coeficiente de difusión

La solución analítica de la ley de Fick para esferas en términos de la humedad media, m , suponiendo control interno y difusividad y volúmen constantes es (Crank, 1975):

$$\frac{m - m_s}{m_0 - m_s} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{1}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2 \pi^2 D \text{ef } t}{R^2}\right) \quad (1)$$

dónde m_s y m_0 son las humedades de saturación e inicial (b. seca), t = tiempo (sec); R = radio esférico equivalente (m); D_{ef} = coeficiente de difusión efectivo (m^2/s). Los datos de humedad “versus” tiempo se ajustaron mediante la ecuación (1) obteniéndose el valor de la difusividad mediante técnicas de regresión no lineal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra las curvas de absorción a 25°C en presencia de ácidos (1 g/100ml) y el control (maceración en agua pura).

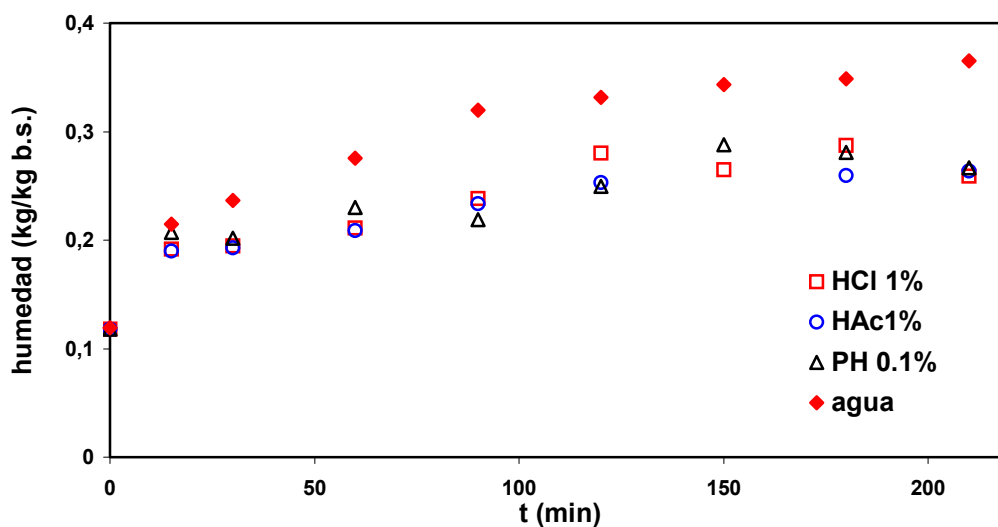


Figura 1: Absorción de agua del grano de arroz entero durante la maceración en soluciones ácidas a 25°C. (♦): agua pura; (□): ácido clorhídrico 1g/100ml; (Δ): ácido fosfórico 0.1 g/100ml; (○): ácido acético 1 g/100ml.

Como puede apreciarse en la Figura, la velocidad de hidratación en medio ácido resulta prácticamente similar independientemente del tipo de ácido y mucho menor que la del control. Se encontraron efectos similares para [ácido]= 0.1 g/100ml. Las curvas de absorción a 55°C en presencia de soluciones de NaOH (0.3, 0.6 y 1 g/100ml) se muestran en la Figura 2 dónde también se incluyó el control.

Puede verse que el efecto del hidróxido se incrementa con la concentración. La Tabla 1 muestra los valores del coeficiente de difusión (ecuación 1) en presencia de álcalis e incluye los valores de la humedad superficial, m_s , obtenida según el método de Isaacs y Gaudy (1968) y del error del ajuste, EA(%), el cual se calculó a partir de la expresión:

$$EA(\%) = 100 \left[\frac{1}{N} \sum (m'_i - m_i) / m'_i \right]^{1/2} \quad (2)$$

Dónde m'_i : humedad predicha; m_i : humedad experimental; N: n° de datos. Puede apreciarse que la difusividad en presencia de hidróxido a 55°C es 3,4 veces el valor obtenido para el agua pura. Una explicación posible de tal incremento podría ser el aumento de la solubilidad de la sílice contenida en la cáscara del arroz. Para el carbonato los coeficientes de difusión a 55°C son 2.83×10^{-11} y 3.35×10^{-11} m²/s (Tabla 1), es decir sólo un poco mayores que la difusividad control ($2,6 \times 10^{-11}$ m²/s), por lo tanto se concluye que el efecto del carbonato en comparación con el NaOH es débil. Las diferencias en la velocidad de absorción usando NaOH y Na₂CO₃ son probablemente debido a la diferencia en el valor de pH de ambos medios de maceración. El pH de las soluciones de Na₂CO₃ varía entre 11.2 – 11.5; mientras que los correspondientes a las soluciones de NaOH fueron 12.3 – 12.8. Este incremento del pH facilita la extracción de la sílice de la cáscara (la solubilidad de la sílice amorfa es muy baja a pH < 10 y se incrementa abruptamente por encima de pH 10), haciendo a la cáscara mucho más permeable al agua.

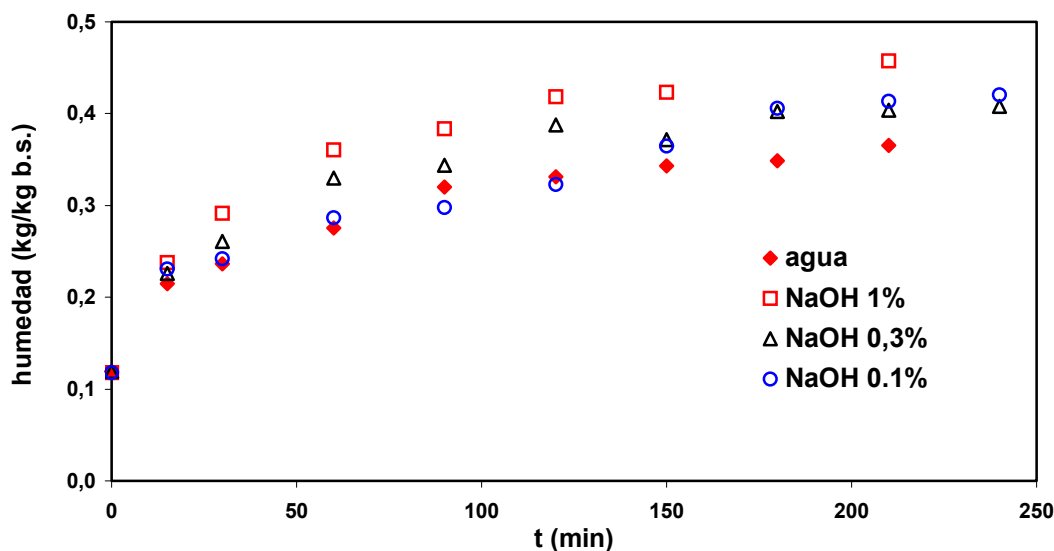


Figura 2: Absorción de agua durante la maceración de arroz en soluciones de NaOH a 55°C. (◆): agua pura; (□): 1g/100g; (△): 0.3g/100g; (○): 0.1g/100g.

CONCLUSIONES

Utilizando la solución analítica de la ecuación de Fick para esfera pudo modelarse satisfactoriamente la absorción de agua del grano de arroz. La incorporación de ácidos en el agua de maceración del arroz afectó negativamente la velocidad de absorción de agua. Más aún, la maceración en medio ácido condujo a velocidades de absorción similares independientemente del tipo de ácido, y mucho menores que la velocidad obtenida para el control (macerado en agua pura). La maceración en medio alcalino, por el contrario, permitió reducir significativamente el tiempo de remojo. Usando NaOH (0,1 g/100 ml) la difusividad resultó $4,17 \times 10^{-11}$ m² s⁻¹, valor significativamente mayor que la difusividad

obtenida para la maceración en agua pura ($2,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Utilizando Na_2CO_3 (0,1 g/100 ml) la difusividad a 55°C resultó $2,83 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, este valor es 32,1% inferior al obtenido con NaOH (0,1 g/100 ml) a la misma temperatura. Puede interpretarse que la presencia de álcalis durante la maceración del arroz facilita la entrada de agua en el grano, incrementando la permeabilidad de la cáscara debido a la solubilización de la sílice contenida en la misma.

Tabla 1. Humedades de saturación y coeficientes de difusión de agua en arroz entero (con cáscara) durante la maceración en soluciones de diferentes agentes químicos a 35 y 55°C .

Agente químico	Temp. ($^\circ\text{C}$)	[Ag. químico] (g/100 ml)	m_s (kg / kg s. seco)	$D \times 10^{11}$ ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)	EA (%)
NaOH	35	0,1	0,43	1,58	2.2
	35	0,3	----	-----	1.4
	35	0,6	----	----	1.7
	35	1,0	0,45	4,23	1.5
	55	0,1	0,42	4,17	0.8
	55	0,3	0,41	6,58	0.6
	55	0,6	0,41	7,57	0.8
	55	1,0	0,42	8,75	1.7
Na_2CO_3	35	0,1	0,43	1,42	0,5
	35	1,0	0,41	1,49	0,8
	55	0,1	0,43	2,83	1,1
	55	1,0	0,43	3,35	0,8

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 1996. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists: Washington, D.C.

Bandyopadhyay, S. and Roy, N.C. (1978). A semi – empirical correlation for prediction of hydration characteristics of paddy during parboiling. Journal of Food Technology, 13, 91–98.

Bhattacharya, K.R. (1985). In B.O. Juliano (ed.), Parboiling of Rice in Rice Chemistry and

Technology (pp 289–348), AACC, Minnesota.

Crank, J. (1975). The Mathematics of Diffusion, 2nd ed., Clarendon Press: Oxford.

Haros, M. and Suarez, C. (1999). Effect of chemical pretreatments and lactic acid on the rate of water absorption and starch yield in corn wet-milling. Cereal Chemistry, 76, 783–787.

Isaacs, W.P., Gaudy, A.F. 1968. A method for determining constants of first order reactions from experimental data. Biotechnol. Bioengng., 10, 69.

Kar, N., Jain, R.K., Srivastav, P.P. (1999). Parboiling of dehusked rice. Journal of Food Engineering, 39, 17–22.

Luh, B.S. and Mikus, R.R. (1980). In B.S. Luh (ed.), Parboiled Rice in Rice Production and Utilization (pp 501–542), AVI, Connecticut.

Velupillai, L. and Verna, L.R. (1982). Parboiled rice quality as affected by the level and distribution of moisture after the soaking process. Transactions of the ASAE, 25, 1450–1456.

RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL ALMIDÓN OBTENIDO POR MOLIENDA HÚMEDA DE AMARANTO

CALZETTA RESIO, Andrea N.; TOLABA, Marcela P. y SUÁREZ, Constantino

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires (Argentina) *TE/FAX: 54-11-4576-3366, E-mail: mtolaba@di.fcen.uba.ar

RESÚMEN

Se estudió el efecto de las condiciones de maceración: temperatura y concentración de SO₂ sobre el rendimiento de almidón, gluten y fibra y sobre la calidad del almidón en la molienda húmeda de amaranto. Los rendimientos de almidón y fibra disminuyeron con la temperatura mientras que el de gluten aumentó con la temperatura. La concentración de SO₂ afectó significativamente los rendimientos de almidón y fibra. La temperatura afectó el contenido de sólidos en las aguas de maceración y procesamiento. El criterio de optimización fue: maximizar los rendimientos de gluten y almidón y simultáneamente minimizar el contenido proteico del almidón. Las condiciones óptimas de maceración resultaron: 54°C, 0,041g SO₂/ 100 ml y 97 minutos de maceración. En estas condiciones los rendimientos de almidón y gluten resultaron 45% y 17,5% respectivamente. Se obtuvo almidón cuyo contenido proteico fue 0,60 %, este valor satisface los requerimientos de pureza establecidos usualmente para almidones.

Palabras claves: molienda húmeda, almidón de amaranto, rendimiento de almidón, calidad de almidón, rendimiento de glúten, rendimiento de fibra.

ABSTRACT

The effect of steeping conditions: temperature and sodium metabisulfite concentration on fraction yields (starch, gluten and fiber yields) and starch quality during the wet-milling of amaranth were investigated. The starch and fiber yields decreased with temperature, however the gluten yield increased with temperature. A significant effect of metabisulfite concentration on starch and fiber yields was observed, being significant the interactions temperature-concentration for gluten yield. Temperature also affected the solid content in steepwater solution and processing water. The effect of steeping conditions on protein content of different fractions was also studied. The optimum conditions required to maximize starch and gluten yields together with the minimization of protein content in starch fraction included steeping at 53.9°C with 0.041 w/v % of sodium bisulfite

concentration during 97.3 minutes. These conditions lead to 45% and 17.5% for starch and gluten yields, respectively. The protein content for starch fraction was 0.60%.

INTRODUCCIÓN

El amaranto es un pseudocereal rico en almidón (48- 69%) y lisina y relativamente rico en escualeno, y tiene 12- 18% de proteína y 5-8% de grasa (Breene, 1991). El alto contenido proteico de este grano sumado a la característica microgranular del almidón hace que la aislación del mismo sea complicada. En bibliografía se describen para el amaranto: la molienda alcalina (Myers y Fox, 1994; Yanez y Walker, 1986), la aislación de almidón a partir de harina de amaranto (Zhao y Whistler, 1994) y la molienda húmeda alcalina en combinación con proteasa (Radosavljevic y col., 1998). Este último método utiliza menores concentraciones de álcali comparado con la molienda alcalina. A escala laboratorio algunos autores usan alcohol isoamílico para aislar el almidón de amaranto (Perez y col., 1993; Sugimoto y col., 1981). Imitando la molienda de maíz otros autores desarrollaron la molienda ácida de amaranto (Uriyapongson y col., 1994). Sin embargo, la información sobre molienda húmeda ácida de amaranto es escasa. La importancia de realizar un estudio sobre este tema radica en obtener mediante un diseño experimental las condiciones óptimas de maceración en medio ácido que permitan maximizar el rendimiento y la calidad de la fracción amilácea de este pseudocereal que debido a su particular característica microgranular se presenta como un promisorio ingrediente funcional.

El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones óptimas de maceración para la aislación de almidón de amaranto considerando para ello como variables operativas: temperatura, concentración de SO₂ y tiempo de maceración. El rendimiento y la calidad de las fracciones fue determinado.

MATERIALES Y METÓDOS

Se usó *Amaranthus cruentus* cuyo contenido de humedad, grasa, ceniza, proteína (N x 6,25) y almidón fue 10,5% (b.s.), 7,7%, 3,1%, 16,8% y 73% respectivamente. Se aplicaron los métodos AOAC estándar (AOAC, 1995).

Obtención del almidón

Se adaptó el método de Perez y col. (1993) a las diferentes condiciones operativas investigadas. Se maceraron 100g de amaranto en una solución de metabisulfito de sodio a tres concentraciones diferentes: 0,01, 0,055 y 0,1 g SO₂/100 ml, se probaron tres temperaturas: 40°, 50° y 60°C siendo los tiempos de maceración: 140, 120 y 45 minutos

respectivamente. El grano macerado se procesó durante 2 minutos en una Waring Blender (Dynamic Corp. of America, New Hartford City, CT). El homogenato se filtró a través de una serie de tamices (80-270 mesh) lavándose repetidamente con solución, se obtuvo la fibra y una suspensión que se centrifugó 20 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se separó cuidadosamente la capa de proteína. El almidón se purificó mediante dos ciclos de centrifugación. Finalmente las fracciones (almidón, fibra y proteína) se secaron 48 hs. en estufa a 40°C (Radosavljevic y col., 1998) y se almacenaron. Los rendimientos (porcentajes) se calcularon como el cociente entre el peso seco de la fracción y la masa inicial de sólido totalmente seco.

Superficies de respuesta

Se analizó el efecto de las condiciones de maceración (variables operativas: x_i , $i=1,\dots,n$) sobre las respuestas estudiadas: rendimiento y contenido proteico. Las respuestas estudiadas (Y_K , $K=1,\dots,p$) se ajustaron mediante un polinomio asociado al diseño experimental (Khuri and Cornell, 1987) :

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Los resultados se procesaron con el software Statgraphics ® (Statistical graphics Corporation, U.S.A.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de las fracciones y calidad del almidón

Los rendimientos y el contenido proteico del almidón (respuestas) para las diferentes condiciones operativas se dan en la Tabla 1. Los errores relativos promedio fueron 6,1-10,8% (rendimientos) y 0,13- 3,66% (proteína). Las respuestas se modelaron con la ecuación (1), siendo x_1 la temperatura y x_2 la $[SO_2]$.

La Tabla 2 muestra el efecto de las variables sobre cada una de las respuestas estudiadas.

Se observa que la $[SO_2]$ afecta todos los rendimientos, mientras que la temperatura sólo afecta el rendimiento de gluten. Los efectos cuadráticos fueron significativos (salvo para rendimiento de almidón). La superficie de respuesta para el rendimiento de almidón predicha a partir de la ecuación (1) se da en la Figura 1. El rendimiento máximo se obtiene a 48,4°C y 0,01% SO_2 . A medida que se incrementa el rendimiento de almidón disminuye el rendimiento de fibra.

Tabla 1. Respuestas obtenidas para las diferentes condiciones experimentales^a.

Variables operativas		Rendimiento (%)			Contenido proteico del almidón (%)
T(°C)	[SO ₂] (%)	Almidón	Glúten	Fibra	
40	0,01	48,8	13,8	21,6	3,8
40	0,055	41,9	17,3	25,4	2,7
40	0,1	34,7	11,3	38,3	4,3
50	0,01	49,4	15,6	28,6	1,9
50	0,1	37,6	13,2	41,0	2,1
50	0,055	42,5	17,6	29,1	0,7
50	0,055	44,3	16,5	26,4	0,7
50	0,055	45,2	15,9	27,8	0,8
60	0,01	44,0	16,6	24,2	2,0
60	0,055	40,6	19,9	23,7	0,7
60	0,1	34,5	18,9	35,5	1,9

^a los valores son promedio de duplicados.

Tabla 2. Efecto de las condiciones de maceración sobre las respuestas estudiadas: coeficientes de la ecuación (1), nivel de significación y coeficientes de correlación de la regresión ^a.

Coeficiente	Rendimiento (%)			Contenido proteico del almidón (%)	
	Almidón	Glúten	Fibra		
Constante	a ₀	44,03	16,71	28,06	0,74
Lineal	a ₁	-1,03*	2,17***	-0,31 ^{NS}	-1,02***
	a ₂	-5,90***	-0,42 ^{NS}	6,73***	0,10***
Cuadrático	a _{1.1}	-3,28***	1,40*	-4,10***	0,98***
	a _{2.2}	-----	-2,73***	6,22***	1,28***
Interacción	a _{1.2}	-----	1,19*	-----	-0,13***
Correlación	r ²	0,95	0,89	0,96	0,99

^a ***, **, * : coeficientes significativos para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: no significativo; ----- coeficiente excluido.

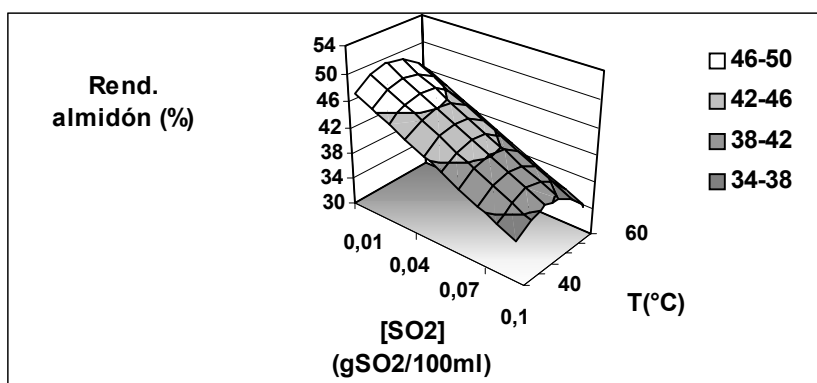


Figura 1: Superficie de respuesta para el rendimiento de almidón predicha mediante la ecuación (1) como función de la temperatura y la concentración de SO₂.

De la Figura 2 puede verse que el máximo rendimiento de gluten se obtiene a 60°C y 0,061% SO₂. La máxima recuperación de fibra se obtiene a 49,6°C y 0,1 % SO₂. La pérdida de sólidos en el agua de maceración es mínima a 40°C y 0,039 % SO₂.

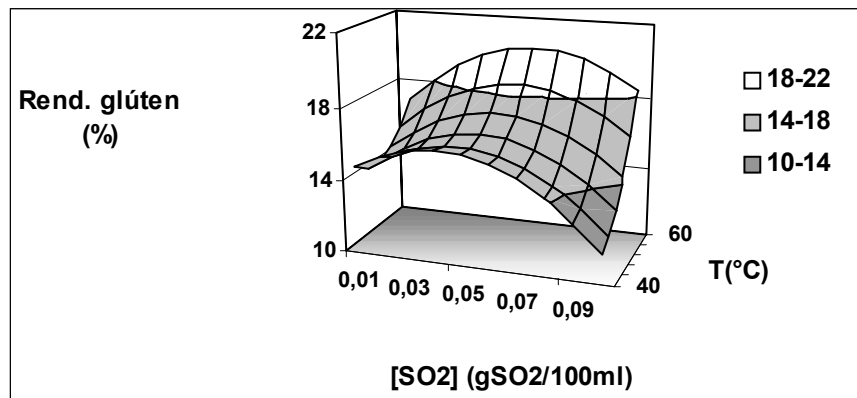


Figura 2: Superficie de respuesta para el rendimiento de gluten predicha mediante la ecuación (1) como función de la temperatura y la concentración de SO₂.

El contenido proteico es un indicador del grado de separación, los valores obtenidos (0,7-4,3%) son comparables a los de bibliografía (0,13- 3,66%) informados por Myers y Fox (1994); Perez y col. (1993) y Zhao y Whistler (1994). Las condiciones de maceración que permiten minimizar el contenido proteico en almidón son 50,6°C y 0,059 % SO₂.

Optimización de las condiciones de maceración

El criterio fue maximizar los rendimientos de almidón y gluten minimizando simultáneamente el contenido proteico del almidón. Las condiciones óptimas resultaron 53,9°C, 0,041% SO₂ y 97,3 minutos; los rendimientos óptimos fueron 45% (almidón) y 17,5% (fibra), siendo 0,6% el contenido proteico del almidón.

CONCLUSIONES

El modelo propuesto resultó satisfactorio para simular el efecto de las condiciones de maceración sobre los rendimientos de las distintas fracciones y la calidad del almidón. Se encontró que la [SO₂] afectó todos los rendimientos, además el efecto cuadrático de la temperatura fue significativo para todas las respuestas estudiadas. La pérdida de sólidos resultó mínima a 40°C en todo el rango de [SO₂].

El objetivo de la optimización fue maximizar los rendimientos de almidón y gluten, simultáneamente minimizar el contenido proteico del almidón. Las condiciones óptimas resultaron 53,9°C, 0,041 g SO₂/100 ml y 97,3 minutos de maceración. En condiciones óptimas el rendimiento de almidón fue 45% y su contenido proteico 0,60%. Condiciones que garantizan una adecuada separación de almidón y gluten.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official Methods of Analysis* (16th ed.). Washington, D.C.: AOAC.

Breene, W. M. 1991. Food uses of grain amaranth. *Cereal Foods World*, vol. 36, 5:426.

Khuri, A.I. & Cornell, J.A., 1987, Response surfaces Designs and Analyses. Marcel Dekker, Inc., American Society for Quality Control, Quality Press.

Myers, D. J. & Fox, S. R. 1994. Alkali wet milling characteristics of pearled and unpearled amaranth seed. *Cereal Chemistry*, 71:96.

Perez, E., Bahnassey, Y. A. & Breene, W. M. 1993. A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starke*, vol 45, 6:211.

Radosavljevic, M., Jane, J. & Johnson, I. 1998 Isolation of amaranth starch by diluted alkaline – protease treatment. *Cereal Chemistry*, 75: 571- 577.

Sugimoto, Y., Yamada, K., Sakamoto, S. & Fuwa, H. 1981. Some properties of normal and waxy- type starches of *Amaranthus hypochondriacus*. *Staerke/Starch*, 33:112-116.

Uriyapongson, Y. & Rayas- Duarte, P. (1994) Comparison of yield properties of amaranth starches using wet and dry- wet milling processes. *Cereal Chemistry*, 71, 571-577.

Yanez, G. A. & Walker, C. E. 1986. Effect of tempering parameters on yield and ash content of proso millet flours and partial characterization of proso starch. *Cereal Chemistry*, 63: 164- 167.

Zhao, J. & Whistler, R. 1994. Isolation and characterization of starch from amaranth flour. *Cereal Chemistry*, 71(4): 392- 393.

MODELADO DEL PROCESO DE HORNEADO DE PRODUCTOS PANIFICADOS

PURLIS, Emmanuel^{1*}; SALVADORI, Viviana O.^{1,2}

¹CIDCA, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET. 47 y 116 (1900) La Plata, Argentina. Tel./Fax: (0221) 425-4853. *e-mail: emmanuel@cidca.org.ar ²MODIAL – Depto. de Ing. Química – Fac. de Ingeniería, UNLP

RESUMEN

El horneado de productos panificados es un proceso complejo en el cual están involucrados varios cambios físicos, químicos y bioquímicos en el producto, tales como la expansión de volumen, evaporación de agua, formación de una estructura porosa, desnaturalización de proteínas, gelatinización de almidón, desarrollo de corteza y reacciones de pardeamiento.

Matemáticamente, el proceso puede ser descrito a través de las transferencias simultáneas de materia y energía dentro del producto y con el medio ambiente existente en la cámara de horneado.

En el presente trabajo se desarrollaron los modelos matemáticos que describen el proceso teniendo en cuenta aspectos fenomenológicos y teóricos del mismo. En base a experiencias realizadas en un equipo convencional, se obtuvieron los perfiles de humedad y de temperatura dentro de muestras de pan. También se efectuaron estudios sobre el cambio de volumen del producto.

Palabras claves: Horneado; modelado; transferencia simultánea; energía; materia.

ABSTRACT

Baking is a complex process that brings about a series of physical, chemical and biochemical changes in the products, such as volume expansion, water evaporation, formation of a porous structure, protein denaturalization, starch gelatinization, crust development and browning reactions.

Mathematically, the process could be described as a simultaneous mass and energy transfer within the product, and with the ambient existing inside the baking chamber.

In the present work, mathematical models have been developed in order to describe the process, taking into account phenomenological and theoretical aspects. Water content and temperature profiles have been obtained inside bread samples in baking experiences using conventional equipment. Also, studies about the volume change of the product have been made.

Keywords: Baking; modeling; simultaneous transfer; energy; mass.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas tres décadas, la tecnología de los productos panificados se ha desarrollado ampliamente, con cambios considerables en la escala de plantas y en el grado de automatización. Varios estudios matemáticos y experimentales se han llevado a cabo con el fin de entender el proceso de horneado de pan (Sablani *et al.*, 1998).

De Vries *et al.* (1989) propusieron un modelo matemático de transferencia calor y agua en la masa y miga, considerando evaporación-condensación en la fase gaseosa y conducción en la fase líquida. El movimiento de burbujas de aire fue postulado como el mecanismo de transferencia de calor y materia en el producto. El transporte de agua fue determinado por la evaporación-condensación, solamente. Sin embargo, Zanoni *et al.* (1994) publicaron que este modelo no es aplicable a la costra. Hasatani *et al.* (1991) llevaron a cabo experiencias para determinar la influencia de la transferencia de agua en la velocidad de calentamiento de pan durante el horneado en un equipo eléctrico. Los datos tiempo-temperatura indicaron que el centro tiende asintóticamente a 100°C y la superficie a la temperatura del horno. Sugirieron que la formación de costra restringe la difusión del vapor desde el interior del pan hacia el exterior.

Carvalho & Martins (1993) reportaron un modelo compuesto por submodelos para el horno y para el pan. Para este, se consideró el aumento de volumen y la existencia de dos regiones, masa y miga (por debajo y por encima de 68°C, respectivamente). La costra no se modeló por la falta de propiedades físicas. La evaporación-condensación fue tomada como el mecanismo de transferencia de energía responsable del aumento de temperatura.

Basados en datos experimentales, Zanoni *et al.* (1991) desarrollaron un modelo fenomenológico del horneado de pan en un equipo eléctrico de convección forzada. Se determinaron los cambios en la temperatura, humedad, volumen y tamaño de corteza. Los resultados mostraron que las variaciones de temperatura y contenido acuoso se rigen por la formación de un frente de evaporación a 100°C. Este frente se mueve dentro del producto durante el horneado, formando dos zonas: la costra, con baja humedad; y la miga, con humedad constante. La temperatura en la costra tiende a la del horno, y la miga a 100 °C. Esto es consistente con lo publicado anteriormente y fue trasladado a un modelo matemático que describe la transferencia de calor y materia durante el horneado de panes cilíndricos. Se usaron propiedades físicas variables y se consideró el cambio de volumen.

En todos los casos citados, los modelos se resolvieron por el método de diferencias finitas.

Por último, también se realizaron estudios sobre los cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso. Se desarrollaron modelos cinéticos para la gelatinización del almidón y el pardeamiento de la superficie del pan (Zanoni *et al.*, 1995).

El objetivo del presente trabajo es presentar un modelo matemático que describa el horneado de pan, en forma general. Para ello, en primer lugar, se realizó un exhaustivo estudio experimental tendiente a caracterizar los aspectos fenomenológicos del horneado. Los resultados de las experiencias, junto con las consideraciones teóricas propias de la transferencia de calor y materia involucradas, permiten el planteo de un modelo adecuado.

El objetivo último de este tema, que escapa a este trabajo en particular, es encontrar soluciones que puedan ser aplicadas en el ámbito industrial (por ej., cálculos de tiempos de horneado en función de las variables operativas).

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Preparación de la muestras

Se utilizó una receta estándar para pan francés, con los siguientes ingredientes y cantidades: harina de trigo tipo 000, 370 g; agua, 200 g; sal, 6 g; azúcar, 6 g; margarina, 6 g; levadura deshidratada, 4.5 g.

Los elementos fueron mezclados en una procesadora Rowenta Universo durante 5 minutos, hasta que se obtuvo una masa homogénea. Esta masa se dejó levar por 35 minutos, a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se dividió el bollo en seis porciones iguales que se amasaron individualmente dándoles forma esférica, y se colocaron espaciadamente sobre una rejilla perforada, sin utilizar molde. Los bollos se dejaron levar nuevamente durante 45 minutos antes de ser horneados.

1.2 Experiencias de horneado

Se realizaron pruebas en un horno eléctrico comercial ARISTON modelo FM87-FC. El mismo cuenta con varios modos de cocción, de los cuales se escogió el modo convencional (representa la condición de convección natural). La temperatura del horno se fijó en 180 °C y el aire no fue humidificado. La rejilla con los bollos de masa se colocó a un nivel medio del horno.

1.3 Medidas de temperatura

Mediante termocuplas T (rígidas, de 0.7 mm de diámetro y flexibles, de 1 mm de diámetro) colocadas en distintas posiciones en el interior de los panes y en el ambiente

del horno, conectadas a un adquisidor de datos Keithley DASTC, se registró la temperatura durante el proceso. En la figura 1 se observa el esquema del corte transversal de un pan. Ts es la termocupla posicionada en la superficie, T1 a 0.5 cm de la misma, T2 a 0.8 cm, T3 a 2 cm y T4 a 5 cm (próxima al centro térmico), respectivamente.

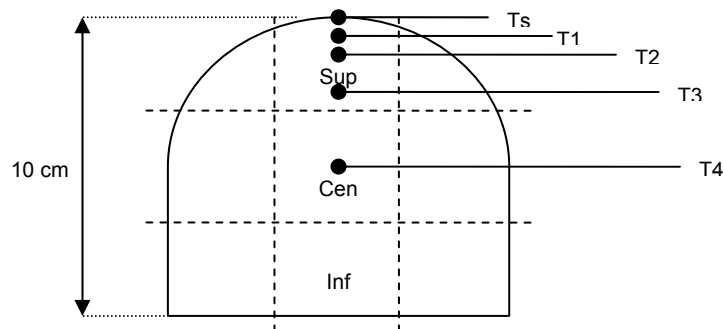


Figura 1. Cortes realizados sobre la rodaja central del pan para la determinación de humedad y posición de termocuplas (Sup: superior; Cen: central; Inf: inferior).

1.4 Medidas de humedad

Para determinar el contenido de agua durante el horneado fue necesario diseñar un método experimental que permitiera disminuir los errores de medición por la evaporación de agua producida al cortar las muestras, al igual que la deformación de las mismas (importante en los primeros minutos del proceso).

La muestra extraída del horno fue sumergida en nitrógeno líquido por 5 minutos y luego almacenada a -20°C durante 5 horas. Así, al congelarse el pan adquiere rápidamente una estructura rígida y se impide la difusión interna de agua. Luego, las muestras congeladas se cortaron con un cuchillo eléctrico en rodajas. La rodaja central se dividió en nueve secciones, tal como muestra la figura 1. Se determinó el contenido de agua de las zonas superior, central e inferior. De las muestras se separó la costra superficial y se midió también la humedad de la misma. Las medidas fueron tomadas a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, y 35 minutos de horneado, utilizando el método de peso seco, en una estufa de vacío a 80°C .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5 Perfiles de temperatura

La figura 2 muestra la historia térmica durante el proceso. Las zonas del pan que se encuentran en contacto directo con el aire del horno y aquellas próximas a la superficie

(hasta 1 cm de profundidad, aproximadamente) incrementan su temperatura rápidamente a más de 100°C. Se observa claramente, que en estas posiciones, la temperatura tiende asintóticamente a la del aire, oscilando de manera idéntica. En las zonas interiores (miga), la temperatura aumenta con menor velocidad, tendiendo asintóticamente a 100°C.

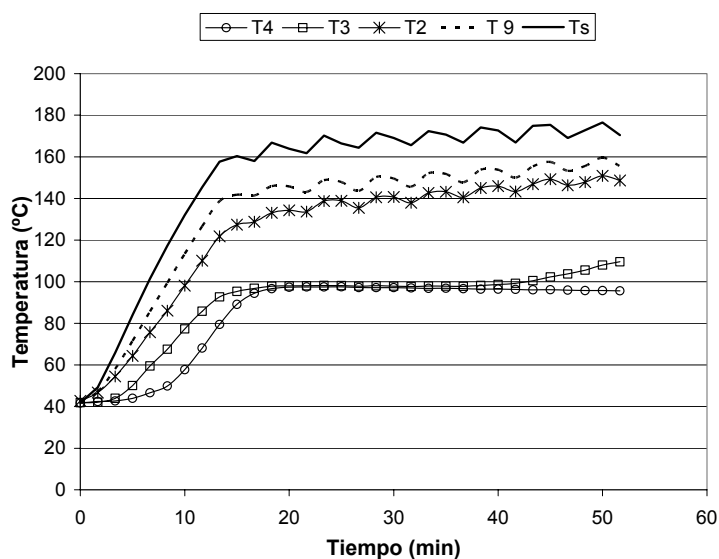


Figura 2. Temperaturas en distintas posiciones de los panes en función del tiempo de horneado.

1.6 Perfiles de humedad

Los valores de la parte central del pan, es decir, la miga, siguen una tendencia casi constante durante todo el proceso (figura 3). Al final del horneado, el máximo descenso del contenido de agua se da en la parte superior de la miga, en un 0.05 (10 % del valor inicial).

En el caso de la costra, la humedad promedio da un valor mínimo. Al cabo de 35 minutos de horneado es de 0.0859 kg de agua/kg de muestra (b.h.).

1.7 Modelo fenomenológico

Los perfiles de temperatura y de humedad concuerdan con los datos existentes en la literatura en productos similares (Zanoni *et al.*, 1993; Thorvaldsson & Skjöldebrand, 1998; Thorvaldsson & Janestad, 1999; Wählby & Skjöldebrand, 2002). En la miga, la temperatura crece hasta tomar un valor constante, cercano a los 100°C, y la humedad permanece casi constante. En el caso de la región más externa, llamada costra, el contenido de agua es muy bajo y la temperatura crece rápidamente, siguiendo la tendencia del ambiente del horno.

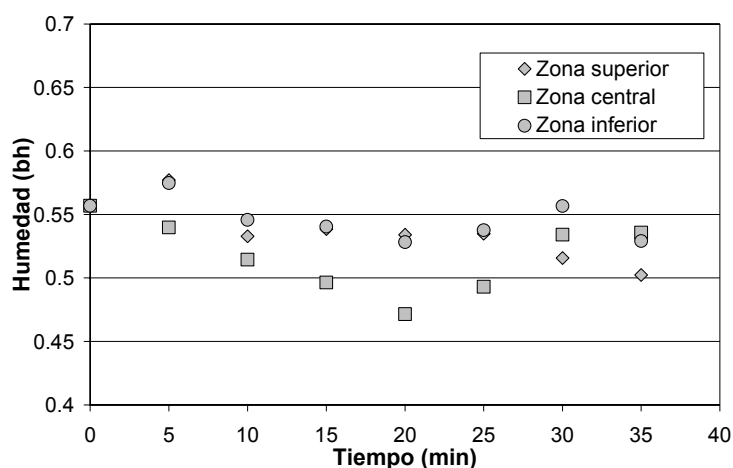


Figura 3. Variación de la humedad de la miga en función del tiempo de horneado.

A partir del análisis de los datos experimentales, se asume la existencia de un frente de evaporación (100°C), el cual separa las dos regiones del pan: costra, de humedad casi nula, y miga, cuyo contenido de agua es levemente menor que el valor inicial de la masa. El avance de este frente hacia el centro de la pieza causa el aumento de la corteza.

Aunque se observa que algunas porciones de la miga superan los 100°C , la formación de costra no es inmediata. A estas temperaturas el agua líquida evapora y difunde hasta la corteza, que le impide llegar al ambiente del horno. En este momento, el gradiente de temperatura produce un flujo de vapor de agua en sentido inverso que al llegar a la zona central de miga más fría condensa nuevamente. De esta manera, también se logra mantener la humedad de la miga casi constante durante todo el horneado. Estas observaciones concuerdan con la variación de humedad de la zona central mostrada en la figura 3.

Respecto al cambio de volumen, se observó que el mismo depende del método utilizado para elaborar el pan. En las condiciones estudiadas, el volumen cambia considerablemente en las etapas de levado, y no en el horneado. La formación casi inmediata de costra le brinda al pan la rigidez necesaria como para no seguir expandiéndose. Si, en cambio, se omite la segunda etapa de levado y se hornean los bollos individuales luego de ser formados, se observa un cambio de volumen significativo.

1.8 Modelo matemático

Se plantean los balances de transferencia de materia y energía (incluye término de radiación) acoplados mediante una condición de contorno de evaporación de agua en la superficie del alimento (cuando ésta alcanza los 100°C). Esta condición de borde es

móvil, conforme el frente de evaporación se desplaza hacia la zona más fría, con la consecuente formación de una costra con características distintas a las de la miga.

Balance de energía:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) \quad (1)$$

donde ρ es la densidad, C_p es la capacidad calorífica, T es la temperatura, t es el tiempo y k es la conductividad térmica.

Balance de materia:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla(D_m \nabla c) \quad (2)$$

donde c es la concentración (agua) y D_m es el coeficiente de difusión de materia (agua). Las propiedades físicas se consideran dependientes del contenido de agua y la temperatura. Las condiciones de contorno para el frente de evaporación son:

$$\text{Energía: } k \nabla T = k_c \nabla T_c - \rho D_m \lambda_v \nabla c \quad (3)$$

donde k_c es la conductividad térmica de la costra, T_c es la temperatura en la costra y λ_v es el calor latente de evaporación.

$$\text{Materia: } \nabla c = 0 \quad (4)$$

Las mismas se aplican en una posición $r(t)$, donde r depende del tiempo, y se encuentra entre el centro y la superficie del pan (al inicio r =distancia del centro a la superficie).

La condición de contorno para la superficie es:

$$\text{Energía: } k \nabla T = h(T_{\text{amb}} - T_{\text{sup}}) \quad (5)$$

donde h es el coeficiente de transferencia calórica, T_{amb} es la temperatura del ambiente (horno), T_{sup} es la temperatura en la superficie del pan.

CONCLUSIONES

Se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica acerca de los estudios publicados hasta el presente referidos al horneado de panes y productos de panificación. Ante la evidencia de la inexistencia de un modelo teórico adecuado que resuelva el sistema estudiado se procedió a realizar, en primer lugar, un completo estudio experimental del proceso que permitió plantear un modelo fenomenológico. Se está trabajando en la solución del mismo empleando elementos finitos y contemplando distintas condiciones de horneado. A partir de las simulaciones del mismo se espera obtener cinéticas de los cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso, obtener ecuaciones de predicción de tiempos de horneado según las condiciones operativas y optimizar el proceso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de CONICET, ANPCyT y UNLP.

BIBLIOGRAFÍA

Carvalho, M. G., Martins, N. *Mathematical modeling of heat and mass transfer in a forced convection baking oven.* AIChE Symposium Series-Heat transfer, San Diego, CA, 1993, 205-211.

De Vries, U., Sluimer, P., Bloksma, A. H. *A quantitative model for heat transport in dough and crumb during baking.* Asp, N. G. (Ed) Cereal science and Technology in Sweden, proceedings of an international symposium, Sweden June 13-16, 1989, 174-188.

Hasatani, M., Arai, N., Katsuyama, H., Harui, H., Itaya, Y., Fushida, N., Tatsukawa, N. *Heat and mass transfer in bread during baking in an electric oven.* Drying = 91. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991, 385-393.

Sablani, S. S., Marcotte, M., Baik, O. D., Castaigne, F. *Modeling of simultaneous heat and water transport in the baking process.* Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **31** (1998) 201-209.

Thorvaldsson, K., Janestad, H. *A model for simultaneous heat, water and vapour diffusion.* Journal of Food Engineering **40** (1999) 167-172.

Thorvaldsson, K., Skjöldebrand, C. *Water diffusion in bread during baking.* Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **31** (1998) 658-663.

Wählby, U., Skjöldebrand, C. *Reheating characteristics of crust formed on buns, and crust formation.* Journal of Food Engineering **53** (2002) 177-184.

Zanoni, B., Peri, C., Bruno, D. *Modeling of browning kinetics of bread crust during baking.* Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **28** (1995) 604-609.

Zanoni, B., Peri, C., Bruno, D. *Modeling of starch gelatinization kinetics of bread crumb during baking.* Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **28** (1995) 314-318.

Zanoni, B., Peri, C., Gianotti, R. *Determination of the thermal diffusivity of bread as a function of porosity.* Journal of Food Engineering **26** (1995) 497-510.

Zanoni, B., Peri, C., Pierucci, S. *A study of the bread baking process. I: A phenomenological model.* Journal of Food Engineering **19** (1993) 389-398.

Zanoni, B., Pierucci, S., Peri, C. *Study of the bread baking process. II: Mathematical modeling.* Journal of Food Engineering **23** (1994) 321-336.

MODELADO Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE COCCIÓN MEDIANTE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y ELEMENTOS FINITOS

PURLIS, Emmanuel^{1*}; SALVADORI, Viviana O.^{1,2}

¹CIDCA, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET. 47 y 116 (1900) La Plata, Argentina.
Tel./Fax: (0221) 425-4853. *e-mail: emmanuel@cidca.org.ar ²MODIAL – Depto. de Ing. Química – Fac. de Ingeniería, UNLP

RESUMEN

En el presente trabajo se simula mediante un modelo numérico la cocción de un corte de carne vacuna. El objetivo principal es el desarrollo de una metodología de trabajo que permita obtener una imagen de la geometría real del alimento (tridimensional e irregular), utilizando técnicas de procesamiento digital de imágenes y visión computacional. En el modelo propuesto, se resuelven los balances de energía y materia, con propiedades físicas y parámetros operativos constantes. La simulación del proceso se realiza por medio del método de elementos finitos (FEM) utilizando un programa comercial. Previo al desarrollo del modelo, se realizó una serie de pruebas de cocción en un horno eléctrico con convección. Las mismas permitieron definir distintas características del comportamiento del sistema que se incorporan como datos a la simulación. Las historias térmicas experimentales fueron contrastadas con los resultados provistos por la simulación numérica.

Palabras clave: Cocción, FEM, Modelado.

ABSTRACT

In the present work a numerical model is used to simulate the cooking of a piece of meat. The aim is the development of a methodology that allows to obtain an image of the real geometry of the food (three-dimensional and irregular), using digital image processing and computational vision. In the proposed model, the heat and mass balances are solved, constant physical properties and constant operative parameters are considered. Finite element method (FEM) is used to simulate the process, using a commercial software. Cooking experiments in an electrical convection oven were done previous to the model development. The experimental behavior of the system is used as data input in the simulation runs. Experimental thermal histories were contrasted with the results provided by numerical simulation.

Keywords: Cooking, FEM, Modeling.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han presentado varios trabajos en el campo de tratamiento térmico de alimentos realizando el modelado y la simulación mediante distintas técnicas numéricas-computacionales. Estos modelos presentan distinto grado de complejidad de acuerdo a las simplificaciones consideradas en la resolución de los mismos.

Sastry *et al.* (1985) desarrollaron un modelo tridimensional en elementos finitos para la solución simultánea de las ecuaciones de transferencia de energía y materia en dominios de forma irregular. El modelo fue aplicado a la destrucción térmica de agaritina en hongos enlatados, obteniendo buenos resultados. La geometría se diseña “manualmente” en base a medidas experimentales promedio del alimento.

Holtz & Skjöldebrand (1986) simularon la cocción de una rodaja de carne picada. Para resolver el sistema usaron el método de diferencias finitas y regresión lineal. Huang & Mittal (1995) realizaron un planteo similar en albóndigas (sistema unidimensional axisimétrico).

Ngadi *et al.* (1997) desarrollaron un modelo de elementos finitos para describir la transferencia de agua en patas de pollo durante la fritura por inmersión. Se discretizaron el músculo, el hueso y el cartílago de la pieza, en coordenadas axisimétricas.

Chen *et al.* (1999) y Zorrilla & Singh (2003) consideraron una geometría bidimensional axisimétrica en la cocción de hamburguesas. Usaron el método de elementos finitos y de diferencias finitas, respectivamente.

En particular, la cocción o precocción de productos cárneos es una operación común en la industria alimenticia. A pesar de su importancia, queda mucho por hacer en el campo del modelado a fin de contar con métodos precisos de determinación de las historias térmicas dentro del alimento, que permitan calcular de modo confiable los tiempos de cocción, fundamentalmente desde un punto de vista microbiológico.

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de una metodología general para obtener una imagen de la geometría real del alimento (tridimensional e irregular). La misma utiliza técnicas de procesamiento digital de imágenes y visión computacional y es independiente del proceso a simular. Para verificar el método, se simula la cocción de un corte de carne vacuna (peceto), resolviendo los balances de energía y materia correspondientes, con propiedades físicas y parámetros operativos constantes. La simulación del proceso se lleva a cabo por medio del método de elementos finitos (FEM) en un programa comercial. Por último, se realizaron determinaciones experimentales a fin de validar los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras

Se emplearon cortes enteros comerciales (peceto) de carne vacuna. Previo a la cocción se retiró la capa de grasa superficial. Las muestras tenían un peso promedio inicial de 750 g, 0.1 m de largo y 0.06 m de diámetro promedio en su sección transversal.

2.2. Modelado de la geometría

El método presentado consiste en captar la forma real de un alimento tridimensional, con la restricción de ser regular en al menos una de sus dimensiones.

Para capturar la geometría real se realiza un corte transversal de la pieza (Figura 1).



Figura 1. Corte transversal del peceto.

Luego, esta imagen se procesa en un programa CAD (AutoCAD versión 2000) con matemáticas NURBS (Non-Uniform Rational B-Splines). Mediante una curva B-spline se toma el contorno irregular del alimento. La curva obtenida (contorno del alimento) se importa desde el programa de elementos finitos (FEMLAB versión 2.2). El primer paso en este entorno es el escalado de la geometría, para que el modelo adopte las dimensiones reales del alimento (Figura 2).

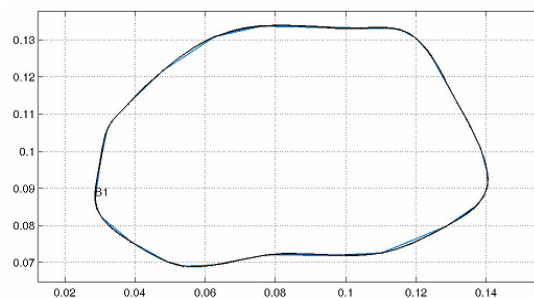


Figura 2. Curva B-spline escalada.

En segunda instancia, la curva se convierte en un sólido bidimensional (Figura 3) y por último, mediante la operación de extrusión, se “recupera” la geometría tridimensional real del alimento (Figura 4).

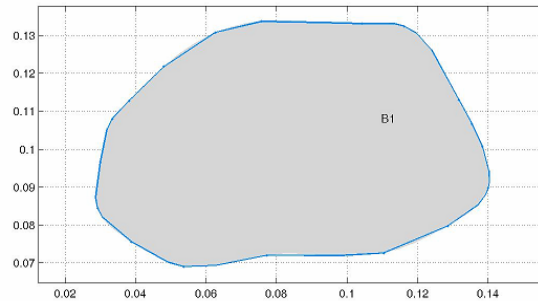


Figura 3. Sólido bidimensional.

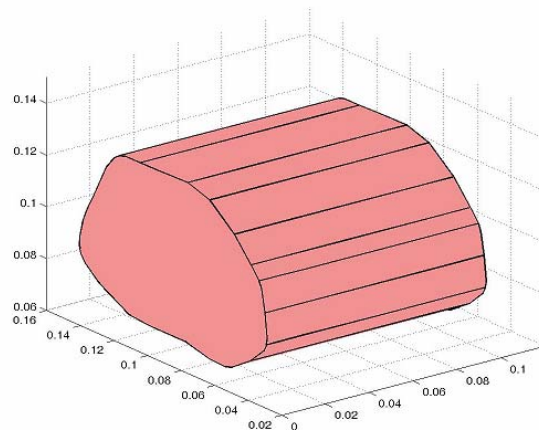


Figura 4. Geometría real del alimento.

2.3. Generación de la malla de elementos finitos

Se trata de la partición de la geometría en pequeñas unidades de formas simples. En tres dimensiones, los subdominios se dividen en elementos tetraédricos cuyas caras, bordes y vértices se denominan caras de la malla, bordes de la malla y vértices de la malla, respectivamente. Los vértices de los elementos de la malla se denominan nodos.

En FEMLAB la malla es generada por medio de la función *meshinit*, de manera automática, tomando como opción de malla el modo “Extremely coarse” que genera el menor número de elementos y como opción de refinamiento de malla el modo “Longest”. El mallado final se muestra en la Figura 5.

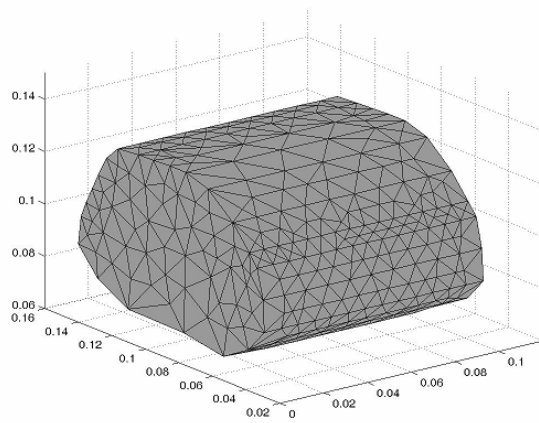


Figura 5. Malla de elementos finitos.

2.4. Modelo matemático

Tomando como volumen de control la pieza de carne entera, los balances de energía y materia a resolver son:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = k \nabla^2 T, \quad \Omega \quad (1)$$

$$\frac{\partial w}{\partial t} = D_m \nabla^2 w, \quad \Omega \quad (2)$$

donde Ω es el volumen de control (dominio). Las condiciones iniciales son:

$$T = T_0, \quad \Omega, \quad t = 0 \quad (3)$$

$$w = w_0, \quad \Omega, \quad t = 0 \quad (4)$$

Las condiciones de contorno se establecieron de acuerdo a resultados experimentales. Para el balance de energía, se consideraron tres condiciones de contorno de acuerdo a las distintas fases del proceso.

$$\begin{aligned} k \nabla T &= h(T_\infty(t) - T_s), & \partial\Omega, & \text{ para } t < t_r \\ k \nabla T &= h(T_\infty - T_s), & \partial\Omega, & \text{ para } t_r < t < t_{iso} \\ T_s &= T_{iso}, & \partial\Omega, & \text{ para } t > t_{iso} \end{aligned} \quad (5)$$

donde $\partial\Omega$ indica el borde del volumen de control, T es la temperatura, w el contenido de agua, t el tiempo, T_s la temperatura de la superficie de la carne (el resto de las variables se detallan en la Tabla 1).

La primera etapa ($t < t_r$) se distingue por ser la que representa la puesta en régimen del horno. La temperatura del mismo (variable con el tiempo) se ajustó mediante mínimos cuadrados a una recta.

En la segunda fase, el horno ya se encuentra en régimen. En este caso, la temperatura ambiente utilizada fue un promedio de la variación observada (sinusoidal). Esta condición

de contorno se usó hasta que la temperatura del borde del alimento llega al valor de la isoterma observada en la superficie del mismo (100.5°C). Esta isoterma corresponde a la evaporación del agua líquida ($t > t_{iso}$).

Para el balance de materia, se usó la siguiente condición para todo el proceso:

$$w = w_s, \quad \partial\Omega \quad (6)$$

Las propiedades físicas del alimento se consideraron dependientes del contenido de agua (Miles et al., 1983; Sanz et al., 1987) y se obtuvieron tomando en cuenta el promedio entre el valor de humedad inicial y final, en la zona central. Los valores de los parámetros operativos (Tabla 1) se obtuvieron experimentalmente (ver sección 2.5).

Tabla 1. Definiciones y valores de propiedades y parámetros utilizados.

Propiedad/Parámetro	Valor utilizado
k (conductividad térmica)	0.4518 W/m °C
ρ (densidad)	1085.16 kg/m ³
Cp (capacidad calorífica)	3406.385 J/kg °C
D_m (coeficiente de difusión de agua)	1×10^{-10} m ² /s
T_0 (temperatura inicial)	20°C
W_0 (humedad inicial)	0.75 kg/kg (bh)
$T_\infty(t)$ (temperatura del horno durante puesta en régimen)	$0.25t + 33.595$ (°C)
t_r (tiempo de puesta en régimen)	636 s
T_∞ (temperatura del horno)	182.37 °C
T_{iso} (temperatura de la isoterma)	100.5 °C
h (coeficiente de transferencia calórica)	25 W/m ² °C
w_s (humedad superficial)	0.55 kg/kg (bh)

2.5. Experiencias de cocción

Para validar el método propuesto se realizaron pruebas de cocción en un horno eléctrico ARISTON modelo FM87-FC. La temperatura del horno fue fijada en 180°C y se usó convección forzada. Las muestras se colocaron sobre la rejilla a un nivel medio del horno. Mediante termocuplas T (rígidas, de 0.7 mm de diámetro) colocadas en distintas

posiciones del alimento y conectadas a un adquisidor de datos Keithley DASTC, se registró la historia térmica del alimento. El coeficiente de transferencia calórica se midió empleando un sensor Omega HFS23, que se adhiere a la superficie del alimento. También se midió el contenido de agua del alimento (método de peso seco), al inicio y al final de la cocción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al aplicar la metodología propuesta para el desarrollo de la malla de elementos finitos, se generaron 2111 elementos, 962 bordes y 621 nodos. Con esta discretización, los balances de energía y materia fueron resueltos simultáneamente en FEMLAB, con un paso de tiempo de 1 segundo, en 15 minutos (valor promedio aproximado de todas las simulaciones realizadas). Para los cálculos se utilizó una PC AMD Athlon 1.67 GHz , 1 GB RAM.

El tiempo de solución depende del número de puntos tomados al generar la curva B-spline, las dimensiones del alimento, el método empleado para desarrollar la malla, la complejidad del modelo (propiedades variables, parámetros operativos variables), el paso de tiempo empleado en el método de elementos finitos y la computadora usada para las simulaciones.

En la Figura 6 se muestra la distribución de temperaturas en el corte transversal central de una pieza de 10 cm de largo, obtenida mediante la simulación del modelo.

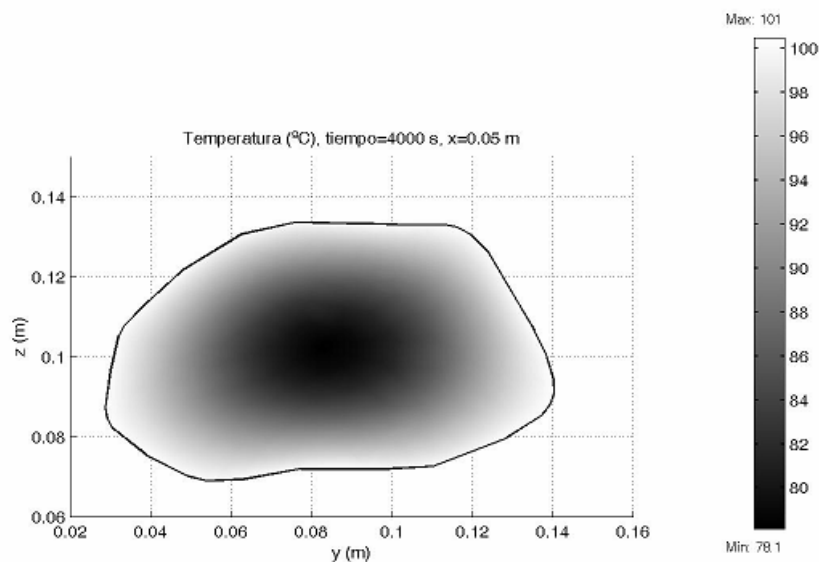


Figura 6. Distribución de temperaturas en el corte transversal central del peceto.

En la Figura 7, se presenta una de las historias térmicas experimentales junto con datos obtenidos numéricamente.

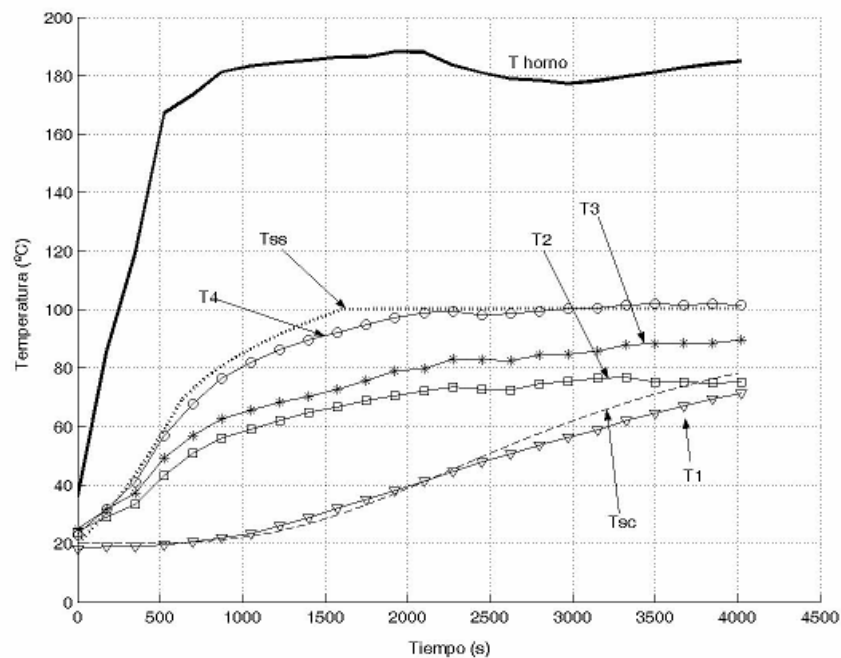


Figura 7. Perfiles de temperatura experimentales y simulados. Experimentales: T1: a 3 cm de la superficie (centro térmico, aproximadamente); T2: a 0.2 cm de la superficie; T3: a 0.1 cm de la superficie; T4: superficie. Simulados: Tsc: a 3 cm de la superficie; Tss: superficie.

Pese a las diferencias observadas en los valores de temperatura y tomando en consideración las simplificaciones adoptadas (propiedades físicas constantes, volumen y peso constante), el método de representación de la geometría conjuntamente con el modelo matemático propuestos predicen aceptablemente el proceso real.

En cuanto a las medidas de humedad, se observa una desviación respecto a los valores experimentales. Al final de la simulación, el valor de la zona central fue de 0.75 (bh.), mientras que el experimental fue de 0.68 (bh.). Esta diferencia se debe probablemente a la pérdida de agua (“exudado”) comprobada durante la cocción. La pérdida de peso total promedio fue de 25 %, respecto a los valores iniciales (750 g). Por lo tanto, en un modelo posterior habrá que considerar este término.

CONCLUSIONES

En primer lugar, la metodología propuesta para el modelado de geometrías irregulares tridimensionales es una buena opción frente a las existentes. Cabe destacar que esta metodología es independiente del fenómeno de transferencia de calor y/o materia que se

quiera resolver, por lo tanto, la misma puede resultar de suma utilidad en la simulación de cualquier otro proceso de la industria de alimentos.

En segundo lugar, este primer modelo presentado para simular la cocción reproduce aceptablemente los resultados experimentales. No obstante, las diferencias encontradas entre los perfiles de temperatura y humedad experimentales y calculados indican la necesidad de trabajar en el desarrollo de un modelo más completo, evitando as simplificaciones realizadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

AutoCAD 2000, Autodesk Inc., CA, USA.

Chen, H., Marks, B. P., Murphy, R. Y. *Modeling coupled heat and mass transfer for convection cooking of chicken patties.* J Food Eng **42** (1999) 139-146.

FEMLAB 2.2, COMSOL Inc., MA, USA.

Holtz, E., Skjöldebrand, C. *Simulation of the temperature of a meat loaf during the cooking process.* J Food Eng **5** (1986) 109-121.

Huang, E., Mittal, G. S. *Meatball cooking-Modeling and simulation.* J Food Eng **24** (1995) 87-100.

Miles, C. A., van Beek, G., Veerkamp, C. H. *Calculation of Thermophysical Properties of Foods.* Project COST 90, Applied Science Publishers. London and New York, 1983.

Ngadi, M. O., Watts, K. C., Correia, L. R. *Finite element method modelling of moisture transfer in chicken drum during deep-fat frying.* J Food Eng **32** (1997) 11-20.

Sanz, P. D., Alonso, M. D., Mascheroni, R. H. *Thermophysical Properties of Meat Products: General Bibliography and Experimental Values.* Trans. ASAE., 38, 283 (1987).

Sastry, S. K., Beelman, R. B., Speroni, J. J. *A three-dimensional finite element model for thermally induced changes in foods: application to degradation of agaritine in canned mushrooms.* J Food Sci **50** (1985) 1293-1299.

Zorrilla, S., Singh, R.P. *Heat transfer in double-sided cooking of meat patties considering two dimensional geometry and radial shrinkage.* J Food Eng **57** (2003) 57-65.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de CONICET, ANPCyT y UNLP.

MODELADO Y SIMULACIÓN DE LA DESCONGELACIÓN Y EL CALENTAMIENTO DE ALIMENTOS MEDIANTE MICROONDAS

CAMPAÑONE, Laura A. (1,2) y ZARITZKY Noemí E. (1,2)

(1) Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. lacampa@ing.unlp.edu.ar. (2) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Argentina. UNLP-CONICET Calle 47 y 116. La Plata (1900) Argentina.

RESUMEN

El empleo de las microondas durante la descongelación acelera el proceso debido a su capacidad de generar energía dentro del producto. Sin embargo, existen algunos problemas asociados a la distribución de la temperatura, generados por la absorción preferencial de la energía electromagnética por parte del agua líquida (“runaway”). Con el fin de analizar el comportamiento de los alimentos durante la descongelación mediante microondas se desarrolló un modelo matemático que resuelve los balances microscópicos acoplados de energía y materia. El modelo se aplica a productos de gran tamaño para los cuales la ley Lambert es válida, obteniendo resultados equivalentes a los calculados por la aplicación de las leyes de Maxwell. El sistema se resolvió empleando un método de diferencias finitas implícito en sistemas unidimensionales y un método de dirección alternante en dos y tres direcciones. El modelo fue validado con datos de nuestro laboratorio así como también con datos experimentales de literatura.

ABSTRACT

The use of microwaves in thawing accelerates the process. However, there are some problems associated to temperature distribution within the products, owing to preferential absorption of electromagnetic energy by liquid water (“runaway”). To analyze the behavior of food microwave thawing, a mathematical method was developed by solving the unsteady state heat and mass transfer differential equations. The model was applied to large systems for which Lambert’s law is valid because it leads to similar results as Maxwell equations. The numerical solution was developed using an implicit finite difference method in one dimensional systems and an alternating direction method in two and three-dimensions. The model was validated with own data as well as with experimental data from literature.

Keywords: Microwaves, Thawing, Mathematical modelling.

INTRODUCCIÓN

La congelación es un método muy difundido y eficiente para la conservación de alimentos. La industria suele conservar sus materias primas en forma congelada y los procesos de descongelación empleados habitualmente son muy lentos, con el riesgo de crecimiento microbiano, deterioro del producto y la excesiva pérdida de agua causada por exudado. El empleo de las microondas durante la descongelación acelera el proceso debido a su capacidad de generar energía dentro del producto por interacción de la radiación con las moléculas de agua. Sin embargo, existen algunos problemas asociados a la desigual distribución de la temperatura dentro del producto, generados por la absorción preferencial de la energía electromagnética por parte del agua líquida, debido a las diferencias entre sus propiedades dieléctricas y las correspondientes al hielo (“runaway”). Este ha sido un factor determinante en la aplicación de esta tecnología a nivel industrial (Taoukis y col., 1987).

Con el fin de caracterizar la distribución de temperatura dentro de los productos, varios autores han abordado la temática de la descongelación con el empleo de microondas desde un punto de vista matemático. El modelado implica resolver en forma acoplada la distribución de temperatura, humedad y la absorción de energía electromagnética dentro del producto.

Para conocer la potencia absorbida por unidad de volumen se puede aplicar un procedimiento riguroso que consiste en evaluar la distribución de campo electromagnético resolviendo las ecuaciones de Maxwell (Ayappa y col., 1991), las mismas gobiernan la propagación de la radiación en un medio dieléctrico. En literatura existen varios trabajos que presentan la resolución de las ecuaciones de Maxwell durante el proceso de descongelación (Basak y Ayappa, 2002; Oliveira y Franca, 2002). Una aproximación a este método consiste en considerar un decaimiento exponencial de la absorción de la energía electromagnética en el interior del producto, cuyo comportamiento es descrito por la ley de Lambert; la aplicación de esta ley en la descongelación está contemplada en productos con tamaños mayores a un valor crítico (Ayappa y col., 1991). Varios autores abordaron el modelado considerando válida dicha ley (Taoukis y col., 1987; Zeng y Faghri, 1994; Chamchong y Datta, 1999; Taher y Farid, 2001).

Los objetivos de este trabajo comprenden:

-Caracterizar la distribución de temperatura y humedad dentro de los alimentos durante la descongelación por medio de microondas, resolviendo los balances de energía y materia

acoplados, los cuales tienen en cuenta la absorción de energía electromagnética y consideran propiedades térmicas y electromagnéticas variables con la temperatura.

-Validar las predicciones con datos de literatura y datos experimentales propios.

MODELADO MATEMÁTICO

Para predecir los perfiles de temperatura y humedad durante la descongelación de productos, se propuso un modelo matemático realizando las siguientes suposiciones:

- 1-Temperatura y concentración de agua iniciales uniforme en los productos,
- 2-Propiedades térmicas, de transporte y dieléctricas dependientes de la temperatura,
- 3-No se consideran cambios de volumen durante la descongelación,
- 4- Condiciones de contorno de transferencia térmica convectivas; vaporización en la interfase,
- 5- El campo eléctrico se considera incidente normal a la superficie.

Para describir la transferencia térmica se deben plantear ecuaciones de balance similares a la descongelación convencional considerando acoplado un término de generación interna debido a la energía aportada por las microondas (Ayappa y col., 1991). Así, el balance microscópico de energía es el siguiente:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) + Q \quad (1)$$

donde ρ es la densidad, k es la conductividad y Q es el término correspondiente a la generación volumétrica de energía por microondas. El modelo emplea un calor específico aparente que agrupa el calor específico sensible y el calor latente de solidificación del hielo (L_f):

$$C_p (T < T_{if}) = C_p (T > T_{if}) - L_f Y_0 \frac{\partial w}{\partial T} \quad (2)$$

donde Y_0 es el contenido inicial de humedad, T_{if} es la temperatura inicial de descongelación y w es la fracción másica de hielo.

En términos de potencia, la ecuación (1) se puede reescribir como:

$$V \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = V(\nabla k \nabla T) + P \quad (3)$$

Donde V es el volumen de producto y P es la potencia generada por absorción de las microondas.

Para completar el modelo, se plantean las siguientes condiciones iniciales y de contorno:

$$t = 0 \quad T = T_{ini} \quad 0 \leq x \leq L \quad (4)$$

$$x = 0 \quad -k \frac{\partial T}{\partial x} = 0 \quad t > 0 \quad (5)$$

$$x = L \quad -k \frac{\partial T}{\partial x} = h(T - T_a) + L_{\text{vap}} k'_m (C_w - C_{\text{equi}}) \quad (6)$$

Donde x es la coordenada axial, L es el semiespesor en dicha dirección, T_{ini} es la temperatura inicial, h es el coeficiente de transferencia de energía, T_a es la temperatura del aire, L_{vap} es el calor latente de vaporización, C_w es la concentración de humedad en la interfase del producto y C_{equi} es la concentración de equilibrio obtenida de la isoterma de sorción del producto expresada como Kg agua/volumen de muestra, k'_m es el coeficiente de transferencia de materia expresado en unidades equivalentes del alimento. Para los casos de transferencia bi y tri dimensional estas condiciones son válidas para todas las componentes espaciales consideradas.

La potencia absorbida por los materiales durante la descongelación con microondas está representado por el término P . La generación de calor es función de la temperatura en una posición determinada. En este trabajo, se considera válida la ley de Lambert (Lin y col., 1995), ya que se trabajó con dimensiones de alimentos mayores a valores críticos:

$$P = P_0 e^{(-2\alpha d)} \quad (7)$$

donde P_0 es la potencia superficial y α es el factor de atenuación.

Para conocer el perfil de humedad durante la descongelación de los productos se plantea el balance microscópico de materia considerando que el transporte de materia se realiza de acuerdo a la ley de Fick y se supone que el coeficiente de difusión depende de la temperatura. De acuerdo a estas suposiciones el balance microscópico de materia es:

$$\frac{\partial C_w}{\partial t} = \nabla(D_w \nabla C_w) \quad (8)$$

Para resolver el balance de materia se deben plantear las siguientes condiciones iniciales y de contorno:

$$t = 0 \quad C_w = C_{w,\text{ini}} \quad 0 \leq x \leq L \quad (9)$$

$$x = 0 \quad \frac{\partial C_w}{\partial x} = 0 \quad t > 0 \quad (10)$$

$$x = L \quad -D_w \frac{\partial C_w}{\partial x} = k'_m (C_w - C_{\text{equi}}) \quad t > 0 \quad (11)$$

Cuando la temperatura alcanza 100 °C se supone que la energía absorbida por radiación se emplea para vaporizar el agua y la condición (11) se transforma en:

$$x = L \quad J_m A L_{\text{vap}} = P \quad t > 0 \quad (12)$$

siendo J_m el flujo másico de agua vaporizada. Para los casos bi y tri dimensionales estas condiciones iniciales y de contorno son válidas para todas las componentes espaciales consideradas.

Los balances microscópicos de energía (eq. (2)) y de materia (eq. (8)) se encuentran acoplados y dichos balances con sus condiciones de contorno conforman un sistema de ecuaciones diferenciales no lineales. Para su resolución se empleó el método de Diferencias Finitas Implícito Crank-Nicolson.

Cuando se analizó la transferencia de energía y materia en forma unidireccional se empleó el método de Diferencias Finitas clásico (Campañone, 2001). Cuando la transferencia fue bi y tridimensional se empleó un esquema de resolución alternante (Cleland, 1979; 1991). Una descripción completa del método numérico de resolución se presenta en Campañone y Zaritzky (2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de validar el modelo numérico se realizaron experimentos de descongelación de productos empleando un horno microondas. Las muestras se realizaron con carne picada vacuna en forma de cubos. Las mismas se colocaron en envases de vidrio, material transparente a la radiación. La selección del tamaño de las muestras se realizó respetando el valor crítico impuesto por la validez de la ley de Lambert (Ayappa y col., 1991), por lo cual se trabajó con cubos de 6 cm de espesor.

Para simular la descongelación de alimentos, las experiencias se realizaron en un microondas (BGH), cuya potencia máxima es 1000 W, con un frecuencia de operación de 2450 MHz.

Previo a la realización de los experimentos las muestras se congelaron en un freezer a -20 °C y permanecieron en el interior del mismo durante un día. Otro grupo de muestras se conservó a -6 °C en una cámara frigorífica. La temperatura de las muestras, se midió antes y después del calentamiento, a través de termocuplas tipo T, las mismas se conectaron a un equipo de adquisición y control de datos Keithley DAS-TC/B, conectado a su vez a una PC.

La potencia absorbida por las muestras se midió por un método calorimétrico (Lin et al, 1995). Se propuso un modelo polinómico para la dependencia de la potencia con la cantidad de agua y se empleó un programa estadístico (SYSTAT 10) de regresión no lineal para estimar los parámetros del modelo y calcular la desviación. Así se obtuvo la siguiente relación:

$$P_o = 112.3 + 10.718 W - 0.0845 W^2 + 0.0002 W^3, \quad 50 \leq W(\text{gr}) \leq 200, \quad r^2 = 0.945 \quad (13)$$

La potencia obtenida a través de la ecuación (13) se alimentó como dato en la resolución del modelo matemático.

RESULTADOS Y DISCUSION

El modelo matemático se validó contra datos experimentales de temperatura obtenidos en literatura durante la descongelación con transferencia uni y bidimensional. Debido a la ausencia de datos de tiempos de descongelación o perfiles de temperatura o de humedad en transferencia tridimensional, el modelo se validó utilizando datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio. El modelo empleó un incremento temporal de 0.1 s y en cada dirección se dividió el dominio en 15 incrementos espaciales. Las propiedades térmicas de los productos se presentaron en Campañone (2001), mientras que en el modelo se utilizaron las propiedades electromagnéticas presentadas por Taher y Farid (2001) y Chamchong y Datta (1999).

Para validar el modelo en transferencia unidimensional, se emplearon datos experimentales de temperatura obtenidos por Taher y Farid (2001). En este trabajo los autores estudiaron la descongelación de carne picada en forma de placa plana (4 cm de espesor), midiendo la temperatura en distintas posiciones internas. En la Figura 1 se muestran los datos experimentales (Taher y Farid, 2001) y los resultados numéricos obtenidos en el presente trabajo.

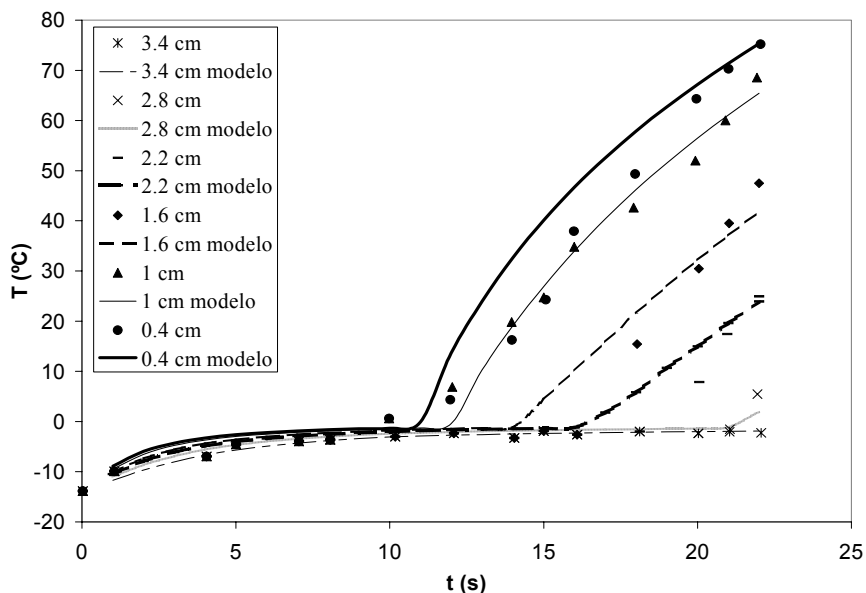


Figura 1: Perfiles de temperatura obtenidos durante la descongelación de carne picada (placa plana, 4 cm de espesor): predicciones numéricas (líneas) y datos experimentales obtenidos por Taher and Farid (2001) en diferentes posiciones internas (símbolos).

Analizando la forma de los perfiles se puede observar que mientras el producto permanece congelado el perfil es uniforme; a medida que el producto se descongela cambian las propiedades térmicas y dieléctricas, aumentando rápidamente la temperatura en la zona descongelada. El punto caliente lo constituye la superficie, comportamiento predicho por la ley de Lambert. Con respecto a la bondad de la predicción se observa muy buena concordancia con los datos experimentales. El modelo desarrollado en este trabajo sigue el comportamiento general de los datos experimentales en todas las posiciones estudiadas.

Para validar las predicciones numéricas con datos en transferencia bidimensional se emplearon datos de Chamchong y Datta (1999). En este trabajo los autores midieron la temperatura en el centro y 1 cm debajo de la superficie de un bloque de tilosa (con 3% de sal) durante la descongelación. Presentan datos de temperatura inicial y final (temperatura superficial final $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$) para descongelación empleando distintos niveles de potencia. Resultados experimentales y los valores predichos por nuestro modelo se presentan en la Figura 2(a). Se puede observar que los resultados numéricos predicen correctamente los valores observados experimentalmente.

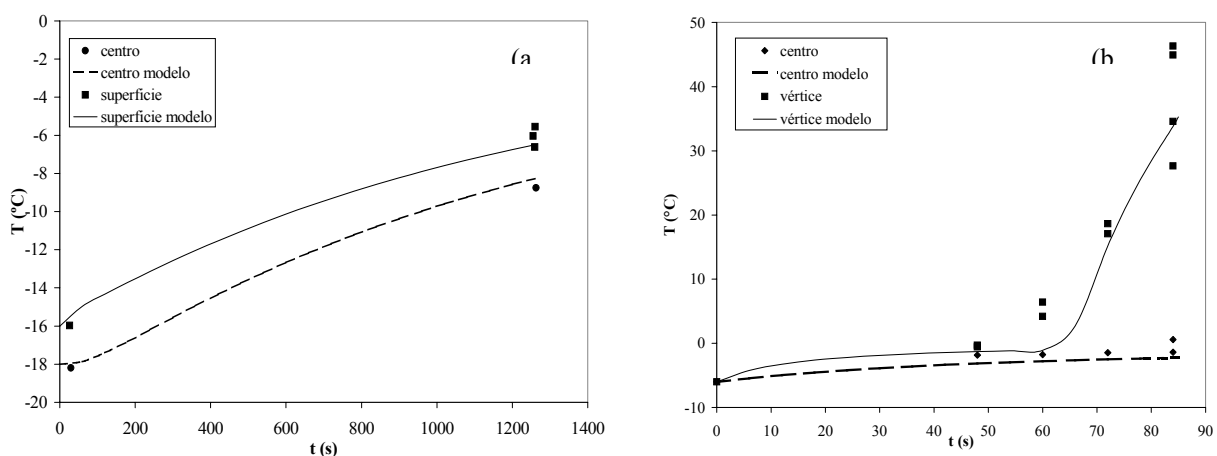


Figura 2: Perfiles de temperatura predichos por el modelo numérico y resultados experimentales obtenidos en :(a) bloques de tilosa, transferencia 2D (Chamchong and Datta (1999), símbolos) (b) bloques de carne picada (este trabajo, símbolos), transferencia 3D.

Por último el modelo se validó en transferencia tridimensional contra datos obtenidos en nuestro laboratorio en cubos de carne picada. Se midieron los valores de temperatura del centro y de los vértices en función del tiempo. En la Figura 2(b) se presentan los valores experimentales y numéricos de temperatura en las posiciones estudiadas. Se observa en ambos casos que el modelo matemático predice con bastante exactitud la temperatura en función del tiempo. Existe mayor desviación cuando la temperatura supera $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, y esto se debe fundamentalmente a dos fuentes de error: (1) experimental: posicionamiento de

las termocuplas en las esquinas del producto, (2) numérico: la composición del producto afecta fuertemente las propiedades dieléctricas (Gunasekaran, 2002).

CONCLUSIONES

En este trabajo se resolvieron en forma satisfactoria los balances microscópicos de energía y materia durante la descongelación mediante microondas. El modelo se validó considerando transferencia de energía y materia uni, bi y tridimensional. Con el empleo del mismo en un próximo trabajo se podrá apreciar el efecto de las características de los productos y de la forma de operación en los perfiles de temperatura, pérdida de agua y tiempo de proceso. Es aplicable en las condiciones que se observan en las prácticas habituales de descongelación de piezas grandes con el empleo de microondas.

BIBLIOGRAFIA

- Ayappa K.G., Davis H.T., Crapiste G., Davis E.A., Gordon J. (1991).** Microwave heating: an evaluation of power formulations. *Chemical Engineering Science*, 46 (4), 1005-1016.
- Basak T. and Ayappa K.G. (2002).** Role of length scales on microwave thawing dynamics in 2D cylinders. *Int. Journal of Heat and Mass Transfer*, 45, 4543.
- Campañone L. A. (2001).** Transferencia de calor y materia en congelación y almacenamiento de alimentos, sublimación de hielo, calidad, optimización de condiciones de proceso. Tesis doctoral, Facultad de Ingeniería, UNLP, Argentina.
- Campañone L.A., Zaritzky N.E. (2005).** Mathematical analysis of microwave heating process, *Journal of Food Engineering*, 69, 359.
- Chamchong M., Datta A.K. (1999).** Thawing of foods in a microwave oven: I. Effect of power levels and power cycling. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 34(1), 9.
- Cleland A.C., Earle R.L. (1979).** Prediction of freezing times for foods in rectangular packages. *Journal of Food Science*, 44, 964.
- Cleland D.J., Cleland A.C. (1991).** An alternating direction, implicit finite difference scheme for heat conduction with phase change in finite cylinders. In *Proceedings of the XVIII International Congress of Refrigeration*, Montreal, 356.
- Gunasekaran N. (2002).** Effect of fat content and food type on heat transfer during microwave heating. MS Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA.
- Lin Y.E., Anantheswaran R.C., Puri V.M. (1995).** Finite element analysis of microwave

heating of solid foods. *Journal of Food Engineering*, 25, 85.

Oliveira M.E.C., Franca A.S. (2002). Microwave heating of foodstuffs. *Journal of Food Engineering*, 53, 347.

Taher B. H., Farid M.M. (2001). Cyclic microwave thawing of frozen meat: experimental and theoretical investigation. *Chemical Engineering and Processing*, 40, 379.

Taoukis P., Davis E.A., Davis H.T., Gordon J. and Talmon Y.(1987). Mathematical modeling of microwave thawing by the modified isotherm migration method., *Journal of Food Science*, 2, 455.

Zeng X., Faghri A. (1994). Experimental and numerical study of microwave thawing heat transfer for food materials. *Transactions of ASME*, 116, 446.

CAMBIOS DE COLOR, VOLUMEN Y VITAMINA C DURANTE EL SECADO DE ANANÁ

RAMALLO¹, Laura A. y MASCHERONI², Rodolfo H.

¹Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Universidad Nacional de Misiones
Felix de Azara 1552 - (3300) Posadas, Misiones - Argentina

²CIDCA (CONICET - UNLP). 47 y 116 – (1900) La Plata – Argentina lr.am@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Se estudiaron los cambios de color, volumen y pérdida de vitamina C de medias rodajas de ananá durante el secado bajo diferentes condiciones (45, 60 y 75°C). Los cambios en el color se evaluaron con un colorímetro Hunterlab a diferentes tiempos de secado. El parámetro de color hue cambia significativamente con el contenido de humedad, pero esta variación no depende de la temperatura del proceso. La variación del espesor de la rodaja de ananá fue independiente de la temperatura de secado y siguió un comportamiento lineal con el contenido de humedad. La contracción en la dirección radial fue tres veces menor que la pérdida de espesor. El contenido de ácido ascórbico se cuantificó mediante cromatografía líquida (HPLC). Para un valor de humedad definido, la retención del ácido ascórbico fue similar a 60 y 75°C, pero se observó mayor retención cuando la temperatura de secado fue de 45°C.

Palabras clave: ananá, encogimiento, color, secado, ácido ascórbico

ABSTRACT

The changes of color, volume and loss of vitamin C in pineapple half slices during drying under different conditions (45, 60 and 75 °C) were studied. Changes in color were evaluated by a Hunterlab colorimeter at different times of drying. The hue color parameter changes significantly with the moisture content, but this variation does not depend on process temperature. Thickness variation of the pineapple slice was independent of the drying temperature and followed a linear behavior with moisture content. Shrinkage in the radial direction was three times smaller than the loss of thickness. Ascorbic acid content was quantified by liquid chromatography (HPLC). For a defined moisture value, the retention of ascorbic acid was similar at 60 and 75°C, but a higher retention was observed when the drying temperature was fixed in 45°C.

INTRODUCCIÓN

El secado de alimentos de alta humedad, como las frutas, genera gran cantidad de cambios físicos y químicos. Algunos son directamente percibidos por el consumidor, como el color, otros afectan la calidad nutricional, como la pérdida de nutrientes y otros modifican la cinética y el diseño de los equipos, como la variación de volumen.

Desde el punto de vista nutricional, el ananá es importante en la dieta por su aporte de vitamina C, fibras y minerales. La degradación del ácido ascórbico (AA) se ve afectada por numerosos factores tales como la temperatura, la actividad del agua, el pH, el tiempo de almacenamiento, etc. (Fennema, 1993; Pardo Seda et al., 1994; Uddin et al., 2002; Nunes et al., 1998). La magnitud de la retención del AA durante el secado de vegetales, alimentos éstos de alto contenido de humedad y compleja composición química, depende de las condiciones con que se efectúe este proceso.

Debido a que durante el proceso de deshidratación se produce un cambio importante en el volumen de la fruta, éste debe ser tenido en cuenta al plantear las ecuaciones matemáticas para la predicción del tiempo de secado. Los modelos de predicción de los cambios de volumen y área superficial durante el secado de alimentos suelen ser el resultado del ajuste de los datos experimentales (Ramallo et al., 2001; Bernardi et al., 2001; Ratti, 1994; Lozano et al., 1983).

El color del ananá es un factor decisivo en la aceptabilidad del producto ya que un leve tono amarillo está asociado al grado de madurez y al desarrollo del flavour característico de la fruta (Bartolomé et al., 1996). El aumento de la temperatura durante el secado genera en los vegetales complejas reacciones de pardeamiento y degradación de pigmentos, al mismo tiempo que la deshidratación genera sencillamente la concentración de algunos pigmentos. Esta evolución del color puede cuantificarse objetivamente mediante medidas instrumentales y analizar de esta manera el efecto del procesamiento sobre las características del color.

Los objetivos del presente trabajo fueron cuantificar y analizar cambios en el color, volumen y contenido de vitamina C durante el secado convectivo de medias rodajas de ananá a diferentes temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las frutas de ananá (*Anana comosus*) utilizadas en los ensayos se obtuvieron de locales comerciales. Las frutas fueron peladas manualmente y cortadas en medias rodajas de 0.6

cm de espesor y 11.5 ± 0.5 cm de diámetro; con un sacabocados se les retiró el centro. Debido a que existe variación en el contenido de azúcar, vitamina C (Ramallo y Mascheroni, 2004) y, a simple vista, color entre la base y la parte superior de la fruta, solo fue utilizada la zona central de cada fruta.

Para analizar la variación de área se registró el contorno de cada muestra marcada para su posterior identificación; el espesor se tomó como el valor medio de las mediciones en tres puntos de cada muestra.

Procedimiento de secado

Las experiencias de secado se llevaron a cabo en un secadero convectivo de flujo transversal bajo condiciones constantes de velocidad de aire (3 m/s) y temperatura (45, 60, 75°C), con tres repeticiones a cada temperatura. En cada ensayo, 14 medias rodajas de ananá se colocaron dentro de dos cestas de aluminio evitando el contacto entre los trozos de fruta. A tiempos preestablecidos (cada 10 min durante la primer hora de secado y posteriormente cada 15 min), se retiró una cesta del secadero y se registró su peso para la determinación de las curvas de secado; de la otra cesta, cada 30 minutos aproximadamente, se extrajeron tres muestras a las cuales se les midió los valores de L , a y b ; de inmediato las mismas muestras se fraccionaron en dos partes: a una se le determinó la humedad y a la otra, el contenido de ácido ascórbico, ambas determinaciones por duplicado. Los tiempos del proceso de secado fueron: 6 horas a 45°C, 3.5 horas a 60°C y 150/180 min a 75°C.

Se midió el espesor de las medias rodajas de ananá con un calibre manual sobre seis muestras a distintos tiempos de secado, a las tres temperaturas de trabajo. Las mediciones fueron realizadas tan rápidamente como fuera posible, para no afectar el proceso. Se registró el cambio en el área transversal de las medias rodajas de ananá al cabo de 3.5 hs. de secado a 60°C y 3 hs. a 75°C. El espesor fue expresado como la relación del valor medido a cada tiempo respecto al valor inicial (E/E_0).

Evaluación del color

La lectura instrumental del color se realizó con un Colorímetro Triestímulo HunterLab D25A-9, a diferentes tiempos de secado. Las muestras de ananá se colocaron dentro de una caja de Petri de 6 cm de diámetro y 1 cm de profundidad, superponiendo los trozos de manera tal de cubrir completamente la superficie, generando así un lecho que actúa como un sólido opaco. Durante la lectura, el recipiente conteniendo las muestras se cubrió con una caja cilíndrica negra. Cada medida se registró como la media de cuatro lecturas sobre una misma muestra, rotando el recipiente 90° entre cada lectura. A tiempo cero (fruta fresca) las mediciones se realizaron por triplicado, tomando muestras de diferentes

sectores de la fruta. Se registraron los valores de L (lightness), a (+a=rojo, -a=verde) y b (+b=amarillo, -b=azul). Se utilizaron los siguientes parámetros del color:

- Ángulo $hue = \tan^{-1}(b/a)$
- $Chroma = (a^2 + b^2)^{1/2}$

Determinación del contenido de ácido L-ascórbico

Proceso de Extracción: Cada muestra fue pesada y triturada en un mortero de porcelana durante 5 minutos, con la adición, en forma gradual, de 50 ml de solución buffer (pH 2.5). Esta mezcla se transfirió a un vaso de vidrio oscuro, se sometió a ultrasonido por 10 minutos, se filtró y de inmediato, se inyectó al cromatógrafo.

Cuantificación del ácido L-ascórbico: se llevó a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC), con columna Alltima C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) y detector UV ($\lambda = 254$ nm). Se utilizó una fase móvil formada por buffer (fosfato de potasio 0.02M, pH=2.5 ajustado con ácido fosfórico): acetonitrilo (98:2 v/v) a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La identificación y cuantificación se realizó por comparación del tiempo de retención y magnitud del área del pico con un Standard de referencia.

Standard de referencia: las muestras standard de ácido L-ascórbico se prepararon diluyendo 100 mg de ácido L-ascórbico (A-0278, SIGMA) en 100 ml de buffer; posteriormente esta solución se diluyó 1/10, 1/50 y 1/100. Se inyectaron 10 μ l de cada una de estas soluciones para verificar que la relación concentración-área mantiene comportamiento lineal en este rango de concentraciones. Se tomó como referencia el área obtenida con la inyección de 10 μ l de standard concentración 0.02 mg/ml (técnica de patrón externo); se cuantificó el área de referencia al iniciar y al finalizar cada cesión de cromatografía.

Los análisis en todos los casos se realizaron por duplicado y los resultados que se exponen son los valores medios.

Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó gravimétricamente, mediante secado en estufa a 75°C hasta pesada constante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Color

Los valores de a y b aumentan durante el secado a 45 y 60°C. A 75°C solo se aprecia aumento en el parámetro a (de -14 a -7), lo cual indicaría que nos alejamos de la región

con pigmentación verdosa. Los valores de L se mantienen prácticamente constantes, revelando que no se generan tonos grises durante el proceso.

En todos los casos se observa que la fruta fresca presenta un valor de hue mayor a 100; en la medida que avanza la deshidratación este valor disminuye (aumento de coloración amarilla), aunque en ningún caso se registraron valores menores a 90° .

El hue fue el parámetro de color que presentó cambios más significativos y consistentes durante el proceso. Se encontró que la variación del hue con el tiempo de secado presenta comportamiento lineal y que la velocidad de cambio aumenta con la temperatura del proceso (Figura 1).

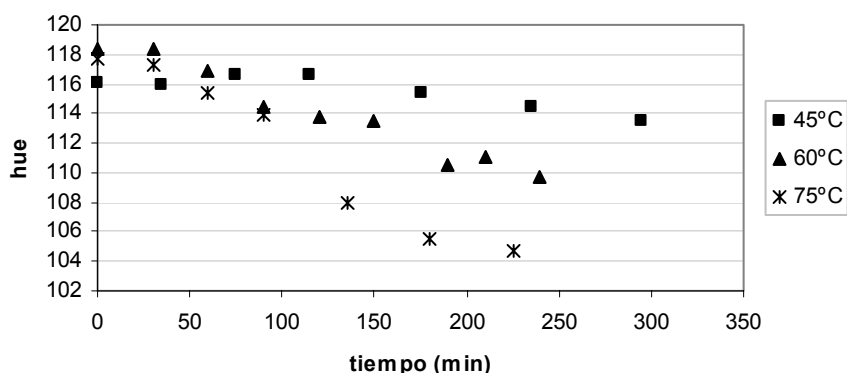


Figura 1: Cambio en los valores de hue de medias rodajas de ananá, durante el secado a distintas temperaturas.

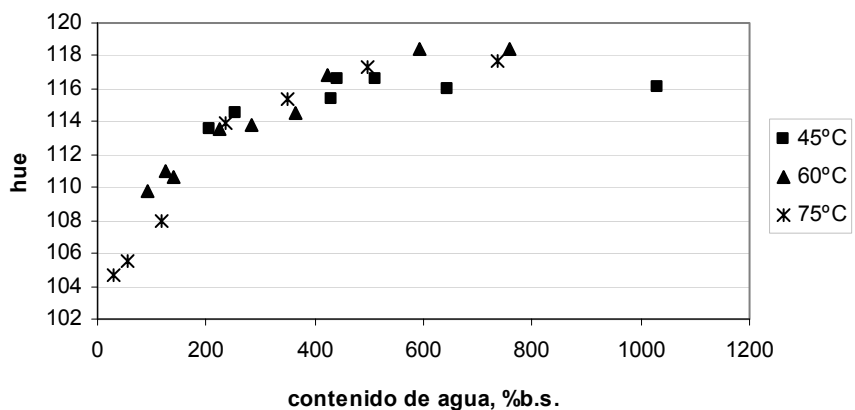


Figura 2: Variación en los valores de hue en función al contenido de humedad de la fruta durante el secado a 45, 60 y 75°C

El análisis estadístico de los resultados indica que el parámetro hue presenta un comportamiento semilogarítmico con el contenido de humedad y el modelo empírico resultante no presenta diferencias con la temperatura de secado (Figura 2). En dicha figura se puede apreciar que el parámetro hue permanece constante hasta un contenido de humedad de aproximadamente 500 %b.s.; luego disminuye en la medida que avanza

la deshidratación y en forma independiente a la temperatura de secado. Por estas observaciones experimentales, los cambios en el color pueden ser atribuidos a la simple concentración de los pigmentos durante el secado y a alguna reacción de caramelización a 75°C cuando el ananá ya tiene bajo contenido de agua. Se observa que el *chroma* aumenta durante el secado a 45 y 60°C; los resultados registrados a 75°C muestran muy poca variación en este parámetro.

Contenido de ácido L-ascórbico

La máxima retención de AA se obtuvo durante el secado a 45°C. Se observó que las diferencias en los valores del contenido de AA en la fruta fresca (C_0) no afecta la cinética de deterioro, ya que el comportamiento global de las experiencias en tres repeticiones fue similar, tanto a 45°C como a 60°C (Fig. 3.a y 3.b). A 75°C la dispersión de los resultados es importante; la alta variabilidad no pudo atribuirse a diferencias en los valores de C_0 ni en el pH de las frutas (Fig. 3.c). Similar situación de variabilidad se observó en vegetales verdes (Giannakourou and Taoukis, 2003) y durante el secado de persimmons (Nicoletti et al., 2004), entre otros.

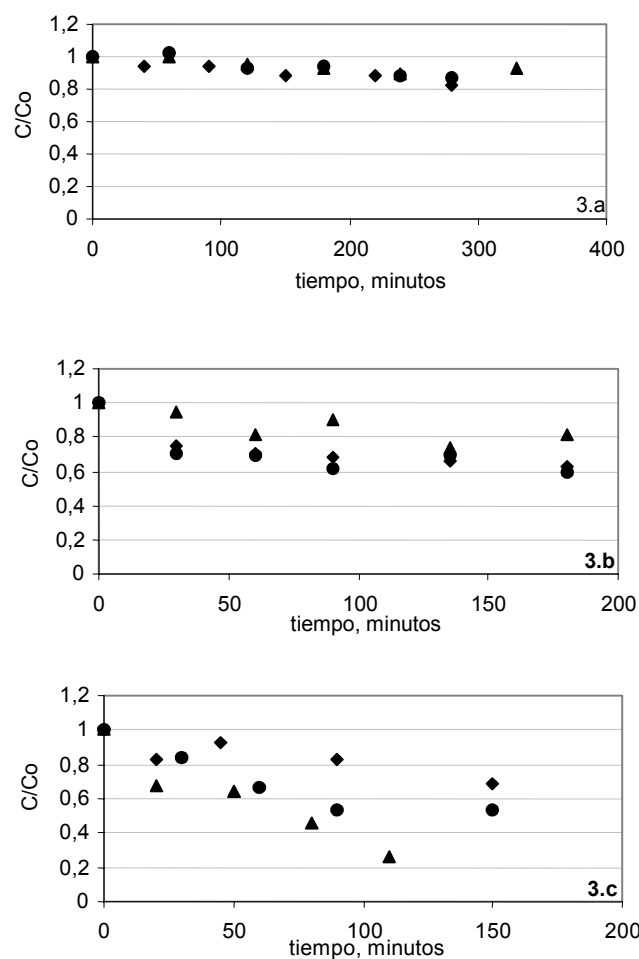


Figura 3: Contenido de ácido l-ascórbico (relativo a su valor inicial) durante el proceso de secado a 45°C (3.a), 60°C (3.b) y 75°C (3.c). Diferentes símbolos corresponden a diferentes muestras

Un incremento en la temperatura de secado favorece la velocidad del proceso, pero simultáneamente se incrementa la velocidad de degradación del AA (Ramallo y Mascheroni, 2004). El tiempo requerido para que el contenido de humedad descienda al 50% y al 30% del valor inicial y la respectiva retención de ácido ascórbico, a cada temperatura, se muestran en la Tabla 1. Cada valor es el resultado de la media de tres ensayos y se presentan junto al desvío Standard consecuente. Se observa que el tiempo necesario para alcanzar determinado valor de W/W_0 es menor a 75°C que a 45°C, sin embargo la retención de ácido ascórbico es mayor a 45°C.

En la figura 4 se muestra la retención de ácido ascórbico en función al contenido de humedad en ananá durante el secado a tres temperaturas diferentes. Para un dado valor de humedad, la retención del AA es similar a 60 y 75°C, pero se observa claramente una mayor retención durante el secado a 45°C.

Tabla 1: retención de ácido ascórbico en medias rodajas de ananá, cuando el contenido de humedad alcanza el 50% y el 30% del valor inicial

Temperatura de secado (°C)	50% de la humedad inicial		30% de la humedad inicial	
	Tiempo (min.) ± ds	% de retención de ácido ascórbico ± ds	Tiempo (min.) ± ds	% de retención de ácido ascórbico ± ds
45	115.0 ± 18.02	93.9 ± 1.01	231.7 ± 27.54	88.7 ± 0.58
60	71.0 ± 3.60	79.7 ± 5.13	133.3 ± 7.64	71.3 ± 8.08
75	45.0 ± 5.00	73.3 ± 11.37	80.0 ± 10.00	63.0 ± 19.67

Variación del volumen

Se analizó la dependencia del encogimiento (E/E_0) con el contenido de humedad adimensional, W/W_0 (W es el contenido de agua actual y W_0 es el contenido de agua inicial). Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la variación de espesor se analizaron individualmente los resultados experimentales obtenidos a cada temperatura y se encontró que no existen diferencias significativas, en el rango de 45 a 75°C. El modelo que mejor representa el comportamiento del sistema es el modelo lineal, con un coeficiente de correlación para esta regresión de 0.9487:

$$E/E_0 = 0.3047 + 0.7323 W/W_0 \quad (1)$$

La Fig. 5 muestra los resultados experimentales de la variación del espesor con la humedad adimensional durante el secado a 45, 60 y 75°C y los valores predichos por la

Ec. (1). El error Standard de la estimación es de 0.0736, este valor puede usarse para construir los límites de predicción del modelo al 95% de confianza.

El área superficial de las muestras al final del secado varía entre el 75 y el 80% del área original (fruta fresca), en tanto que en las mismas experiencias el espesor es del 26% del espesor original.

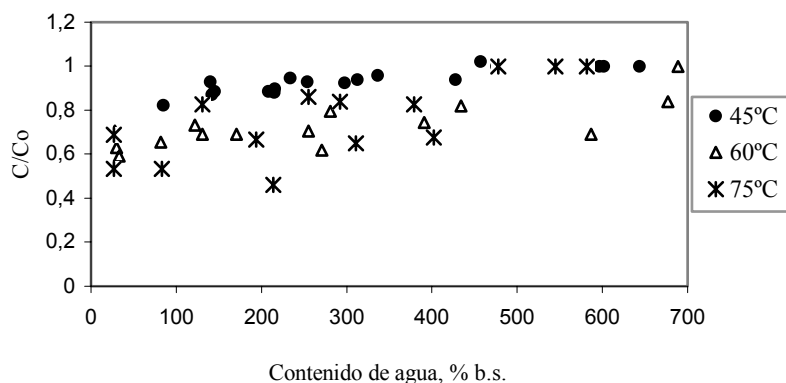


Figura 4: Contenido de ácido ascórbico en ananá durante el proceso de secado a diferentes temperaturas, en función a su contenido de humedad.

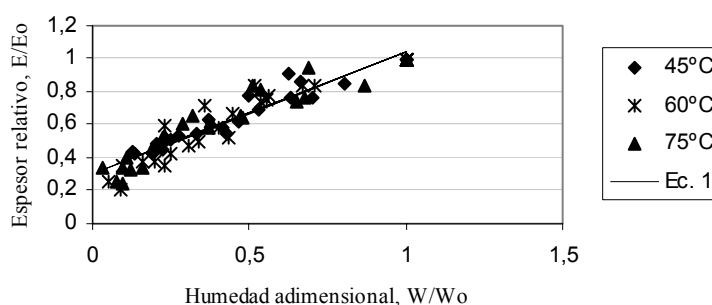


Figura 5: Variación del espesor la humedad adimensional durante el secado a diferentes temperaturas. La línea continua muestra los valores predichos por la Ec. (1)

CONCLUSIONES

El *hue* fue el parámetro de color que presentó cambios más significativos y consistentes durante el secado; determinándose una estrecha relación entre este parámetro y el contenido de humedad de la fruta de modo independiente de la temperatura del proceso, por lo que los cambios en el color pueden ser atribuidos simplemente a la concentración de los pigmentos durante la deshidratación.

La máxima retención de AA se obtuvo durante el secado a 45°C. Se observó que las diferencias en los valores del contenido de AA en la fruta fresca (C_0) no afectan la cinética de deterioro.

El modelo que mejor representa la dependencia de la disminución del espesor con el contenido de humedad de la fruta durante el secado es el modelo lineal, estableciéndose que dicho comportamiento es independiente de la temperatura del proceso. La contracción en la dirección radial es tres veces menor que la pérdida de espesor.

BIBLIOGRAFÍA

Bartolome, A.; Ruperez, P. and Fuster, C. (1996) Freezing rate and frozen storage effects on color and sensory characteristics of pineapple fruit slices. *Journal of Food Science*, 61 (1): 154-156.

Bernardi, I.; Vullioud, M.; Márquez, C. and De Michelis, A. (2001) Change of volume and area during air dehydration of whole rose hip fruits. *Proceedings of ENPROMER 2001*, Santa Fe, Argentina; vol. III, pp. 1447-1452.

Fennema, O.R. (1993) *Química de los Alimentos*. Zaragoza, Spain: Editorial Acribia.

Lozano, J.; Rotstein, E. and Urbicaín, M. (1983). Shrinkage, Porosity and Bulk Density of Foodstuffs at Changing Moisture Content. *Journal of Food Science*. 48: 1497-1502.

Nunes, M.C., Brecht, J.K., Morais, A.M. and Sargent, S.A., (1998), Controlling temperature and water loss to maintain ascorbic acid levels in strawberries during postharvest handling, *Journal of Food Science*, 63, pp. 1033-1069.

Pardio Sedas, V., Waliszewski Kubiak, K.N. and Garcia Alvarado, M., (1994), Ascorbic acid loss and sensory changes in intermediate moisture pineapple during storage at 30-40°C, *International Journal of Food Science and Technology*, 29, pp. 551-557.

Ramallo, L.; Pokolenko, J.; Balmaceda, G. and Schmalko, M. (2001) Moisture diffusivity, shrinkage and apparent density variation during drying of leaves at high temperatures. *International Journal of Food Properties*, vol. 4(1), pp. 163-170.

Ramallo, L.A. and Mascheroni, R.H. (2004) Prediction and determination of ascorbic acid content during pineapple drying. *Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004)*, São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol. C, pp. 1984-1991

Ratti, C. (1994). Shrinkage during drying of foodstuffs. *Journal of Food Engineering*, 25: 91-105.

Uddin, M.S.; Hawlader, M.N.A.; Luo Ding and Mujumdar, A.S. (2002) Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage. *Journal of Food Engineering*, 51, pp. 21-26.

Giannakourou, M.C., Taoukis, P.S., (2003), Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions, *Food Chemistry*, 83, pp. 33-41.

Nicoletti, J.; Silveira-Junior, V.; Telis-Romero, J. and Telis, V. (2004) Ascorbic acid degradation during convective drying of persimmons with fixed temperature inside the fruit.

Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol. C, pp. 1836-1843.

VARIABILIDAD DE PROPIEDADES FÍSICAS DE HÍBRIDOS DE GIRASOL CULTIVADOS EN BALCARCE (Argentina)

DI LEO M. José, RICCOBENE Isabel C. y NOLASCO Susana M.

GI TECSE, Depto. Ing. Qca., Facultad de Ingeniería, UNCPBA, Av. del Valle 5737, B7400JWI-Olavarría, Bs. As., Argentina. Tel.: (54-2284)451055/56. E-mail.: snolasco@fio.unicen.edu.ar; iriccobe@fio.unicen.edu.ar.

RESUMEN

El diseño de cosechadoras, equipos de transporte y descascarado, secado y almacenamiento, entre otros, requiere del conocimiento de las propiedades físicas de los granos y/o semillas. El objetivo del trabajo fue analizar la variabilidad de características físicas de híbridos de girasol cultivados en Argentina. Se analizaron diez híbridos de girasol tradicional cultivados en Balcarce. Se emplearon tres híbridos de cáscara estriada de bajo porcentaje de aceite potencial y siete híbridos de cáscara negra de alto porcentaje de aceite potencial. Para el conjunto de híbridos el contenido de aceite osciló entre 43,8-54,1%, valores superiores a la actual base de comercialización en Argentina. El análisis estadístico de la varianza permitió detectar diferencia estadísticamente significativa entre híbridos para el peso de mil granos, contenido y espesor de cáscara, largo y ancho del grano, densidad volumétrica y real, diámetro equivalente, volumen y aptitud al descascarado ($P \leq 0,01$). El efecto del genotipo no fue significativo para el espesor del grano y la porosidad del lecho.

Palabras claves: Girasol, *Helianthus annuus* L., híbridos, granos, variabilidad, propiedades físicas.

ABSTRACT

The physical properties of grains are essential for equipment designing related to handling, harvesting, aeration, drying, storing, dehulling and processing. The objective of this work was to examine the physical properties variability of sunflower hybrids seeds grown in Argentina. Ten traditional hybrids samples grown in Balcarce, three of stripped hull and lower potencial percentage of oil, and seven of black hull and higher potencial percentage of oil were evaluated. The oil content varied from 43.8 to 54.1%, being a superior value in comparison to the commercialisation base in Argentina. Significant differences ($P \leq 0.01$) among hybrids were detected for weight of one thousand seed, the hull content, the hull

thickness, the length and width of seed, the bulk density, the true density, the equivalent diameter, volume and dehulling ability. No significant differences among hybrids were detected for the seed thickness and bulk porosity.

Key words: Sunflower, *Helianthus annuus* L, hybrids, seed, variability, physical properties.

INTRODUCCIÓN

El girasol es cultivado principalmente para obtener aceite a partir del procesamiento de sus granos. El conocimiento de las características de los granos productores de aceite, en especial aquellas que afectan de manera directa o indirecta el proceso tecnológico de producción de aceite y harinas, contribuyen al control de la materia prima que ingresa al/los procesos, factor fundamental dentro del desarrollo de la agro-industria. Algunas propiedades físicas de estos granos y su comparación con otras semillas se consideran necesarias para el diseño apropiado de equipos de transporte, cosechadoras, equipos de descascarado, secado, almacenamiento y otros procesos. Diferentes estudios del efecto de la humedad sobre las propiedades de diferentes granos han sido realizados, entre ellos podemos citar trabajos sobre soja (Deshpande y col., 1993); girasol (Gupta y Das, 1997); cártamo (Baumler y col., 2005) y quinoa (Vilche y col., 2003). Sin embargo, es escasa la bibliografía referida al efecto de factores genéticos sobre las propiedades físicas del grano de girasol (Di Leo y col., 2004). Tanto los factores genéticos como los ambientales determinan el desarrollo y el rendimiento del girasol y pueden, en mayor o menor medida, ser manipulados por el hombre con el objeto de aumentar la cantidad y la calidad de los alimentos disponibles para la humanidad. Debido al interés económico que representa un aumento del porcentaje de aceite en los granos de girasol, se han realizado considerables esfuerzos vía mejoramiento genético para lograr incrementos en dicho contenido. Un importante aumento en el porcentaje de aceite en los granos de girasol (37% hasta un 49%) se observa al comparar los cultivares ofrecidos en nuestro país para ser sembrados comercialmente desde la década del 1930 hasta 1995 (Aguirrezábal y Pereyra, 1998). La introducción en Argentina de cultivares de cáscara negra, de mayor porcentaje de pepa que los de cáscara estriada, fue uno de los factores preponderante en el incremento del porcentaje de aceite logrado. El objetivo del trabajo fue analizar la variabilidad de características físicas de híbridos de girasol cultivados en Argentina. Las propiedades analizadas fueron longitudes características, peso de mil granos, contenido y espesor de cáscara, densidad real y volumétrica, porosidad, volumen, diámetro equivalente y aptitud al descascarado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siete híbridos de girasol tradicional de cáscara negra (CN): Jaguel, Paraíso 20, Contiflor 11, Rancul, Zenit, Dekasol 3900, Cariló y tres híbridos de cáscara estriada (CE): Morgan 742, ACA 884 y Pyramid-1 se sembraron a campo en la Unidad Integrada Balcarce (37°45' LS y 58°18' LO, Provincia de Buenos Aires, República Argentina) con un diseño experimental de bloques completos aleatorizados, con tres repeticiones. La cosecha se realizó cuando los granos tenían 11% de humedad. Los granos fueron limpiados manualmente, desechando todo tipo de material extraño como también los granos rotos e inmaduros. Se homogeneizó la humedad de las muestras por secado (estufa de aire forzado, a 40-45°C), las que fueron posteriormente almacenadas a baja temperatura ($\gg 5^{\circ}\text{C}$) durante un período mayor a 72 horas. Antes de realizar las mediciones, la cantidad de granos necesarios fueron llevados a temperatura ambiente. Se caracterizaron las muestras respecto a humedad (AOAC 1980), porcentaje de cáscara (separación manual), rendimiento porcentual de aceite (RMN, Robert y Morrison, 1979) y peso de mil granos (gravimetría). Los datos son promedio de triplicados y se expresan en base seca (b.s.). Para determinar el tamaño de los granos se tomaron muestras al azar de 30 granos. Para cada grano individual, se midieron las tres principales dimensiones, llamadas largo (L), ancho y espesor y el espesor de la cáscara, utilizando un micrómetro de exteriores (DP-1HS, Digimatic Mini-Processor, Mitutoyo) (Figura1).

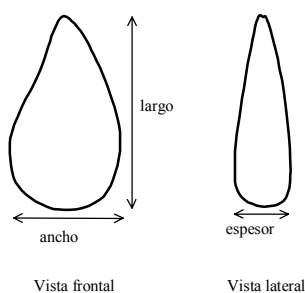


Figura 1 Dimensiones características del grano de girasol.

La densidad volumétrica (ρ_b), relación entre la masa de la muestra y el volumen total de los granos, se determinó utilizando una balanza de peso hectolítrico (volumen total 250 ml). La densidad real (ρ_t), definida como la relación entre el peso de la muestra y su volumen, fue determinada por picnometría (método de desplazamiento de líquido-agua-). La porosidad (ϵ), definida como la fracción de espacios en un volumen de granos que no se encuentran ocupados por los mismos (Gupta y Das, 1997), fue calculada con la

siguiente relación (Mohsenin, 1986): $\varepsilon = (1 - \rho_b / \rho_t) * 100$. El volumen (V_g) de un grano (mm^3) fue determinado con la siguiente relación (Ozarlan, 2002): $V_g = (m / \rho_t) / 103$, donde m es el peso de un grano (g.) determinado desde las muestras utilizadas para calcular la densidad real. El diámetro equivalente (D_e), definido como el diámetro de una esfera que tiene el mismo volumen de la partícula se determinó utilizando la siguiente expresión: $D_e = (6 V_g / \pi)^{1/3}$, donde V_g indica el volumen del grano. La aptitud al descascarado (AD) se determinó en un equipo piloto, basado en un proceso centrífugo con una velocidad de rotación de 3300 rpm. La AD se calculó como la relación porcentual entre el porcentaje de cáscara extraído mecánicamente y el contenido total de cáscara (descascarado manual).

Se estudió la variabilidad de las propiedades físicas de los granos utilizando la técnica de Análisis de la Varianza (ANOVA). Cuando la diferencia entre “tratamientos” (híbridos) para una variable fue significativa ($P \leq 0,01$) se compararon sus medias aplicando la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan las propiedades generales y longitudes características de los granos de los híbridos de girasol analizados. Para el conjunto de híbridos el contenido de aceite osciló entre 43,8% y 54,1%, con un promedio de $49,5 \pm 2,32$, valores prácticamente iguales o superiores a la actual base de comercialización en Argentina (42%) y coincidente con el rango de variación (42% a 55%) observado en el conjunto de cultivares híbridos sembrados actualmente en la Argentina (Aguirrezábal y Pereyra, 1998). El contenido de cáscara para el conjunto de híbridos varió entre 21,0 y 29,5% (b.s.). En general, los híbridos de cáscara estriada presentaron un mayor contenido de cáscara que los híbridos de pericarpio negro. Los híbridos de cáscara estriada ACA 884 y Morgan 742 no se diferenciaron significativamente entre sí para el contenido de cáscara, pero sí lo hicieron del resto de los híbridos (Tabla 1). El peso de mil granos para el conjunto de híbridos varió entre 54,2 y 70,0 gramos (b.s.), presentando el mayor valor el híbrido Morgan 742 (Tabla 1). Las longitudes características (largo, ancho y espesor) presentaron bajos coeficientes de variación, comprendidos entre 1,1 y 5,7%. El híbrido Zenit (CN) presentó el mayor largo de grano, diferenciándose significativamente de los restantes híbridos, con excepción de Morgan 742 y ACA 884 (Tabla 1). Así mismo, este híbrido presentó el menor ancho de grano. El espesor del grano fue aproximadamente similar en todos los híbridos.

Tabla 1: Propiedades generales y longitudes características de los híbridos de girasol cultivados en Balcarce. Para cada variable, valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas entre híbridos (Tuckey, $P < 0,05$).

HÍBRIDO	PROPIEDADES						
	Humedad (% b.s.)	Contenido de aceite (% b.s.)	Contenido de cáscara (% b.s.)	Peso de mil granos (g. b.s.)	Tamaño del grano* (mm)		
					A	B	C
Morgan 742	6,6	45,8 e	29,2 a	70,0 a	11,10 ab	6,10 a	3,53 a
ACA 884	6,9	46,7 de	29,5 a	60,6 abc	10,76 abc	5,06 cd	3,17 a
Pyramid-1	6,6	48,3 bcde	25,4 b	56,6 bc	10,22 d	5,04 cd	3,11 a
Jaguel	6,9	50,7 abc	24,4 bc	63,0 ab	10,18 d	5,72 ab	3,61 a
Paraíso 20	6,8	52,2 a	21,1 ef	54,9 c	10,18 d	5,04 cd	3,29 a
Contiflor 11	6,8	47,8 cde	24,5 b	57,1 bc	10,36 cd	5,38 bcd	3,17 a
Rancul	6,9	50,0 abcd	22,9 cd	63,0 abc	10,65 c	5,42 bcd	3,37 a
Zenit	6,6	50,9 ab	22,6 de	54,9 bc	11,19 a	4,83 d	3,17 a
Dekasol 3900	7,0	52,2 a	21,1 f	54,3 bc	10,10 d	5,28 bcd	3,17 a
Cariló	7,0	50,1abcd	25,8 b	60,3 abc	10,72 bc	5,44 abc	3,31 a

• Valores promedio de A: longitud mayor del grano, B: longitud menor del grano, C: espesor del grano

En la Figura 2 se muestran los espesores cáscara de todos los híbridos. El híbrido Morgan 742 se diferenció significativamente en su espesor de cáscara de todos los híbridos con excepción de ACA 884, mientras éste último solamente presentó diferencias significativas respecto a Zenit, Paraíso 20 (CN) y Dekasol 3900 (CN). En general, los híbridos de cáscara estriada presentaron mayor contenido y espesor de cáscara que los híbridos de cáscara negra. El híbrido Pyramid-1 (CE) presentó un espesor de cáscara aproximadamente similar al de algunos híbridos de cáscara negra, lo que es corroborado con el análisis estadístico (ANOVA) al no diferenciarse significativamente de los híbridos de cáscara negra.

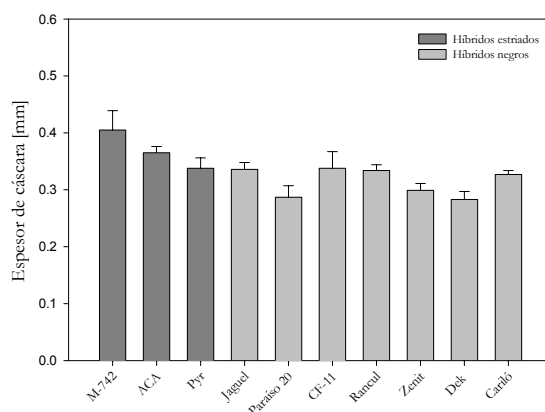


Figura 2 Espesor de cáscara de los diez híbridos cultivados en Balcarce. Las líneas verticales representan el desvío estándar.

En la Tabla 2 se indican los valores de densidad real, densidad volumétrica, volumen de grano y diámetro equivalente obtenidos para los diferentes híbridos. La densidad real para el conjunto de híbridos varió entre 0,742 y 0,825 g.cm⁻³, presentando los híbridos ACA 884, Zenit y Rancul (CN), los mayores valores. La densidad volumétrica varió entre 43,00 y 48,00 g.cm⁻³. El híbrido ACA 884 presentó diferencias significativas para este carácter respecto a los restantes híbridos estudiados, con excepción de Pyramid-1 y Rancul. El efecto del genotipo no fue significativo para la porosidad del lecho. No obstante, en general la porosidad del lecho de granos de los híbridos de cáscara estriada (41,15–42,22%) fue menor que para los híbridos de cáscara negra (41,94 – 45,22%). Las variables diámetro equivalente y volumen de un grano presentaron un comportamiento similar (Tabla 2), presentando el híbrido Morgan 742 los mayores valores para ambas características.

Tabla 2 Densidad real, densidad volumétrica, volumen de un grano y diámetro equivalente (promedio ± desvío estándar) correspondiente a los diez híbridos cultivados en Balcarce. Para cada variable, valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas entre híbridos (Tuckey, P<0,05).

HÍBRIDO	PROPIEDADES			
	Densidad real (g.cm ⁻³)	Densidad volumétrica (kg.hl ⁻¹)	Volumen de grano (mm ³)	Diámetro equivalente (mm)
Paraíso 20	0,742 ± 0,003 f	43,00 ± 1,00 c	73,42 ± 3,59 b	5,194 ± 0,084 b
Rancul	0,805 ± 0,019 abc	46,00 ± 1,00 ab	81,28 ± 9,61 a	5,369 ± 0,213 a
Contiflor 11	0,785 ± 0,017 bcd	44,00 ± 0,58 bc	75,20 ± 5,26 b	5,235 ± 0,121 b
Zenit	0,821 ± 0,004 ab	45,00 ± 0,58 bc	70,20 ± 2,00 b	5,118 ± 0,049 b
ACA 884	0,825 ± 0,011 a	48,00 ± 1,15 a	74,84 ± 3,08 b	5,228 ± 0,071 b
Morgan 742	0,764 ± 0,024 def	45,00 ± 1,00 bc	94,04 ± 5,57 a	5,641 ± 0,111 a
Dekasol 3900	0,745 ± 0,007 ef	43,00 ± 0,58 c	74,65 ± 5,19 b	5,222 ± 0,120 b

La aptitud al descascarado en el conjunto de las muestras analizadas varió entre 9,9 y 65,9%, con un promedio de 25,2 ± 12,8% lo que implica una importante variación de este parámetro. Con excepción de Pyramid-1, los híbridos de cáscara estriada presentaron mayor aptitud al descascarado que los de cáscara negra. El análisis de la varianza permitió detectar diferencias significativas entre híbridos para la aptitud al descascarado. Se detectó diferencia significativa en la aptitud al descascarado de los híbridos Morgan 742 y ACA 884 (ambos de cáscara estriada, de menor rendimiento de aceite promedio y de mayor espesor de cáscara, como puede observarse en la Tabla 3) respecto a los restantes híbridos analizados. Pyramid-1, si bien es un híbrido de cáscara estriada y posee menor contenido de aceite que los híbridos de cáscara negra, presentó una muy

baja aptitud al descascarado (Tabla 3). Es de destacar que este híbrido presenta menor contenido y espesor de cáscara que los híbridos Morgan 742 y ACA 884 (Tabla 1 y 3).

Tabla 3: Valores de aptitud al descascarado y contenido de aceite de los diez híbridos de girasol cultivados en Balcarce promedio \pm desvío estándar). Para la aptitud al descascarado, valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas entre híbridos (Tuckey, $P < 0,05$).

HÍBRIDOS	PROPIEDADES		
	Aptitud descascarado (%)	Contenido de aceite (% b.s.)	Espesor de cáscara (mm)
Morgan 742	52,0 \pm 12,9 a	45,8 \pm 1,7	0,405 \pm 0,034
ACA 884	39,5 \pm 9,7 a	46,7 \pm 1,4	0,365 \pm 0,011
Contiflor 11	22,9 \pm 5,5 b	47,8 \pm 0,4	0,338 \pm 0,029
Paraíso 20	23,8 \pm 3,7 b	52,2 \pm 0,7	0,287 \pm 0,020
Rancul	22,6 \pm 10,6 b	50,0 \pm 1,4	0,334 \pm 0,010
Dekasol 3900	15,0 \pm 6,7 b	52,2 \pm 2,4	0,283 \pm 0,014
Jaguel	24,1 \pm 4,2 b	50,7 \pm 0,9	0,336 \pm 0,012
Zenit	20,8 \pm 2,0 b	50,9 \pm 0,5	0,299 \pm 0,012
Cariló	14,8 \pm 5,0 b	50,1 \pm 1,4	0,327 \pm 0,007
Pyramid-1	16,5 \pm 2,0 b	48,3 \pm 0,5	0,338 \pm 0,018

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que:

- El análisis estadístico de la varianza permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre híbridos para el peso de mil granos, contenido y espesor de cáscara, largo y ancho del grano, densidad volumétrica, diámetro equivalente, volumen y aptitud al descascarado. El efecto del genotipo no fue significativo para el espesor del grano y la porosidad del lecho.
- Los híbridos de pericarpio estriado presentaron mayor contenido y espesor de cáscara que los híbridos de cáscara negra.
- El híbrido Zenit (CN) presentó mayor largo y menor ancho de grano. El híbrido Morgan 742 (CE) presentó el mayor valor de peso de mil granos. Los híbridos ACA 884 (CE), Zenit y Rancul (CN) presentaron los mayores valores de densidad real. Además, el primero de ellos se caracterizó por poseer la mayor densidad volumétrica. El volumen de grano y el diámetro equivalente fueron superiores en el híbrido Morgan 742, con respecto a los otros híbridos analizados.
- La aptitud al descascarado fue mayor en los híbridos de cáscara estriada (menor

rendimiento de aceite promedio y mayor contenido porcentual de cáscara) que en los híbridos de cáscara negra.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con muestras aportadas por la Estación Experimental INTA Balcarce y con el apoyo financiero de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

BIBLIOGRAFÍA

Aguirrezábal L.A.N. y Pereyra V.R. (1998). “Girasol”, en *Calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico*. Coordinadores: **Aguirrezábal, L.A.N. y Andrade, F.** Edición de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP) y de la Estación Experimental Balcarce –INTA, pp. 139-196.

AOAC (1980), Association of the Official Analytical Chemists, Method 14.003, “Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists”. Howitz W., Ph.D. Editor. 13th Edition, Washington D.C. USA.

Baumler E., Cuniberti A. and Nolasco S.M., Riccobene I.C. (2005). “Moisture Dependent Physical and Compression Properties of Safflower Seed”, *Journal of Food Engineering*, (Artículo en prensa, disponible online: [w.w.w.science direct.com.](http://www.science-direct.com)) 7 págs.

Deshpande S.D., Bal S. and Ojha, T.P. (1993). “Physical properties of soybean”. *Journal of Food Engineering Research*, 56(2), 89-98.

Di Leo M.J., Riccobene I.C. and Nolasco S.M. (2004). Variability in dehulling ability of sunflower hybrids (*Helianthus annuus L.*) in Argentina. *Proc. 16 th. International Sunflower Conference*, USA. Cap. Breeding and Genetics. págs. 591-595.

Gupta R.K. and Das S.K., (1997). “Physical properties of sunflower seeds”. *Journal of Agricultural Engineering Research*. Vol 66, 1-8.

Mohsenin N.N. (1986). “Physical Properties of Plant and Animal Materials”, 3rd. Edn. Gordon and Breach, New York.

Özarslan C. (2002). “Physical properties of cotton seed”. *Biosystems Engineering* 83, 169-174.

Robertson J. and Morrison W. (1979). “Analysis of oil content of sunflower seed by wide-line NMR”. *Journal of American Oil Chemists' Society* 56: 961-964.

Vilche C., Gely M. and Santalla E. (2003). Physical Properties of quinoa seeds *Biosystems Engineering* 86(1), 59-65.

EFFECTO DE LA HUMEDAD SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES FISICAS DE UN HÍBRIDO DE GIRASOL DE CASCARA NEGRA

BAÜMLER Erica R., NOLASCO Susana M., RICCOBENE Isabel C.

Grupo de Investigación TECSE, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNCPBA. Av. del Valle 5737, B7400JWI-Olavarría, Buenos Aires, Argentina. Tel.-Fax.: (54-2284)451055/56. E-mail.: iriccobe@fio.unicen.edu.ar; snolasco@fio.unicen.edu.ar.

RESUMEN

Diferentes propiedades físicas del híbrido de girasol de cáscara negra, Paraíso 20 fueron evaluadas en función del contenido de humedad de la muestra (2,0 a 17,8% en base seca). Las principales dimensiones de los granos presentaron los siguientes rangos 9,927-10,205 mm; 3,041-4,946 mm; 2,962-3,172mm, para largo, ancho y espesor respectivamente. El espesor de la cáscara fue la longitud característica más afectada por la variación en el contenido de humedad (coeficiente de variación 10,3%). La densidad real aumentó linealmente al incrementar el contenido de humedad de la muestra. El aumento en el contenido de humedad de los granos determinó un crecimiento lineal de la densidad volumétrica y un aumento lineal de la porosidad del lecho de granos ($R^2=0,863$, $P\leq 0,0025$ y $R^2=0,933$, $P\leq 0,0017$, respectivamente). El volumen y el peso de los granos aumentaron linealmente con la humedad. El coeficiente de expansión volumétrica mostró un comportamiento lineal creciente con el contenido de humedad.

Palabras clave: Girasol, *Helianthus annuus* L., propiedades físicas.

ABSTRACT

Several physical properties of sunflower grain were evaluated as a function of moisture content (2,0% to 17,8%, dry basis). The length, width and thickness varied from 9,927-10,205 mm; 3,041-4,946 mm; 2,962-3,172mm, respectively. The hull thickness was the mostly affected of the principal dimensions. (Variation Coefficient: 10,3%). The true density presented an increase when the moisture increased. As moisture content increased, the volumetric density was found to decrease linearly and porosity was found to increase linearly ($R^2=0,863$, $P\leq 0,0025$ y $R^2=0,933$, $P\leq 0,0017$, respectively). The volume and weight of grains increased linearly with the moisture. The coefficient of volumetric showed a linear behavior with the increase on moisture content of grain.

Key words: Sunflower, *Helianthus annuus* L., physical properties.

INTRODUCCIÓN

Argentina es uno de los principales países productores de granos oleaginosos, de sus aceites y harinas, con un potencial importante en el Complejo Oleaginoso mundial, situación ésta que coloca a nuestro país en inmejorables condiciones frente a la tendencia creciente en la demanda de aceites vegetales y harinas proteicas a nivel mundial.

En particular el aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) en nuestro país tiene una composición en ácidos grasos que lo hace especialmente adecuado a las pautas actuales de nutrición y salud. Por su alta concentración de ácido linoléico y de ácido oleico, es recomendado para dietas preventivas o terapéuticas de enfermedades cardiovasculares ya que su bajo contenido en grasas saturadas, así como el significativo aporte de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas contribuyen a bajar el colesterol en sangre (Fernández, 2000). Además el aceite de girasol se distingue por ser el que contiene el mayor cantidad de α -tocoferol (vitamina E, poderoso antioxidante biológico natural) dentro de todos los aceites.

Las constantes modificaciones genéticas realizadas sobre los granos de girasol, con el fin de incrementar el contenido de materia grasa, han producido, paralelamente, una disminución en la proporción relativa de cáscara y han generado frutos de pericarpio fino ocasionando esto un problema en el procesamiento de los mismos (Hernández *et al.*, 2003).

Esta situación conlleva a profundizar estudios en pos de conocer las *propiedades físicas* de estos materiales agrícolas. Resulta importante para la realización de operaciones post-cosecha y para seleccionar el equipo adecuado de manejo de los granos (Gupta y Das, 1997; Murthy *et al.*, 1998) conocer acabadamente algunas de sus propiedades; las cuales pueden verse afectadas por numerosos factores tales como tamaño, forma, características superficiales y contenido de humedad del grano. Esta dependencia como así también la comparación de estas propiedades con las correspondientes a otros granos se consideran necesarias para el diseño apropiado de equipos de transporte, cosechadoras, equipos de descascarado, secado, almacenamiento y otros procesos. Gupta y Das (1997) analizaron las propiedades físicas de una variedad de girasol (Morden) cultivada en la India.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar algunas características físicas del grano de un híbrido de girasol aceitero de cáscara negra (Paraíso 20) cultivado en la República Argentina y la influencia del contenido de humedad sobre las mismas. Las propiedades

analizadas fueron longitudes características, densidad real y volumétrica, porosidad, volumen, peso del grano, coeficiente de expansión, diámetro equivalente y esfericidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron granos de girasol aceitero, de cáscara negra (Paraíso 20), cultivados en la localidad de Balcarce (37° 45' LS y 58° 18' LO), Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Las muestras se limpiaron manualmente. La humedad se determinó en estufa de vacío (Official Method 14003, AOAC 1980); el peso de mil granos se obtuvo extrapolando el peso de 100 granos; la separación cáscara/pepa se efectuó manualmente y el rendimiento porcentual de aceite por A.O.C.S., Ag 1-65, 1998. Todos los datos informados son promedio de triplicados, se expresan en base seca (b.s.) y fueron analizados utilizando Software Sigma Plot for Windows Versión 4.01 (1997 SPSS Inc.).

Las muestras fueron acondicionadas para realizar los estudios de humedad. Se prepararon submuestras con diferentes contenidos de humedad, por secado de los granos (estufa de aire forzado, a 40-45°C) o por rociado de los mismos con la cantidad de agua necesaria, las muestras fueron mantenidas a baja temperatura ($\approx 5^{\circ}\text{C}$) durante un período mayor a 72 horas, para lograr homogeneidad en la distribución de humedad, luego para cada una de ellas se determinó el contenido de humedad. Antes de realizar las mediciones, la cantidad de semillas necesarias fueron llevadas a temperatura ambiente.

Las propiedades físicas determinadas fueron:

- Longitudes características: Micrómetro de exteriores (DP-1HS, Digimatic Mini-Processor, Mitutoyo).
- Densidad real, densidad volumétrica y porosidad: La densidad volumétrica (peso hectolítrico) y real (picnometría) de la muestra fueron determinadas a las diferentes humedades analizadas. La porosidad fue definida (ε) como la fracción de espacios en un volumen de granos que no se encuentran ocupados por los mismos (Gupta y Das, 1997; Baryeh y Mangope, 2002).
- Volumen y peso del grano y coeficiente de expansión: El volumen (V_g) fue determinado a partir de la densidad real y del número de granos; el peso del grano se obtuvo a partir del peso de las muestras utilizadas para determinar la densidad real, dividiéndolo por el número de granos y el coeficiente de expansión volumétrica (ψ) fue calculado mediante la relación entre el volumen (V_g) y el volumen del grano seco (V_g^0).
- Diámetro equivalente y esfericidad: El diámetro equivalente (D_e), definido como el diámetro de una esfera que tiene el mismo volumen de la partícula, se calculó a partir del

volumen del grano determinado por picnometría y la esfericidad (ϕ) se determinó como la relación entre el diámetro equivalente y el largo (L) del grano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los granos de girasol de cáscara negra presentaron un contenido de humedad inicial de 5,5% en b.s. y un contenido porcentual de aceite (54,9% b.s.) superior a la base de comercialización (42%).

El peso de mil granos resultó ser de $46,3 \pm 0,742$ g (b.s.) y presentaron un valor de la relación cáscara/pepa de $0,270 \pm 0,007$ (b.s.).

Las variaciones observadas con el contenido de humedad del largo, ancho y espesor de los granos y del espesor de la cáscara se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Dimensiones características

<i>Humedad (% b.s.)</i>	<i>Largo (mm)</i>	<i>Ancho (mm)</i>	<i>Espesor (mm)</i>	<i>Espesor de cáscara (mm)</i>
17,8	9,937±0,489	4,696±0,344	2,962±0,471	0,251±0,049
13,6	9,927±0,375	4,746±0,336	2,985±0,393	0,227±0,046
8,7	10,165±0,393	4,946±0,330	3,168±0,419	0,249±0,056
6,4	10,212±0,468	3,041±0,433	3,172±0,455	0,231±0,054
5,5	10,205±0,534	4,816±0,443	3,105±0,410	0,300±0,075
4,5	9,983±0,371	4,892±0,284	3,143±0,352	0,275±0,046
2,0	10,028±0,421	4,868±0,368	3,062±0,399	0,238±0,040

Los valores registrados se encontraron en un rango de 9,927-10,205 mm; 3,041-4,946 mm; 2,962-3,172mm, para largo, ancho y espesor respectivamente.

La modificación de la humedad de los granos causó pequeñas variaciones en su tamaño, siendo el espesor de la cáscara el más afectado (coeficiente de variación de 10,3%).

La variación de la densidad real (ρ_t) de los granos con el contenido de humedad se observa en la Figura 1.

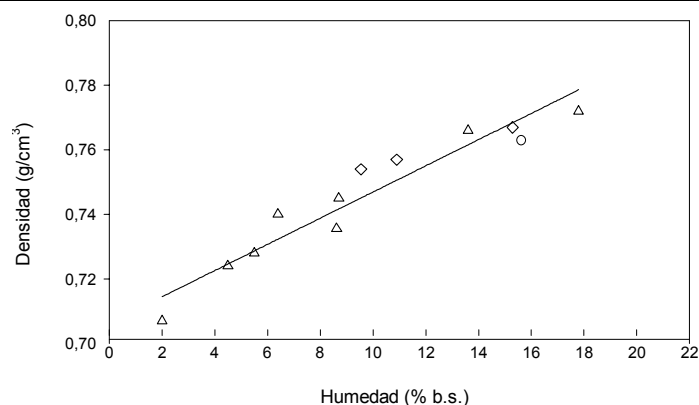


Figura 1. Variación de la densidad real de los granos con el contenido de humedad

La densidad (ρ_t) aumenta linealmente, desde $0,707 \text{ g/cm}^3$ hasta $0,772 \text{ g/cm}^3$, cuando el contenido de humedad aumenta, este comportamiento es similar al observado en otros granos como el maíz, soja, semillas de calabaza, trigo y girasol (Gupta y Das, 1997); y puede ser representado matemáticamente por una expresión de la forma:

$$\rho_t = 0,7064 + 4,53 \cdot 10^{-3} X \quad (R^2 = 0,94 - P < 0,0001)$$

donde X corresponde al contenido de humedad de los granos (% b.s.).

La densidad volumétrica (ρ_b) decreció linealmente a medida que el contenido de humedad de los granos aumentó (Figura 2).

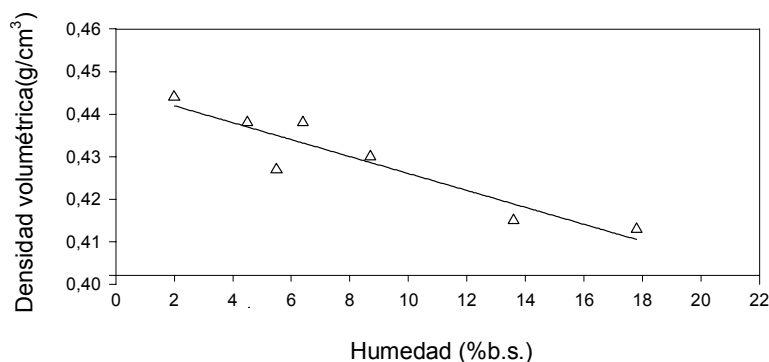


Figura 2. Variación de la densidad volumétrica de los granos con el contenido de humedad

El comportamiento de la densidad volumétrica frente a variaciones de la humedad se refleja mediante la siguiente expresión:

$$\rho_b = 0,4459 - 1,989 \cdot 10^{-3} X \quad (R^2 = 0,863 - P < 0,0025)$$

donde X corresponde al contenido de humedad de los granos (% b.s.).

El aumento del contenido de humedad de los granos determinó un aumento lineal de la porosidad del lecho de granos. Este comportamiento es similar al presentado por Gupta y Das (1997) para girasol, por Carman (1996) para lenteja y por Baryeh y Mangope (2002)

para guisante. Sin embargo, Sreenarayanan *et al.* (1985) determinó que la porosidad de la soja decrece linealmente con el incremento del contenido de humedad del grano.

Ambas variables, volumen y peso de los granos, aumentaron linealmente con la humedad, sin embargo el incremento del volumen fue superior al incremento del peso del grano. El volumen del grano de girasol aceitero de cáscara negra disminuyó un 14% al disminuir la humedad en el rango analizado.

El comportamiento del volumen y peso del grano, puede ser representado por la siguiente ecuación: $Y = y_0 + aX$, donde "Y" representa el peso (g) o el volumen del grano (mm^3) según corresponda y "X" la humedad de las semillas (% b.s.). Las constantes para cada variable se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Constantes obtenidas para las curvas de peso y volumen del grano vs. humedad

y_0	a	R^2	P
Volumen del grano			
62,48	0,677	0,864	0,0025
Peso del grano			
0,0438	$7,977 \cdot 10^{-4}$	0,927	0,0007

El coeficiente de expansión volumétrica, calculado a partir del volumen de los granos, presentó una disminución a medida que la humedad decrece, comportamiento similar al observado en granos de maíz (Pagano y Crozza, 2001). Se puede representar mediante la siguiente expresión:

$$\psi = 0,8476 + 9,170 \cdot 10^{-3} X \quad (R^2 = 0,863 - P < 0,0015)$$

donde X es la humedad del grano en base seca.

El diámetro equivalente (D_e) de los granos de girasol aceitero de cáscara negra presentó el siguiente rango de valores: 4,497-5,208 mm; media: 5,066 mm. Estos valores fueron del orden del reportado por Gupta y Das (1997), Pagano y Crozza (2001) y Baryeh y Mangope (2002).

El D_e se incrementó linealmente frente a un aumento en el contenido de humedad ($D_e = 0,0167 X + 4,926$; $R^2 = 0,857$; $P = 0,0027$; con D_e en mm y X en % b.s.).

La esfericidad (ϕ) presentó comportamiento lineal creciente, donde:

$$\phi = 0,4844 + 0,0022 X \quad (R^2 = 0,925 - P < 0,0005)$$

donde X es la humedad del grano en base seca.

Del análisis realizado puede observarse que las propiedades de los granos ven afectadas por cambios en el contenido de humedad de las muestras. Estas diferencias evidencian características de procesamiento particulares y significativamente diferentes, la

comparación de estas propiedades con las correspondientes a otros granos se consideran necesarias para el diseño apropiado de equipos de transporte, cosechadoras, equipos de descascarado, secado, almacenamiento y otros procesos.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que la modificación de la humedad de los granos del híbrido de girasol aceitero de cáscara negra (Paraíso 20) causó pequeñas variaciones en su tamaño, siendo el espesor de la cáscara la longitud característica más afectada. La densidad real del grano aumentó linealmente al incrementar su humedad. Mayor contenido de humedad originó una disminución de la densidad volumétrica del grano y un aumento lineal de la porosidad del lecho de granos. El volumen y peso del grano, el coeficiente de expansión volumétrica, el diámetro equivalente y la esfericidad aumentaron linealmente con el incremento de la humedad del grano.

El presente estudio evidencia que las propiedades del grano de girasol aceitero, de cáscara negra se ven afectadas por cambios en el contenido de humedad, aspectos éstos que influyen en el diseño de los procesos de transferencia de calor y materia.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC, Association of the Official Analytical Chemists, Method 14.003, "Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists". Howitz W., Ph.D. Editor. 13th Edition, Washington D.C. USA, 1980.

AOCS Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 5th Edition, Dr. David Firestone Editor, AOCS Press, Champaign 1998.

Baryeh E.A., Mangope B.K., "Some physical properties of QP-38 variety pigeon pea". Journal of Food Engineering. Vol 56, pp. 59-65, 2002.

Çarman K., "Some physical properties of lentil seeds". Journal of Agricultural Engineering. Research. Vol 63, pp. 87-92, 1996.

Fernández M.B., "Análisis del proceso de descascarado de girasol". Proyecto final de carrera, Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería UNCPBA, Argentina, 2000.

Gupta R.K., Das S.K., "Physical properties of sunflower seeds". Journal of Agricultural Engineering. Research. Vol 66, pp. 1-8, 1997.

Hernández L.F., Lindström L.I., Bellés P.M., "Modelo mecánico para el estudio de la fractura de la cáscara de los frutos de girasol". Aceites y Grasas, pp. 78-85, 2003.

Murthy C.T., Suwendu Bhattacharya, “Moisture dependant physical and uniaxial compression properties of Black Pepper”. Journal of Food Engineering 37, pp. 193-205, 1998.

Pagano A.M., Crozza D.E., “Modelling of expansion during adsorption for two oleaginous”. Tercer Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos”, Valencia, España, 2001.

Sreenarayanan V.V., Subramanian V. & Visvanathan R. “Physical and thermal properties of soybean”. Proceedings of Indian Society of Agricultural Engineers, 3, 161-169. 1985.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con la muestra de granos aportada por la Estación Experimental INTA Balcarce y con el apoyo financiero de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

EFFECTO DE TRATAMIENTOS FISICOS SOBRE LA CALIDAD DE ESPINACAS MINIMAMENTE PROCESADAS

CASÓLIBA, Ramiro M.; RODRIGUEZ, Silvia del C.

ICyTA-FAyA-Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano 1912. (4200) Santiago del Estero-Argentina. Te: (0385)- 4370120. e-mail: silviadepece@hotmail.com

RESUMEN

Las espinacas son productos perecederos, que sufren pérdidas postcosecha, derivadas de la senescencia, deshidratación y ataque de patógenos. Debido a las grandes distancias hasta los mercados consumidores, es imprescindible adecuar el proceso para que sea rentable, permitiendo su acceso con buena calidad. En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos con agua y aire caliente y recubrimiento con diferentes películas plásticas, en la calidad de espinacas mínimamente procesadas.

Se trabajó con dos variedades de espinacas, cosechadas en Santiago del Estero. Periódicamente se determinó: peso, color y la calidad global de producto, evaluándose: apariencia general y aparición de podredumbres por desarrollo microbiano o daños fisiológicos, utilizando una escala hedónica, obteniendo espinacas mínimamente procesadas que pueden conservarse un tiempo superior a 12 días a 7,5°C y hasta 20 días a 2,5°C, con excelente calidad.

Palabras Claves: Espinacas, tratamientos térmicos, mínimamente procesados, recubrimiento con películas plásticas, tratamiento post cosecha.

ABSTRACT

The spinach are perishable products, its suffer losses postharvest, derived from the senescence, dehydration and attack of pathogens. Due to great distances to consuming markets, it is essential to adapt the process so that he is profitable, allowing its access with good quality. In this work the effect of the application of heat treatments with water and hot air and covering with different plastic films, in the quality of spinach minimal processed was studied. Two varieties of spinach were harvested in Santiago del Estero-Argentina. Periodically was determined: weight, color and overall quality of product, evaluating: general appearance, decay or physiological injury, using a hedonics scale, obtaining

minimally processed spinach can be kept a superior time to 12 days to 7,5°C and until 20 days to 2,5°C, with excellent quality.

INTRODUCCION

La espinaca (*Spinacia oleracea L.*) es una hortaliza que se usa principalmente para su consumo en fresco en Argentina, pero también es procesada industrialmente para obtener espinacas congeladas, deshidratadas y conservadas por calor.

Por ser una hortaliza altamente perecedera, debido a su alta actividad respiratoria (Kader, 2002) y a su elevada pérdida de agua, su vida útil es muy corta: menor de 3 días a temperatura ambiente y menor a 10 días a 0°C almacenadas con alta humedad relativa ambiente (Cantwell, 2001). Es un producto con baja producción de etileno y altamente susceptible al mismo, el cual se manifiesta a través del amarillamiento de las hojas y aumento de pudriciones.

La utilización de películas poliméricas en envases herméticos que producen una favorable atmósfera modificada dentro del envase, ha sido examinada por diferentes estudios. Dicha atmósfera puede reducir la incidencia de los desórdenes fisiológicos, alteraciones microbianas y bioquímicos, cada uno de los cuales, origina cambios en el color, textura, sabor y, en consecuencia, en el valor comercial del producto envasado. Esto es así ya que el envasado puede modificar el metabolismo y por lo tanto reducir el consumo de oxígeno, como la producción de CO₂ (Chiesa y col, 1999).

Las espinacas necesitan mantenerse en atmósferas con concentraciones superiores al 0.4% de oxígeno a fin de evitar problemas de anaerobiosis. En experiencias llevadas a cabo por Ko y col. (1996) se demostró que con atmósferas con 0.8% de oxígeno no hubo efectos nocivos a 5°C y concentraciones de CO₂ no excesivas. Con atmósferas conteniendo 13% CO₂ se observó una rápida disminución de ácido ascórbico y la aparición de off-odors, lo cual no fue aceptable luego del almacenamiento de una semana a 7°C (Babic y Watada; 1996).

Por otra parte, hay muy pocas experiencias realizadas sobre los efectos de atmósferas controladas y modificadas en espinacas mínimamente procesadas y su influencia en el desarrollo microbiano (Cantwell, 2001). Tampoco se encontraron antecedentes sobre el uso de tratamientos térmicos en espinacas y su asociación con la aplicación de atmósferas modificadas a fin de prolongar la vida útil de las mismas. Sin embargo, en lechuga, tratamientos a 50°C durante 60-90 segundos inhiben el pardeamiento en las zonas de corte y retardan el amarillamiento (Loaiza-Velarde y salveit, 2001).

En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos con agua y aire caliente y recubrimiento con diferentes películas plásticas, en la calidad de espinacas mínimamente procesadas.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Se trabajó con espinacas de las variedades, Híbrido NIZ 46-33 y 46-37 cosechadas en la localidad Capital de la provincia de Santiago del Estero. Las plantas se cosecharon, seleccionaron y eliminaron las hojas que no presentaban optima características de calidad.

Metodología

El trabajo se dividió en dos etapas:

- 1- Se realizaron pruebas de almacenamiento de espinacas recubriendo las hojas con diferentes films comerciales y se almacenaron a dos temperaturas: 2,5° y 7,5°C.
- 2- Se realizaron tratamientos térmicos con agua (45°- 50°C, durante 1 –10 min.) y aire caliente (40-50°C, durante 15 a 90 min.), luego se envasaron en los films que resultaron mejores de la etapa 1.

1° Parte

Las hojas de espinacas se lavaron por inmersión en agua clorada (200 ppm) durante 5 min., se escurrieron, se dividieron en lotes y se recubrieron con los siguientes films plásticos polipropileno (PP), polietileno de baja densidad de 30 y 60 µm de espesor (PEBD y PEBD60 respectivamente), polietileno de alta densidad de 30 µm (PE) y cloruro de polivinilo (PVC) y se almacenaron en cámaras frigoríficas a 2,5° y 7,5°C.

Como control se almacenaron espinacas en bolsas de PEBD perforadas, para permitir el normal intercambio de gases y evitar el marchitamiento excesivo de las hojas.

Periódicamente se extrajeron muestras y se realizó:

-Evaluación sensorial de la calidad: con un panel formado por 15 evaluadores, previamente entrenados, utilizándose como control para la calificación de las espinacas tratadas y almacenadas hojas frescas recién cosechadas. Los panelistas calificaron las hojas de espinacas con una escala de 1-9 los siguientes parámetros:

*Aspecto general (correspondiendo: 9 = muy bueno; 5= regular; 1 = muy malo)

*Presencia de podredumbres por daños fisiológicos o desarrollo microbiano (9 =nada; 5= incipiente)

- Pérdida de peso

- Color (L, a y b)

2° Parte

Se realizaron los siguientes tratamientos térmicos a las hojas:

- Por inmersión en agua:

- 45° C durante 2 y 5 min.
- 48° C durante 1 y 3 min.
- 40° C durante 5 y 10 min.
- 50° C durante 1 y 2 min.

- Por exposición en aire:

- 40° C durante 30, 60 y 90 min.
- 45° C durante 15, 30 y 45 min.
- 50° C durante 15 y 30 min.

Luego de los tratamientos térmicos las espinacas fueron enfriadas rápidamente con agua a 5°C, escurridas y se envasadas con los dos films que resultaron mejores de la etapa 1: polipropileno y polietileno de baja densidad de 30 µm.

Las espinacas tratadas, se almacenaron a 2,5° y 7,5° C en cámaras con una humedad relativa de aproximadamente 90%. Periódicamente se extrajeron las muestras y se determinó la evolución de los parámetros mencionados en la Parte 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1° PARTE

Se determinó que la pérdida de peso del producto fue elevada en las hojas recubiertas con PVC y en las almacenadas en bolsas perforadas, alcanzó aproximadamente un 20% a los 17 días de almacenamiento a 7,5°C. Con el resto de las películas la pérdida de agua fue baja e inferior al 8% para el mismo tiempo de almacenamiento.

En la Figura N° 1 se muestra la evolución de la pérdida de peso de las espinacas mínimamente procesadas y recubiertas con las distintas películas estudiadas.

La pérdida de agua durante el almacenamiento a 2,5°C si bien fue ligeramente inferior que la de las hojas conservadas de 7,5°C, no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$).

No se observaron diferencias significativas entre PVC y el control; tampoco entre el resto de los films para el mismo tiempo de almacenamiento.

Uno de los principales factores de calidad evaluados por el consumidor en el momento de adquirir el producto es su apariencia general, y la presencia de podredumbres, los que se observan a través del envase (representado en la Figura N° 2).

Se determinó que el film que permitió conservar mejor la apariencia general de las hojas fue el PEBD presentando un valor promedio de $7 \pm 0,6$ al cabo de los 14 días de almacenamiento a $2,5^{\circ}\text{C}$. Los films restantes al cabo de ese tiempo de conservación presentaron valores inferiores a 6, valor establecido y convenido entre los evaluadores como mínimo para determinar la no comerciabilidad del producto.

Figura N° 1: Porcentaje de pérdida de agua durante la conservación de espinacas envasadas con distintos films plásticos a $7,5^{\circ}\text{C}$. $\text{LSD}_{0,05} = 3.1$

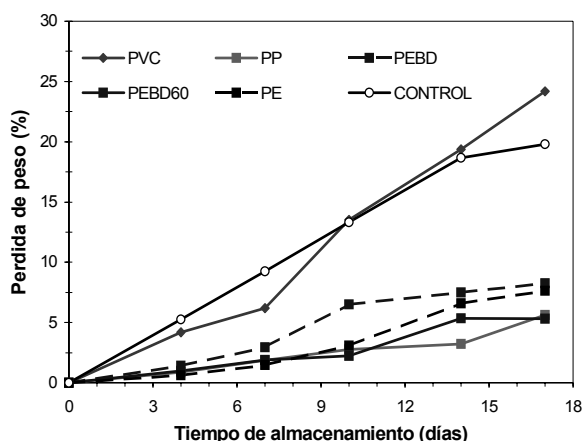
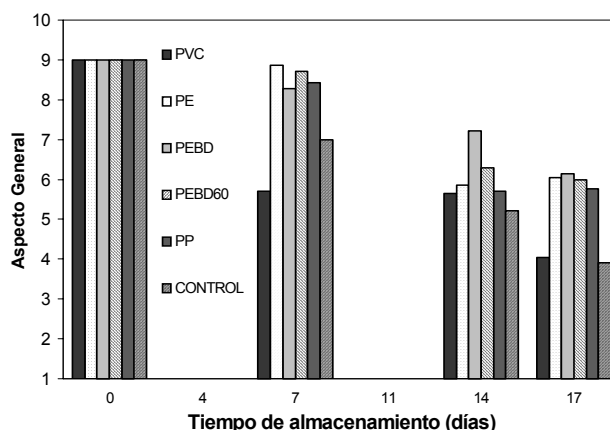


Figura N° 2: Evolución de la apariencia general de espinacas a $2,5^{\circ}\text{C}$ con distintas películas plásticas. $\text{LSD}_{0,05} = 0.4$



No se encontraron diferencias significativas respecto de ambos factores de calidad entre las espinacas almacenadas a $2,5^{\circ}\text{C}$ y $7,5^{\circ}\text{C}$ ($P > 0,05$) hasta los 7 días de almacenamiento. Sin embargo en las espinacas almacenadas a $7,5^{\circ}\text{C}$ a partir de los 11 días la calidad global del producto disminuyó notablemente.

De la observación de la evolución de los parámetros de color L^* y a^* , se determinó que L^* disminuyó en las hojas recubiertas con PVC, PE, PEBD 60 y bolsas perforadas aproximadamente un 50% durante los 4 días de almacenamiento, mientras que en las almacenadas en PEBD y PP permaneció prácticamente constante (datos no mostrados). Respecto de a^* las espinacas recubiertas con PEBD fueron las que presentaron menor valor (-8) lo que concuerda con la observación visual de que las hojas acentuaron su color verde.

Tomando en cuenta los parámetros de color evaluados se puede apreciar que los films que permiten retener mejor el color verde de las espinacas fueron: el PEBD y PP. No se encontraron diferencias significativas entre las variedades estudiadas respecto de la evolución en el tiempo de los parámetros aquí descriptos.

2° PARTE

Se puede observar que el tratamiento que permitió conservar mejor el aspecto general de las hojas al cabo de los 7 días de conservación fue el que se realizó con agua caliente a 45°C durante 2 minutos, con la ventaja de que este tratamiento puede ser incorporado al proceso sin realizar prácticamente ninguna modificación, durante la segunda etapa de lavado con agua clorada.

En las Figuras N° 3 y 4 se presenta la evolución de la apariencia general de las espinacas tratadas térmicamente con aire y agua caliente recubiertas con PEBD y PP durante el almacenamiento a 7,5°C, respectivamente.

Las espinacas tratadas térmicamente con agua a 45°C por 2 min. y almacenadas a 2,5°C presentaron al cabo de 20 días de conservación muy buen aspecto general, color y no evidenciaron la aparición de podredumbres.

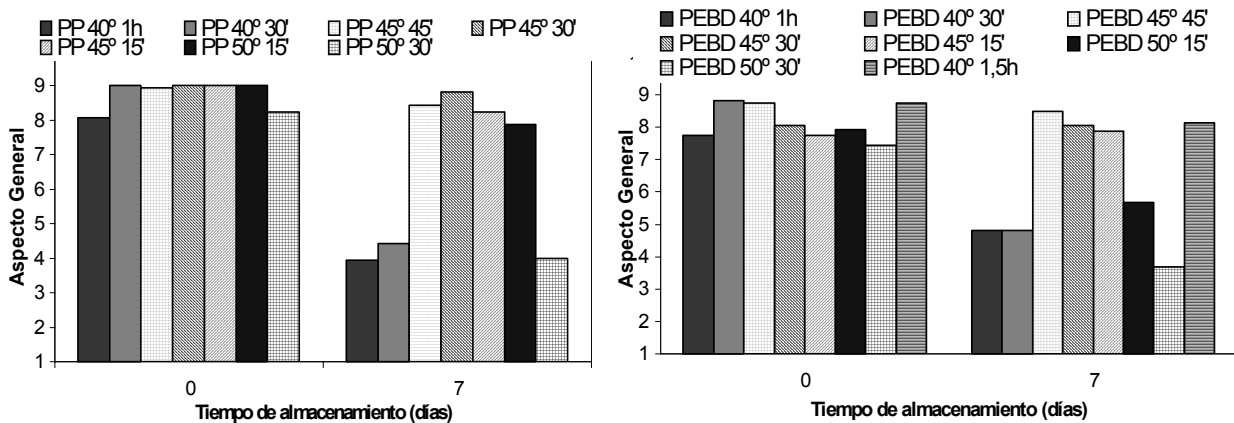


Figura N° 3: Aspecto general de espinacas tratadas térmicamente con aire y envasadas en polipropileno (A) $LSD_{(\alpha=0,05)} = 0,38$ y Polietileno de baja densidad de 30µm de espesor (B) $LSD_{(\alpha=0,05)} = 0,35$.

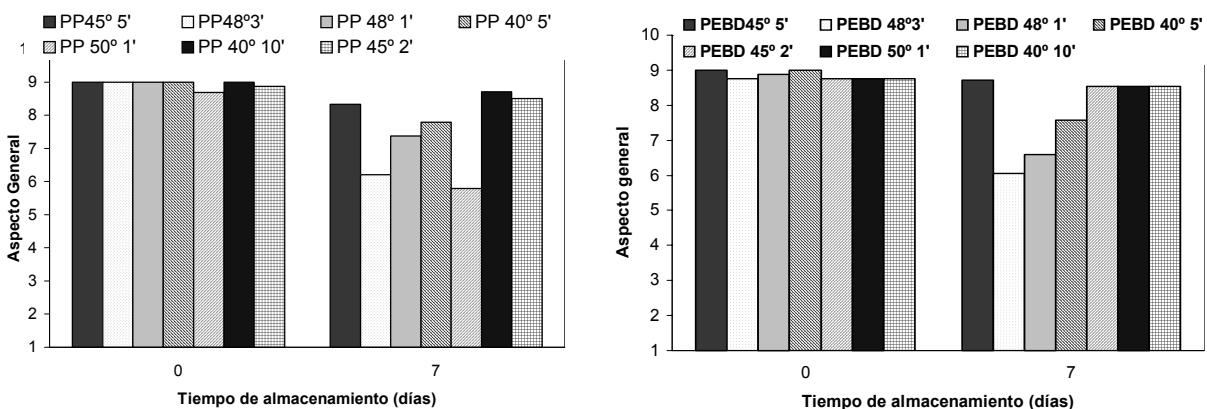


Figura N° 4: Aspecto general de espinacas tratadas térmicamente con agua y envasadas en polipropileno (A) $LSD_{(\alpha=0,05)} = 0,40$ y Polietileno de baja densidad de $30\mu\text{m}$ de espesor (B) $LSD_{(\alpha=0,05)} = 0,35$.

Un aspecto muy importante es que el tratamiento térmico seleccionado además de permitir conservar por mayor tiempo las hojas de espinacas, retarda considerablemente el amarillamiento de las hojas, tal como se observa en la Tabla N° 1, donde se presenta la evolución de los parámetros de color L^* y a^* , respectivamente.

Tabla N° 1: Evolución de los parámetros L^* y a^* en espinacas mínimamente procesadas pretratadas con agua caliente a 45°C por 2 min. y almacenadas a $7,5^\circ\text{C}$ en bolsas de polipropileno (PP) y polietileno de baja densidad (PEBD).

Tiempo (días)	PP		PEBD	
	L^*	a^*	L^*	a^*
0 (después del tratamiento térmico)	51.30 ± 4.5	$- 3.6 \pm 0.5$	51.30 ± 4.5	$- 3.6 \pm 0.5$
2	49.7 ± 6.1	$- 5.7 \pm 0.3$	46.5 ± 4.9	$- 6.0 \pm 0.4$
7	49.2 ± 5.2	$- 6.2 \pm 0.4$	47.1 ± 3.9	$- 6.5 \pm 0.5$
11	48.3 ± 4.7	$- 6.8 \pm 0.5$	49.0 ± 5.6	$- 6.2 \pm 0.5$

Al comparar los valores presentados en la Figura N° 4 y la Tabla N° 1 respecto de la evolución de estos mismos parámetros en el producto sin pretratamiento térmico se puede comprobar el efecto positivo en la apariencia general del producto y conservación del color verde, resultando ser altamente recomendable su aplicación.

En las espinacas tratadas térmicamente y almacenadas a $2,5^\circ\text{C}$ estos parámetros de color conservaron valores similares aún al cabo de los 20 días de conservación.

CONCLUSIONES

- Los films que conservaron mejor la calidad de las espinacas fueron polietileno de baja densidad (PEBD) de $30\mu\text{m}$ de espesor, siguiendo en orden el polipropileno (PP).
- Las espinacas recubiertas con PEBD y PP a temperatura ambiente pueden ser almacenadas por hasta 5 días. Al disminuir la temperatura de almacenamiento hasta $2,5^\circ\text{C}$ o inferiores (hasta 0°C), las espinacas pueden comercializarse hasta los 14 días.

- La conservación a 2,5 °C permitió mantener por 14 días la calidad global del producto mientras que a 7,5 °C el tiempo de conservación fue inferior, pudiendo comercializarse las espinacas hasta los 11 días.
- En función de los datos obtenidos y considerando otros factores muy importantes en la industria alimentaria, tales como: ahorro de tiempo y energía, el tratamiento que se recomienda es con agua caliente a 45°C durante 2 minutos. Además este tratamiento puede ser incorporado al proceso sin realizar prácticamente ninguna modificación, durante la segunda etapa de lavado con agua clorada.
- Las espinacas tratadas térmicamente con agua a 45°C por 2 min. y almacenadas a 2,5°C presentaron al cabo de 20 días de conservación muy buen aspecto general, color y no evidenciaron la aparición de podredumbres.

BIBLIOGRAFIA

Babic, I. and. Watada, A. E. 1996. Microbial population of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. *Postharvest Biol. and Technology.* 9, 187-193.

Cantwell, M. 2001. Características y Condiciones Recomendadas para el Almacenamiento por Tiempo Largo de Frutas y Hortalizas Frescas. Webb site of University California-Davis.

Chiesa, A.; Massa, A.; Filippini, O.; Frezza, D. Y Moccia, S. 1999. Evolución del contenido de ácido ascórbico en la postcosecha de lechuga mínimamente procesada. *Anales del XXII Congreso de Horticultura.* Trabajo N° 110.

Kader, A. 2002. *Postharvest Technology of horticultural crops.* Third Edition. University of California. Publication 3311. Cap. 4.

Ko, N.P., Watada, A. E., Schlimme, D. V. And Bouwkamp, J.C. 1996. Storage of spinach under low oxygen atmosphere above the extinction point. *Journal of Science.* Vol 61 N° 2. 398-406.

Loaiza-Velarde, J. C. Y Salveit, M. E. 2001. Heat shock applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue. *J. Amer. Sci.* 126: 227-234.

BIO-NUTRIENTES ORGANICOS NATURALES A PARTIR DE CARNES ROJAS DE LOMBRICES *Eisenia foetida* EN ALIMENTACIÓN AVIAR

⁽¹⁾ARNAU, Enrique M.; ⁽¹⁾CORRO, Marta; ⁽²⁾ARMADA, Margarita.

(1) CITA. Fac. de Ingeniería Universidad Nacional de Jujuy. (2) INIQUI. Fac. de Ingeniería Universidad Nacional de Salta. CITA - Gorriti N° 237 (4600). S. S. de Jujuy. Argentina

RESUMEN

Se estudió la utilización de los estiércoles de pollo compostados en la alimentación de las lombrices *Eisenia foetida*. Se evaluaron las mejores condiciones para la reproducción de las mismas. La mejor masa cárnica se logró a pH 7 ± 0.05 , temperatura $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y humedad de $80\pm 1\%$. Se evaluó la harina de lombriz en sus características químicas y funcionales. Se observó que los músculos circulares y longitudinales de las lombrices, difieren poco de los de otros animales. Con harinas hidrolizadas con papaína, se preparó una suspensión pre-starter, para alimentar los pollos. La calidad de la carne avícola obtenida, es superior desde el punto de vista nutricional, valor calórico y seguridad alimentaria a la disponible en el mercado, ya que tiene: mejor desarrollo muscular, por mayor deposición de proteínas a medida que se aproxima al peso corporal adulto, mejores rendimientos en los cortes preferidos por los consumidores y menor índice de conversión de balanceados.

Palabras clave: Lombrices-Proteínas-Hidrólisis enzimática-Calidad de Carne Aviar

ABSTRACT

It was studied the use of composted chicken dung in the feeding of the *Eisenia foetida* earthworms. The best conditions for their reproduction were assessed. The best meat mass was achieved at pH 7 ± 0.05 , temperature $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ and humidity $80\pm 1\%$. It was evaluated the earthworm flour in its chemical and functional characteristics. It was observed that the circular and longitudinal muscles of the earthworms have little difference with that of other animals. With the hydrolyzed flours, with papain, we prepared a pre-starter suspension to feed the chicken. The quality of the poultry meat obtained is superior from the nutritional point of view, its calorie value and alimentary safety to that available in the market, since it has: better muscle development, due to greater protein deposition as it gets near to the adult body weight, better yields in the preferred cuts of the consumers and less conversion index of the balanced ones.

INTRODUCCIÓN

Según las proyecciones de las Naciones Unidas la población mundial aumentará en un 72% entre 1995 y el año 2050. Es de esperar que para entonces, se haya reducido el déficit alimentario, haya aumentado el consumo de alimentos inocuos y nutritivos per cápita en los países que padecen escasez y se hayan diversificado los regímenes alimenticios poblacionales, para mantener un vida sana y activa, con la consiguiente eliminación de las deficiencias específicas. Todos estos cambios tendrán un peso en los sistemas de producción de alimentos, en los recursos naturales y en el medio ambiente.

Conscientes de que los recursos naturales son limitados, y en la búsqueda de nuevas fuentes, la masa de los llamados desechos, si es manejada con adecuadas tecnologías y espíritu empresarial, constituye una fuente de recursos.

La lombricultura es el único sistema existente, de transformación de recursos orgánicos, que permite obtener por un lado *Humus de Lombriz*, de excelente calidad en fertilización orgánica y por otro lado, *Proteínas* de excelente calidad, para ser utilizadas como bionutriente orgánico tanto en nutrición vegetal como animal, en sistemas de producción integral, como la de alimentación avícola.

Las dietas balanceadas con base en cereales como maíz y proteína vegetal más las fuentes de minerales, vitaminas y aditivos alcanzan un máximo de energía metabolizable (EM) de 2950 cal/Kg, como promedio del iniciador y finalizador del crecimiento de aves, este es un nivel impráctico para poder alcanzar los rendimientos deseados en pollos de engorde. Para elevar los niveles de EM regularmente se emplea el uso de residuos avícolas (grasa) o harinas de carne.

Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados o lo hacen con excesiva lentitud por las aves y deben ser aportados por la dieta en un equilibrio tal que responda a los requerimientos nutricionales de las mismas, por lo que resulta importante conocer la composición aminoacídica en la formulación de piensos que incluyen la harina de lombriz.

La biosíntesis de los aminoácidos en animales monogástricos está supeditada a que el organismo disponga de grupos aminados, de cadenas carbonadas y de enzimas específicas que aseguren la transaminación. En las aves que consumen dietas concentradas, las materias nitrogenadas alimenticias están representadas principalmente por prótidos. Estas proteínas son hidrolizadas total o parcialmente en el tubo digestivo. No es totalmente evidente la existencia de una degradación completa de las proteínas hasta aminoácidos antes de la absorción intestinal.

Se debe además tener en cuenta que el crecimiento de las aves recién nacidas depende de la yema y del saco vitelino, por lo que, la incorporación exógena de una suspensión de

nutrientes produce un aumento inicial de peso que se mantiene hasta la faena. Esta suspensión nutritiva (pre-starter) estimula el tracto digestivo, haciendo que los pollitos en los primeros días de vida se independicen con mayor rapidez de los nutrientes del saco vitelino y posteriormente sirva como suministro de proteínas de alto valor biológico hasta completar el tiempo de vida antes de su faena.

El desarrollo de la avicultura industrial se inició con el mejoramiento genético de las aves y el avance en el conocimiento sobre la alimentación de monogástricos para definir cuales son los nutrientes y materias primas más apropiadas para suministrarlas. Otro aspecto de la nutrición y de la alimentación avícola, es el de dietas formuladas en base al concepto de la proteína ideal, cuya composición es idéntica a las exigencias para el mantenimiento y crecimiento del animal, dándose relaciones entre la lisina y otros aminoácidos en especial los azufrados

MATERIALES Y METODOS

Para el análisis de comparación de aminoácidos, para se confeccionó una base de datos, resultado de una recopilación del “Institut National de la Recherche Agronomique” INRA, Francia y el análisis de aminoácidos de harina de lombriz realizado en un analizador Beckman 120-C.

Para una visualización simple de las ventajas de la sustitución de harinas de carne bovinas por las harinas de lombriz, en lo referente a diferencias de composición aminoacídica se realizó una representación gráfica de barras.

A la misma base de datos se aplicaron técnicas estadísticas, utilizando el proceso de Análisis de Componentes Principales (ACP), a través de la utilización del “ Sistema portable d’Analyse des Done Numériques “ (SPAD-N), que junto al cartografiado de la información, permite brindar una representación de toda estructura de la información en un solo gráfico, incluyendo simultáneamente, las relaciones multidimensionales y los productos analizados conjuntamente, lo que permite brindar un diagnóstico por imagen y la rápida interpretación de toda la información contenida en los datos.

Las Proteínas hidrolizadas de lombrices se obtuvieron por hidrólisis enzimática con papaína, de la harina de lombriz (malla 60), en suspensión acuosa de 300 gr/l, con adición de papaína de 200,400, 600,1000,1400 y 1800 mg por cada Kg de harina de lombriz. Se incubó a 40°C y pH 7,0 -7,2 durante 48 horas, con agitación continua. La actividad proteolítica, se evaluó como nitrógeno amínico de los aminoácidos liberados, por el método de Sorensen. Se estudió el efecto de la concentración de Enzimas, sobre el % de Nitrógeno Amínico en las muestras y su evolución en función del tiempo.

En la sustitución de fuentes de proteínas en balanceados avícolas, se realizó un estudio preliminar con quince pollos de genética conocida, a los cuales se les asignó aleatoriamente una ración de alimentos cada lote de cinco.

El resto de los principales factores de producción que afectan el crecimiento de aves, se mantuvieron constantes durante el total de tiempo de crecimiento hasta la undécima semana (manejo, ambiente, sanidad). Se computó el peso y el consumo de alimentos de los pollos en la séptima y undécima semana de vida.

Con los datos obtenidos en esta experiencia, se realiza el diseño experimental con treinta pollos para cada fórmula de alimento ensayada.

Los pollitos BB, se adquirieron en una granja de Jujuy. De cuatro cajas conteniendo 100 unidades cada uno, se eligió una al azar para ser trasladada a granja de experimentación. Los pollitos fueron colocados en una unidad de cría o madre artificial, que es el lugar acondicionado especialmente donde se reciben los pollitos BB, se dispone de los implementos de crianza con campanas de calefacción, comederos y bebederos. La temperatura de recepción fue de 34° C en un ámbito de 10 m² aproximadamente.

Al cabo de 24 horas, se acondicionaron noventa jaulas de dimensiones 400x500x500mm, con un hábitat adecuado para mantener la temperatura, una cama de cáscara de arroz de 3 cm. de espesor, con el objeto de que sea aislante de la temperatura, absorbente de la humedad y diluyente de las deyecciones, como así también los comederos y bebederos individuales. Se procedió a distribuir los pollitos al azar en las jaulas desde el N° 1 al 90, el trabajo consistió en tomar una bolsa de bolillas numeradas y sortear el lugar de cada pollito para que coma una determinada ración (0, I, II,) jaula N° 1 a 30 Ración I; Jaula N° 31 a 60 Ración II; Jaula N° 61 a 90 Ración 0. La diferencia en las raciones consistió en reemplazar el 7 % de harina carne y hueso por harinas de lombriz en la ración I y la ración II harina hidrolizada. En los tres casos el agregado de proteínas de las harinas se mantuvo constante, es decir 32.2 kg/tn de balanceado, esta representa el 15% en las raciones 0-A y 17% para las raciones 0-B. Dentro de cada ración se subdividió en A y B donde la diferencia consistió en el contenido total de la proteína 21 % para la A y el 19% para la B.

Para el tratamiento estadístico de los datos experimentales, obtenidos en la hidrólisis enzimática con papaína, se usó el software MINITAB y se efectuó un análisis de varianza (one-way-Anova) a fin de determinar la similitud estadística entre los quintuplicados (o replicados) de cada condición y de todos ellos con el promedio matemático, a cada tiempo. Usando el software STATISTIC se ajustaron los datos experimentales a un

modelo matemático propuesto. Para la selección del modelo se tomó en cuenta la naturaleza de la reacción, asociando a una cinética química simple $dN/N = -k dt$.

Se determinó textura de la carne de músculos femorales y pectorales en Texturómetro QTS.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Fig.1, se observa una apreciable diferencia en la composición de aminoácidos, en especial en Lisina, Treonina, Cistina+Metionina, Arginina, etc., al sustituir a la harina de carne por la de la lombriz, lo que mejora la relación de dichos aminoácidos, los que producen un aumento del grosor y de la longitud de los músculos.

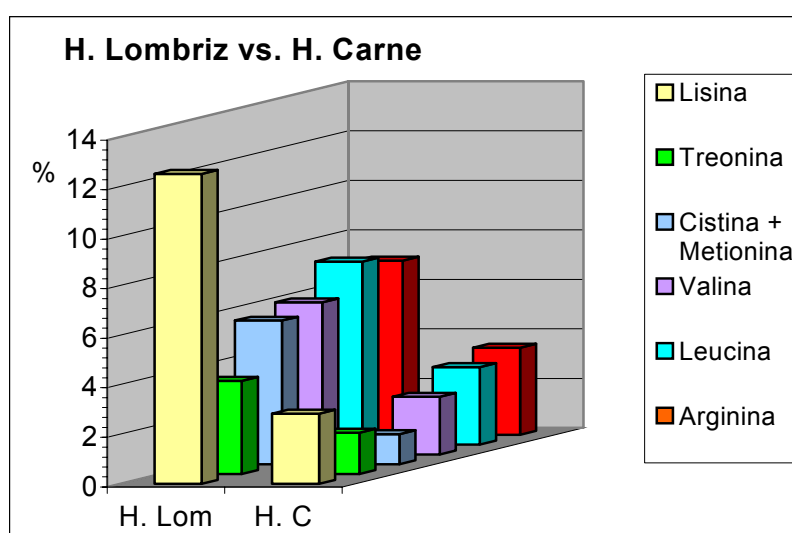
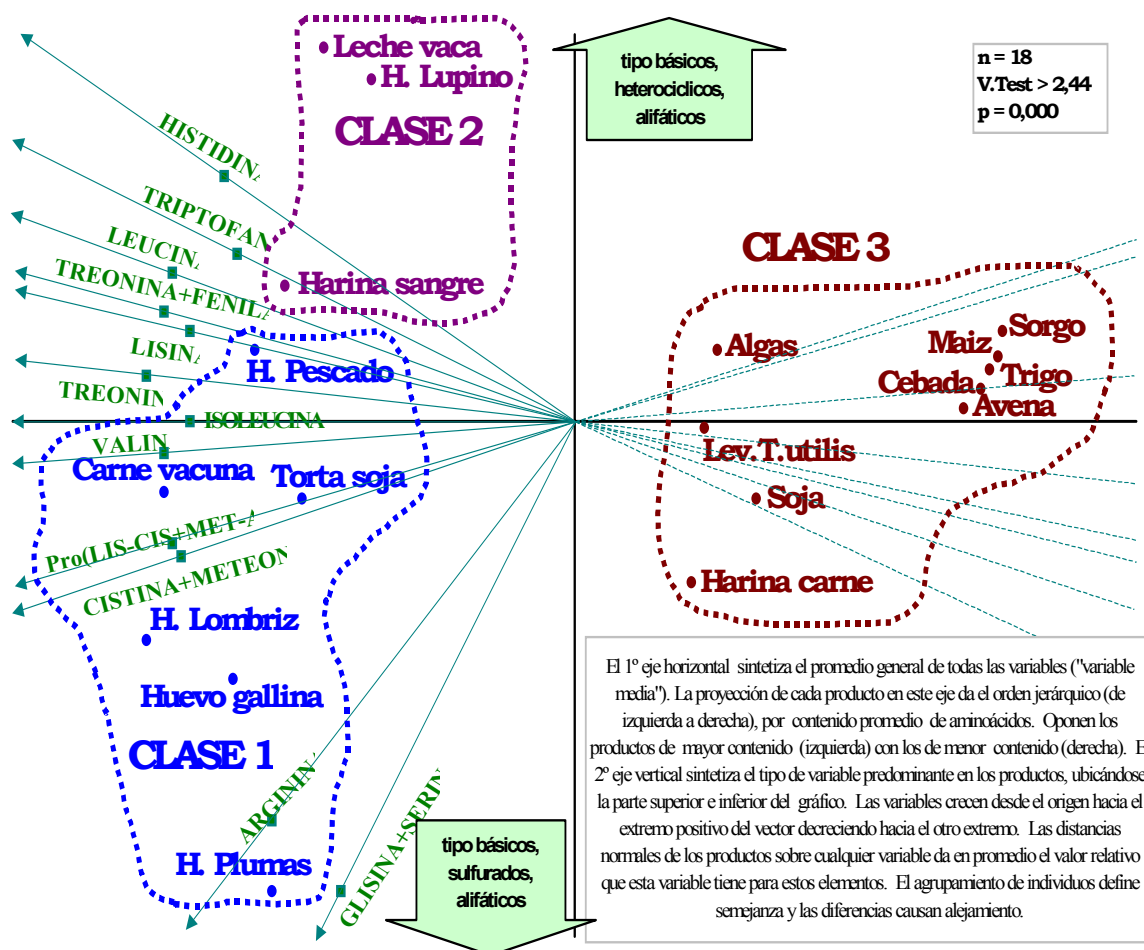


Figura 1

Aplicando técnicas estadísticas y el cartografiado gráfico de la información, corroboramos en Fig. 2, dos grupos entre clases homogéneas, uno donde están los cereales con bajos contenidos promedios de aminoácidos y otro donde resalta la harina de lombriz de mayor proporción de aminoácidos.

Los resultados del análisis estadístico muestran que: 1) el modelo propuesto ajusta satisfactoriamente los datos, 2) los valores de R^2 están alrededor de 0.96–0.97, no siendo menores a 0.90 en ningún caso. Los quintuplicados (o replicados) no difieren significativamente entre sí, siendo la corrida promedio de cada condición representativa de ese tratamiento con un nivel de significancia del 95%. Cuando se compararon los promedios entre sí se encontró que para [E]:[0], [200], [400] y [600] no hay diferencia significativa; mientras que para las [E]: [1000], [1400] y [1800] también hay similitud estadística aunque con un error un poco mayor.



En la Fig. 3, se observa el efecto de la concentración de enzima sobre el porcentaje de nitrógeno amínico, evidenciando que a mayor concentración de enzima [E] es mayor el porcentaje de Nitrógeno de Amínico.

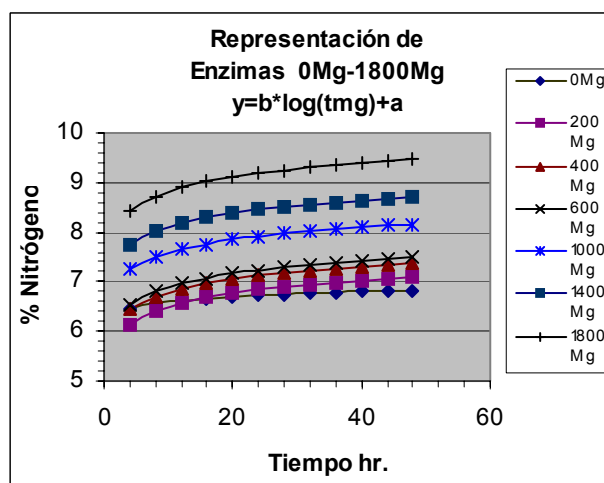


Figura 3

De acuerdo a las características de la suspensión obtenida y analizando los efectos de las distintas raciones de alimentos en el peso de los pollos Fig. 4, se realizó un diseño aleatorizado unifactorial, con tres niveles del factor, donde el mismo es el tipo de

alimentación y los tres niveles son las tres raciones 0, I, II. El estudio indica que hay diferencia a favor de la ración II que contiene proteínas hidrolizadas, con respecto al peso medio de los pollos en cada semana. Analizando los diagramas tipo caja de la semana siete y undécima se observa la distribución de los pesos alimentados con las distintas raciones al final de cada semana de vida. Se plantea un modelo estadístico lineal, se prueba la hipótesis nula, que dice que todas las medias de los tratamientos son iguales, esto es no hay diferencias entre las medias citadas; el análisis de la varianza es suministrado por el SPSS v10, donde hay que notar que en cada semana el cuadrado medio entre tratamientos es mucho mayor que el cuadrado medio dentro de tratamientos, esto indica que es improbable que las medias de tratamientos sean iguales. El crecimiento en los tres casos es exponencial durante todo el período de crianza, siendo la curva en forma de “S” alargada que sigue el modelo con ajuste a la función de Gompertz.

EVOLUCIÓN DEL PESO PROMEDIO SEMANAL DE LOS POLLOS SEGÚN RACIÓN

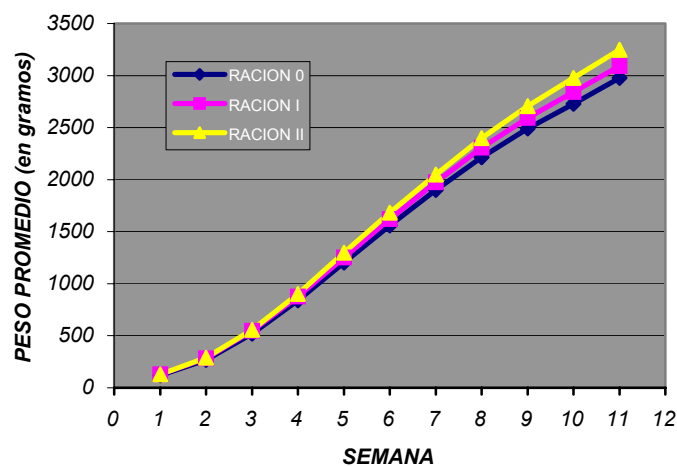


Figura 4

Las aves suelen ser sangradas y después desplumadas directamente tras haber sido sacrificadas. Las plumas son eliminadas del cuerpo antes de que los músculos que rodean las papilas de las plumas hayan alcanzado la rigidez cadavérica. Con mayor frecuencia, se eliminan la cabezas, los cuellos y las patas de las canales que son evisceradas. Durante el sacrificio y la evisceración se producen inevitables pérdidas de un cuarto porcentual del peso corporal. Se observa en Tabla1 que entre los tres grupos de pollos eviscerados, correspondiente a las raciones utilizadas, que los rendimientos mejoran con el uso de la harina de lombriz, tanto en el peso como en los promedios de los cortes preferenciales de carne, músculos femorales y pectorales. Las composiciones químicas de los pollos que comieron las harinas especiales muestran resultados superiores en proteínas, grasas y cenizas Tabla 2.

Tabla 1

Ración	Peso Vivo	Indice de Conv.	Ave Esvicerada		Visceras Comestibles		Desperdicios		Pechuga		Muslo	
			Gramos	%	Gramos	%	Gramos	%	Gramos	%	Gramos	%
Ración 0	2967	2,53	1987	67,00	267	8,90	713	24,10	366	12,30	417	14,00
Ración I	3092	2,46	2080	67,30	282	9,10	731	23,60	405	13,08	466	15,10
Ración II	3304	2,30	2247	68,00	308	9,30	749	22,10	465	14,20	528	16,30

Tabla 2

	Ración 0		Ración I		Ración II		Pollo M	
	Pechuga	Muslo	Pechuga	Muslo	Pechuga	Muslo	Pechuga	Muslo
Humedad %	71.69	73.01	70.57	72.10	70.33	71.69	73.11	76,22
Cenizas %	1.17	1.27	1.20	1.29	1.21	1.31	1.08	1,02
Proteínas %	23.84	20.86	24.50	21.68	25.07	22.31	22.94	19,1
Grasa %	1.44	1.56	1.59	1.64	1.27	1.26	1.40	1,48

La textura de las carnes en cuanto a dureza, cohesividad y masticabilidad se presenta en Tabla 3, observándose los efectos de la alimentación suministrada a los pollos tanto la tradicional, como la sustituida con proteína hidrolizada de lombriz.

Tabla 3

	Ración 0		Ración I		Ración II		Pollo M	
	Pechuga	Muslo	Pechuga	Muslo	Pechuga	Muslo	Pechuga	Muslo
Cohesividad	5.42	5.65	5.23	5.49	4.94	5.16	5.73	5.83
Masticabilidad	5.23	5.83	5.69	5.11	5.73	6.28	4.96	4.73
Adhesividad	-6.16	-5.21	-7.28	-5.43	-7.43	-5.63	-6.02	-4.73
Dureza	5.42	5.23	5.45	5.33	5.66	5.66	5.30	5.03
Gomosidad	4.67	4.10	4.73	4.03	4.68	4.06	4.16	4.28
Elasticidad	3.30	2.45	3.42	3.01	3.43	3.15	2.96	2.25

CONCLUSIONES

De los estudios realizados sobre la producción de lombrices *Eisenia foetida* a partir de estiércoles avícolas, se obtienen masas cárnicas, en forma de harinas, de alto contenido proteico, con un excelente perfil de aminoácidos, que suministrados en las dietas de pollos, en reemplazo de harinas de carne bovina y otras, se obtienen mejores carcasas de pollos, con mejor crecimiento desde las primeras semanas, utilizando los pollitos este nutriente como pre-starter, con menores índices de conversión de balanceados, mayores pesos de cortes preferidos por el consumidor, mejoramiento de la textura y calidad proteica, que hacen en general a un aumento de la productividad del sector productivo avícola.

BIBLIOGRAFIA

Berri, C.; Wacrenier, N.; Millet, N. and Le Bihan-Duval (2001). Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristic of broilers from experimental and commercial lines. *Poultry Science* 80: 833-838.

Brenes, A.; Marquardt, R. R.; Guenter, W. and Viveros, A. (2002). Effects of enzyme addition on the performance and gastrointestinal tract size of chicks fed lupin seed and their fractions. *Poultry Science* 81: 670-678.

Césari, R. M. (2001). Diagnóstico por imágenes de datos Universidad Nacional de Cuyo. Texto completo ISBN N° 044117.

Fletcher, D. L. (1999). Broiler breast meat color variation, pH, and texture. *Poultry Science* 78: 1323-1327.

Han, Y. and Parsons (1991). Protein and amino acid quality of feather meal *Poultry Sci.* 70:812-822.

Kalinowski, A.; Moran, Jr. E. T. and Wyatt, C. (2003). Methionine and cystine requirements of slow-and fast- feathering male broiler from zero to three weeks of age.

Latour, M. A. y otros (1994). The effects of dietary fat on growth performance, carcass composition, and feed efficiency in the broiler chick. *Poultry Science* 73: 1362-1369.

Lyon, B. G.; Smith, D. P. and Savage, E. M. (2004). Effects of diet and feed withdrawal on the sensory descriptive and instrumental profiles of broiler breast fillets. *Poultry Science* 83: 275-281.

Noy y Pichasow (1993). Efecto de la suplementación vía oral de una solución nutritiva (pre starter). *Agroindustria* Año 19 N° 109, Julio-Agosto 2001, p.p.20-30.

Sandusky, C. L. and Heath, J. L. (1998). Sensory and instrumental-measured ground chicken meat color. *Poultry Science* 77: 481-486.

SPAD-N. Systeme Portable Analyse des Dones Numériques versión 2.5PC (1994). Centre International de Statistique et d'informatique Appliques Francia.

ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE CALOR MEDIANTE FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA EN VARIABLE DISCRETA EN EL ENFRIAMIENTO DE PAPAS

ANSORENA, María R.^{*(1,2)}; DEL VALLE, Carlos E.⁽¹⁾; SALVADORI, Viviana O.^(2,3)

⁽¹⁾Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos – Fac. de Ingeniería, UNMDP Juan. B. Justo 4302 (7600) Mar del Plata, Argentina. Tel: (0223)-4816600. Fax: (0223)-4810046. ⁽²⁾ CIDCA – Fac. de Cs. Exactas, UNLP y CONICET ⁽³⁾MODIAL – Fac. de Ingeniería, UNLP *e mail: ransorena@fi.mdp.edu.ar

RESUMEN

Varias operaciones típicas del procesamiento y conservación de alimentos están vinculadas con cambios de la temperatura en función del tiempo. Existen soluciones analíticas que pueden emplearse en sistemas de geometría sencilla, con propiedades físicas constantes y condiciones de contorno constante. Cuando interesa analizar la temperatura bajo condiciones de contorno variables es imprescindible emplear otra herramienta de cálculo. Se ha demostrado la versatilidad de las funciones de transferencia en variable discreta, $F(z)$, principalmente en la predicción de historias térmicas frente a distintas perturbaciones externas. El propósito del presente trabajo es sistematizar el cálculo de las funciones de transferencia, evitando la determinación experimental de las mismas. Se realizaron varias series de ensayos experimentales, utilizando cilindros de papa y midiendo su respuesta térmica frente a escalones negativos de temperatura, simulando la refrigeración poscosecha de alimentos frescos de origen vegetal. Se estudió la dependencia de los coeficientes de la función de transferencia con el diámetro y la altura de las muestras.

Palabras claves: Función de transferencia, enfriamiento, papa.

ABSTRACT

Food processing and food storage operations involve temperature vs. time relationships. Analytical solutions solve simple geometry systems, with constant physical properties and constant boundary conditions. To analyze temperature evolution under variable boundary conditions another calculation tool is needed. The versatility of the discrete transfer functions $F(z)$ has been demonstrated, mainly in the prediction of thermal histories forehead to different external perturbations. The aim of the present work is to systematize the calculation of transfer functions, avoiding their experimental determination. Several

series of experimental tests were performed, using potato cylinders and measuring their thermal responses to negative steps in the external temperature, simulating the refrigeration of fresh vegetables. The dependence of the transfer function coefficients with the diameter and the height of the samples were studied.

Keywords: Transfer function, Cooling, Potato.

INTRODUCCIÓN

La transferencia de calor es uno de los principales fenómenos que ocurren en la mayoría de las operaciones involucradas en la transformación y preservación de alimentos, en particular, el enfriamiento. En la mayoría de los casos los alimentos son sometidos a cambios en la temperatura del entorno, por lo que la temperatura tiene una influencia directa en la calidad de los mismos y el conocimiento de las historias térmicas tiene gran importancia en el diseño y operación de los equipos (Becker, & Fricke, 2004).

La aplicación de funciones de transferencia en alimentos, para la resolución de problemas de transferencia de calor, ha sido motivo de estudio de varios trabajos en la última década demostrando ser una herramienta válida para el análisis de problemas de transferencia de calor con condiciones de contorno variables (Márquez y col., 1998,2003; Salvadori y col., 1994; Vírveda y col., 2000).

TEORÍA

El comportamiento dinámico de cualquier sistema lineal puede ser caracterizado por una función de transferencia discreta $F(z)$. Por lo tanto, la respuesta del sistema $R(z)$ a cualquier perturbación $P(z)$, puede predecirse conociendo los coeficientes f_n de la función de transferencia $F(z)$ de la siguiente manera:

$$R(z) = F(z) P(z) \quad (1)$$

En alimentos sometidos a un enfriamiento, la perturbación es la temperatura externa y la respuesta es la temperatura en el punto característico, en este caso, el punto a mayor temperatura, que coincide con el centro geométrico si el alimento tiene una composición homogénea, condiciones de contorno simétricas y si el mecanismo de transferencia de calor en el alimento es conductivo.

La temperatura en el centro térmico T_c se calcula a los intervalos de muestreo Δ , de acuerdo a:

$$T_c(n\Delta) = T_i + R(n\Delta) \quad (2)$$

donde:

$$R(n\Delta) = P(0)f_{n+1} + P(\Delta)f_n + \dots + P((n-1)\Delta)f_2 + P(n\Delta)f_1 \quad (3)$$

En resumen: conociendo los coeficientes de la función de transferencia $F(z)$, f_n y los valores de perturbación en los intervalos $n\Delta$, $P(i\Delta)$, se calcula para cada intervalo, la temperatura en el punto característico.

Con el objetivo de encontrar ecuaciones de predicción de $F(z)$ para el sistema particular estudiado en este trabajo, se analizó la dependencia de los coeficientes experimentales f_n con el intervalo de muestreo y con las dimensiones del alimento: diámetro y altura.

En función de dicho análisis y atendiendo a los fundamentos teóricos de transferencia de calor en sistemas de propiedades constantes, se propone la ecuación (4) para regresionar los coeficientes f_n con el tiempo de muestreo Δ :

$$f_n = a(n\Delta)^d \exp(-b(n\Delta)) \quad (4)$$

Los tres parámetros de la ecuación (4), a , b y d dependen fuertemente del diámetro D y la altura H . Dichas relaciones son contempladas en los siguientes modelos de regresión (Ansorena y col., 2005):

$$a = m \exp(nD + pH) \quad (5)$$

$$b = q \exp(rD) (H^2 + sH + u) \quad (6)$$

$$d = v \exp(wD) (H^2 + yH + z) \quad (7)$$

donde m , n , p , q , r , s , u , v , w , y y z son los parámetros de regresión.

MATERIALES Y METODOS

1. Preparación de las muestras y adquisición de datos tiempo/temperatura

Papa fresca y pelada a mano fue cortada en cilindros de distintos diámetros y alturas. Las dimensiones de las muestras se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Diámetros y alturas de las muestras de papa

Muestra	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Diámetro (m)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.04	0.05
Altura (m)	0.02	0.03	0.04	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03

Las muestras, inicialmente a temperatura uniforme igual a 30°C, fueron sumergidas en un baño termostatzado a 5°C (M 911 Coleparmer) provocando un salto escalón negativo en la temperatura del entorno. Se registró la evolución de la temperatura en el centro geométrico de las muestras mediante termocuplas conectadas a un adquisidor Testostor 175, utilizando un intervalo de muestreo Δ de 1 minuto

2. Determinación los coeficientes de $F(z)$

Adimensionalizando los datos de temperatura resultantes de las historias térmicas experimentales en función de las temperaturas inicial y externa, se genera el polinomio $R(z)$. En tanto los coeficientes de $P(z)$ son iguales a la unidad. La división polinomial indicada en la Eq. (1) fue realizada con MATLAB, empleando la función *deconv* (MATLAB 6, 2000).

3. Regresión no lineal

Las ecuaciones (4), (5), (6) y (7) fueron ajustadas mediante regresión no lineal empleando la rutina de cuadrados mínimos *lsqcurvefit* (MATLAB 6, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1a muestra los coeficientes experimentales f_n para los cilindros de igual diámetro en tanto en la figura 1b se representan los coeficientes experimentales f_n correspondientes a muestras de igual altura.

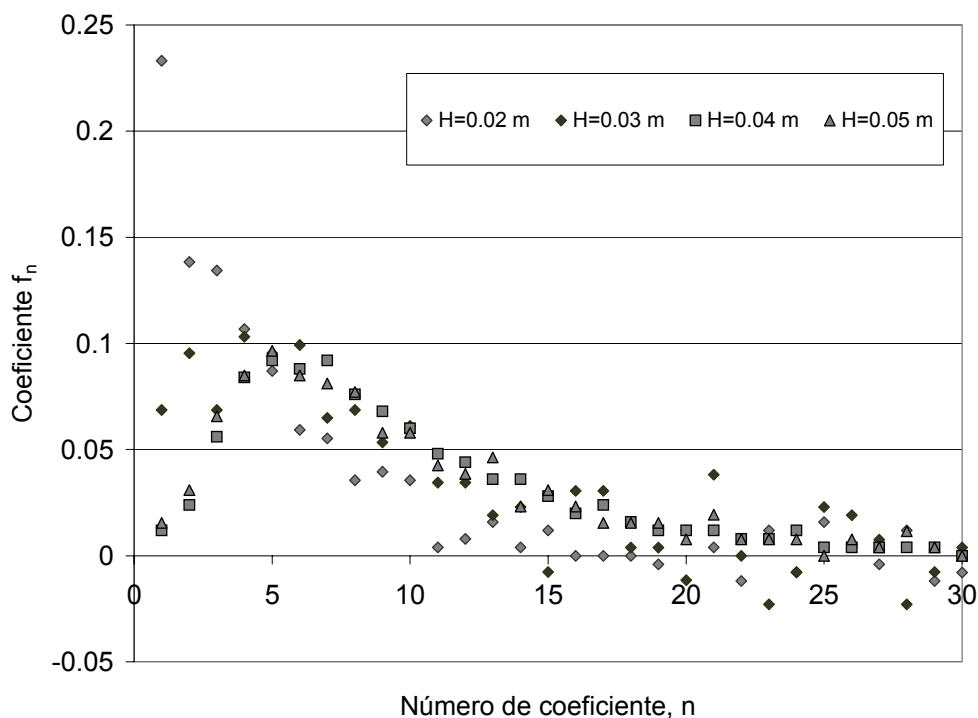


Figura 1a. Coeficientes experimentales de $F(z)$ para $D=0.04$ m y distintos valores de H .

Cabe destacar que el ajuste de las ecuaciones de regresión propuestas se realizó en dos etapas ya que al incluir la dependencia de los parámetros a , b y d con las dimensiones geométricas en la ecuación (4) para realizar una única regresión, no se obtuvieron

resultados satisfactorios, probablemente debido al gran número de parámetros involucrados.

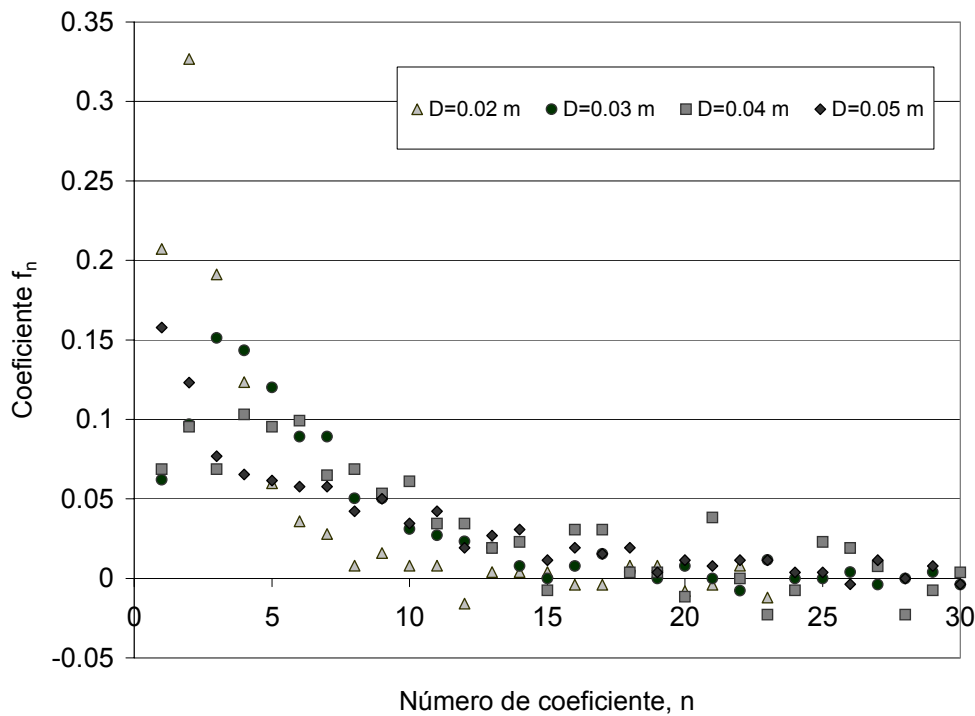


Figura 1b. Coeficientes experimentales de F(z) para H=0.03 m y distintos valores de D.

Los valores de los parámetros a, b y d correspondientes a cada cilindro se detallan en la tabla 2. A partir de estos valores se calcularon los parámetros de ajuste de las ecuaciones (5), (6) y (7).

Tabla 2. Parámetros de regresión de la ecuación (4)

Serie	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
a	0.2757	0.0788	0.0177	0.0219	0.6326	0.1273	0.0791	0.0875
b	0.2463	0.2612	0.3368	0.3325	1.3776	0.4570	0.261	0.2231
d	2.03E-06	0.9085	2.0203	1.8892	2.8973	1.3867	0.9061	0.9092
r²	0.9500	0.9475	0.9784	0.9708	0.9849	0.9796	0.9125	0.9488

$$a = 509.04 \exp(-1.152D - 1.469H) \quad r^2=0.9645 \quad (8)$$

$$b = 0.282 \exp(-0.84D)(H^2 - 2.973H + 25.597) \quad r^2=0.9691 \quad (9)$$

$$d = 0.0034 \exp(-0.563D)(H^2 + 1847H - 3007) \quad r^2=0.90 \quad (10)$$

Los coeficientes experimentales y predichos para dos muestras en particular (P₁ y P₅) se comparan en las figuras 2a y 2b, observando una buena concordancia entre los distintos valores.

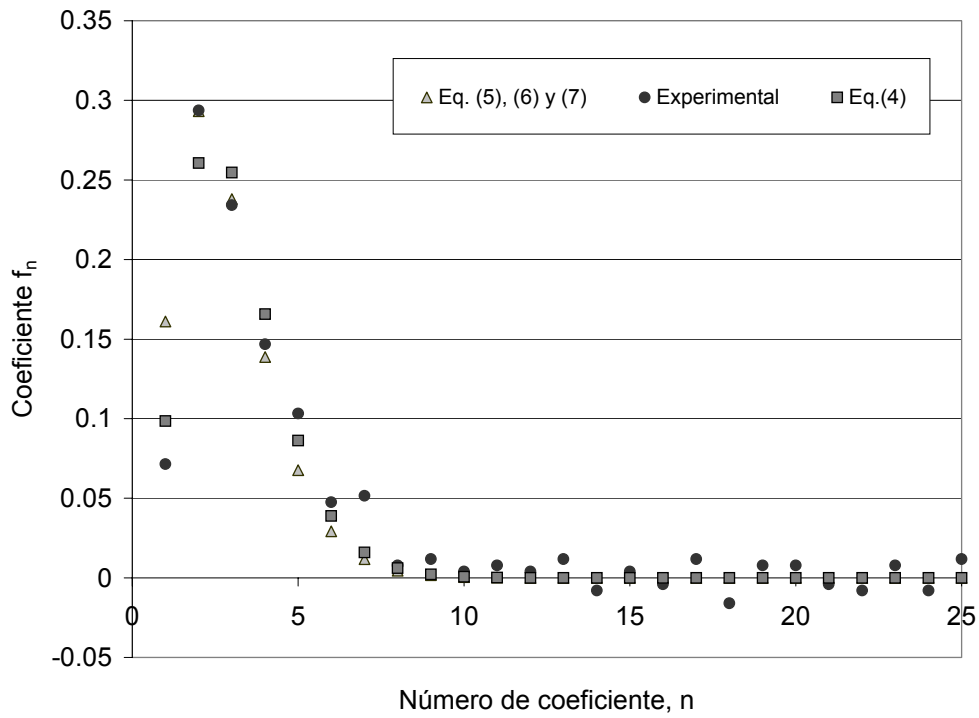


Figura 2a. f_n experimentales y predichos para P_5

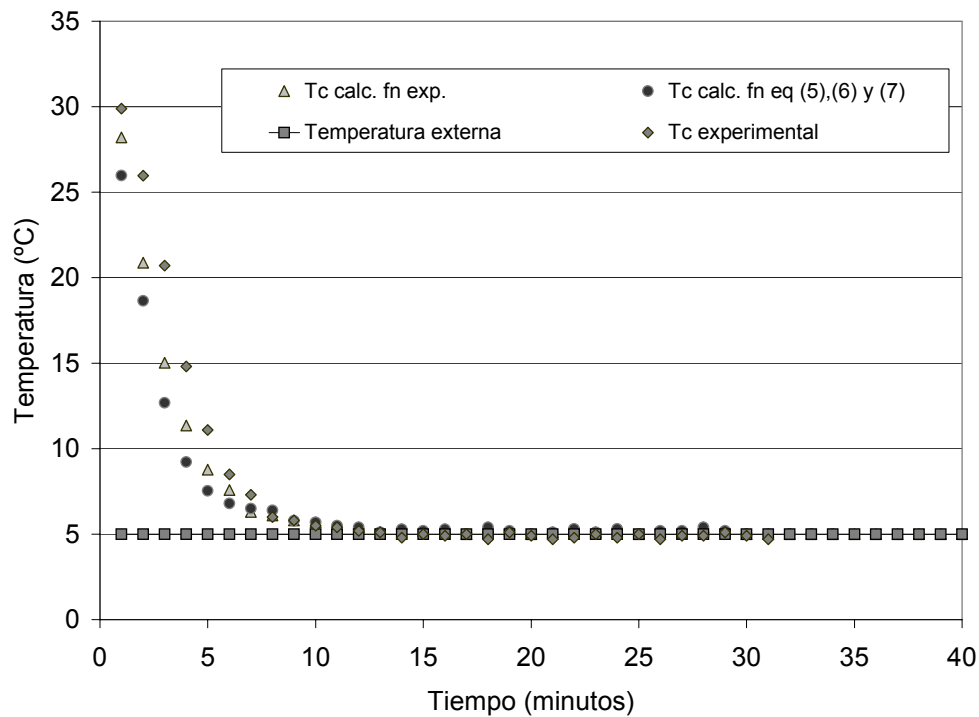


Figura 2b. f_n experimentales y predichos para P_1

Por último en la figura 3 se ha graficado la respuesta térmica, experimental y calculada, del centro térmico de la muestra P_5 frente a una perturbación escalón. La historia térmica se ha calculado empleando en la ecuación (2) los coeficientes f_n experimentales y los

valores de f_n correspondientes al modelo propuesto (ecuaciones (4), (5), (6) y (7)). Se observa que ambas curvas calculadas representan con muy buena precisión los valores de temperatura experimentales.

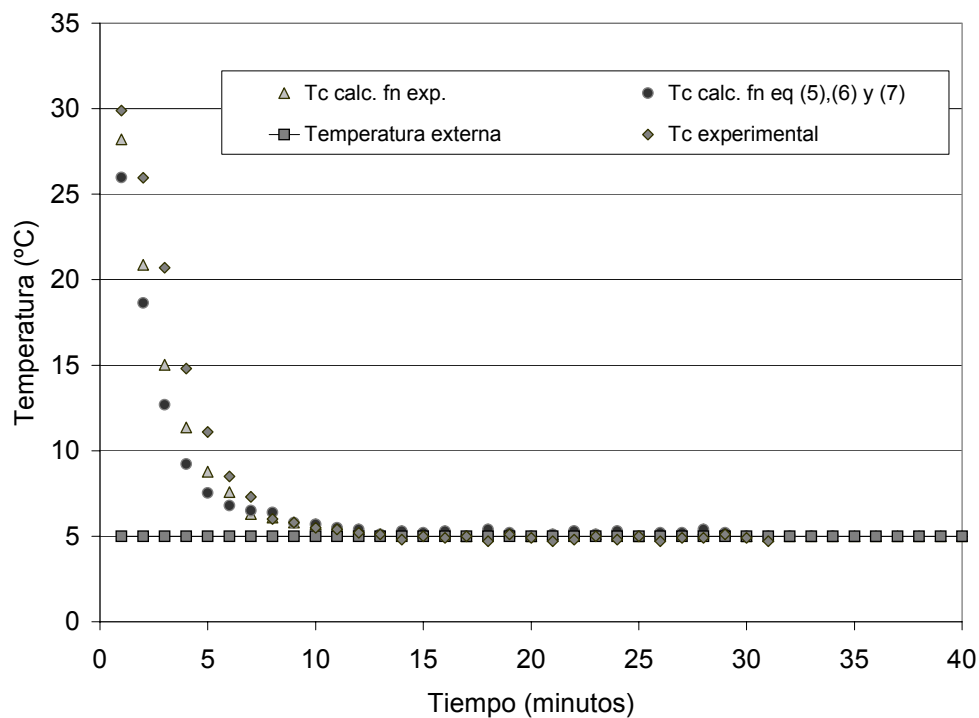


Figura 3. Temperaturas experimental y calculadas del centro térmico de la muestra P5

CONCLUSIONES

El uso de funciones de transferencia en variable discreta $F(z)$ permite predecir las historias térmicas de alimentos conductivos frente a condiciones de contorno variables en el tiempo, en particular en el análisis de distintas condiciones de refrigeración de alimentos.

La metodología propuesta en este trabajo permite sistematizar el cálculo de los coeficientes de $F(z)$ en función de las dimensiones del producto, evitando su determinación experimental.

BIBLIOGRAFIA

- Ansorena, R., del Valle, C.E., Salvadori, V.O. (2005).** Thermal processing of seafood: Effect of container size. *En Actas de Enpromer* (aceptado).
- Becker, B. R., & Fricke, B. A. (2004).** Heat transfer coefficients for forced- air cooling and freezing of selected foods. *Int J Refrig*, 27, 540.
- Márquez, C. A., De Michelis, A., Salvadori, V.O., Mascheroni, R.H. (1998).** Application of transfer functions to the thermal processing of particulate foods enclosed in liquid medium. *J. Food Eng.* 38,189.

Márquez, C.A., Salvadori, V.O., Mascheroni, R.H., De Michelis, A. (2003). Application of transfer functions to the thermal processing of sweet and sour cherries preserves: Influence of particle and container sizes. *Food Sci. Technol. Int.* 9(2), 69.

MATLAB 6 Release 12 (2000). The MathWorks, Inc: Natick, MA.

Salvadori, V.O., Sanz, P.D., Dominguez Alonso, M., Mascheroni, R.H. (1994). Application of z-transfer functions to heat or mass transfer problems. Their calculation by numerical methods. *J. Food Eng.* 23, 293.

Vírseda, P., Pinazo, J., Pichetto, M G., Soto, V. (2000). Heat conduction in multi-layer spherical products during cooling and storage by transfer function (F_z). *In Improving postharvest technologies of fruits, vegetables and ornamentals*, Murcia, Spain, Vol. II: 859.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido realizado con el aporte de CONICET, ANPCyT, UNLP y UNMdP.

EFFECT OF DIMENSIONS ON THE COOLING RATE OF CONDUCTIVE FOODS USING TRANSFER FUNCTIONS

GLAVINA ⁽¹⁾, Mariela Y., DI SCALA ^(1,2), Karina C., and DEL VALLE ⁽¹⁾, Carlos E.

⁽¹⁾Grupo de Investigación en Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Mar del Plata. Juan B. Justo 4302. Tel. 0223-4816600. FAX: 0223-4810046. Mar del Plata. 7600. Argentina. ⁽²⁾ CONICET (Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas). Argentina. E-mail: kdiscala@fi.mdp.edu.ar

RESUMEN

Se simularon las historias térmicas de alimentos conductivos durante procesos de enfriamiento, utilizando funciones de transferencia, a fin de evaluar la respuesta del sistema a un cambio brusco en la temperatura del entorno.

El alimento se caracterizó como un sistema de primer orden con demora (L), con ganancia unitaria y constante de tiempo (τ). Cilindros de papa de diferentes alturas y diámetros fueron sometidos a cambios escalón en la temperatura del entorno. A partir de las historias térmicas en el centro geométrico se obtuvieron los valores de L y τ para cada condición experimental y se relacionaron con el diámetro y la altura de las muestras.

La metodología propuesta permite predecir satisfactoriamente la evolución de temperatura en el centro geométrico de cilindros de papa frente a cambios bruscos en la temperatura del entorno.

ABSTRACT

Thermal histories of conductive foods were numerically simulated during cooling using transfer function methodology as the response to a sudden change in the surrounding temperature.

Potato cylinders were characterized as delayed first order systems, with unit gain, a time constant (τ) and dead time (L). Samples of different heights and diameters were used to study the effects of dimensions on the cooling rate as well as the relationship between size and transfer function parameters.

The present approach allows the prediction of the temperature profiles in the geometrical center of potato cylinders when the surrounding temperature is changed.

Keywords: transfer functions, cooling, dimensions, potatoes.

INTRODUCTION

In many food processing applications, including cooling, heat transfer is the main physical phenomena that occurs, and temperature which is the main variable that affects foods quality attributes, depends on time as well as the position inside the sample. Due to changes in the surrounding temperature during cooling, the estimation of food thermal histories is required in order to achieve not only the optimally process time but also to design food refrigeration equipment (Becker, & Fricke, 2004).

Transfer functions with discrete variables in the z-domain to predict temperature profiles in food products during thermal processes were reported (Salvadori, Mascheroni, Sanz, & Domínguez Alonso, 1994; Marquez, De Michelis, Salvadori, & Mascheroni, 1998). Nevertheless, the application of transfer functions with continuous variables in the s-domain (Laplace Transform) presents a simple model to predict thermal histories in foods where heat is mainly transport by conduction (Glavina, Di Scala, Ansorena, & del Valle, 2005).

Some authors studied the effects of size on heating and cooling rates using transfer function with discrete variable (Marquez, Salvadori, Mascheroni, & De Michelis, 2003), response factors (Virsedá, & Pinazo, 1997) and mathematical modeling (Abril, Virsedá, & Moure, 1998) but the information is rather scarce.

The aim of this work was to predict thermal histories of conductive foods with transfer functions in continuous variables, assuming that they behaved as delayed first order systems and to relate the transfer functions parameters with the sample dimensions.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation and time/temperature data acquisition

Potato cylinders were cut from fresh, hand peeled into samples of different heights and diameters. The diameters and heights ranged from 2 to 5 cm.

The samples were subjected to a step like change in the surrounding temperature by moving them from one well-stirred water bath at 30 °C to another at 5 °C (M 911 Coleparmer, Germany). Temperatures at the geometrical center of the samples were registered with a temperature data logger (Testo GMBH & Co. Testo - Str.1, D -79853 Lenzkirtch, Germany).

Model

The food response was predicted assuming that it behaved as a delayed first-order system. The transfer function of a system in the Laplace transform domain is defined as the ratio of output variable $T_c(s)$ to the input variable $T_a(s)$ (Stephanopoulos, 1984). The transfer function for a delayed first-order system with unit gain is:

$$\frac{T_c(s)}{T_a(s)} = \frac{e^{-Ls}}{\tau s + 1} \quad (1)$$

Where T_c is the center sample temperature, T_a is the surrounding temperature, L is the dead-time and τ is the time constant.

Since the ambient temperature undergoes a sudden step like change, Eq. (1) can be written as:

$$T_c(s) = \frac{A}{s} \frac{e^{-Ls}}{\tau s + 1} \quad (2)$$

Where A/s represents the Laplace transform of the mentioned step like change.

By the inversion of Eq. (2) the evolution of T_c in the time domain is obtained:

$$T_c(t) = T_0 \quad t < L \quad (3)$$

$$T_c(t) = T_0 + (T_f - T_0) \cdot (1 - e^{-(t-L)/\tau}) \quad t \geq L \quad (4)$$

Where T_0 is the temperature of the source bath, T_a is the temperature of the destination bath and t is the time elapsed since the sample is moved from one bath to another.

A mathematical model was proposed to relate the diameter (D) and the height (H) of sample cylinders to cooling rates through the model parameters associated with Eqs. (3) and (4) as following:

$$\begin{bmatrix} L \\ \tau \end{bmatrix} = a_1 + a_2 \times D + a_3 \times H + a_4 \times D \times H \quad (5)$$

Model parameters were estimated by fitting the corresponding equations to the experimental data, using a non-linear regression routine (MATLAB, MathWorks Inc., v. 7.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Regression coefficients associated with Eq. (5) are shown in Table 1 along with the standard deviation and r^2 tests.

The average lag and constant time are 46.05 ± 7.00 and 367.35 ± 19.02 , respectively.

Figures 1 and 2 show the comparison between experimental and calculated lag and constant time for all the data obtained in laboratory. Although the slopes of lines in the mentioned figures tend to unity (Table 1), the interception with y-axis is different from zero indicating differences between the compared data. This could be due to experimental error during measurement of thermal histories.

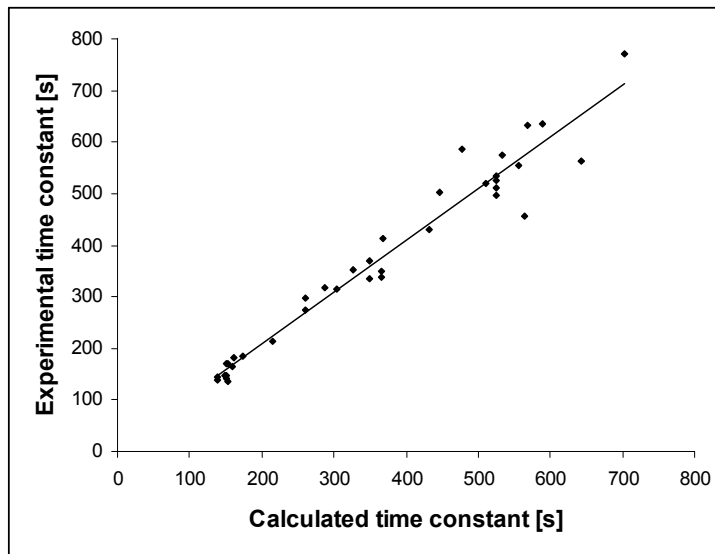


Figure 1. Comparison of experimental and calculated time constant (τ), based on Eq. (5), $r^2 = 0.95$.

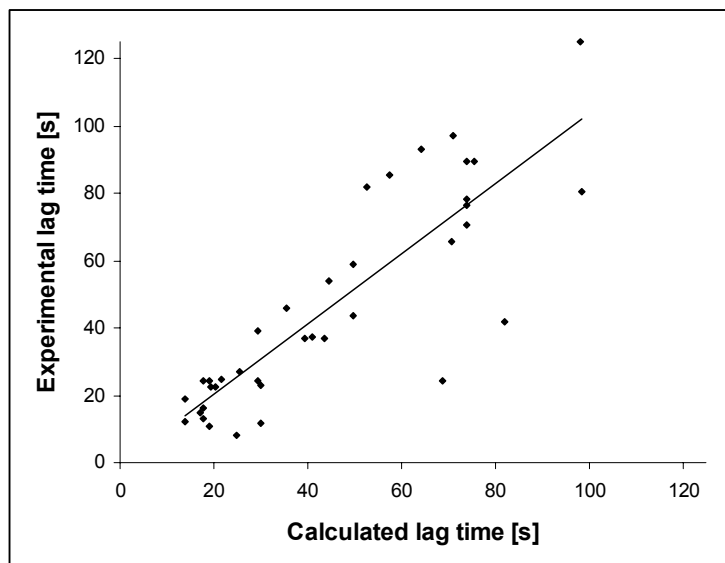


Figure 2. Comparison of experimental and calculated lag time (L), based on Eq. (5), $r^2 = 0.73$.

Both the time constant (τ) and the dead time (L) increased with either height or sample diameter. As expected, both parameters are related to the response time of the system and cooling rate which are directly influenced by the sample size. As the diameter or height is increased, cooling from the outer surface of the sample presents a lower rate since the temperature front needs more time to reach the geometrical center through the material.

Table 1. Regression parameters for lag time (L) and time constant (τ) obtained for potatoes cylinders, based on Eq. (5).

Parameters	Dead Time, L (s)	Time constant, τ (s)
a_1	20.918	98.276
a_2	-7.252	8.673
a_3	-8.826	-55.402
a_4	6.308	33.91
R^2	0.908	0.978
σ	7.007	19.022
Slope of line in Figs. 1 and 2	1.042	1.005

Figure 3 shows typical temperature profiles at the geometrical center of different samples together with the representation of the modeling equation. The results indicate that the transfer function predicts experimental thermal histories in a very close mode.

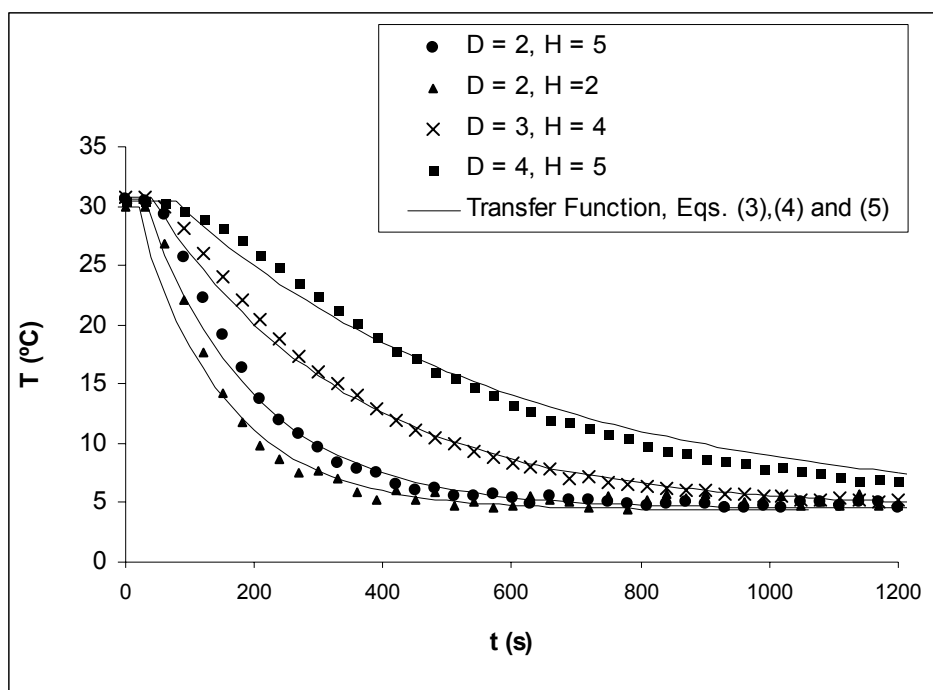


Figure 3. Temperature profiles at the geometrical center of potato cylinders during cooling at 5°C. (Diameters and heights are in centimeters)

CONCLUSIONS

Transfer functions in Laplace Transform domain to predict thermal histories during cooling of conductive foods, particularly potatoes cylinders, were studied.

The transfer function parameters were related to sample dimensions (diameter and height) and statistical tests were used to validate the presented mathematical model.

The proposed methodology was satisfactorily applied to simulate cooling rates and the results can be used to maximize the efficiency of the cooling operations for foods.

BIBLIOGRAFIA

Abril, J., Virseda, P., & Moure, J. (1998). Modelización de la penetración de calor en conservas vegetales. In: *Segundo Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos*. Bahía Blanca, Argentina, March 24-27. Paper IV. 11.

Becr, B. R., & Fricke, B. A. (2004). Heat transfer coefficients for forced-air cooling and freezing of selected foods. *International Journal of refrigeration*, 27, 540-551.

Glavina, M.Y., Di Scala, K.C., Ansorena, R., & del Valle, C.E. Estimation of Thermal Diffusivity of Foods using Transfer Functions. *Lebensm.-u.-Technol.* (Accepted for Publication, March 2005)

Marquez, C. A., De Michelis, A., Salvadori, V. O., & Mascheroni, R. H. (1998). Application of transfer functions to the thermal processing of particulate foods enclosed in liquid medium. *Journal of Food Engineering*, 38, 189-205.

Marquez, C. A., Salvadori, V. O., Mascheroni, R. H., & De Michelis, A. (2003). Application of transfer functions to the thermal processing of sweet and sour cherries preserves: Influence of particle and container sizes. *Food Sci. Tech. Int.*, 9, 69-76.

Salvadori, V. O., Mascheroni, R. H., Sanz, P. D., & Domínguez Alonso, M. (1994). Application of z-transfer functions to multidimensional heat transfer problems. *Latin Am. Appl. Res.*, 24, 137-147.

Stephanopoulos, G. (1984). *Chemical Process Control: an introduction to theory and practice*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632, USA.

Virseda, P., & Pinazo, J. M. (1997). Thermal behavior in multilayer products by response factors. *Journal of Food Engineering*, 33, 347-358.

MODELADO Y SIMULACIÓN DE LA DESODORIZACIÓN DE ACEITES VEGETALES

MATEOS Lorena E., ECHARTE Roberto E. y CRAPISTE Guillermo H.

PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur-CONICET), La Carrindanga Km 7, C.C. 717, 8000 Bahía Blanca, Argentina, Fax: (54-291)4861600. E-mail: lmateos@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló y resolvió numéricamente un modelo para la simulación de un desodorizador continuo de aceites vegetales. El modelo consiste principalmente en un conjunto de ecuaciones algebraicas que representan la eliminación por destilación de los distintos ácidos grasos y otros componentes del aceite, incluyendo la cinética de formación de isómeros *trans*.

Se completa con correlaciones para calcular las propiedades de equilibrio de los distintos compuestos, ecuaciones para evaluar las propiedades físicas de ambas fases, y un método de cálculo para la eficiencia de cada etapa. El modelo permite estudiar el efecto del tipo de material (tipo de aceite, contenido inicial de ácidos grasos libres y tocoferoles) y las variables operativas (temperatura, presión, caudales de aceite y vapor de arrastre) sobre la eficiencia del proceso y la calidad del producto.

Palabras Claves: Desodorización, aceites, simulación, ácidos grasos libres, tocoferoles, isómeros *trans*.

ABSTRACT

A model to simulate the continuous deodorization of vegetable oils was developed and solved numerically. The model consists in a set of algebraic equations representing the stripping of the main free fatty acids and other oil compounds, as well as the kinetic of production of *trans*-isomers. Also includes correlations to evaluate the equilibrium properties of the volatile compounds and the physical properties of both phases, and a method of calculation for the efficiency in each stage. The model is useful to study the effect of the material (oil, initial content of free fatty acids and tocopherols) and the operation variables (temperature, pressure, and stripping vapor) on process efficiency and oil quality.

INTRODUCCIÓN

La desodorización es la última etapa del proceso de refinado de aceites vegetales y está orientada a eliminar los ácidos grasos libres y productos volátiles que confieren sabores y olores indeseables a los aceites comestibles. La desodorización se realiza por un proceso de destilación y arrastre con vapor a relativamente altas temperaturas (200-270°C) y bajas presiones (1-8 mm Hg). La desodorización es factible debido a la gran diferencia de volatilidades entre los triglicéridos presentes en los aceites neutralizados y blanqueados, prácticamente no volátiles, y las sustancias que se desea eliminar. La utilización de un gas inerte o vapor de arrastre aumenta la vaporización y reduce más la temperatura necesaria para la destilación (Norris, 1985).

Durante el proceso también se eliminan parcialmente otros componentes importantes de los aceites, como tocoferoles, tocotrienoles, esteroides y ésteres grasos. Además, pueden formarse isómeros *trans* y originarse pérdidas de triglicéridos por arrastre o degradación térmica e hidrolítica. La aplicación de bajas presiones durante la operación protege el aceite caliente de la oxidación atmosférica, reduce el daño térmico y la hidrólisis indeseada del aceite por el agua, y reduce la cantidad necesaria de vapor.

En general los compuestos indeseables en el aceite sin desodorizar tienen menor presión de vapor que los ácidos grasos, de modo que cuando el contenido de los ácidos grasos libres se reduce de 0.01-0.03% y el valor de peróxido es cero en el aceite desodorizado, la mayoría de estos compuestos han sido eliminados.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo y resolución numérica de un modelo para la simulación de un desodorizador continuo de aceites vegetales que permita estudiar el efecto del tipo de material y las variables operativas sobre la eficiencia del proceso y la calidad del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo consiste principalmente en un conjunto de ecuaciones algebraicas (dependiendo del número de etapas) que representan la eliminación por destilación de los distintos ácidos grasos y otros componentes del aceite, incluyendo la cinética de formación de isómeros *trans*. Se completa con correlaciones para predecir las propiedades de equilibrio de los distintos compuestos, ecuaciones para evaluar las propiedades físicas (viscosidad, densidad y difusividades) de ambas fases, y un método de cálculo de la eficiencia de cada etapa.

El modelo matemático desarrollado considera un proceso sin reacción química, el aceite o triglicéridos como no volátil y seis compuestos volátiles: los ácidos grasos libres

principales palmítico (pal), esteárico (est), oleico (ol), linoleico (lin) y linolénico (linn) y el tocoferol (toc). Los balances se realizaron en base libre de soluto, es decir considerando que los caudales de aceite (triglicérido) y vapor se mantienen constantes a lo largo de toda la columna (Figura 1).

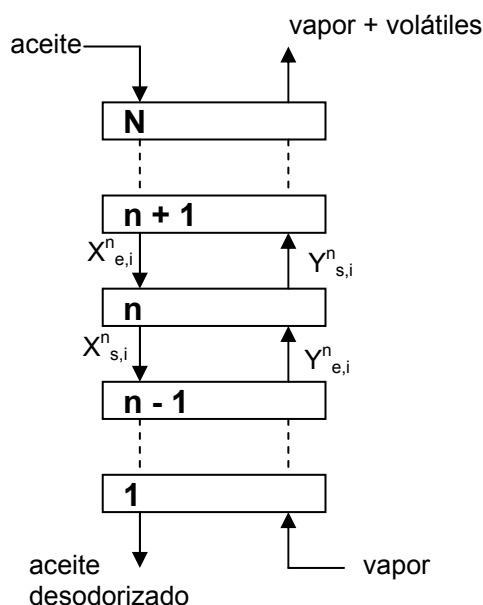


Figura 1. Esquema del desodorizador continuo con N platos.

El balance de masa del compuesto i para un plato n está dado por:

$$W (X_{e,i}^n - X_{s,i}^n) + S (Y_{e,i}^n - Y_{s,i}^n) = 0$$

donde W es el caudal de aceite (triglicérido) en kg/min, S es el caudal de vapor en kg/min, $X_{e,i}^n$ y $X_{s,i}^n$ son las composiciones en masa del compuesto i en la corriente de aceite de entrada y salida del plato n , e $Y_{e,i}^n$ y $Y_{s,i}^n$ son las composiciones en masa del compuesto i en la corriente de vapor de entrada y salida del plato n .

La ecuación de equilibrio relaciona las composiciones entre las corrientes de salida del plato:

$$Y_{s,i}^n = K_i \cdot X_{s,i}^n$$

K_i es la constante de equilibrio que puede ser calculada como:

$$K_i = \frac{\gamma_i \cdot P_i^0(T)}{P_T} \cdot E$$

donde γ_i es el coeficiente de actividad, $P_i^0(T)$ es la presión de vapor del compuesto puro i a la temperatura del sistema, P_T es la presión total del sistema y E es un factor de eficiencia del proceso de desodorización, calculado a partir del método AIChE (King, 1980).

Los ácidos grasos insaturados pueden presentar diferentes configuraciones geométricas, aunque en los aceites vegetales están naturalmente en la forma *cis*. Durante la desodorización, por efectos de la temperatura y el tiempo de procesamiento, se forman cantidades variables de ácidos grasos *trans*. Esta transformación es común a todos los ácidos grasos insaturados y es proporcional al grado de insaturación (Melo, 2002). Las reacciones de isomerización geométrica del ácido linoleico y linolénico pueden ser representadas por una cinética de primer orden con una constante de isomerización que varía con la temperatura de acuerdo a la ley de Arrhenius (Hénon et.al., 1999):

$$(\text{trans } C_{18:2})_t = (C_{18:2})_{t=0} \cdot (1 - 10^{-K(L) \cdot t}) \quad \log K(L) = -\frac{7921.95}{T} + 12.76$$

$$(\text{trans } C_{18:3})_t = (C_{18:3})_{t=0} \cdot (1 - 10^{-K(Ln) \cdot t}) \quad \log K(Ln) = -\frac{6796.63}{T} + 11.78$$

donde $(\text{trans } C_{18:2})_t$ y $(\text{trans } C_{18:3})_t$ representa el contenido de isómeros *trans* del ácido linoleico y linolénico, respectivamente, formado en el tiempo t ; $(C_{18:2})_{t=0}$ y $(C_{18:3})_{t=0}$ son el contenido de ácido linoleico y linolénico en el tiempo cero, $K(L)$ y $K(Ln)$ son las constantes de isomerización del ácido linoleico y linolénico en h^{-1} , t es el tiempo de proceso en horas y T es la temperatura de operación en K.

Las presiones de vapor de los ácidos grasos libres y del tocoferol se calcularon a partir de expresiones encontradas en bibliografía:

$$\text{Ácidos grasos libres (Daubert et.al., 19993): } P^{\circ} = \exp\left[A - \frac{B}{T} - C \ln T + D T^E\right]$$

$$\text{Tocoferoles (Willner et.al., 1997): } P^{\circ} = \exp(-30.110 + 0.0691T)$$

donde P° es la presión de vapor del compuesto puro en Pa, T es la temperatura de operación en K, y A , B , C , D , E son constantes características para cada ácido.

Para predecir los coeficientes de actividad a dilución infinita de los distintos ácidos grasos en el aceite se utilizó un modelo a contribución grupal tipo UNIFAC (Fredenslund et. al., 1976, Foco et.al, 1996, Ferreira et.al, 2003).

El modelo fue resuelto en forma numérica a través de un programa de simulación, utilizando un método de relajación para hacer converger la columna de tal forma que entre dos iteraciones sucesivas el error sea menor (o igual) al impuesto en el programa. Además el programa cuenta con distintas subrutinas para el cálculo de propiedades de los componentes y de las corrientes de proceso (presiones de vapor, peso molecular, difusividades, densidades, viscosidades, etc.); así como también para el cálculo de la eficiencia de plato, cinética de isomerización y equilibrio en cada plato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan corresponden a simulaciones realizadas bajo las siguientes condiciones básicas: flujo de aceite 250 kg/min, flujo de vapor 3 kg/min, presión de operación 600 Pa, temperatura de operación 515 K, número de etapas 6, y cantidad inicial de ácidos grasos 0.1 % en peso.

La composición inicial del aceite a desodorizar influye en la concentración final de tocoferoles, la cantidad de isómeros trans generados, y en menor medida en el porcentaje de ácidos grasos eliminados (Figura 2).

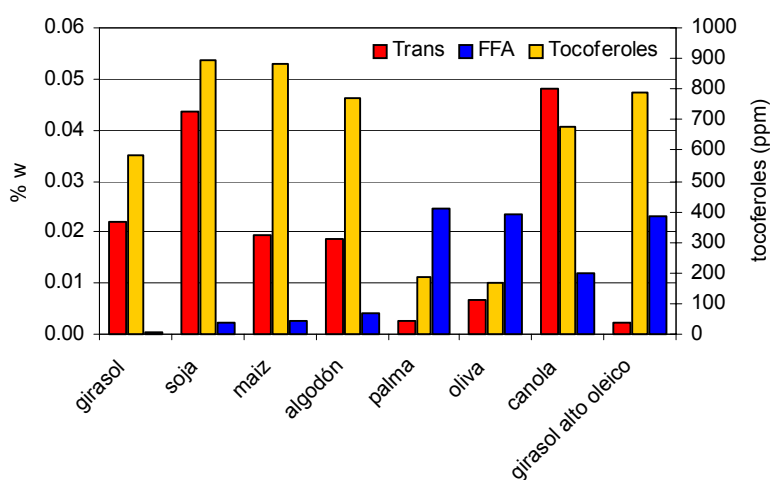


Figura 2. Efecto de la composición de los distintos aceites en la concentración final de tocoferoles, la cantidad de isómeros trans generados, y en el porcentaje de ácidos grasos eliminados.

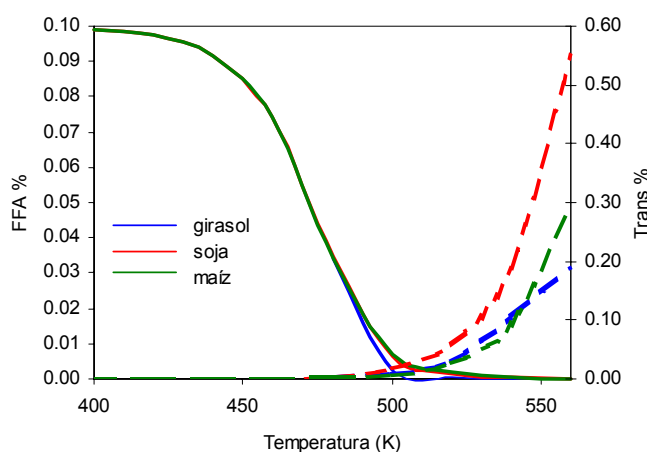


Figura 3. Influencia de la temperatura de operación en la cantidad de FFA remanentes en el destilado y la formación de isómeros trans (trans). Las líneas punteadas cooresponde a los trans y las líneas llenas a los FFA.

En la figura 3 se muestra la influencia de la temperatura de operación en la formación de isómeros trans y en la eliminación de ácidos grasos libres, para tres clases de aceites diferentes.

En las figuras 4, 5 y 6 se puede observar la influencia de las variables del proceso (temperatura, presión y flujo de vapor) sobre la eliminación de los distintos ácidos grasos libres y la retención de tocoferoles. A mayores temperaturas se incrementa significativamente la formación de isómeros trans (0.1-1%) y la pérdida de tocoferoles (10-50%), generándose un compromiso entre la eficiencia del proceso para la eliminación de los ácidos grasos libres y la calidad del aceite tratado. A partir de ciertos valores límites, un incremento del caudal de vapor o del número de etapas no modifica sustancialmente la eficiencia de la desodorización.

En conclusión, el modelo desarrollado predice satisfactoriamente el comportamiento de los desodorizadores continuos, constituyéndose en una herramienta de utilidad para la optimización del proceso. Permite estudiar el efecto del tipo y composición del aceite, el diseño del equipo y las distintas variables de operación sobre la eficiencia del proceso, la composición del destilado y la calidad del aceite desodorizado.

BIBLIOGRAFÍA

Daubert T.E., Danner R.P., Sibul H.M. y Stebbins C.C. *Physical and Thermodynamic Properties of Pure Chemicals. Data Compilation.* AIChE, New York. 1993.

Ferreira O. y Foco G.M., Latin American Applied Research, 2003. 33, 257.

Foco G., Bermudez A. y Bottini S., J. Chem. Eng. Data. 1996. 41, 1071.

Fredenslund A., Jones R.L. y Prausnitz J.M. AIChE J. 1976. 21(6), 1086.

Hénon G., Kemény Z., Recseg K., Zwobada F. y Kovari K. JAOCS. 1999. 76(1), 73.

King C.J. *Separation Processes.* McGraw-Hill Book Company. 1980. Cap.12.

Melo J. A&G. 2002. XII(1), 13.

Norris Frank A., En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 4th ed,* D. Swern (ed) John Wiley, New York. 1985. Cap. 3.

Willner Th., Jeß U. y Weber K. *Fett/Lipid.* 1997. 99(4), 138.

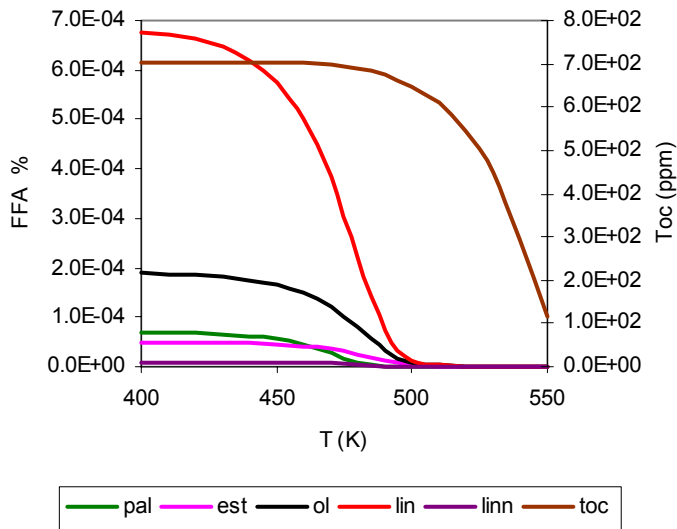


Figura 4. Influencia de la temperatura de operación en la cantidad de FFA y tocoferoles remanentes en el aceite de girasol.

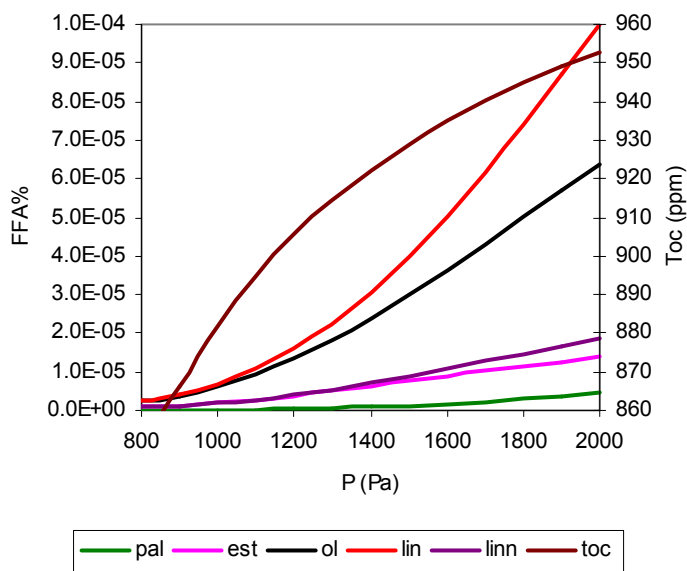


Figura 5. Influencia de la presión de operación en la cantidad de FFA y tocoferoles remanentes en el aceite de soja.

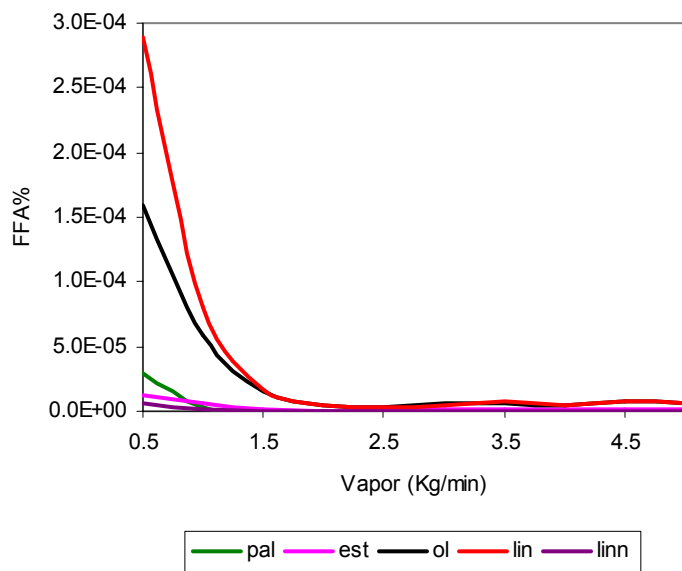


Figura 6. Influencia del flujo de vapor de arrastre en la cantidad de FFA remanentes en el aceite de maíz.

APLICACIÓN DE CO₂ CUASICRÍTICO EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITE DE AJO

ANDREATTA, Alfonsina E.; FOCO, Gloria; MABE, Guillermo; BOTTINI, Susana B. *

PLAPIQUI, UNS - CONICET, Camino La Carrindanga, Km 7, C.C. 717 Bahía Blanca, Argentina, Tel. +54-291-4861700, sbottini@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

Se presenta una nueva alternativa de extracción de aceite de ajo (*Allium Sativum*) por medio de la aplicación de fluidos cuasicríticos y se compara con los métodos tradicionales de hidrodestilación y arrastre con vapor de agua, evaluando rendimientos, costos operativos y calidad de los extractos obtenidos. La composición de los extractos obtenidos se analizó por cromatografía gaseosa con espectrometría de masas, cromatografía líquida, IR y UV.

Palabras Claves: Ajo, Extractos, CO₂ Cuasi-crítico.

ABSTRACT

A new alternative for the extraction of garlic oil (*Allium Sativum*) with near-critical fluids is presented and compared to the traditional methods of hydro-distillation and steam stripping, evaluating yields, operative costs and quality of the extracts. The extracts were analyzed by gas chromatography using a mass spectrometer detector, by liquid chromatography, IR and UV.

INTRODUCCIÓN

El procesamiento del ajo tiene considerables ventajas para la industria de alimentos, ya que permite reducir los problemas derivados de la variabilidad estacional, el transporte a granel y el manejo del producto fresco. El aceite de ajo, rico en compuestos órgano-sulfurados volátiles, es usado como saborizante y en la prevención y tratamiento de varias enfermedades. Los mayores componentes organosulfurados del ajo fresco son los cisteín-sulfóxidos y las γ -glutamyl-cisteínas, presentes en cantidades aproximadamente iguales en peso; juntos constituyen el 95% del azufre total en el ajo y ascienden a un promedio de 20 mg/g de ajo fresco. Los principios saborizantes y olfativos del ajo fresco están asociados a la presencia de alqu(en)il tiosulfatos RS-(O)-SR y compuestos relacionados, formados por acción de la enzima alinasa sobre los aminoácidos precursores alqu(en)il-cisteín-sulfóxidos, cuando el tejido celular es destruido (Whitaker,

1976). La alicina (dialil tiosulfonato) es el tiosulfonato predominante y el responsable de muchos de los atributos bioactivos de los extractos de ajo. Las temperaturas de extracción por hidrodestilación o arrastre con vapor de agua convierten a los alquil tiosulfonatos en polisulfuros saturados e insaturados y en compuestos azufrados heterocíclicos (Block, 1992). Los alquil tiosulfonatos y tiosulfonatos se asocian con el sabor a ajo fresco, mientras que los alqu(en)il polisulfuros se relacionan con el sabor a ajo cocido.

El objetivo de este trabajo es presentar una nueva alternativa de extracción de aceite de ajo por medio de la aplicación de fluidos cuasicríticos y compararla con los métodos tradicionales de hidrodestilación y arrastre con vapor de agua.

El uso del CO₂ en condiciones cuasicríticas para el procesamiento de alimentos, nutracéuticos, sabores y aromas resulta interesante, debido a las bajas temperaturas de operación, la ausencia de oxígeno en el sistema de extracción y la excelente recuperación de productos libres de solvente que contienen compuestos volátiles responsables de aroma y sabor (Shultz y Randall, 1970). Además, el CO₂ resulta un fluido muy apropiado por ser no tóxico, no inflamable, fácil de obtener y relativamente económico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron extracciones utilizando equipos clásicos de hidrodestilación y de arrastre con vapor de agua y un extractor Soxhlet de alta presión trabajando con dióxido de carbono líquido en condiciones cuasicríticas. Para los ensayos de hidrodestilación se partió de 200 g de bulbos de ajo fresco cortados en pedazos pequeños y homogenizados en 200 ml de agua destilada a temperatura ambiente, en una licuadora doméstica operando a velocidad media durante 1 minuto. La mezcla se dejó macerar durante una hora para permitir actuar a la enzima alinasa. Igual procedimiento se llevó a cabo para las extracciones por arrastre con vapor de agua y con CO₂ líquido, pero sin el agregado de agua en la maceración.

Extractor Soxhlet de alta presión

El equipo utilizado en la extracción discontinua con CO₂ líquido fue construido en los talleres de PLAPIQUI sobre un diseño basado en la patente de Jennings y col. (1981) (Figura 1). El aparato consta básicamente de un equipo Soxhlet estándar ubicado dentro de un recipiente cilíndrico de acero, con una tapa del mismo material y sistema de cierre rápido. En la tapa se ubican los conductos de alimentación y descarga de CO₂ y un condensador (punto frío) conectado a un baño refrigerante. La evaporación del CO₂ se produce en la base del aparato (punto caliente), mediante el calor suministrado por sunchos calefactores que abrazan el cilindro de acero. El solvente destila entre el balón y

el condensador. El solvente líquido cae desde el condensador al tubo cilíndrico donde se ubica la muestra a ser extraída. Cuando el nivel del solvente con el material extraído alcanza la parte superior del sifón, se produce la descarga en el balón, para comenzar otro ciclo de evaporación-condensación. Un termistor ubicado a la altura del sifón y conectado a un lector y registrador (S3VAB), permite medir el número de ciclos de extracción a través de la variación de temperatura producida al completarse un ciclo. Mientras se está desarrollando un ciclo, la temperatura que registra el sensor está influenciada por la temperatura del condensador. Cuando el termistor toma contacto con el líquido al concluir un ciclo de extracción, la temperatura se incrementa rápidamente hasta el valor correspondiente a la temperatura de extracción fijada en el controlador del sistema de calefacción, indicando la culminación de un ciclo. El proceso se continúa hasta completar un número de ciclos suficientes que garantice la extracción completa del material. Más detalles sobre el funcionamiento y condiciones de operación del extractor se pueden encontrar en Marchiaro (2000).

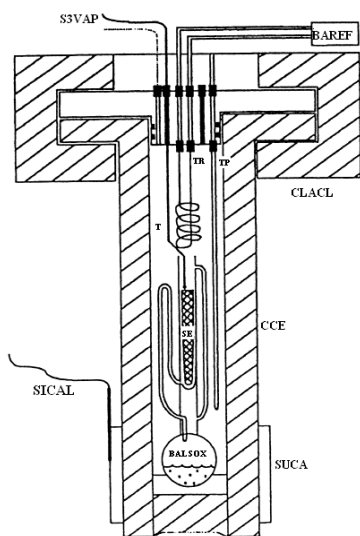


Figura 1. Extractor Soxhlet de alta presión.
 CLACL: clampas de cierre; CCE: cuerpo de la celda;
 BA REF: baño refrigerante; SUCA: suncho calefactor;
 SICAL: sensor de temperatura de calefacción; TR: condensador; TP: tubo de carga del solvente; SE: muestra; SIF: sifón; BALSOX: balón Soxhlet; T: termistor; S3VAP: contador de ciclos

Técnicas analíticas:

Los extractos obtenidos en los tres tipos de ensayos se analizaron mediante los siguientes métodos:

GC-MS: Se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Hewlett Packard HP 6890) con un detector por espectrometría de masas (Hewlett Packard HP 5972A) y una columna (HP 5) de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de film. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector 250°C; caudal de

gas carrier (He) 1 ml/min; temperatura del detector 280°C; modo scan; energía de ionización 70 eV; volumen inyectado 5µl; temperatura inicial del horno 60°C (4min) y calentamiento a 4°C/min hasta 200°C (10 min).

Si-HPLC: Se empleó un equipo de cromatografía líquida (Varian VISTA 5500) con detector de arreglo de diodos (Waters 996) y columna (Varian MicroPack Si-10) de 10 µm de diámetro de partícula, 300mm de largo x 4mm de espesor. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: velocidad de flujo constante a 1.8 ml/min con una composición inicial de 2% 2-propanol / 98% hexano por 6 min, un incremento lineal hasta 10% 2-propanol durante 10 minutos, y luego a 10 % por 9 minutos antes de retomar la composición inicial por 5 min. La detección se llevó a cabo a 254nm.

Espectroscopia UV: Las mediciones de absorción se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-visible de haz simple (SHIMADZU 160A) con una lámpara de deuterio como fuente de excitación y un detector de diodos entre 200 y 1000nm.

(FTIR): se utilizó un equipo Nicolet 520 de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó que un tiempo de maceración de 45 minutos resulta suficiente y que tiempos mayores no incrementan los rendimientos de extracción. En los ensayos de hidrodestilación y de arrastre con vapor de agua, 2h 30' de operación fueron suficientes para extraer todo el aceite de ajo, mientras que en los ensayos con CO₂ cuasi-crítico se requirieron 8 ciclos de extracción para agotar al material. La maceración con o sin agregado de agua no afecta los resultados, ya que el ajo fresco tiene la cantidad suficiente de agua para que ocurran las reacciones enzimáticas. Es conveniente realizar la maceración en un recipiente tapado para evitar la fuga de volátiles.

Calidad de los extractos obtenidos por los distintos métodos de extracción

Las Tablas 1 y 2 resumen las propiedades físicas de los extractos obtenidos, los rendimientos de extracción y los costos operativos estimados de los respectivos procesos. Los extractos de ajo obtenidos con CO₂ líquido tienen el aroma característico del ajo fresco, en contraste con los extractos obtenidos por hidrodestilación y arrastre con vapor de agua, que semejan el aroma al ajo cocido. Esto puede asociarse a la presencia de tiosulfatos en los extractos obtenidos con CO₂, y a la presencia de polisulfuros en aquellos correspondientes a los dos restantes métodos. La Tabla 3 muestra los resultados de los análisis correspondientes a la espectrometría de masas (GC-MS).

Tabla 1. Propiedades físicas y rendimientos de los extractos

	Hidrodestilación	Arrastre con vapor de agua	Extracción CO ₂
Color	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo fuerte
Densidad (g/ml)	1.08	1.08	1.18
Solubilidad en agua	Insoluble	Insoluble	Soluble
Rendimiento (% P)	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	5

Tabla 2. Costos operativos de los diferentes procesos de extracción

	Hidrodestilación		Arrastre con vapor		Extracción CO ₂	
	U\$S	U\$S	U\$S	U\$S	U\$S	U\$S
Muestra U\$S 3.10/kg	200g	0.62	200 g	0.62	150g	0.47
Consumo energético Kw.h U\$S 0.155/KWh	0.157	0.02	0.442	0.07	0.099	0.02
Consumo energético Kw.h/g	0.393		1.106		0.014	
CO ₂ U\$S 1.20/kg					0.738	0.89
Costo de operación		0.64		0.69		1.38
Costo de operación total (U\$S/g producto)		1.60		1.73		0.18

Tabla 3. Composición de los extractos de ajo obtenidos por hidrodestilación, arrastre con vapor de agua y extracción con CO₂ cuasicrítico, según los análisis por GC-MS

Composición	% área		Composición	% área Ext. con CO ₂
	Hidro- destilación	Arrastre con vapor		
Dialil sulfuro	2.207	2.783	Dialil sulfuro	0.200
Dialil disulfuro	34.277	25.837	Dialil disulfuro	5.063
Dialil trisulfuro	24.253	27.635	Dialil trisulfuro	0.827
Dialil tetrasulfuro	1.019	1.897	Alil metil sulfuro	0.492
Alil metil sulfuro	0.893	1.127	Alil metil trisulfuro	0.325
Alil metil disulfuro	7.231	7.738	1-Propenil metil sulfuro(Z)	0.933
Alil metil trisulfuro	13.105	15.961	Diisopropil sulfuro	0.248
Dimetil disulfuro	0.689	1.054	Alil isotiocianato	1.280
Dimetil trisulfuro	2.304	3.289	Metano isotiocianato	0.339
Dimetil tetrasulfuro	0.138	0.176	2,5-Dimetil tiofeno,	20.676
Alil isotiocianato	0.099	0.183	2 -(1-Metiletil) tiofeno	0.393
Metil 1-propenil disulfuro	0.220	1.108	2-Metil 5-propil tiofeno	0.391
Tolueno	0.117	0.104	4-Piridincarbonitrilo	0.803
1,3-Ditiano	1.570	1.551	1-Oxa 4,6-diazociclooctane 5-tiona	1.833
1,2,4-Tritiolano 3,5-dietil	0.248	0.346	5-Metil 1,2,3- tiadiazol	53.649
1-Oxa 4,6-diazociclooctane 5-tiona	8.398	7.458	4-Metil pirido (2,3-d) pirimidina	0.314
Di 1-propenil sulfuro	0.718		4-Metil 1,5-heptadieno	0.380
3H-1,2-Ditiol 3-one 4,5-dimetil	2.174		1,1-Dietoxi etano	0.246
5-Metil 1,2,3-tidiazole	0.341		Benzofurano	2.386
Etil tiourea		0.147	1,3-Ditiano	2.055
3-Metil tiopropanal		0.055	2,2' -Ditiobis- Etanol,	0.385
1-Propenil metil sulfuro (Z)		0.122	S-metil metanetiosulfonato	0.704
1,2,5-Tritiepano		0.164	3 Ácido butenoico	0.440
2,4-Dimetil tiofeno		0.146	Furano	0.402
4-Metil tiociclohexanona		0.509	3-(2propinilo) ácido propanoico	3.311
1,3-Butadieno		0.166	3-Metoxi 1-propeno	0.295
1,5-Heptadieno 3,4-dimetil		0.443	Ciclobutano	0.431
			1,3-Dimetoxi propano	0.295
			1-Metoxi 2 propanol	0.398
			Dibutil ftalato	0.506

Se observa que, mientras que los compuestos polisulfurados son mayoritarios en los aceites extraídos por hidrodestilación y arrastre con vapor de agua, dichos compuestos están presentes en muy pequeñas cantidades en los extractos obtenidos con CO₂. Las altas temperaturas aplicadas en las técnicas GC y GC-MS pueden originar la descomposición térmica de los tiosulfatos, impidiendo su detección, por lo que estas técnicas deben ser reemplazadas por cromatografía líquida (HPLC), supercrítica, criogénica, y otros métodos analíticos que empleen temperaturas más bajas (Block y col. 1992; Block, 1993).

Mono-, di- y trisulfuros son los componentes mayoritarios de los aceites obtenidos por hidrodestilación y arrastre con vapor de agua analizados por GC-MS. Semmler (1892) estableció la importancia del dialil disulfuro y dialil trisulfuro en el sabor del extracto de ajo obtenido por destilación. La capa de agua obtenida en estos procesos es pálida y contiene algunos compuestos volátiles suspendidos y disueltos (Yu y col., 1989). Boelens y col. (1971) sugieren que la ausencia de tiosulfatos en el aceite de ajo obtenido por destilación se debe a que, por su solubilidad en agua, éstos están presentes en la fase acuosa y no logran ser transferidos a la fase orgánica. Como se observa en la Tabla 3, la mayoría de los compuestos detectados por GC-MS en los extractos producidos con CO₂ (que podrían ser el resultado de la descomposición térmica de los tiosulfatos durante el análisis), no están presentes en los aceites obtenidos por hidrodestilación y arrastre con vapor de agua. Análisis efectuados con HPLC permitieron determinar la presencia de tiosulfatos (RS(O)SR') de alilo (All), propenilo (Pro) y metilo (Me) en el extracto obtenido con CO₂ (ver Figura 2) y fueron caracterizados por comparación directa de sus tiempos de retención con análisis de la literatura (Block, 1992). Los compuestos identificados fueron: 1, AllSS(O)Pro-(E); 2, AllS(O)SPro-(Z); 3, AllS(O)SAll; 4, AllS(O)SMe; 5, MeS(O)SMe. La forma de los cromatogramas obtenidos en el presente trabajo es similar a la presentada por Block (1992), aunque hay un corrimiento de 3 minutos en los picos. Este corrimiento es asignado a las diferencias en longitud, diámetro y tamaño de poro de las columnas utilizadas (columna de 10 µm, 300mm x 4mm en nuestro trabajo y de 5 µm, 250mm x 4,6mm en el mencionado trabajo). Para asegurar la presencia de alicina, una muestra de este extracto fue analizada por el Laboratorio de Análisis de Residuos Tóxicos de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Cuyo). Este laboratorio determinó la presencia de 3,58 mg de alicina/g de extracto, por comparación con su propio patrón sintetizado.

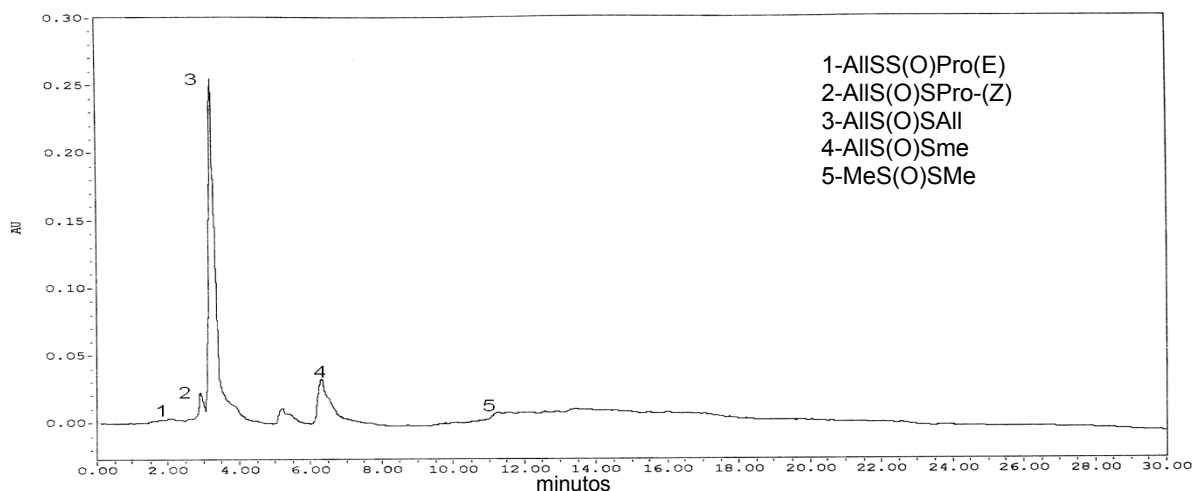


Figura 2. Resultados de HPLC sobre el extracto obtenido con CO₂ cuasi-crítico

La Figura 3 muestra un espectro UV realizado a las muestras obtenidas por hidrodestilación y con CO₂ cuasicrítico. Dichos espectros confirman que estamos en presencia de compuestos de distinta naturaleza. El espectro del extracto con CO₂ coincide aproximadamente con el espectro del patrón de alicina (Calvey y col., 1994) con un máximo de absorción a los 250nm. Esto permite asegurar la presencia de alicina y/u otros tiosulfatos.

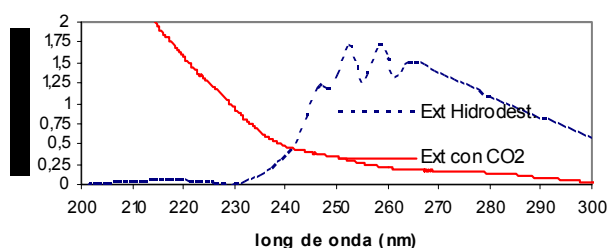


Figura 3. Análisis UV de los extractos obtenidos con hidrodestilación y con CO₂ cuasi-crítico

La Figura 4 muestra resultados obtenidos por FTIR. En el extracto obtenido con CO₂, el espectro IR muestra picos de los grupos sulfóxido C-S(O)-C en el rango 1070-1035 cm⁻¹; una fuerte absorción del enlace C=C a 1680-1625 cm⁻¹; bandas entre 3100-2900 cm⁻¹ y 1470-1430 cm⁻¹ correspondientes al grupo CH₃, una banda característica del grupo tiosulfato C-S(O)S-C a 1095-1080 cm⁻¹ (Block y col., 1986); del grupo sulfone entre 1350-1300 cm⁻¹ y 1160-1120 cm⁻¹; del enlace S-C a 800-700 cm⁻¹ y de las uniones S-S a 500-400 cm⁻¹. La muestra extraída por hidrodestilación mostró picos entre 3100-2900 cm⁻¹ y 1470-1430 cm⁻¹ correspondientes al grupo CH₃; a 1400-1200cm⁻¹ del CH; a 1680-1625 cm⁻¹ del enlace C=C; una banda a 800 - 700 cm⁻¹ correspondiente al enlace S-C y entre 400-500 cm⁻¹ de las uniones S-S.

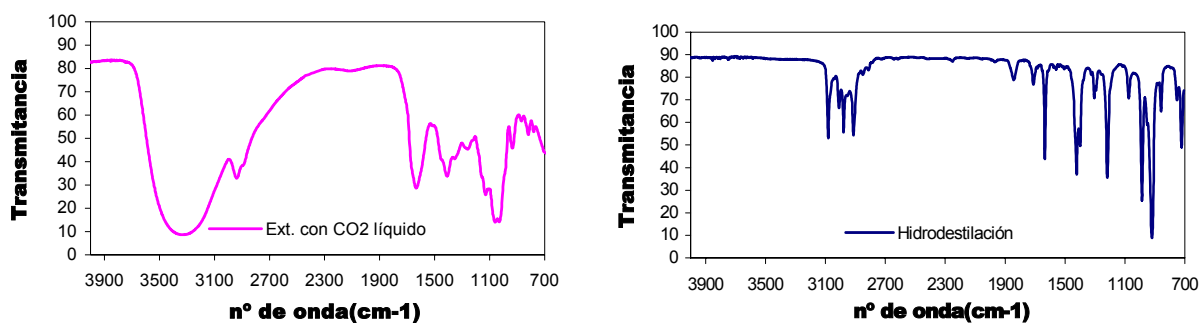


Figura 4. Análisis IR de los extractos obtenidos con hidrodestilación y con CO₂ cuasi-crítico

CONCLUSIONES

La utilización de dióxido de carbono líquido en condiciones cuasicríticas representa un proceso atractivo para la extracción de aceite de ajo, ya que produce mayores rendimientos y extractos de mejor calidad que la hidrodestilación y el arrastre con vapor de agua. Los mayores rendimientos redundan también en menores costos operativos por unidad de producto. El extracto obtenido con CO₂ presenta el aroma típico del ajo fresco, a diferencia del aceite obtenido por hidrodestilación y por arrastre con vapor de agua, caracterizado por el aroma a ajo cocido. La presencia de alicina en el extracto obtenido con CO₂ le aportaría a éste sus propiedades bioactivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Block, E., Thiruvazhi, M. (1993).** Allium chemistry: Synthesis of alk(en)yl 3,4-dimethyl-2 thienyl disulfides, components of distilled oils and extracts of Allium species, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2235.
- Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J., Jain, M., Apitz-Castro, R. (1986).** Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 108(22), 7045.
- Block, E., Naganathan, S., Putman, D., Zhao, S. (1992).** Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2418.
- Boelens, M., de Valois, P., Wobben, H.J., Van der Gen, A. (1971).** Volatile flavor compounds from onion. *J. Agric. Food Chem.*, 19, 984.
- Calvey, E., Matusik J. E., White K.D., Betz J. M., Block E., Littlejohn M. H., Naganathan S. and Putman D. (1994).** Off-Line Supercritical Fluid Extraction of Thiosulfinates from Garlic and Onion. *J. Agric. Food Chem.*, 42(6); 1335.
- Jenning (1981).** High Pressure Soxlet Extractor design. US. Patent 4,265.

Marchiaro, A. (2000). Tesis de Magister, UNS. Extracción de Aceite de Rosa Mosqueta con gases densos.

Semmler, F.W. (1892). Das ätherische Öl des Kuchenzwiebel. *Archiv der Pharmazie* 230, 443.

Shultz, W.G., Randall, J.M. (1970). Liquid carbon dioxide for selective aroma extraction. *Food Technol.*, 24, 1282.

Whitaker J.R. (1976). Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic. *Adv. Food Res.*, 22, 73.

Yu, T., Wu, C., Rosen, R., Hartman, T. Ho, C. (1994). Volatile Compounds Generated from Thermal Degradation of Alliin and Deoxyalliin in Aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 146.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de CONICET y la Univ. Nacional del Sur.

COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE QUESO MOZZARELLA PREACIDIFICADO CON ÁCIDO LÁCTICO VERSUS ELABORACIÓN TRADICIONAL.

BELLO, Gabriela R.*, CASTAGNASSO, Hilda R.*; LARA, Jorge D.*, MICELI, Elisa C.*.

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Avda. 60 y 119 (1900) La Plata. Buenos Aires. Argentina. Tél. (0221) 423-6758, Fax (0221) 425-2346. ialechería@ceres.agro.unlp.edu.ar

RESUMEN

La mozzarella es un queso de pasta hilada de alto contenido de humedad. El propósito del trabajo fue evaluar el rendimiento de dos elaboraciones de mozzarella: una tradicional adicionada con fermento láctico y otra preacidificada con ácido láctico. Se analizaron los parámetros físico - químicos de la leche cruda. Se maduró la masa previamente al hilado, sólo en el caso de la mozzarella tradicional. La leche analizada presentó en sus valores medios: 3,08 % de materia grasa; 2,950 % de proteína; 6,66 de pH; 18,8 ° Dornic de acidez; 0,140 % de calcio y 1,0300 g / ml de densidad. En mozzarella tradicional se obtuvo 5,02 de pH; 0,080 % de calcio; 25,50 % de materia grasa y en la preacidificada los valores fueron 5,55 de pH; 0,055 % de calcio y 22,00 % de materia grasa. El rendimiento fue de 9,84 % para la tradicional y de 8,62% para la preacidificada representando una diferencia significativa,.

Palabras claves: mozzarella, acidificación, rendimiento.

ABSTRACT

The mozzarella is a stretching cheese classified as of high humidity. The purpose of this experiment is to evaluate the yield of mozzarella preacidified with lactic acid compared with traditional feature fermented by lactic bacterial. The composition characterization included: pH, Dornic acidity, matter lipid, protein and calcium percentage. The milk used showed a medium composition of 3,08 % matter lipid; 2,950 % protein; 6,66 pH; 18,8° Dornic; 0,140 % calcium and 1,0300 g/ml bulk density. The results were as follows traditional treatment: final yield 9,84 %; pH 5,02; lipid matter 25,50 % and 0,080 % calcium. Lactic acidification: final yield 8,62 %; pH 5,50; lipid matter 22,00 % and 0,055 % calcium. The principal conclusion is that lactic preacidification yield was lower than yield of traditional procedure.

INTRODUCCIÓN

La mozzarella, de origen italiano, pertenece al grupo de los quesos de pasta hilada así denominado por el proceso de amasado de la cuajada en inmersión en agua caliente, con la obtención de hilos plásticos. Actualmente, es un queso difundido a nivel mundial, elaborándose en muchos países a partir de leche de vaca y de búfala.

Según el artículo 618, del Código Alimentario Argentino (1), por queso Mozzarella Argentino, se entiende el producto fresco, elaborado con leche entera o normalizada, acidificada por cultivos de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y / o enzimas específicas, que cumpla las siguientes condiciones:

Masa cruda, hilada, salada y fermentada. Pasta blanda, algo consistente y ligeramente elástica. Superficie lisa, entera, brillante, de color blanco-amarillento. Estabilización mayor de 24 horas. Peso no menor de 200 gramos y envuelta en origen. Composición: agua: máximo 60%, grasa: mínimo 35%.

Se mantendrá en la fábrica hasta su expendio a temperatura inferior a 10° C.

Este queso puede utilizarse para consumo directo o como ingrediente en la preparación de comidas, dentro de las cuales se destaca la pizza, siendo el destino de la mayor parte de la mozzarella producida a nivel mundial. Para este fin, se utilizan las mozzarellas de menor contenido de humedad llamadas en U.S.A. "*pizza-cheese*". Los valores de humedad de estos quesos oscilan entre 47% y 48%, lo cual permite un correcto feteado. En cambio, aquellos que presentan valores entre 52% y 60% de humedad, de corta vida útil, no tienen buen comportamiento en el corte y son utilizados como quesos de mesa. (2)

Actualmente, se fabrican en Italia, desde hace más de veinte años, dos variedades de mozzarella la tradicional, que responde a las mismas especificaciones de nuestro Código Alimentario y otra, a nivel de producción industrial que utiliza ácidos orgánicos para preacidificar la leche antes del agregado del cuajo. (2).

El rendimiento de un queso depende de los siguientes factores: la composición química de la leche, la cantidad de grasa y proteínas que pasan de la leche al queso en el proceso de fabricación, el contenido de humedad final del queso, el incremento que se produce por la adición de componentes extra lácteos (3). La fórmula del rendimiento del queso mozzarella tiene que estimarse planta por planta; pues varían los procesos de elaboración. El rendimiento de una masa tradicional oscilaría entre valores de 12,70 % (4), 9,50 % y 10,50 % (5) (kilogramos de queso / 100 litros de leche). Para mozzarella elaborada por preacidificación con ácido láctico, los rendimientos fluctuaron entre 11,05 %

y 10,79 % (kilogramos de queso /100litros de leche), dependiendo del pH de preacidificación.(6).

El pH de la masa es el parámetro que indica el momento óptimo para hilarla ya que revela el grado de desmineralización de la misma. Para la obtención de hilos es necesaria la desmineralización de la cuajada. En la mozzarella tradicional el pH óptimo para el hilado es de alrededor de 5. En el caso de la mozzarella preacidificada se llega a un pH de 5,6 en la leche por adición de ácido láctico previo a la coagulación.

El calcio ionizado tiene un papel importante en la formación de la red de cuajada por establecer los puentes entre las micelas coaguladas por el cuajo. Por otro lado, el calcio micelar (bajo la forma de fosfocaseinato de calcio mantenido en estado coloidal íntimamente ligado a la caseína) es de gran importancia en la definición de la firmeza del coágulo. (5)

Las leches de bajo tenor de calcio, ya sea por deficiencias en la alimentación del animal o por haber sido sometidas a tratamiento térmico, producirán cuajadas más blandas, con mayor propensión a perder sólidos en el corte que las de contenido normal de calcio. Esto se traduce en una disminución en el rendimiento. Por este motivo, las leches tratadas térmicamente deben ser adicionadas con sales de calcio.

El comportamiento de la leche preacidificada se explica ya que la acidificación de la leche a un pH de alrededor de 5,7 se caracteriza por un inicio de la desmineralización de las micelas con solubilidad de calcio coloidal.

Esto explica porqué la cuajada presenta una consistencia menor, es más frágil y blanda pero posee características físico-químicas para ser hilada.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rendimiento de mozzarella preacidificada con ácido láctico en relación a la tradicional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de quesos: a) Procedimiento tradicional

Se realizaron los diferentes ensayos a partir de 20,00 litros de leche proveniente de un ordeño diario de un establecimiento de la zona aledaña a nuestra Casa de Estudios. Se pasteurizó a 72° C durante 20 segundos. Se enfrió a 37° C y se adicionó 8 ml cloruro de calcio en solución 50,00 % m / v, 1,00 % de fermento láctico termófilo liofilizado comercial y cuajo bovino en la cantidad necesaria para coagular a 32° C durante 30 minutos. Una vez alcanzada la consistencia adecuada del gel se cortó en dados de 1,50 cm de lado. Se agitó lentamente durante 20 minutos hasta alcanzar los 42° C. Se dejó reposar 10 minutos y se eliminó el suero, concentrando la masa en uno de los laterales de la tina. Se trasladó

la cuajada a una mesa de desuerado y se fraccionó en moldes de 1,00 kg. Se dejó reposar la masa a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas hasta llegar al pH óptimo para el hilado, para ello se hizo la prueba del hilado con agua a 82 ° C. Alcanzado el éxito del ensayo se procedió a cortar la masa y se la hiló en iguales condiciones que el mismo, llegando el interior de la masa 63° C. Se sumergió en salmuera al 20,00 % durante 4 horas. Se extrajo de la misma y se escurrió durante 2 horas y se pesó.

b) Elaboración de masa preacidificada

Se realizaron los diferentes ensayos de igual forma que para la tradicional pero una vez pasteurizada se enfrió a 18° C y se adicionó solución de ácido láctico al 10,00 % m / v y se esperaron 10 minutos hasta que se estabilizara el pH en $5,6 \pm 0,1$ y se continuó exactamente igual que con la tradicional.

Análisis físico-químicos

En la leche, previo a la elaboración y en el queso mozzarella se efectuaron las siguientes determinaciones: contenido de materia grasa por el método volumétrico Gerber (Norma IRAM 14.003-2/1990), el porcentaje de proteínas totales por el método Kjeldahl (FIL 20B 1993, macro Kjeldahl), la acidez por el método volumétrico Dornic (AOAC 947.05-CAA 13.11), el contenido de calcio por método complejo – volumétrico (en leche) y Max Schultz en queso y pH por el método potenciométrico. (Método potenciométrico con equipo HANNA HI 8424). También se efectuaron las determinaciones de materia grasa (método Gerber) y pH (método potenciométrico) en el suero una vez extraída la cuajada.

Determinación del rendimiento

Con el peso obtenido luego del escurrido se calculó el rendimiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La leche y los quesos elaborados arrojaron como valores promedio de los parámetros físicos – químicos (ver tabla 1).

Los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento fueron: 9,84 % para la mozzarella tradicional y 8,62% para la mozzarella preacidificada con ácido láctico. La diferencia de rendimientos obtenidos se considera significativa analizada por la prueba de Student con un 95% de probabilidad.

Estos valores se observan teniendo en cuenta las diferencias composicionales entre ambos quesos derivadas de las distintas tecnologías de elaboración. El menor contenido de materia grasa de la mozzarella preacidificada puede considerarse un indicador de la

pérdida de sólidos durante el trabajo de la cuajada. Este comportamiento estaría relacionado con las características de la cuajada proveniente de una leche preacidificada blanda, de menor consistencia y de mayor fragilidad que la de una mozzarella tradicional. En el pH de coagulación 5,6 de este tipo de mozzarella existe menor contenido de calcio coloidal ligado a la caseína (2). Se destaca la importancia que tiene la presencia del calcio coloidal en la firmeza del coágulo.(5).

Tabla1. Composiciones promedios de leche y mozzarella

	Materia grasa [% m/v]	pH	Calcio [% m/v]	Densidad [g / ml]	Proteínas [% m/v]
Leche	3,08	6,66	0,140	1,0300	2,950
Mozzarella tradicional	25,50	5,02	0,080	_____	25,64
Mozzarella preacidificada	22,00	5,50	0,055	_____	25,22

En la elaboración de mozzarella preacidificada lo que ocurre es una desmineralización de la leche. Este fenómeno, que se traduce en un menor contenido de calcio coloidal influye en la formación del coágulo y en las características de este una vez obtenido. En la mozzarella tradicional, en cambio, se desmineraliza la masa una vez realizada la coagulación y el trabajo de la cuajada, por lo tanto, (todo el proceso hasta la obtención de la masa) se realiza sin pérdidas de calcio y por consiguiente con menores pérdidas de sólidos en el suero.

La elaboración de mozzarella preacidificada implica menores tiempos operativos eliminando la espera más o menos prolongada de la masa en la fábrica para cumplir su acidificación y poder ser hilada.

CONCLUSIÓN

Los rendimientos obtenidos, son significativamente menores en la mozzarella preacidificada que en la tradicional, similar comportamiento se observa con el porcentaje de calcio y el contenido de materia grasa.

En un análisis posterior puede evaluarse la incidencia económica de este ahorro en los tiempos de proceso en relación a las pérdidas de rendimiento en el producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Código Alimentario Argentino, de la Canal y asociados S.R.L.** Editora. Pág. 215 / 216.
- Addeo, F. La Mozzarella un Queso Tradicional en Evolución. Anales Congreso Internacional de Tecnología en Producción de Quesos (FEPALE) Bs. As. 1996, Pág. 251 / 271.
- Spreer. E.** Lactología Industrial. Ed. Acribia 1991, Pág.365.
- Savello, P.** La química del queso. Últimas Novedades Tecnológicas en la Industria Láctea. Publitec Editora.1193. Sección II Pág. 1 / 28
- Mansur Furtado, M.** Mussarela: Uma abordagem práctico- teórica. Leite y derivados N ° 33 marzo / abril 1997. Pág.42 / 49
- Alvarenga Viana Mosquim, M. C., Mansur Furtado, M., Feraz, M, Gonzaga, L.** Fabricación de Queso Mozzarella por Acidificación Directa con Ácido Láctico. Industria lechera N ° 714 .1998. Pág. 41 / 48

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO SOBRE EL COMPORTAMIENTO VISCOELÁSTICO DEL TEJIDO DE MANZANA

DOCTOROVICH, Romina S.; MARTINEZ, Vanesa Y.; SALVATORI, Daniela M.; ALZAMORA, Stella M.

Dep. de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Ciudad Universitaria, Buenos Aires (1428), Argentina. TE: 011-45763366. E-mail: alzamora@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se analizó el efecto de la incorporación de calcio en la conducta viscoelástica lineal de tejido de manzana mediante ensayos oscilatorios y de fluencia. Todas las muestras mostraron un comportamiento de sólido, con G' dominando la respuesta viscoelástica. Las muestras tratadas con o sin el agregado de calcio mostraron una pronunciada disminución en G' comparada con el tejido fresco. Los datos experimentales de fluencia fueron ajustados según el modelo de Kelvin generalizado con seis elementos con un coeficiente de correlación $> 0,99$. Las capacitancias inicial y viscoelásticas aumentaron significativamente con los tratamientos, mientras que los tiempos de retardo permanecieron aproximadamente constantes.

ABSTRACT

It was analyzed the effect of calcium incorporation on the viscoelastic lineal behaviour of apple tissue using oscillatory shear and creep tests. All samples showed a viscoelastic solid behavior with G' dominating the viscoelastic response. Treated samples with or without calcium showed a pronounced decrease in G' as compared with the fresh tissue. A generalized Kelvin model with six elements was found to satisfactorily describe the creep compliance function with correlation coefficients > 0.99 . Initial compliance and decay compliances significantly increased with the treatments while retardation times were approximately constant.

Palabras claves: deshidratación osmótica, calcio, propiedades viscoelásticas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño de alimentos funcionales utilizando matrices vegetales impregnadas con componentes fisiológicamente activos

para incrementar el consumo de vitaminas, minerales y otros compuestos (Hasler, 1998). Los ensayos reológicos en donde se aplican pequeñas deformaciones brindan información acerca de los cambios microestructurales a nivel celular. Los métodos dinámicos a pequeñas deformaciones se utilizaron para caracterizar la conducta del material frente a una fuerza o deformación aplicada. El ensayo de fluencia permite predecir separadamente las características elásticas, viscoelásticas y de flujo viscoso (Jackman y Stanley, 1995). Ambos ensayos se complementan para describir de mejor manera las propiedades viscoelásticas de los materiales. Se ha observado que las propiedades viscoelásticas de frutas cambian con la incorporación de calcio debido a la alteración de la estructura del tejido a diferentes niveles y a las interacciones químicas y físicas con los componentes celulares (Alzamora y col., 2000).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la incorporación de calcio en la conducta viscoelástica lineal de tejido de manzana sometido a procesos de impregnación en una solución acuosa concentrada de sales de calcio a presión atmosférica ó a vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras: Se utilizaron manzanas (*Malus pumila*, var. Granny Smith) adquiridas en el comercio. Las manzanas se pelaron y se cortaron paralelas al eje principal en rodajas (> 0.6 cm de espesor). Luego el tejido de manzana se sometió a los distintos tratamientos de impregnación con calcio (a presión atmosférica o al vacío).

Impregnación con calcio: Para la impregnación a presión atmosférica (IA), las placas de manzana se sumergieron en soluciones isotónicas de glucosa conteniendo sales de calcio (5,88% p/p de lactato y gluconato de calcio (Saporiti S.A.C.I.F.I.A., Argentina) durante diferentes tiempos (2, 6, 10 y 22 h); para la impregnación al vacío (IV), las placas se sumergieron 10 min a 50 mmHg y 10 min a presión atmosférica. Luego las placas ($0,6 \pm 0,03$ cm de espesor final) se cortaron en discos (3 cm de diámetro) con un sacabocados. Las muestras tratadas con calcio se denominaron IA y IV en el caso de impregnación a presión atmosférica y al vacío, respectivamente. Como control, las placas de manzana se sumergieron en soluciones isotónicas sin el agregado de calcio (muestras CIA y CIV).

En estudios previos (Anino y col., 2005) se determinaron las concentraciones de calcio de la matriz vegetal como resultado de los distintos tratamientos (3,1; 8,1; 1300; 1600; 3100 ppm de calcio de las muestras control, CIA 2h, CIA 6h, CIA 10h y CIA 22h, respectivamente).

Mediciones viscoelásticas: Para realizar los ensayos dinámicos y rotatorios se utilizó un reómetro Paar Physica CR 300 (USA), con sensor de placas paralelas (3 cm de diámetro). Todos los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de 20 °C.

Ensayos Oscilatorios: Las muestras se sometieron a los siguientes ensayos: 1) Barrido de Amplitud con control de la deformación. A través de este ensayo se determinó el rango viscoelástico lineal (RVL) a una frecuencia angular de 10 s^{-1} ; y 2) Barrido de Frecuencia a deformación constante. Los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') se midieron en un rango de frecuencias entre 0,1 y 100 s^{-1} usando un valor de amplitud de deformación de 0,05%.

Ensayos de Fluencia: Las muestras se sometieron a un esfuerzo de cizalla constante igual a 35 Pa durante 60 segundos, luego se removió el esfuerzo y se registró la recuperación de la muestra durante 120 segundos.

Las determinaciones se realizaron utilizando 12 réplicas para cada tratamiento en ambos ensayos.

Análisis de los datos: En el ensayo de Barrido de Amplitud, el rango viscoelástico lineal se determinó mediante el software Paar Physica US 200 (USA).

Las curvas de capacitancia del ensayo de fluencia fueron ajustadas mediante un modelo mecánico. El mismo estaba representado por medio de un resorte conectado en serie con dos elementos de Kelvin-Voigt y un pistón. La siguiente ecuación describe dicho modelo (Sherman, 1970):

$$J(t, \tau) = J_0 + \sum_{i=1}^2 J_i (1 - e^{-t/\lambda_i}) + t/\eta_N \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: $J(t, \tau)$ es la capacitancia ($= \gamma(t) / \tau$ siendo $\gamma(t)$ la deformación al tiempo t y τ el esfuerzo constante aplicado); J_0 es la capacitancia instantánea a $t=0$; J_i son las capacitancias de retardo, $\lambda_i (= \eta_i \times J_i)$ son los tiempos de retardo y η_i son los coeficientes de viscosidad asociados con los elementos de Kelvin-Voigt; η_N es el coeficiente de viscosidad asociado con el flujo Newtoniano.

El análisis de las regresiones no lineales y la determinación de las curvas promedio, así como también de las mínimas diferencias significativas a un nivel de confianza $< 0,05$, se realizaron usando el paquete matemático y estadístico del software STATGRAPHICS Plus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos Oscilatorios: Como se observa en la TABLA 1, todas las muestras presentaron un incremento del módulo de almacenamiento G' con el aumento de la frecuencia angular. Las muestras inmersas en soluciones con y sin calcio a presión atmosférica ó a vacío mostraron una disminución de G' con respecto al tejido fresco. En el caso del tratamiento a presión atmosférica, se observó una disminución de G' con el tiempo alcanzándose un valor constante a partir de las 6 h. Los tejidos tratados con calcio exhibieron valores menores del módulo G' que los tejidos inmersos en la solución sin el agregado de calcio. La disminución de G' en los tejidos sometidos a vacío fue menor que en el caso de los tejidos tratados a presión atmosférica.

TABLA 1: Módulo de almacenamiento G' (Pa) a distintas frecuencias angulares para tejido de manzana sometido a inmersión en solución isotónica de glucosa con y sin calcio.

<i>sin calcio</i>				
<i>Tejido de manzana</i>	$\omega = 100 \text{ s}^{-1}$	$\omega = 10 \text{ s}^{-1}$	$\omega = 1 \text{ s}^{-1}$	$\omega = 0,1 \text{ s}^{-1}$
Tejido fresco	268 ± 71 ^a	240 ± 68 ^a	213 ± 59 ^a	213 ± 58 ^a
CIA 2 h	191 ± 11 ^b	165 ± 11 ^b	150 ± 10 ^b	143 ± 9 ^b
CIA 6h	102 ± 16 ^c	88 ± 14 ^c	79 ± 13 ^c	72 ± 12 ^c
CIA 10h	91 ± 18 ^c	78 ± 15 ^c	69 ± 14 ^c	62 ± 12 ^c
CIA 22h	93 ± 11 ^c	80 ± 10 ^c	74 ± 9 ^c	64 ± 8 ^c
CIV	186 ± 42 ^b	159 ± 36 ^b	144 ± 33 ^b	139 ± 32 ^b
<i>con calcio</i>				
Tejido fresco	332 ± 71 ^a	294 ± 59 ^a	270 ± 52 ^a	265 ± 48 ^a
IA 2h	134 ± 44 ^b	115 ± 38 ^b	104 ± 34 ^b	96 ± 31 ^b
IA 6h	80 ± 7 ^{cd}	69 ± 6 ^c	60 ± 5 ^c	55 ± 5 ^c
IA 10h	80 ± 12 ^{cd}	68 ± 10 ^c	59 ± 9 ^c	52 ± 8 ^c
IA 22h	74 ± 13 ^d	63 ± 10 ^c	55 ± 9 ^c	50 ± 8 ^c
IV	120 ± 9 ^{bc}	103 ± 7 ^b	92 ± 7 ^b	84 ± 7 ^b

No hay diferencias significativas a un 95 % de nivel de confianza entre los valores de la misma columna con la misma letra.

El módulo de pérdida G'' (no se muestran los valores) disminuyó a medida que aumentó el tiempo de inmersión, pero en menor medida que G' . Por tanto, el material se volvió

cada vez menos elástico a medida que avanzaba el tratamiento. Las muestras impregnadas al vacío mostraron un comportamiento similar a las muestras tratadas a presión atmosférica durante 2 h.

Ensayos de Fluencia: En la FIGURA 1 se representan las curvas experimentales de fluencia, las cuales se ajustaron matemáticamente según el modelo generalizado de Kelvin-Voigt (Ecuación 1, donde $i = 2$) con coeficientes de correlación $> 0,99$.

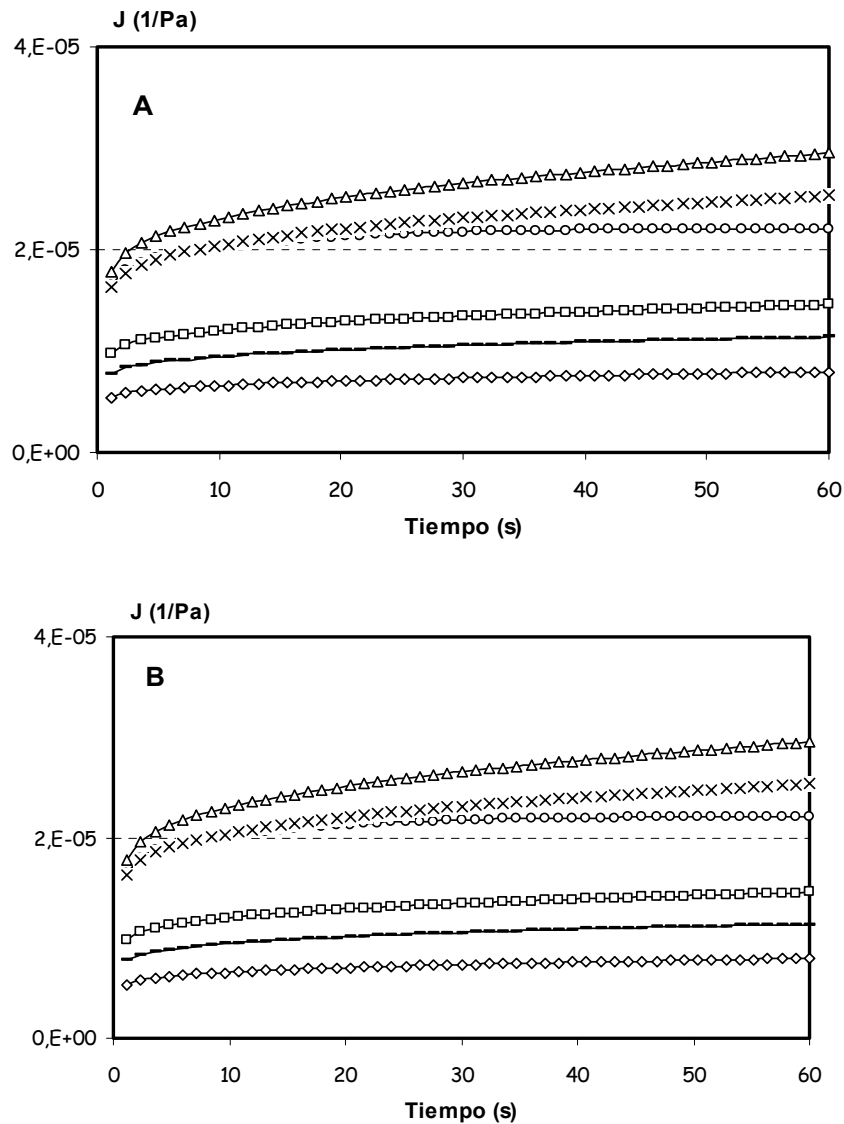


Figura 1: Curvas de fluencia. A) Tejido de manzana inmerso en la solución isotónica sin agregado de calcio. \diamond : Tejido fresco, \square : CIA 2h., \triangle : CIA 6h., \circ : CIA 10h., \times : CIA 22h., - : IV. B) Tejido de manzana inmerso en la solución isotónica con agregado de calcio. \diamond : Tejido fresco, \square : IA 2h., \triangle : IA 6h., \circ : IA 10h., \times : IA 22h., - : IV.

El tejido fresco mostró valores de capacitancias (inicial y viscoelásticas) menores que las muestras tratadas (TABLA 2). Se observó un incremento de la capacitancia instantánea y viscoelásticas con el aumento del tiempo en los tejidos tratados sin calcio a presión atmosférica hasta que alcanzaron valores constantes a los 6 h. En cambio, en presencia

de calcio no se observaron diferencias significativas entre la capacitancia instantánea de las muestras tratadas durante 2 y 22 h, lo que indicaría una recuperación del tejido. Este comportamiento coincide con lo observado en estudios previos realizados a grandes deformaciones (Anino y col., 2005). Los tejidos tratados a vacío mostraron valores de capacitancias (J_0 , J_1 , J_2 , $1/\eta_N$) similares a los exhibidos por las muestras tratadas durante 2 h en condiciones atmosféricas.

TABLA 2: Parámetros viscoelásticos* calculados con la ecuación (1).

sin calcio						
Tejido de manzana	J_0 (1/Pa) (x 10 ⁶)	J_1 (1/Pa) (x 10 ⁶)	J_2 (1/Pa) (x 10 ⁶)	λ_1 (s)	λ_2 (s)	η_N (Pa.s) (x 10 ⁻⁷)
Tejido fresco	4 ± 1,5 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,7 ± 0,9 ^a	11 ± 3,4 ^a	1,0 ± 0,4 ^a	5 ± 2,2 ^a
CIA 2h	8 ± 2,0 ^b	2,1 ± 0,7 ^b	2,6 ± 0,8 ^b	12 ± 1,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,7 ^b
CIA 6h	14 ± 2,6 ^c	5 ± 1,1 ^c	5 ± 1,0 ^c	13,0 ± 0,9 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,4 ^c
CIA 10h	13 ± 2,9 ^c	4,2 ± 0,9 ^c	4,7 ± 0,9 ^c	13 ± 1,0 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,5 ^c
CIA 22h	13 ± 1,5 ^c	4,1 ± 0,6 ^c	5,8 ± 0,6 ^c	13 ± 1,3 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,2 ^c
CIV	7 ± 1,1 ^b	1,8 ± 0,3 ^b	2,2 ± 0,4 ^{ab}	14 ± 4,0 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	4,6 ± 0,2 ^a
con calcio						

Los tiempos de retardo (λ_1 , λ_2) no fueron afectados significativamente por los distintos tratamientos, indicando ello que la velocidad de la respuesta de los elementos estructurales asociados no fue influenciada por los mismos.

CONCLUSIONES

Los tratamientos de inmersión en soluciones isotónicas con y sin calcio provocaron un aumento de la fluidez y una disminución de la elasticidad (ensayo de fluencia) y del módulo de almacenamiento (ensayo oscilatorio) del tejido de manzana. Las muestras tratadas con calcio mostraron menores valores de G' comparadas con las muestras inmersas en la solución sin la adición de calcio. En el ensayo de fluencia, las muestras tratadas con calcio durante 22h mostraron una leve recuperación del tejido, puesto de manifiesto a través de un menor valor de J_0 . Ello podría deberse a que la mayor cantidad de calcio incorporada favorecería su interacción con las pectinas de la pared

celular, disminuyendo su solubilidad, y contrarrestando la pérdida de otros componentes solubles y la hidrólisis de los polímeros de la misma.

BIBLIOGRAFIA

Alzamora S.M., Castro M.A., Vidales S.L., Nieto A.B. and Salvatori D.M. (2000). The role of tissue microstructure in the textural characteristics of minimally processed fruits. In: *Minimally Processed Fruits and Vegetables*. An Aspen Publication, USA.

Anino S., Salvatori D. and Alzamora S.M. (2005). Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts. *Food Research International*. Enviado.

Ferry J.D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. 3rd ed., John Wiley & Sons, USA.

Hasler, C.M. (1998). A new look at an ancient concept. *Chem. Industry*, 2, 84-89.

Jackman R.L. and Stanley D.W. (1995). Creep behavior of tomato pericarp tissue as influenced by ambient temperature ripening and chilled storage. *Journal of Texture Studies* 26, 537-552.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de la Universidad de Buenos Aires, el CONICET y la ANPCYT (Proyecto BID1201/OC-ARPICT13955).

DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE PENETRACIÓN DE SAL EN *ENGRAULIS ANCHOÍTA* DEL EFECTIVO PATAGÓNICO.

CZERNER^(1,2), Marina y YEANNES^(1,2), María I.

(1)UNMDP, (2) CONICET

Preservación y Calidad de Alimentos. Departamento de Química. FCEyN. UNMDP. Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Argentina. TE 54 223 4756167 FAX: 54 223 4753150. E.mail: myeannes@mdp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es determinar la velocidad de penetración de sal (NaCl) en *E. anchoíta* del efectivo patagónico en la etapa de presalado y determinar la influencia de la temperatura del medio sobre la misma. Se realizaron experiencias sobre tres lotes de anchoitas: A, con 7.75 % p/p lípidos (%líp); B, con 6.80 %líp y C, con 2.97 %líp. Se tomaron muestras de anchoitas mantenidas en baños de salmuera saturada a distintas temperaturas (entre 4 y 21° C), determinándose contenido de humedad y de cloruros durante el tiempo necesario para llegar a una constancia del tenor salino, que resultó ser de 24 h para lote C y 55 hs para A y B,. Se encontró que la velocidad, tanto de penetración de sal como de reducción de humedad, es menor cuanto mayor sea el contenido de lípidos. Asimismo, el aumento en la temperatura de presalado incrementó la velocidad de penetración de sal y la de reducción de humedad en los tres lotes.

Palabras clave: *Engraulis anchoíta* – efectivo patagónico – velocidad de penetración de sal

ABSTRACT

The aim of the present work is to determine the rate of salt (NaCl) penetration in *E. anchoíta* belong to the patagonic effective during the presalted and to determine the relationship between temperature and rate of salt penetration. The sampling was carried out on three lots of anchovies of varying lipid content: lot A, with 7.75% w/w of lipids (%lip); lot B, with 6.80 % lip and lot C, with 2.97 % lip. Each lot were maintained in saturated brine bath at different temperatures (between 4 and 21° C) until constant level of salt, it was of 24 hs for C lot and 55 hs for A and B. Samples were taken from each lot and it were analyzed for chloride concentration and humidity content. It was found that the rate, both salt penetration and reduction of humidity, decrease with increasing lipid content. Also, an

increase in the presalted temperature increases the rate of salt penetration and reduction of water content in the three lots.

Keywords: *Engraulis anchoita* – patagonic effective – rate penetration of salt

INTRODUCCIÓN

La *Engraulis anchoita* es una especie pelágica del Atlántico Sudoccidental, que se distribuye desde el sur de Brasil (24° S) hasta los 48° latitud Sur. Investigaciones biológicas indicarían que existen en nuestro país al menos dos efectivos pesqueros principales: el bonaerense y el patagónico (Hansen, 2004). Esta especie tiene un promedio de captura anual que rara vez superó 20 -25 ton, y la mayor parte de los desembarques habitualmente tienen lugar en Mar del Plata (SAGPyA, 2004). En cuanto a las zonas de pesca, antes de 1985 casi la totalidad de las capturas provenía de la población bonaerense; pero al menos desde el año 1988, pequeños porcentajes de las capturas anuales han correspondido a la anchoíta patagónica.

El grupo norteño cumple un ciclo migratorio anual bien determinado. En Agosto-Septiembre, y en ocasiones algo antes, los primeros cardúmenes arriban a las aguas costeras y de la plataforma intermedia argentina provenientes del NE. Su presencia es masiva durante el pico de la estación reproductiva (octubre-noviembre), cuando se produce el mayor volumen de captura (Hansen, 2004). Existe menos información disponible acerca de la población austral, que tendría composición química variable y diferente a la bonaerense. Se pueden encontrar cardúmenes del efectivo patagónico entre los 41 y 47° lat S. De acuerdo a estimaciones realizadas por el INIDEP, este stock representaría menos del 30% del total de la biomasa de anchoíta.

Los trabajos de investigación y experiencia de las empresas en el procesado de la anchoita se centran en el efectivo bonaerense. Dado que la condición biológica, directamente relacionada con la composición química, ejerce una gran influencia sobre el procesado de esta especie, con tiempos de madurado mucho mayores para anchoita de otoño (Filsinger y Yeannes, 1994), resulta de sumo interés caracterizar y determinar el comportamiento del efectivo patagónico durante el salado-madurado, debido a la posibilidad de expansión de las pesquerías actuales al sur de los 41° lat S.

En el salado y madurado se lleva el producto a un a_w (actividad de agua) final de 0,75-0,80, inactivando los microorganismos patógenos y parte de los deteriorantes. La primera etapa del proceso, el presalado, consiste en sumergir la anchoita en baños de salmuera saturada, para lograr un a_w de 0.80-0.84, lo que posibilita la obtención de un producto sanitariamente seguro y considerado estable.

El objetivo del presente trabajo es determinar la velocidad de penetración de sal en la **etapa de presalado** en la anchoita del efectivo patagónico, y la influencia de la temperatura del medio sobre la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con la especie *E. anchoíta*. Se obtuvieron dos lotes de muestra procedentes de Puerto Madryn, capturados durante el mes de Agosto con 20 días de diferencia, y un lote procedente de Mar del Plata, capturado en el mes de noviembre. Los dos primeros (A y B) pertenecen al efectivo patagónico, mientras que el último (C) al bonaerense. Las muestras arribaron al laboratorio frescas, mantenidas en hielo. Se efectuaron las siguientes determinaciones fisicoquímicas: humedad, en estufa a 105° C hasta peso constante (AOAC, 1990); lípidos por hidrólisis ácida (AOAC, 1990); cenizas a partir de muestra seca, por calcinación hasta cenizas blancas (AOAC, 1993); proteínas por Kjeldahl (AOAC, 1993). Se determinó cloruros por el método de Mohr (Kirk, 1996), a partir de cenizas para anchoita fresca y de muestra seca para la anchoita presalada.

Arreglo experimental

Los lotes fueron acondicionados en baños de salmuera sobresaturada. Las anchoitas se utilizaron enteras, con escamas y en todos los casos la relación salmuera: anchoita fue de 1:1. Los baños se mantuvieron a 5, 9, 16 y 18° C para el lote A; a 8, 11, 18 y 21° C para B y a 4, 10 y 20° C para el lote C. Se extrajeron muestras hasta tenor salino en el músculo constante. En todos los casos se monitoreó la penetración de sal en el músculo (a partir del contenido de cloruros) y su pérdida de agua (a partir de contenido de humedad) en función del tiempo.

Análisis estadístico

La diferencia entre los lotes se determinó mediante análisis de varianza de una vía, según el procedimiento de Lison (1976) para la comparación de dos series de mediciones.

Para determinar los efectos de las variables tiempo y temperatura sobre la penetración de sal y pérdida de agua los datos se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías según el procedimiento de Hick (1964).

Para evaluar la diferencia en la penetración de sal y en la pérdida de agua en función de la temperatura se utilizó el Test de Duncan de rango múltiple (Hick, 1964).

El ajuste de los resultados se realizó por regresión lineal utilizando Microsoft Excel, Microsoft Office XP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del contenido lipídico en la penetración de sal.

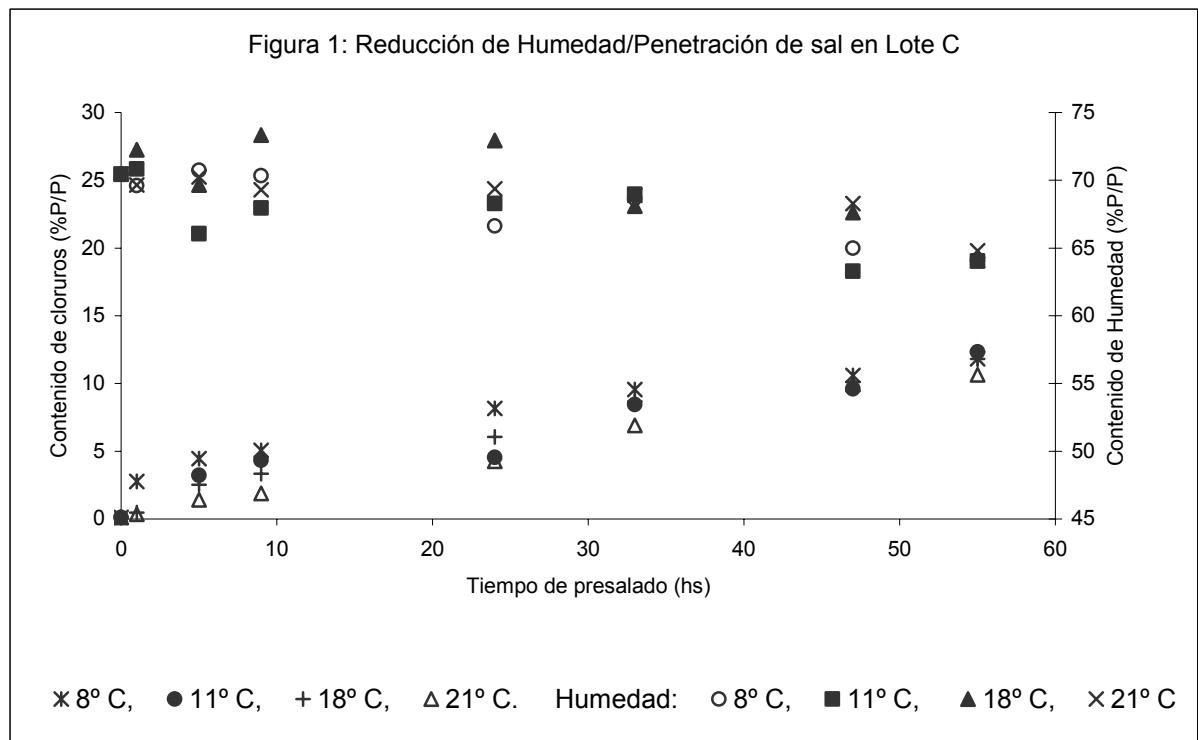
Los resultados de las determinaciones, expresados en % p/p, para el lote A fueron: 70.86% de humedad, 19.54% de proteínas; 7.75% de lípidos, 1.46% de cenizas y 0.12% de cloruros. Para B fueron: 71.45% de humedad, 19,83% de proteínas, 6.80% de lípidos, 1.48% de cenizas y 0.12% de cloruros. Para el lote C: 75.70% de humedad, 19.53% de proteína, 2.97% de lípidos, 1.57% de cenizas y 0.12% de cloruros.

Se compararon los lotes A y B, pertenecientes al efectivo patagónico, mediante análisis de la varianza. La variación en los valores de contenido de humedad y lípidos, determinaron una diferencia significativa entre ellos, perteneciendo por lo tanto a distintas poblaciones (P=0.01).

Se confirmó una correlación cuadrática entre contenido de humedad y de lípidos para los tres lotes de acuerdo al modelo de Yeannes y Almandós (2003).

En la Figura 1 se presentan los resultados de penetración de sal y expulsión de agua obtenidos para el lote B. Comportamientos similares se obtuvieron para los lotes A y C. Como se esperaba, el contenido de sal en la muestras aumentó y el de humedad disminuyó a medida que avanzó el tiempo de presalado. En la primeras horas de presalado las muestras presentan un incremento de humedad respecto del contenido inicial, para comenzar a reducirse linealmente a partir de aproximadamente un 4.5 g NaCl/100 g músculo (equivalentes a 5.4-6 g NaCl/ 100 g H₂O, variando con la temperatura), en todos los casos. Esto concuerda con los resultados de Cabrer et al. (2002), que determinaron el mismo comportamiento para la misma especie del efectivo bonaerense y los de Gou et al. (2003); quienes encontraron que, en carne, soluciones salinas con contenidos de sal mayores a la fuerza iónica del músculo provocan un incremento en el "swelling" (hinchamiento de la proteína) y en la capacidad de retención de agua, alcanzando un máximo en 5.85 g NaCl/100 g H₂O. A mayores contenidos de sal, el "swelling" disminuye progresivamente lo que se denomina "shrinkage". Luego de 24 hs. de presalado, se alcanzaron valores de humedad de 63-67 %p/p para C, y de 65-73% p/p para A y B, variando dentro de estos rangos para las distintas T utilizadas en cada caso. A las 24 hs. el contenido de cloruros en C hasta 10-13% p/p, concordando con resultados obtenidos por Zugarramurdi y Lupín (1977); mientras que en los lotes A y B este contenido llegó sólo 4-8 % p/p. Recién luego de 55 hs de presalado se alcanzaron en A y en B contenidos de humedad y cloruros similares a los del lote C en 24 hs. De acuerdo a estos resultados tanto la penetración de sal como la pérdida de agua es más rápida en el

lote C que en los lotes A y B, requiriendo estos últimos 30 hs adicionales de presalado para alcanzar los mismos contenidos de cloruros y humedad que A. Esto puede explicarse considerando que los lípidos se encuentran formando parte del músculo y constituyen una barrera a la difusión, tanto de agua hacia el exterior como de sal hacia su interior.



Efecto de la temperatura en la penetración de sal.

Se observan en los tres lotes diferencias en la penetración de sal y en la reducción de humedad para las distintas temperaturas. Se realizó un Análisis de Varianza a fin de determinar si las mismas son significativas o resultado de la variabilidad normal de las determinaciones. Se encontró que, además del lógico efecto del tiempo, existe a su vez un efecto de la temperatura, tanto sobre la penetración de sal como sobre la pérdida de agua para los tres lotes ($P=0.01$). Se determinaron cuáles son las temperaturas que presentan diferencias la penetración de sal y la pérdida de agua para los tres lotes de anchoita mediante el Test de Duncan. En los tres lotes se encontró que existe diferencia en la penetración de sal y en la pérdida de contenido de agua para todas las temperaturas ($P=0.01$).

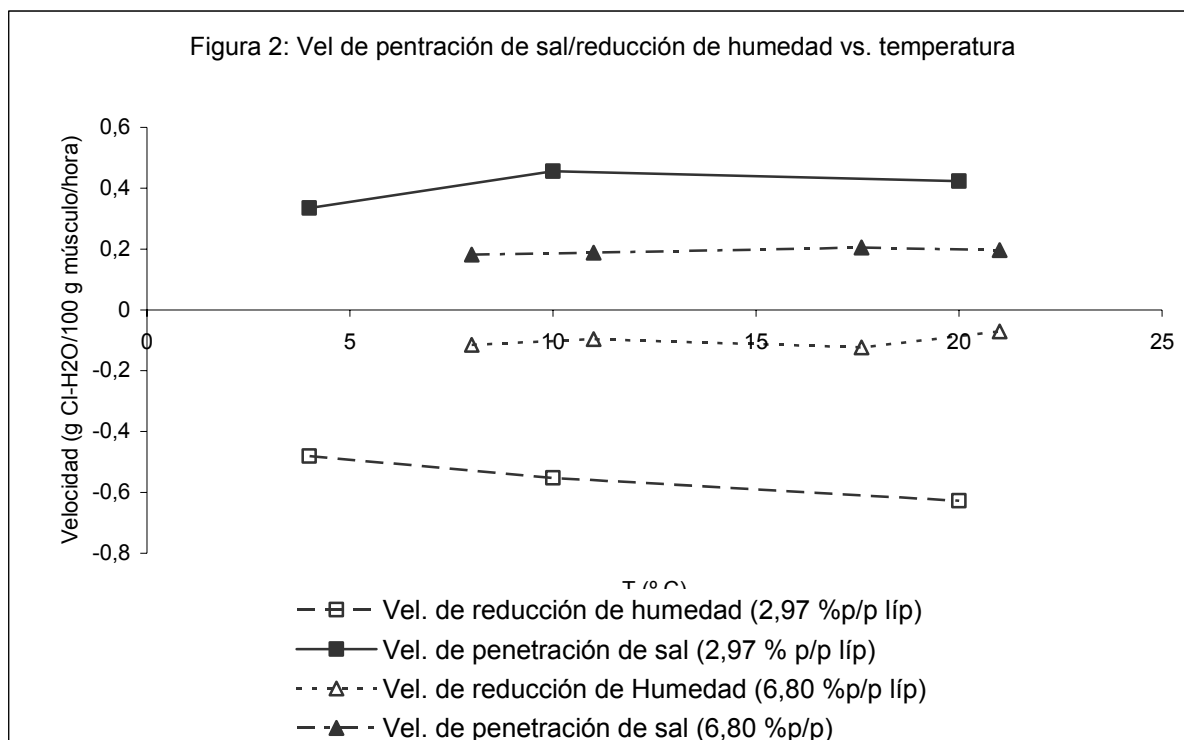
Por otra parte, la menor reducción de humedad y menor penetración de sal resultó en las muestras correspondientes a las mínimas temperaturas ensayadas, 4 y 5° C.

Velocidades de penetración de sal.

Se puede considerar que el transporte de sustancias en el músculo ocurre en un sistema difusivo donde el agua contenida en el mismo y el NaCl proveniente de la salmuera fluyen simultáneamente en direcciones opuestas. La difusión se rige por la Ley de Fick, donde el flujo másico de una sustancia es proporcional a su difusividad y al gradiente de concentración (Okos et al., 1992). Según esta ley en el estado no estacionario y con una difusividad constante, el flujo másico disminuye progresivamente a medida que el gradiente de concentraciones se disipa debido al transporte de sustancias. Sin embargo, los resultados de estudios de Vestergaard et al., 2005; Guiheneuf et al., 1997; Gou et al., 2003; Palmia et al., (1993) indican que tanto el coeficiente de difusión de sal como el de difusión de agua dentro del músculo no son constantes, sino dependientes del “swelling”, el grado de deshidratación y la concentración de electrolitos en el mismo, por lo que en este caso utilizar la Ley de Fick nos permitiría un acercamiento al proceso real, siendo discutible su aplicación inmediata para materiales que no son constantes en sus propiedades físicas. Consecuentemente, en este trabajo se calcularon las velocidades de penetración de sal (v_{NaCl}) y de reducción de humedad (v_{Hum}), utilizando la porción variable de la curva, linealizando los puntos experimentales y determinando la pendiente de la recta. De esta forma se obtuvo una velocidad constante de transporte de masa para el período no estacionario. En todos los casos se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) mayores a 0.87 en el ajuste para la determinación de velocidad de penetración de sal y superiores a 0,6 para reducción de humedad, siendo este último menor debido al ya mencionado fenómeno de “swelling”, de utilidad a fines comparativos. Las velocidades de penetración de sal y de reducción de humedad fueron similares en los lotes A y B y alcanzaron valores mayores para el lote C a todas las temperaturas (Figura 2).

Se encontraron diferentes valores de velocidad a las distintas temperaturas experimentadas para todos los lotes. Las máximas velocidades obtenidas corresponden a temperaturas entre 7 y 20° C, siendo menores a 4 y 5° C. La dependencia de la difusividad con la temperatura puede describirse según la ley de Arrhenius, donde ésta crece exponencialmente con $-1/T$ (Okos et al., 1992). Esto concuerda con los resultados obtenidos, donde la velocidad, proporcional a la difusividad, sea de reducción de humedad o de penetración de sal, crece con la temperatura.

Debe considerarse que la completa comprensión del fenómeno de difusión de sal y de agua en carnes debe incluir un profundo análisis de la relación entre el coeficiente de difusión y la deformación física debido al “swelling” y al posterior “shrinkage”, así como también la interacción agua-miosina.



CONCLUSIÓN

El tenor lipídico afecta la penetración de sal en *E. anchoita*, presentando menor velocidad de penetración de sal y de reducción de humedad los ejemplares pertenecientes al efectivo patagónico que poseen mayor contenido de lípidos.

La penetración de sal y la reducción de humedad se ven favorecidas por las mayores temperaturas en el rango estudiado.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Sra. Irene Ameztoy en las determinaciones de laboratorio

Trabajo subsidiado por UNiversidad Nacional de Mar del Plata, Proeycto 15/E243.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC (1990). Official methods of analysis (13th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Cabrer, A. I., Casales, M. R., Yeannes, M. I. 2002. Physical and Chemical Changes in anchovy (*Engraulis anchoita*) Flesh During Marination. Journal of Acuatic Food Product Technology. Vol 3, N° 1, 19-30.

- Filsinger, B. E.; Yeannes, M. I. 1996.** VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1er. Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur. 6 al 9 de abril. Centro Cultural San Martín. Buenos Aires. Argentina.
- Gou P., Comaposada J. y Arnau J.. 2003.** NaCl content and temperature effects on moisture diffusivity in the Gluteus medius muscle of pork ham. Meat Science. Vol 63, 29-34.
- Guiheneuf T., Gibbs S. y may L. 1997.** Measurement of the inter-diffusion of sodium ions during pork brining by one-dimensional ²³Na Magnetic Resonance Imaging (MRI). Journal of Food Engineering. Vol 31, 457-471.
- Hansen, Jorge. 2004.** Conferencia organizada por PROPIA. 7 de diciembre. Escuela Nacional de Pesca.
- Hicks, Charles R. 1964.** Fundamental Concepts in the Desing of Experiments. Holt, Rinehart and Winston, Inc. USA.
- Kirk, R; Sawyer, R.; Egan, H. 1996.** Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Segunda Edición. Editorial Continental S.A.. De C.V. México.
- Lison, L. 1976.** Estadística aplicada a la Biología Experimental. Ed. Universitaria de Buenos Aires. Argentina.
- Okos, M. R., Narsimhan, G., Singh R. K. y Weitnauer, A. C. 1992.** Food Dehidratation, en Handbook of Food Engineering. Heldmann D. R. y Luna D. B. (Editores). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). 2004** Informe de Desembarques. Disponible en: www.sagpya.org.ar.
- Vestergaard, C., Risum J. y Adler-Nissen J. 2005.** ²³Na-MRI quantification of sodium and water mobility in pork during brine curing. Meat Science. Vol 16, 663-372.
- Yeannes, Maria I. y Almandos, María E. 2003.** Estimation of fish proximate composition satarting from water content. Journal of Food Composition and Analisis. Vol 16, 81-92.
- Zugarramurdi, Aurora y Lupín, Héctor.1977.** Estudio sobre el salado de anchoíta. II. Dinámica del proceso. Rev. Latinoam. Ing. Quim. Apl. 7:25- 38.

COMPARACION DE COSTOS ENERGETICOS DEL SECADO DE MAIZ CON AIRE CALIENTE (SISTEMAS DE FLUJO CRUZADO Y MIXTO) Y AIRE NATURAL (ECO-SECADO). UN ESTUDIO POR SIMULACION.

GALATI SEBASTIAN L.² y GINER, SERGIO A^{1,2,3}

¹Investigador CICPBA. Lugar de trabajo ²Centro de Investigación y Desarrollo en Criótecnología de Alimentos (CIDCA). Universidad Nacional de La Plata-CONICET. Calle 47 y 116, (1900). La Plata. TE: 0221 425-4853. E-mail: saginer@ing.unlp.edu.ar. ³Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue comparar los costos energéticos del secado de maíz con aire caliente y natural. Con este fin, se utilizaron softwares de simulación, dos para secado con aire caliente, flujo cruzado (FC) y mixto (FM) y uno para secado con aire natural (SAN). Cada sistema fue evaluado en su condición típica de operación.

Se predijo el secado de 0.205 a 0.17 b.s. Secando con aire caliente, a 95°C. En FC, se usaron 2,4 kg aire/kg grano, mientras que en FM, 1,83. Se consumieron 6801 kJ en FC y 5136 kJ en FM, por kg de agua evaporada, con costos de \$ 0.80/tonelada (t) para FC y 0.60/t para FM. En SAN, la altura de lecho fue de 3 m; caudal de aire, 0.03 m³/(m³ s), temperatura del aire, 17°C; humedad relativa, 60%. El consumo fue de 465,14 kJ/kg. Los costos fueron de 0,30 \$/t de grano, promisoriamente menores.

ABSTRACT

The objective of this work was to compare corn drying energy costs by heated and natural air. To this end, simulation softwares were used, two for heated air drying, cross-flow (FC) and mixed-flow (FM) and one for natural air drying (SAN). Each system was simulated at a typical operating condition

Drying was predicted to occur from corn m.c. of 0.205 to 0.17 dec., d.b. Drying with heated air at 95°C was considered. In FC, a ratio of 2.4 kg air/kg grain, was used, being this ratio of 1.83 in FM. Energy consumption was 6801 kJ in FC and 5136 kJ in FM per kg water evaporated, leading to costs of \$a (argentine) 0.80/grain tonne (t) in FC and 0.60/t in FM. In SAN, bed height was 3 m; airflow, 0.03 m³/(m³ s), air temperature, 17°C; relative humidity, 60%. Consumption was of 465.14 kJ/kg. Costs were of 0.30 \$/t, considerably lower.

INTRODUCCION

El secado de granos procesa unas 50 millones de toneladas (Mt) anuales en Argentina. Comprende transferencia de calor y materia entre los sólidos y el aire en lechos fijos, estáticos o móviles. El secado convencional por aire caliente consume combustible fósil, mientras deshidrata excesivamente y fragiliza la periferia del material. El secado con aire natural (eco-secado) aprovecha el potencial de evaporación del aire ambiente y utiliza la energía eléctrica de los ventiladores, minimizando las emisiones a la atmósfera del secado convencional. Se han modelado previamente y desarrollado simuladores de secado convalidados para los sistemas continuos con aire caliente, de flujo cruzado (Giner, 1999) y mixto (Bruce y Giner, 1998). A su vez, se cuenta con un simulador de secado lento, ya desarrollado previamente (Gely y Giner, 2002). Los simuladores predicen temperaturas y humedades de granos y aire en función de la posición del lecho y tiempo de secado. Permiten estimar la demanda energética y por tanto los costos operativos del secado. El secado con aire natural presenta un potencial importante, pero se desconocen los costos energéticos en comparación con el secado convencional. El objetivo de este trabajo, por tanto, fue realizar una estimación de costos de energía por tonelada de grano para secado de maíz con aire caliente (FC y FM) y secado con aire natural. Cada sistema fue evaluado en su condición típica de operación.

Palabras clave: Secado ecológico, aire natural, flujo cruzado, flujo mixto, ecuación equilibrio.

MATERIALES Y METODOS

Secado con aire caliente en Flujo Cruzado

Para simular el sistema de flujo cruzado, se utilizó una versión modificada del programa Flu_X (Giner, 1999; Estrebou y Giner, 2004) (con versiones en Fortran 90 y Delphi) que utiliza un sistema de ecuaciones diferenciales parciales resolviendo la humedad y temperatura del aire y granos en función del tiempo y posición de la columna de secado. La velocidad de secado de los granos individuales se calculó con la expresión de Becker (Giner, 1999).

$$\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} a_v \sqrt{Dt} + 0.331 a_v^2 Dt \quad (1); \quad D = D_0 \exp\left(\frac{E_a}{RT_{aabs}}\right) \quad (2)$$

donde W es la humedad media de un grano, dec., b.s., siendo W₀ el valor inicial y W_e el de equilibrio. El área específica de semilla, a_v = 833 m⁻¹, D₀ = 8.067 x 10⁻⁷ m²/s, y E_a = 26,48 kJ/mol (6334 cal/mol) (Giner y Mascheroni, 1991). En estos sistemas, el flujo de

granos cae verticalmente en una columna de alrededor de 0,3 m de espesor, perforada en ambas caras para permitir el flujo horizontal del aire (Figura. 1). El programa utiliza datos de grano como humedad inicial, media, final y temperatura inicial, de aire como flujo másico, humedad, temperatura, y dimensiones como espesor de columna en secado, enfriamiento, y las secciones transversales de flujo de aire. Los principales parámetros de comportamiento (resultados del programa) son la potencia de ventilación eléctrica, el tiempo de residencia, la producción de granos en t /h, y el consumo de energía por kg de agua evaporada. De allí puede estimarse el consumo de combustible, y finalmente el precio por tonelada.

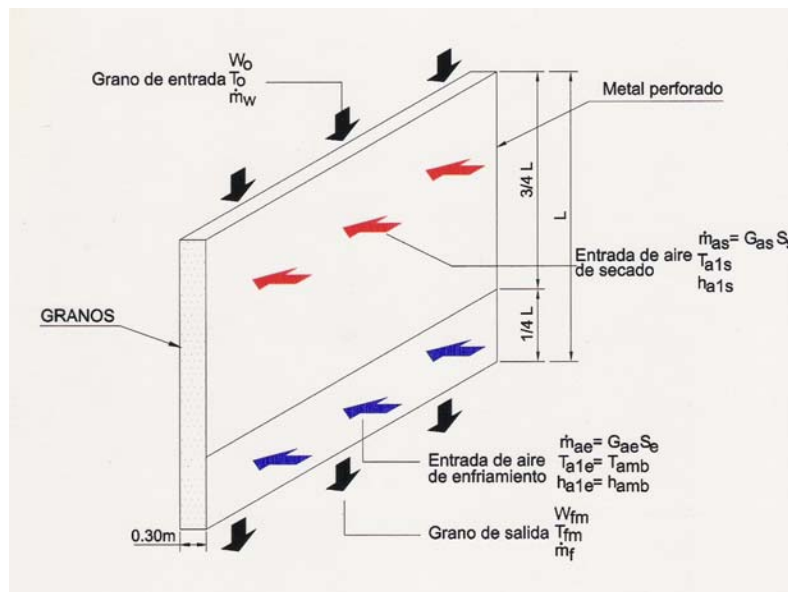


Figura 1. Esquema de una columna para el secado en flujo cruzado.

Secado con aire caliente en Flujo Mixto

Para predecir este sistema, más complejo, se utilizó un modelo de secado similar al de flujo cruzado, incluso con una cinética de secado simplificada (Bruce, 1984), ajustada a los mismos datos de la ec. (2).

$$\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = \exp(-kt) \quad (3); \quad k = k_0 \exp\left(-\frac{k_1}{T_{aabs}}\right) \quad (4)$$

donde $k_0 = 1.659 \text{ s}^{-1}$ y $k_1 = 3184.7 \text{ K}^{-1}$. No obstante, el modelo del equipo es aquí más complejo, puesto que el aire ingresa a la columna por tubos en V invertida, abiertos del lado de entrada y cerrados del lado de salida, y egresa por tubos similares, cerrados del lado de entrada y abiertos del lado de salida. El aire va saliendo de los tubos de entrada y se arregla con el flujo zigzagueante de granos parte en flujo cruzado, parte en cocorriente

y parte en contracorriente. El simulador pseudo2d desarrollado con estas suposiciones, Sekmix, codificado en Fortran 90, fue convalidado previamente (Giner y Bruce, 1998), que utiliza las condiciones operativas de aire y granos en forma similar al programa de flujo cruzado, agregando la complejidad del mazo de tubos que contiene la secadora. El principio de flujo mixto y su interpretación por el simulador, se esquematizan en la Figura 2, donde puede verse que, por simetría el sistema se reduce a una rodaja cuyo espesor de grano no supera los 0,20 m. El principal problema del secado con aire caliente es que produce un pronunciado gradiente de humedad en el grano, deshidratando fuertemente la periferia, produciendo decoloración superficial y generando tensiones mecánicas que fragilizan y pueden romper el cereal, disminuyendo su calidad y precio.

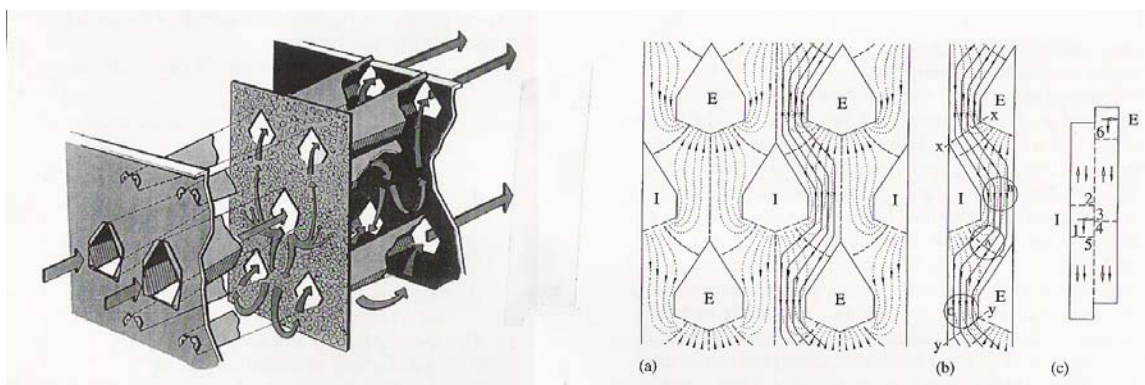


Figura 2. Principio del secado en flujo mixto (izquierda) y centro (a). Rodaja aislada por simetría (b) e interpretación del modelo pseudo 2D (c).

Secado con aire natural

Este sistema es muy distinto de los anteriores. Debe utilizar una estrategia para aprovechar el potencial de secado de aire ambiente de manera de utilizar sólo energía eléctrica de los ventiladores, entre fin del verano y el otoño, cuando se cosecha el maíz. Emplea alturas de lecho muy superiores, de entre 2 y 4 m, caudales específicos de aire menores, y su objetivo es secar el grano antes de que se perciba el desarrollo microbiano, principalmente de hongos. Sus tiempos de secado son mayores que en secado con aire caliente, y la adopción de esta técnica depende de los costos asociados dado que se produce un grano que no ha experimentado gradientes. En este sistema es muy importante la predicción precisa de la pérdida de carga del aire a través del lecho, que impacta en la potencia de ventilación, y disponer de una buena simulación del secado,

puesto que los costos salen del producto de ambos factores. La pérdida de carga se evaluó en base a la expresión de Hukill e Ives (Brooker y col., 1992).

$$\Delta p_u = \frac{aV^2}{Ln(1+bV)} \quad (5)$$

donde Δp_u es la pérdida de carga por m de longitud de lecho de grano limpio con empaque flojo. Los coeficientes son $a = 2.07 \times 10^4$ y $b = 30,4$ en unidades SI.

El secado con aire natural (SAN) se simuló con un modelo de balances macroscópicos de materia y energía en aire y granos. El lecho se dividió en capas, considerando transferencia "al equilibrio" por la lentitud del proceso (Gely y Giner, 2002). En consecuencia, es necesario contar con una buena expresión de la isoterma de equilibrio para maíz (Brooker y col., 1992).

$$W_e = \left[-\frac{Ln(1-h_r)}{K(T+C)} \right]^{1/N} \quad (6)$$

donde h_r es la humedad relativa del aire en equilibrio, decimal. Los coeficientes de maíz dentado amarillo son $K = 8,654 \times 10^{-5}$; $C = 49,81$; $N = 1,8634$. Las ecuaciones se codificaron en lenguaje Fortran 90, en el programa Sek_An 1.0.

RESULTADOS Y DISCUSION

Secado con aire caliente por flujo cruzado

Simulación de la secadora

Se partió de una secadora de tres columnas de **0.3 m** de profundidad cada una y **60 m²** de secado a **95 °C** y **20 m²** de enfriamiento a **15 °C**. Con una humedad absoluta del aire de **0.01 kg vapor/kg aire seco** que ingreso con un caudal específico de **0.25 kg/m² s**, arrojando un caudal Q secado: **2700 kg/min.** y un caudal Q enfriado: **900 kg/min.** El grano entra en la secadora con una humedad inicial W_o : **0.205** y una humedad final de W_f : **0.167**.

Una vez determinados los datos anteriormente mencionados e incluidos dentro del **Flu_X** se procederá a la corrida del programa. El mismo generó la producción húmeda horaria de **66,48 t/h**, un tiempo de residencia de **48.1 min**, y un consumo específico de energía de **6801 kJ/kg** los cuales son de vital importancia a la hora de calcular los costos de secado. Expresando caudales de aire y grano en kg/h, se obtiene una relación entre ambos de **2,4 kg aire/kg grano**, que representa un parámetro de diseño importante.

Costos energéticos del secado en flujo cruzado

Una vez determinado el tiempo de residencia (t_s) por el simulador en función de las condiciones operativas ya descritas, se calcula la producción, expresada como grano

húmedo, $prod = \dot{m}_0 = \frac{m_0}{t_s} = \frac{\rho_{L0}SZ_{max}}{t_s}$ (7) donde m_0 es la masa de grano en la secadora. El

símbolo ρ_{L0} es la densidad de lecho evaluada a W_0 , S es la sección transversal total y Z_{max} el espesor promedio de la columna. El caudal de materia seca viene dado por

$\dot{m}_s = \frac{\dot{m}_0}{1+W_0} = \frac{\rho_{L0}}{1+W_0} \frac{SZ_{max}}{t_s}$ (8). La velocidad de evaporación \dot{m}_{wa} viene dada por:

$\dot{m}_{wa} = \dot{m}_s (W_0 - W_f)$ (9) donde W_f es la humedad media del grano a la salida. En

consecuencia, el consumo de energía (C_e , en energía/tiempo) surge de multiplicar el consumo específico por kg de agua evaporada (C_{ee}), por la velocidad de evaporación

\dot{m}_{wa} . $C_e = C_{ee} \dot{m}_{wa} \Rightarrow C_e = \dot{m}_{as} C_{pa} (T_a - T_{amb})$ (10), donde \dot{m}_{as} es el caudal másico de aire

caliente en la zona de secado, T_a la temperatura de secado y T_{amb} el valor ambiente. Para calcular el costo, el consumo C_e se divide por el calor de combustión del combustible utilizado para obtener el consumo de combustible. En nuestro caso, el valor calorífico del gas natural usado fue de 9000 kcal/Nm³. A su vez, considerando el precio del combustible en \$0,15/Nm³, y dividiendo por la producción de grano húmedo, se obtiene un costo de \$ 0,80/t de grano.

Secado con aire caliente en Flujo Mixto

Simulación de la secadora

En este caso la secadora cuenta con **15** filas de conductos para la entrada del aire y otras tantas para su salida en secado y **4** filas para enfriamiento del maíz, con un ancho de **3.6** m, una altura de **12.2** m, y una profundidad de **1.9** m. La secadora presenta 25 conductos en cada fila de entrada o salida de aire, separados por 0.15 m horizontales. En donde el aire para secado entra con un caudal de **2000** kg /min. con una , humedad absoluta **0.01** kg. vapor/kg. aire seco a una temp. de secado de **95 °C**. El caudal de aire de enfriamiento es de **530** kg/min, a 15 °C. De igual manera que en el caso anterior se desea secar el grano de **0.205** hasta **0.167**.

Tales datos se ingresaron al programa **Sek_Mix** que, luego de ejecutarse, entregó los resultados siguientes: producción húmeda, **65.66** t/h, consumo específico **5136** kJ/ kg de agua evaporada. El tiempo de residencia predicho fue de **44.5** min. El cociente de flujo de aire a flujo de grano dio 1,8 kg aire/kg grano.

Costos energéticos del secado en flujo mixto

Siguiendo un procedimiento análogo al de flujo cruzado, se obtiene un costo de \$0,60/t de grano, inferior al de flujo cruzado como podía esperarse del uso más eficiente del aire.

Secado con aire natural

Simulación del sistema

A diferencia de los casos anteriores, el sistema de secado es un lecho fijo estático, de 3 m de altura. El caudal específico que deberán entregar los ventiladores será $Q_{vv} = 0.03 \text{ m}^3$ de aire / (m^3 lecho s) con una temperatura de aire de $T_a: 17 \text{ }^\circ\text{C}$ y una $h_r = 0,6$ (60%, que puede considerarse un valor representativo de la región pampeana argentina, y que es aceptable por ser menor que la actividad acuosa final del grano debe ser de 0,7). La humedad inicial y final de grano, y su temperatura inicial son los mismos que en los casos anteriores. Los datos anteriores se ingresaron en el programa **Sek_An versión 1.0**, dando resultados como producción horaria húmeda por unidad de sección transversal de **35.25 kg /m² h** con un tiempo de residencia de secado de **63.8 h** (consideradas continuas) de ventilación con aire natural. Con estos dos últimos datos, la sección necesaria para igualar la producción de los sistemas de aire caliente es de **1844 m²** (aproximadamente 40 m x 45 m). Para este caso el consumo de energía será en su totalidad eléctrica y resulta **465.14 kJ /kg** de agua, muy inferior al de los casos anteriores.

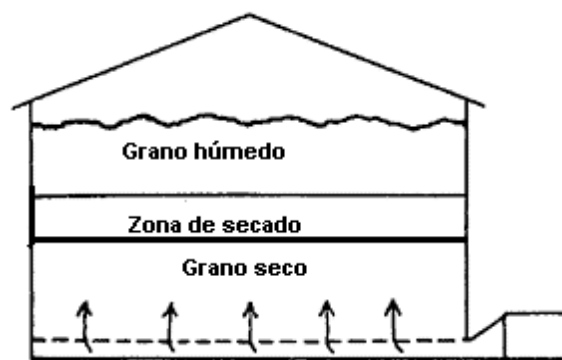


Figura 3. Esquema de una instalación de secado con aire natural.

Costos energéticos del secado con aire natural

Con la sección estimada, se obtiene la misma producción de granos que en los casos anteriores, usando la ec. (7), y la velocidad de evaporación en kg/tiempo es igual también. La energía consumida en el secado surge de las ecuaciones de potencia absorbida por el aire de secado. $P_{ot} = \Delta p Q_v = 1,5 \Delta p_u Z_{max} Q_{vv} S Z_{max}$. Donde $\Delta p = 1,5 \Delta p_u Z_{max}$. Siendo 1,5 un coeficiente para prever compactación y presencia de finos. Q_v y Q_{vv} son los caudales vol. y vol. específico, respectivamente. La potencia eléctrica es mayor, y utiliza la eficiencia del par motor ventilador, del 50%. Así, $P_{otel} = P_{ot}/0,5$. La energía consumida en el secado,

surge de multiplicar P_{otel} por el tiempo de secado predicho por el simulador, así $E_{el}=P_{otel}t_s$. Multiplicando E_{el} , expresada en kWh por el costo del kWh (\$ 0,05 o 0,10 según zonas), se obtiene el costo horario de energía eléctrica, que dividida por la producción de granos, nos da el valor en \$/t. Ese valores resultaron de 0,19 y 0.38 \$/t, según el valor del kWh empleado, resultando inferiores a los del secado con aire caliente.

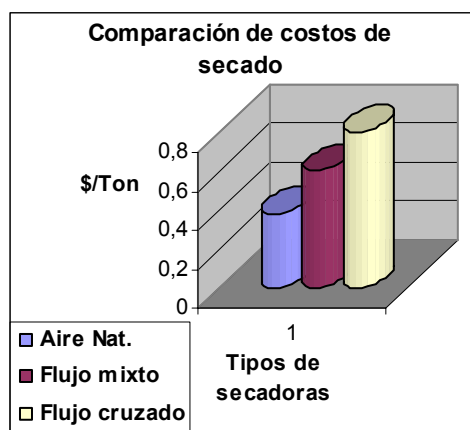


Figura 4. Gráfico comparativo de costos de secado.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de simuladores previamente convalidados en granos, se ha estimado que el secado con aire natural de maíz, si bien utiliza un tiempo de secado mayor y emplea mayor área de piso comparado con el secado con aire caliente, constituye la alternativa más benéfica tanto con el medio ambiente como con el grano mismo, y resulta mas económico, dado que sus costos energéticos de secado por tonelada varían entre \$ 0,19 y 0,38, comparado con \$ 0,60 y 0,80 para los dos sistemas de aire caliente más utilizados (flujo cruzado y mixto).

BIBLIOGRAFÍA

Estrebou, C.A. y Giner, S.A. Visual Software (FluX) for Simulation of Cross Flow Dryer Performance and Effect on Quality. Examples for Wheat. Estrebou, C.A. and Giner, S.A. (2004) *Drying 2004* – Proceedings of the 14th IDS 2004 São Paulo, Brazil, vol. A, pp. 605-612

Giner, S.A. y Mascheroni, R.H. (1991). Modelado de la transferencia de calor y materia en maíz en secadoras de flujo cruzado con flujo de aire de dirección alternante. Actas del IV Congreso Latinoamericano de Transferencia de Calor y Materia. Volumen1:61-64.La Serena, Chile

Gely, M.C. y Giner, S.A. (2002). Comparison of Costs for Soybean Conventional Drying And Dryeration. A Computer Simulation Analysis. ASAE Paper 026080 ASAE/CIGR Annual International Meeting, Chicago, Illinois.

Giner, S.A. Two-Dimensional Simulation Model of Steady-State Mixed-Flow Grain Drying. Part 2: Experimental Validation. S.A. Giner and D.M. Bruce. Journal of Agricultural Engineering Research 71(1): 51-66 (1998).

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO EXTRAÍDO DE ALGAS PARDAS (*Macrocystis pyrifera*)

PÉREZ María V.¹, GÓMEZ César G.¹, MIGUEL Víctor U.¹, VILLAR Marcelo A.¹, LOZANO Jorge E.¹ y RINAUDO Marguerite²

¹PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino "La Carrindanga" Km. 7, (8000) Bahía Blanca, Argentina, TE 54-291-4861700 int 212, Fax 54-291-4861600, email: jlozano@plapiqui.edu.ar

²CERMAV (CNRS), BP53, 38041 Grenoble, Francia

RESUMEN

En este trabajo se realizó la extracción de alginatos a partir de algas pardas por transformación de sus sales insolubles a la forma soluble, como alginato de sodio, seguido de sucesivas disoluciones y precipitaciones para eliminar impurezas. Se compararon tres vías de precipitación - purificación, utilizando etanol, ácido y calcio. Los rendimientos obtenidos fueron desde 25 a 36 %, respecto a la masa inicial de alga. Los costos de tiempo y operativo siguen la tendencia vía calcio > vía ácido >> vía etanol. Los pesos moleculares varían según el tratamiento, siendo más bajos aquellos obtenidos mediante vía calcio, dado que este proceso es más agresivo y presenta mayor número de pasos. Las restantes vías arrojaron pesos moleculares similares, cercanos a 200.000 g/mol. En todos los casos se observa en la determinación de pesos moleculares, la presencia de agregados de alto peso molecular. La relación de ácidos manurónico a gulurónico (M/G) resultó de aproximadamente 1,05, siendo levemente más baja en alginatos extraídos vía calcio.

Palabras clave: alginato, extracción, algas pardas, NMR, SEC

ABSTRACT

Alginate extraction from brown seaweeds was performed by converting their insoluble salts into the soluble ones, namely sodium alginate; followed by successive dissolutions and precipitations in order to remove impurities. Three methods of precipitation /purification were compared, that is ethanol, acid and calcium. Efficiency of extraction was in the range of 25 to 36 %, with respect to the initial mass of algae. Time and operative costs follow the trend calcium way > acid way >> ethanol way. Alginate weight average molecular weight (Mw) varied with treatment. The lower Mw corresponded to alginates purified by the calcium way; this result was attributed to the aggressiveness of the method and the number of steps involved in the procedure. The other extraction ways gave similar Mw (about 200,000 g/mol). In all cases the molecular weight determination indicated the presence of high Mw aggregates. Manuronic to

guluronic acid ratio (M/G) resulted approximately 1.05, being lower for alginates extracted by the calcium way.

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas del litoral argentino constituyen recursos naturales renovables económicamente importantes que no han sido debidamente aprovechadas hasta el presente (Ferrario y col, 1996, McHugh, 1987; 2003). Existen tres grupos de algas clasificadas por su color: pardas, rojas y verdes. Cada una de ellas posee el predominio de un polisacárido característico (Percival and McDowell, 1990). Los alginatos provienen de las algas pardas, en tanto que el agar y los carragenatos de las algas rojas. Los géneros de algas pardas de los que se obtienen la mayoría de los alginatos son entre otras, *Laminaria digitata*, *hyperborea* y *japonica*, *Sargassum*, *Lessonia* y *Macrocystis pyrifera*. Esta última, conocida como “cachiyuyo” y que abunda en el litoral patagónico, puede medir 25 metros o más (King, 1983; Ferrario y col, 1996).

Los alginatos representan hasta el 40 % del peso seco del alga y forman parte del tejido de sostén de la planta (Percival and McDowell, 1990). Químicamente son copolímeros de ácido β -D-manurónico y su epímero en C-5, ácido α -L-gulurónico (Haug y col., 1966; Atkins, 1971, FAO, 1997).

El proceso de obtención de alginatos a partir de algas pardas se estudió con el objeto de bajar costos, aumentar rendimientos y mejorar sus propiedades. Para su producción se conocen básicamente dos métodos tradicionales: (i) precipitación con una sal soluble de calcio, y (ii) en medio ácido fuerte (Arvizu-Higuera, 1997). En este trabajo se presenta un estudio comparativo de estos dos métodos con un tercero alternativo, basado en la capacidad de insolubilización de alginato de sodio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El extracto de alginato fue obtenido de hojas y tallos de algas pardas secas (*Macrocystis pyrifera*) de la costa patagónica argentina (Comodoro Rivadavia, Chubut, febrero de 2003). Para ello, las algas fueron secadas, trituradas y tamizadas (mallas 10-20) para quitarles la arena remanente. El contenido de humedad se realizó por secado a 120 °C y el de cenizas en mufla a 450 °C (Larsen, 2003), ambos durante 16 h. Para la extracción se utilizó agua destilada, HCl (37 % p/p) Ciccarelli (Arg.), NaOH, Na₂CO₃, CaCl₂ y tierra de diatomeas Anedra (Arg), EtOH 96% medicinal Porta (Arg.) y negro de eriocromo T. Como muestra de referencia se utilizó alginato de sodio Fluka (Suiza).

Método de extracción

Los ensayos se basaron en el método de extracción desarrollado por Arvizu Higuera y col. (1997) que incluye un proceso de pre-extracción, para transformar las sales de alginato en ácido algínico, utilizando una solución ácida (pH 3-4) con agitación mecánica (300 rpm; 15 min). Las algas pretratadas fueron luego agitadas (60 °C; 120 min) en una solución 1 N de Na₂CO₃ (pH ~ 10). La pasta obtenida fue luego hidratada (60 °C), se agregó tierra de diatomeas y se centrifugó (4000 rpm; 15 min). El alginato de sodio (NaAlg) obtenido fue purificado siguiendo tres métodos diferentes:

- *Vía etanol (I)*: La solución acuosa de NaAlg obtenida se precipitó con la adición de etanol. Luego el precipitado fue lavado en Soxhlet con etanol y secado bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.
- *Vía ácido (II)*: A la solución clarificada de NaAlg se le adicionó una solución 1 N de HCl (pH ~ 1,6), con agitación a temperatura ambiente (1 h); luego fue centrifugada para separar el precipitado de ácido algínico, el cual se solubilizó con una solución 1 N de Na₂CO₃ (pH ~ 10) con agitación y a temperatura ambiente durante 1 h. El polímero de NaAlg fue precipitado, lavado y secado de acuerdo a lo indicado en la vía etanol.
- *Vía calcio (III)*: A la solución de NaAlg se le agregó una solución 1 M de CaCl₂, dando lugar al precipitado de alginato de calcio (CaAlg), el cual fue lavado en soxhlet con agua (64 h) y agitado en medio ácido (pH ~ 1,8) durante 3,5 h. El ácido algínico insoluble obtenido fue separado mediante centrifugación y lavado con 1,5 L de HCl 0,05 N, verificando la ausencia de Ca²⁺ con el indicador negro de eriocromo T (solución al 5 % en etanol). Las fibras de ácido algínico se solubilizaron en solución acuosa 1 N de Na₂CO₃, (pH ~ 10), dando lugar a la solución de NaAlg, la cual se precipitó, lavó y secó de acuerdo a lo indicado en la vía etanol.

Caracterización química y molecular de alginatos

Se determinó el contenido de agua y cenizas mediante análisis termogravimétrico (TGA) en una balanza TGS-2 Perkin-Elmer (USA) en atmósfera de nitrógeno (10 mL/min) en el rango de temperaturas 30 - 730 °C (a 10 °C/min). Se consideraron cenizas, tanto al carbonato de sodio formado como a otros residuos carbonatados (Soares, 2004).

Las cantidades relativas de alginato / ácido algínico (-COO⁻ y -COOH) fueron determinadas mediante titulación. La diferencia entre el HCl inicial y el final, después de estar en contacto con el biopolímero, correspondió a los moles de HCl consumidos, los cuales son iguales a los moles de -COO⁻ presentes en el biopolímero.

Se determinó cualitativamente la presencia de iones Na⁺, Mg²⁺, K⁺ y Ca²⁺ mediante espectrometría por fluorescencia de rayos X en un espectrómetro por fluorescencia de

rayos X, PANalytical PW 2403 Magi'X (Holanda) con ánodo de rodio, cristales LiF200, PE, PX1 y PX4, en atmósfera de Helio.

Los NaAlg purificados fueron caracterizados por cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) en un equipo Waters Alliance GPCV2000 (USA), equipado con tres detectores en línea: refractométrico, viscosimétrico y de dispersión de luz Wyatt (USA); con dos columnas en serie (Shodex OH-pack 805 and 806). Los resultados se expresaron como peso molecular promedio en peso (Mw) e índice de polidispersión (Mw/Mn).

Por último, la relación de monómeros (M/G) en los alginatos fue determinada usando Resonancia Magnética Nuclear ^1H RMN. Las muestras fueron disueltas en D_2O , SDS (Vitry, France), en una concentración de 6 mg/mL. Los experimentos de RMN fueron llevados a cabo en un espectrómetro Bruker AC300 (Germany).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican que las algas tenían un contenido de agua de aproximadamente 11 % en peso y un 4 % en peso de arena remanente. El porcentaje de cenizas fue de 36 %, correspondiendo el resto a materia orgánica.

Rendimientos y comparación económica relativa de métodos

El rendimiento del proceso de extracción se calculó respecto del alga seca y sin arena remanente (8,5 g). La purificación de NaAlg con etanol dio como resultado los mayores rendimientos, mientras que los correspondientes a las vías ácido y calcio no presentaron diferencias considerables (Tablas 1 y 2). Para cada método se calcularon los consumos efectivos de la materia prima y de cada insumo, con el fin de evaluar las diferencias y estimar la conveniencia de cada una de las vías. Las diferencias relativas se expresaron en costos totales y pueden clasificarse en la siguiente progresión: Vía III > Vía II >> Vía I (100 > 99,7 >> 69,6 %). Se verificará en un próximo trabajo si estas vías pueden ser extendidas a escala industrial y si los costos se corresponden con los aquí estimados.

Caracterización química y molecular de los alginatos obtenidos

En casi todas las muestras extraídas la concentración de alginato, $-\text{COO}^-$, no presentó diferencias significativas (Tabla 2), aunque fue baja comparada con el alginato comercial. Estos bajos valores corresponden a una cantidad de ácido algínico mayor a la deseada en el producto final. Sin embargo el pH fue mayor que 7 en todos los casos, probablemente debido a la presencia de impurezas propias de la extracción, tales como carbonato de sodio.

Tabla 1. Rendimientos promedio y comparación del costo de tres métodos de extracción de alginato de sodio

	Vía etanol	Vía ácido	Vía calcio
Costos unitarios (\$/tn)			
Rendimiento promedio(% p)	34,5	27	28
Consumo de alga (g/g prod)	303	400	370
Agua (ml/g)	676	912	912
HCl (g)	14,6	444	14,6
Na ₂ CO ₃ (1 N)	624	998	998
Ca Cl ₂ (1 M)	0	0	470
Etanol (mL)	812	727	727
Total (\$/tn)	2429	3481	3492
Costo relativo (%)	69,6	99,7	100

Tabla 2. Rendimientos y características del alginato de sodio de *Macrocystis pyrifera* extraído mediante diferentes vías de precipitación – purificación, incluyendo: Intensidades de elementos químicos Ca²⁺ y Na⁺. Características moleculares y contribución de bloques de copolímeros en muestras de alginato de sodio, mediante distintas vías

		muestra						
		Comercial	NaAlg I.1	NaAlg I.2	NaAlg II.1	NaAlg II.2	NaAlg III.1	NaAlg III.2
		Vía Etanol		Vía ácido		Vía calcio		
	R%(p/p)		33	36	25	29	27	29
	Humed. %(p/p)	11,6	9,3	10,8	11,3	10,7	10,3	11,1
	Cenizas %(p/p)	23,4	31,3	31,6	24,5	26	28	33,5
	-COO ⁻ %(p/p)	80	56	61	54	61	62	79
	Mw (kDa)	279	297	117	227	213	94	56
	Mw/Mn	1,9	1,8	1,5	1,6	1,6	3	1,9
	GG	0,48	0,69	0,89	0,76	0,59	0,69	0,77
	M/G	0,25	1,2	0,8	1,25	1,3	1,8	0,95
	pH [§]	6,5	7	9	8	8	7	10
Intensidad (ctas/s)	Na ⁺	64	21	26	132	45	45	30
	Mg ²⁺	285	275	418	262	225	269	249
	K ⁺	34	44	40	23	25	18	42
	Ca ²⁺	1110	1161	1242	1039	1131	1209	1206
	Na ⁺ /Ca ²⁺	0,058	0,037	0,025	0,127	0,04	0,018	0,021

§ Soluciones al 2%(p/p), papel indicador 1-14 Merk

El análisis termogravimétrico arrojó valores de contenido de agua similares, tanto para los extractos como para el alginato comercial (la temperatura de deshidratación se consideró desde 30 hasta 210 °C). Los valores de cenizas fueron más elevados de lo esperado, considerando el alto porcentaje de ácido algínico por cada muestra, dado que este polisacárido

en su forma ácida no deja prácticamente residuos inorgánicos a las temperaturas estudiadas (Soares, 2004). Las cenizas remanentes, que no están relacionadas con la formación de Na_2CO_3 , corresponden a otras sales inorgánicas, dadas por la presencia de K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , como se observa en la Tabla 2.

Si bien no se cuantificó la concentración de iones presentes en cada muestra, se realizó un análisis cualitativo en base a la intensidad medida para cada una de las muestras indicadas en la Tabla 2 (Ca^{2+} y Na^+). La relación entre intensidades de los cationes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es un buen índice para observar la calidad del producto final respecto de la formación de agregados. Este valor fue menor en los alginatos extraídos respecto del comercial, lo cual corrobora que la calidad del producto final no es la deseada, con excepción de la muestra II.1.

Caracterización por NMR y SEC

La caracterización molecular muestra la fuerte incidencia que tiene el tipo de tratamiento en la calidad del producto final. El proceso vía calcio, fue mucho más agresivo y los pesos moleculares correspondientes fueron prácticamente un orden de magnitud menores que los de las muestras obtenidas por las otras vías (Tabla 2). El peso molecular de los alginatos restantes fue del mismo orden de magnitud, aunque se observa que los resultados no fueron reproducibles entre uno y otro para la misma vía. Esta dispersión es inherente a los biopolímeros, los cuales sufren importantes cambios ante pequeñas perturbaciones en su manipulación. La polidispersión resultó elevada para todas las muestras, según los datos obtenidos por cromatografía de exclusión de geles. El índice de polidispersión resultó aún mayor para los alginatos obtenidos mediante la *Vía III*, debido tanto a la escisión de cadenas provocada por la agresividad del método como a la presencia de agregados de alto peso molecular, en forma de geles de CaAlg .

La relación entre co-monómeros (Tabla 2) dio un promedio de 1,05, con un desvío estándar del 22 %. Esta dispersión se debe nuevamente a la presencia de agregados que no permiten una preparación adecuada y reproducible de la muestra, para ser analizada luego por RMN. Problemas similares se observaron en la cuantificación de diadas de bloques de guluronato (GG). Los resultados de análisis molecular y químico ponen de manifiesto que es importante mejorar los procesos de purificación, para eliminar la mayor cantidad de posibles fuentes de error, y encontrar reproducibilidad dentro de un rango ingenieril más aceptado.

CONCLUSIÓN

Se considera que la extracción de alginatos ha sido satisfactoria en cuanto a la cantidad de producto final y sus propiedades, particularmente las moleculares. El proceso vía precipitación con calcio resultó ser muy agresivo, deteriorando las propiedades finales.

Por su parte el método de extracción vía etanol resultó ser el más rentable. Se observó en todos los casos que el intercambio ácido alginico / alginato no fue completo, dando como producto final una mezcla de los mismos en cantidades no deseadas. Tanto la impureza del material como la presencia de agregados de calcio, hacen menos reproducibles las propiedades finales (desventaja inherente a los biopolímeros). Por los motivos expuestos, se debería mejorar el proceso de purificación.

BIBLIOGRAFIA

Arvizu-Higuera D.L., Hernández-Carmona G. & Rodríguez-Montesinos E. (1997) *Ciencias Marinas*, 23(2): 195-207.

Atkins E.D.T., Mackie, W., Parker K.D. & Smolko E.E. (1971) *Polymer Letter*, 9: 311-316.

FAO, 49th JECFA (1997), Sodium alginate, Calcium alginate, Alginate Acid, www.fao.org

Ferrario M. y Sar E. (ed) *Macroalgas de Interés Económico. Cultivo, Manejo, Industrialización*. Editorial de la UNLP. La Plata, 1996.

Haug A., Larsen B. & Smidsrod O. Acta Chem. Scand, (1966) 20: 183-190.

King, A.H. Chap. 6, *Food hydrocolloids (2)*, M. Glicksman (ed), Boca Raton, FL: CRC Press 1983.

Larsen B., Salem D.M.S.A., Sallam M.A.E., Mishrikey M.M., Beltagy A.I. (2003) *Carbohydr Res*, 338: 2325-2336.

McHugh D.J. *FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 441*. Rome, 2003.

McHugh D.J. Chap 2. *FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 288*. Rome, 1987.

Percival E. and McDowell R.H. Chap. 15, *Methods in Plant Biochemistry (2)*, Academic Press Ltd 1990.

Soares J.P., Santos J.E., Chierice G.O., Cavalheiro E.T.G. (2004) *Ecl Quím*, 29 (2): 57-63.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Alfio Zambón por la recolección y preparación inicial de las algas. A la Lic. Silvana Tripodi por la realización experimental de los análisis termogravimétricos. Este trabajo fue realizado gracias al subsidio PICT: 09-0816, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

COMPARACIÓN DE TIEMPOS DE CONGELACION Y DESCONGELACION DE ALIMENTOS CALCULADOS UTILIZANDO METODOS NUMERICOS, APROXIMADOS Y DE REDES NEURONALES

ODDONE, Sebastián¹, GOÑI, Sandro¹, SEGURA, Juan A.¹, SALVADORI, Viviana O.^{2,3} y MASCHERONI, Rodolfo H.^{2,3,4}

¹Departamento de Ciencia y Tecnología, UNQ. ²CIDCA (UNLP – CONICET). 47 y 116 - (B1900AAJ) La Plata, Argentina. ³MODIAL – Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP. ⁴email: rhasche@ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

La congelación y la descongelación son procesos fuertemente no lineales y su modelado y simulación son muy complejos. Es difícil desarrollar métodos simples y precisos para la predicción de tiempos de proceso, que cubran amplios rangos de características del alimento y condiciones de operación. Las Redes Neuronales Artificiales (RNA) permiten modelar sistemas complejos de un modo relativamente simple, donde las no linealidades del sistema se resuelven por el entrenamiento de la red. Pueden ser utilizadas para estimar tiempos de proceso sin necesidad de un modelo matemático o ecuación de predicción asociados al problema físico.

La red fue entrenada partiendo de 632 valores experimentales de tiempos de congelación y descongelación para alimentos y sustancias de prueba y se realizó el proceso de validación respectivo. Los resultados predichos por la red se contrastaron contra los provistos por un método numérico, un método de predicción aproximado y resultados experimentales. Se obtuvo una muy buena precisión, con errores absolutos del mismo orden que aquellos de los mejores métodos de predicción numéricos o simplificados.

Palabras clave: tiempo de congelación; tiempo de descongelación; predicción; red neuronal; método numérico; fórmula aproximada

ABSTRACT

Freezing and thawing of foods are highly nonlinear processes. Their modelling and simulation is very complex. It is difficult to develop simple and accurate methods for the prediction of process times, valid over a wide range of food characteristics and process conditions. Artificial neural networks (ANN) allow to model complex systems in a relatively simple manner, in which system nonlinearities are dealt by means of the learning and

training of the network. ANN may be used to estimate process times without the need of a mathematical model or a prediction equation associated to the physical problem.

The net was trained using 632 experimental values of freezing and thawing times of foods and test substances, and the validation process was performed. Results provided by the net were compared against those of a numeric model, an approximate prediction equation and to experimental data. The average absolute error for the network was of the same order than that of the best numeric or approximate prediction methods.

Keywords: freezing time; thawing time; prediction; neural network; numeric method; approximate formula

INTRODUCCIÓN

El modelado del proceso de la transferencia de calor, tanto en la congelación como en la descongelación de alimentos, lleva a balances de energía fuertemente no lineales debido a la rápida variación de las propiedades térmicas (capacidad calorífica **C_p**, conductividad térmica **k** y densidad **ρ**) con la temperatura:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial k}{\partial x} \frac{\partial T}{\partial x} + k \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + G I \frac{k}{x} \frac{\partial T}{\partial x} \quad (1)$$

En este balance **T** es temperatura, **t** es tiempo, **x** la coordenada de posición y **GI** un índice geométrico que vale 0 para placa plana, 1 para cilindro infinito y 2 para esfera.

La solución del balance implica utilizar métodos numéricos, los que se vuelven bastante complejos en los casos de formas multidimensionales o irregulares y que -en muchos casos- son específicos para cada geometría. En este trabajo se utilizó un desarrollo previo, consistente en un método de diferencias finitas explícitas, ampliamente validado contra datos experimentales y teóricos¹.

Otra opción que se ha verificado como muy simple y precisa es usar ecuaciones aproximadas específicas para formas regulares simples (placa plana, cilindro y esfera) y generalizarlas por el uso de factores de forma para geometrías multidimensionales regulares o irregulares. Si llamamos **t_{reg}** al tiempo de congelación o descongelación de la forma regular simple, **t_{mul}** al de la forma multidimensional y **E_{mul}** al factor de forma específico de ese alimento multidimensional tenemos:

$$t_{mul} = \frac{t_{reg}}{E_{mul}} \quad (2)$$

Como fórmulas de referencia (**t_{reg}**) usaremos las desarrolladas previamente por los autores^{2,3}. Para los tiempos de congelación **t_f** y de descongelación **t_d**:

$$t_f = \left[\frac{L_D^2}{\alpha_0} (aT_c + b) \left(\frac{1}{Bi} + C \right) (1 + Ti)^n (-1 - Ta)^{-m} \right] \quad (3)$$

$$t_d = \left[\frac{L_D^2}{\alpha_0} (aT_c + b) \left(\frac{1}{Bi} + C \right) (-1 - Ti)^n (1 + Ta)^{-m} \right] \quad (4)$$

con L_D : espesor; α_0 : la difusividad térmica sin congelar; Bi : el número de Biot; T_c , T_i y T_a : las temperaturas final e inicial del alimento y del refrigerante o calefaccionante, respectivamente. Las constantes son dadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Constantes para las ecuaciones aproximadas de predicción de t_f y t_d

Geometría	t_f / t_d	a	b	c	m	n
Placa Plana	t_f	- 1,272	65,489	0,184	1,070	0,096
Cilindro ∞	t_f	- 0,750	32,198	0,179	1,032	0,037
Esfera	t_f	- 0,439	24,804	0,167	1,078	0,073
Placa Plana	t_d	0,321	23,637	0,435	0,763	0,099
Cilindro ∞	t_d	0,109	12,572	0,428	0,707	0,032
Esfera	t_d	0,039	8,120	0,408	0,671	0,027

REDES NEURONALES ARTIFICIALES. El interés primordial de este trabajo es validar un método de cálculo alternativo, el método de las Redes Neuronales Artificiales (RNA), que no tiene las complicaciones del desarrollo de los anteriormente citados.

Las RNA permiten modelar sistemas complejos de una manera relativamente simple, donde las no linealidades intrínsecas del sistema son absorbidas mediante técnicas de aprendizaje y entrenamiento de la red. De esta forma pueden ser utilizadas con fines de estimación o predicción sin la necesidad de contar con un modelo matemático asociado al problema físico⁴. El progreso de la neurobiología permitió construir modelos matemáticos de neuronas para simular la conducta neuronal. Estas simulaciones se extendieron al modelado dinámico y su avance se logró por el desarrollo del concepto del método de identificación **perceptrón**⁵. De allí el nombre de Redes Neuronales Artificiales aplicado a estos métodos. El interés en estos modelos se basa en que es posible trabajar sin realizar ninguna suposición sobre los mecanismos del proceso y en la capacidad para manejar sistemas no lineales y para establecer relaciones entre las distintas variables del sistema en estudio⁶. Para procesos en tecnología de alimentos las redes neuronales comienzan a utilizarse en 1992⁷ y su uso se expande constantemente.

Topológicamente, una red neuronal es una estructura de nodos interconectados

organizada en capas y balanceada a través de factores de peso; la salida de cada nodo alimenta a todos los nodos de la capa siguiente. El factor final que gobierna la salida de un nodo es la función de transferencia. En una primera instancia, la red aprende de un conjunto de datos definidos de entrada y salida, para luego aplicar a nuevos patrones de entrada y predecir el comportamiento de salida. La forma más común de aprendizaje consiste en la corrección de errores a través de una técnica conocida como “**backpropagation**” que requiere de una red neuronal **perceptrón**, definida como una red con conexiones denominadas feedforward interlayer. Es decir, es una estructura jerárquica que consiste en varias capas de neuronas totalmente interconectadas, que admiten como entradas las salidas de los elementos de proceso (neuronas o nodos) de la capa anterior. En la **red perceptrón multicapa** se distinguen tres tipos de capas:

1) Capa de entrada. Está formada por **n** unidades que envían las señales de entrada a la capa siguiente (esas **n** unidades son los datos de entrada).

2) Capas ocultas. Están formadas por neuronas sin contacto físico con el exterior.

3) Capa de salida. Está formada por **m** neuronas cuyas salidas constituyen el vector de salidas externas del perceptrón multicapa (esas **m** neuronas son los datos de salida, en nuestro caso, los valores calculados de tiempo de proceso).

En un trabajo previo de los autores⁸ se desarrolló la red perceptrón que se utilizará en este trabajo, la que fue optimizada utilizando **algoritmos genéticos**. Sus principales características son:

- a) una **capa de entrada** con funciones de transferencia tangente hiperbólicas,
- b) una **capa oculta** con funciones sigmoideas, otras dos **capas ocultas** con funciones de transferencia lineales,
- c) una **capa de salida** con funciones de transferencia también lineales.

El **número de neuronas** por capa fue: **8-9-7-8-1**.

La **tasa de aprendizaje** fue **0.36**,

El **coeficiente de momento** fue **0.55**.

Se puede obtener mayor información sobre el desarrollo y validación de la red en la publicación citada⁸.

VALORES EXPERIMENTALES DE TIEMPOS DE DESCONGELACION Y DE CONGELACION DE ALIMENTOS. Tanto para entrenar la RNA al desarrollarla como para validar los distintos métodos de predicción se necesita de un conjunto amplio de datos experimentales. En este trabajo se utilizaron en total **425** tiempos experimentales de congelación (214 de placa plana, 35 de cilindro infinito, 114 de esfera y 62 multidimensionales) y **207** tiempos experimentales de descongelación (104 de placa

plana, 55 de cilindro infinito y 48 de esfera)^{3,9,10}. Estos datos cubren un muy amplio rango de condiciones de operación (T_a , T_i , T_c , Bi), tamaño de productos y tipo de alimentos (frutas, distintas carnes enteras o picadas, pescados, puré de papas y sustancias de prueba), lo que da amplia validez a los métodos comparados.

PROCEDIMIENTO DE CALCULO

En una primera etapa⁸, la red se entrenó y validó contra el conjunto total de datos y contra cada grupo individual de alimentos (separados por proceso y forma del alimento), para determinar si existían diferencias en la precisión obtenida con las redes entrenadas con distintos juegos de datos (conjunto total o subconjuntos específicos).

Validada la red se utilizaron, a los fines de comparar la precisión de los distintos métodos de predicción de tiempos de proceso, los mismos juegos de datos experimentales empleando el método numérico, ecuación aproximada y la RNA.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la validación de la red, cuando se utilizó el conjunto completo de datos experimentales de tiempos de congelación, se obtuvo un error promedio en los valores predichos por la RNA del 10.4% (Figura 1).

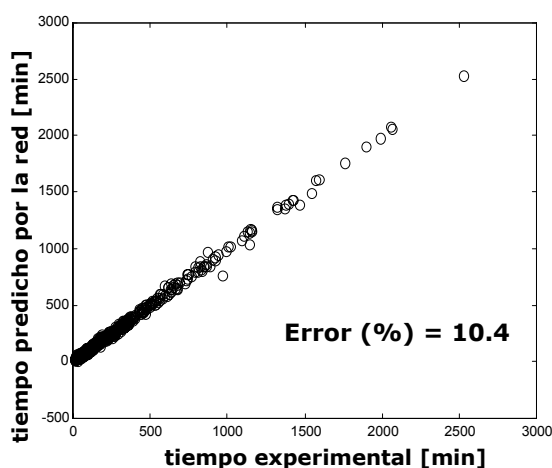


Figura 1. t_f predichos con red optimizada vs todos los valores experimentales

Al realizarse el entrenamiento y validación contra cada grupo individual de alimentos (separados por proceso y forma del alimento), los errores disminuyeron porque se estaba trabajando sobre grupos específicos de características más homogéneas. Los valores obtenidos para estos casos están dados en la Tabla 2.

Tabla 2. Errores promedio de t_f y de t_d predichos por la red neuronal

Proceso y geometría	Error porcentual promedio
Congelación placa	3,98
Congelación cilindro	1,06
Congelación esfera	3,07
Congelación multidimensional	2,13
Descongelación placa	4,30
Descongelación cilindro	3,52
Descongelación esfera	3,18

En el proceso de comparación de los distintos métodos, no se pudo trabajar con el juego completo de datos porque para varios productos no se tenían los valores de propiedades necesarios para correr el método numérico. El número total de datos comparados fue de 68 para congelación y 116 para descongelación, los que se presentan en la Tabla 3 discriminados por proceso y geometría. Incluían congelación de placas de cordero y de carne vacuna y esferas de carne vacuna picada y descongelación de placas, cilindros y esferas de cordero, carne vacuna picada, bacalao, sardina, caballa y geles de agar y de metilcelulosa (tylosa).

Tabla 3. Número de datos para cada proceso y geometría utilizados en la comparación y errores promedio para cada caso

Proceso y geometría	Número de datos	Error porcentual promedio		
		RNA	Numérico	Fórmula
Congelación placa	20	0.71	-1.00	1.45
Congelación esfera	48	1.36	-0.91	1.64
Descongelación placa	35	0.89	0.36	2.08
Descongelación cilindro	44	0.64	-2.20	2.27
Descongelación esfera	37	2.54	-0.90	1.05

Como puede observarse de los datos de la Tabla 3, ampliados en las Figuras 2, 3 y 4 para congelación de placas y esferas y descongelación de placas, los tres métodos tienen muy buena precisión, escasa dispersión y ningún sesgo. Los errores promedio para cada proceso y geometría en ningún caso superan el 2,54%.

Como **Conclusión General** puede afirmarse que los tres métodos comparados tienen una precisión equivalente para la predicción de tiempos de congelación y descongelación y que el método de las RNA es recomendable porque no necesita de modelos o

ecuaciones de predicción y también porque utiliza un menor número de datos de propiedades, por lo que su uso es más simple.

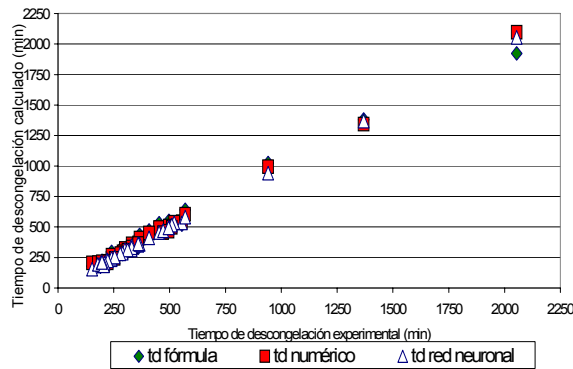


Figura 2. Comparación de los t_f predichos por los tres métodos para placa plana

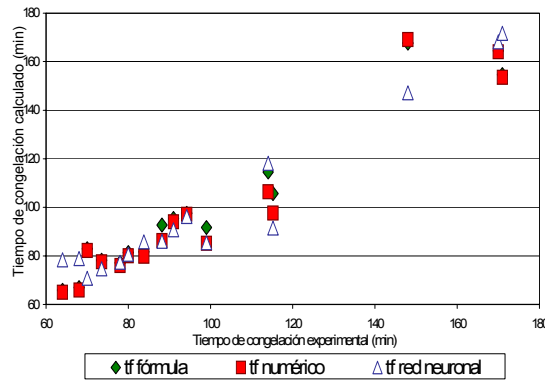


Figura 3. Comparación de los t_f predichos por los tres métodos para esfera

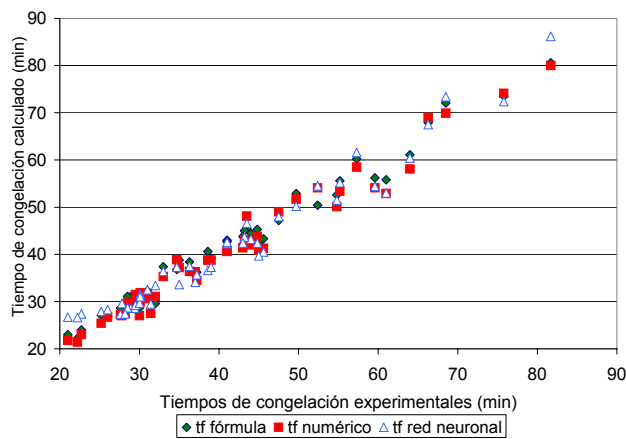


Figura 4. Comparación de los t_d predichos por los tres métodos para placa plana

BIBLIOGRAFÍA

Mascheroni, R.H.; Calvelo, A. (1978). Meat Science 4, 267.

Salvadori, V.O.; Mascheroni, R.H. (1991). Journal of Food Engineering, 13, 67-78.

Salvadori, V.O. (1994). Transferencia de calor durante la congelación, el almacenamiento y la descongelación de alimentos, Tesis de Doctor en Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Ramesh, M.N.; Kumar M.A.; Rao P.N.S. (1996). Journal of Food Process Engineering, 19, 321-329.

Rumelhart, D.; Zipner, D. (1985). Cognitive Science, 9, 75-112.

Bishop, C. M. (1994). Reviews on Scientific Instrumentation, 65, 1803 –1832.

Linko, P.; Zhu, Y.-H. (1992). Progress in Biochemistry, 27, 275–283.

Oddone, S.; Segura, J. A.; Salvadori, V.O.; Mascheroni, R. H. (2005). MEMORIAS Congreso Latinoamericano Ingeniería y Ciencias Aplicadas Clicap, 213-221.

Salvadori, V.O.; Mascheroni, R.H.; De Michelis, A. (1996). International Journal of Refrigeration 19, 87-94.

Salvadori, V.O.; De Michelis, A.; Mascheroni, R.H. (1997). Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 30, 30-35.

COMPARISON OF THIN LAYER EQUATIONS FOR DRYING OF AMARANTH SEEDS

ABALONE¹ Rita; CASSINERA² Armando; GASTÓN³ Analía; LARA⁴ Miguel A.

(¹) FCEIA. IFIR. rabalone@fceia.unr.edu.ar. (²) IFIR. (³) CIUNR. FCEIA. (⁴) FCA. IFIR. FCEIA. UNR. Av. Pellegrini 250. (2000) Rosario. Argentina

RESUMEN

En este trabajo se emplearon los modelos de Lewis, Henderson y Pabis, Thompson y Page para describir el secado de amaranto (*Amaranthus cruentus*), en el rango de temperatura 30-60C y de humedad relativa 0.30-0.60 dec del aire de secado, para contenidos de humedad inicial de grano de 0.15 a 0.32 d.b. La comparación del coeficiente de determinación R^2 , del error standard de la estimación SEE , de la desviación relativa media MRD , y de las gráficas de residuos mostró que el modelo de Page es el más adecuado para ajustar los datos experimentales. Se correlacionaron los parámetros k_p y n con la temperatura, humedad relativa y contenido de humedad inicial aplicando tres dependencias funcionales: polinómica, Arrhenius y potencia. El mejor ajuste de los datos experimentales se obtuvo con la correlación polinómica. Para propósitos prácticos, las otras correlaciones más simples pueden aplicarse para predecir las curvas de secado con similar precisión.

ABSTRACT

In this work the suitability of Lewis, Henderson and Pabis, Thompson and Page models to describe drying characteristics of amaranth (*Amaranthus cruentus*) was studied, in the temperature range of 30-60C, relative humidity range of 0.30-0.60 dec and initial grain moistures contents range of 0.15-0.32 d.b. Comparison of the coefficient of determination R^2 , the standard error of the estimate SEE , the mean relative deviation MRD , and plot of residuals showed that Page model is the most adequate to fit the experimental data. Parameters k_p and n were correlated with drying air temperature, relative humidity and initial moisture content applying three functional dependencies: polynomial, Arrhenius and Power type relationships. The best fitting to the experimental data was obtained with the polynomial correlation. For practical purposes, the other simpler correlations can be applied to predict the drying curves with similar accuracy.

Key words: amaranth, drying, thin layer.

INTRODUCTION

Amaranth has been rediscovered as a useful and promising plant, mainly because it looks like an interesting alternative to alleviate the increasing need for food. The grains are considered as pseudocereal and among the principal attributes recognized to describe this plant as a new crop are: high protein content (13-19%), high level of essential amino acid lysine, high oil content than other grains, suitability to growth in adverse environmental conditions, etc. (Paredes-López, 1994).

Today, the cultivation is developing in India, in China, and in United States, besides taking place in American countries as Mexico, Peru or Bolivia. In Argentina the experience with this pseudo-cereal is reduced to small fields, with a potential semiarid area of about 50 millions of hectares suitable for its growing (Covas, 1994).

Proper post harvest handling is critical for producing high quality grain. Amaranth grain will mold quickly and become unfit for human consumption if stored with a moisture content that is too high, so it is necessary to reduce the moisture level to 10-12% for storage (Weber, 1987). Small quantities of grain are usually dried by moving ambient air over a pile. If amaranth grain production is to compete economically with other crops an artificial drying system for amaranth yet has to be developed.

Tosi & Ré, (1999); Calzeta Resio *et al.*, (1999, 2003, 2004); Lema *et al.*, (2001); Vizcarra Mendoza *et al.*, (2003); Pagano & Mascheroni, (2003, 2005); Abalone *et al.*, (2004a; 2004b), reported values of relevant parameters for the simulation of the drying process of amaranth seeds.

The objectives of this work were to test the suitability of four thin layer models available in literature (Jayas *et al.*, 1991) to describe drying characteristics of amaranth. The effect of drying air temperature, relative humidity and moisture content on drying parameters was evaluated.

2. Selected thin layer equations from literature

The Lewis model, widely applied to predict drying data of cereal and food products, assumes that the internal resistance to moisture movement is negligible, resulting in the simple lumped equation.

$$MR = \left(\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} \right) = \exp(-k_L t) \quad (1)$$

where MR is the moisture ratio, dimensionless; W is moisture content and W_0 is initial moisture content, both in d.b. and k_L is a drying parameter, in h^{-1} .

The Page model is a modified empirical solution of Lewis model:

$$MR = \left(\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} \right) = \exp(-k_P t^n) \quad (2)$$

where a new empirical drying constant n , dimensionless, is introduced to improve model prediction in addition to the drying parameter k_P in h^{-1} .

A different modified drying equation (Henderson and Pabis model) is obtained from equation (1) by adding another constant in the form:

$$MR = \left(\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} \right) = A_1 \exp(-A_2 t) \quad (3)$$

with A_1 , dimensionless, and A_2 in h^{-1} .

Finally, the empirical Thompson equation is considered, where A_3 and A_4 are both in h:

$$t = A_3 \ln(MR) + A_4 (\ln(MR))^2 \quad (4)$$

MATERIALS AND METHODS

Amaranth seed (*Amaranthus cruentus*) were used in the tests. Grains were hand-cleaned to remove any foreign material before being stored in plastic bags.

The seeds were divided into lots and conditioned to obtain five average moisture contents of 0.15, 0.20, 0.25 and 0.32 d.b. The moisture content was determined using the ASAE standard method (ASAE 1984).

Thin layer tests were carried out at four levels of air temperature (30, 40, 50 and 60C) and of relative humidity (0.30, 0.40, 0.50 and 0.60 dec). Three replications for each drying condition were conducted and average drying curves were obtained (Abalone, *et al.* 2004b). The equilibrium moisture content was determined for each drying condition.

RESULTS AND DISCUSSION

The four thin layer models expressed by Eqns (1), (2), (3) and (4) were applied to describe the drying of amaranth and fitted to the experimental drying data.

Analysis of variance (ANOVA) was applied to study the influence of process variables (temperature, relative humidity and initial moisture content) on the drying parameter k_L in Eqn (1), k_P and n in Eqn (2), A_1 and A_2 in Eqn (3), A_3 and A_4 in Eqn (4). The stepwise multiple linear regression technique was used to develop relationships between the parameters of each model and the drying conditions, giving the polynomial expressions listed below with a statistically significance level of 5%.

For Lewis model:

$$k_L = 26.62 - 0.32T + 7.02 \times 10^{-4} T^2 + 69.31W_0 - 43.55W_0^2 + 25.13\varphi - 8.53\varphi^2 - 0.047T\varphi - 0.13TW_0 - 12.57W_0\varphi \quad (5)$$

with a standard error of 0.1298 and a coefficient of determination R^2 of 0.984.

For Page model:

$$k_P = 91.154 - 0.624T + 1.04 \times 10^{-3} T^2 - 24.85W_0 - 13.02W_0^2 - 8.07\varphi^2 + 0.124TW_0 + 0.029T\varphi - 6.56W_0\varphi \quad (6)$$

$$n = 0.95 - 9.28W_0 + 5.74W_0^2 + 0.0217TW_0 + 1.70W_0\varphi \quad (7)$$

with a standard errors of 0.15 and 0.029, R^2 of 0.98 and 0.93, respectively.

For Henderson and Pabis model:

$$A_1 = -2.14 + 0.018T - 2.45 \times 10^{-5} T^2 + 3.42W_0^2 + 0.098\varphi - 5.89 \times 10^{-3} TW_0 \quad (8)$$

$$A_2 = 61.14 - 4.12W_0 - 0.45T + 8.28 \times 10^{-4} T^2 \quad (9)$$

with a standard errors of 0.0096 and 0.198, R^2 of 0.896 and 0.96, respectively

For Thompson model:

$$A_3 = -18.91 + 0.12T - 1.87 \times 10^{-4} T^2 - 16.31W_0 - 8.45W_0^2 - 0.31\varphi - 0.062TW_0 \quad (10)$$

$$A_4 = 75.29 - 0.49T + 7.78 \times 10^{-4} T^2 + 41.83W_0 - 10.35W_0^2 - 0.53\varphi - 0.11TW_0 \quad (11)$$

with a standard errors of 0.044 and 0.084, R^2 of 0.934 and 0.905, respectively.

Using the parameters estimated with Eqns (5) to (11) moisture ratio MR was calculated with Eqns (1) to (4) and the predicted values and experimental data were compared for each drying test.

To assess the adequacy of each model, the coefficient of determination R^2 , the standard error of the estimate SEE , the mean relative deviation MRD and plots of residuals were compared (Chen & Jayas, 1998). Table 1 shows averaged values of R^2 , SEE and MRD , over all the drying conditions. In case of Thompson model, although good individual fitting was obtained with values of R^2 greater than 0.99, when the correlated parameters (Eqn. (10) and (11)) were introduced in Eqn. (4), the model failed to reproduce satisfactorily the moisture ratio evolution for the whole set of drying conditions. Other functional dependency with temperature, initial moisture content and relative humidity were tested but it was not possible to find better correlations than Eqn (10) and Eqn (11).

Typical plots of residuals of individual tests are depicted in *Fig.1*. Lewis, Henderson and Pabis and Thompson models exhibit clear pattern plots while Page model residuals tend to a uniform distribution.

Based on the previous analysis, it can be concluded that Page model is the most adequate

to fit the experimental data on amaranth. In this case, other functional dependency with process variables were also tested to correlate the parameters k_p and n .

An Arrhenius type relationship gave:

$$\ln(k_p) = 14.76077 + 0.68596 \ln(W_0) + 0.13387 \ln(\varphi) + \frac{-4129.00601}{T} \quad (12)$$

$$\ln(n) = 2.14382 + 0.25744 \ln(W_0) + 0.18117 \ln(\varphi) + \frac{-544.34414}{T} \quad (13)$$

with R^2 of 0.95863 and 0.86524, respectively.

For a Power type equation, the following correlation was obtained:

$$\ln(k_p) = -73.08578 + 0.6859 \ln(W_0) + 0.13387 \ln(\varphi) + 12.99088 \ln(T) \quad (14)$$

$$\ln(n) = -9.42715 + 0.25743 \ln(W_0) + 0.18117 \ln(\varphi) + 1.71087 \ln(T) \quad (15)$$

with R^2 of 0.95753 and 0.86423, respectively.

In order to compare the accuracy of the derived correlations within Page model, the coefficient of determination R^2 , the standard error of the estimate SEE , the mean relative deviation MRD obtained when Eqns. (12) to (15) are introduced in Eq.(4) were also included in Table 1.

Table 1 Thin layer drying models fitting criteria

Model	R^2	SEE	$MRD\%$
Lewis	0.97241	0.03193	6.242
Henderson-Pabis	0.86907	0.07433	14.955
Thompson	0.24603	0.23498	28.785
Page, polinomial type	0.99224	0.01948	3.693
Page, Arrhenius type	0.98467	0.02742	5.053
Page, Power type	0.98459	0.02746	5.07

Figure 2 shows measured and predicted values applying the three types of relationships derived for Page model. The suitability of Eqns (2), (6) and (7) in characterizing the thin layer drying behavior of amaranth is also illustrated in Fig. 3, where a different set of experimental data, not used in the estimation of the drying parameters, is plotted against predicted values, in the temperature range of 30-60C, initial moisture content range of 0.19-0.39 d.b., and 0.40 dec relative humidity.

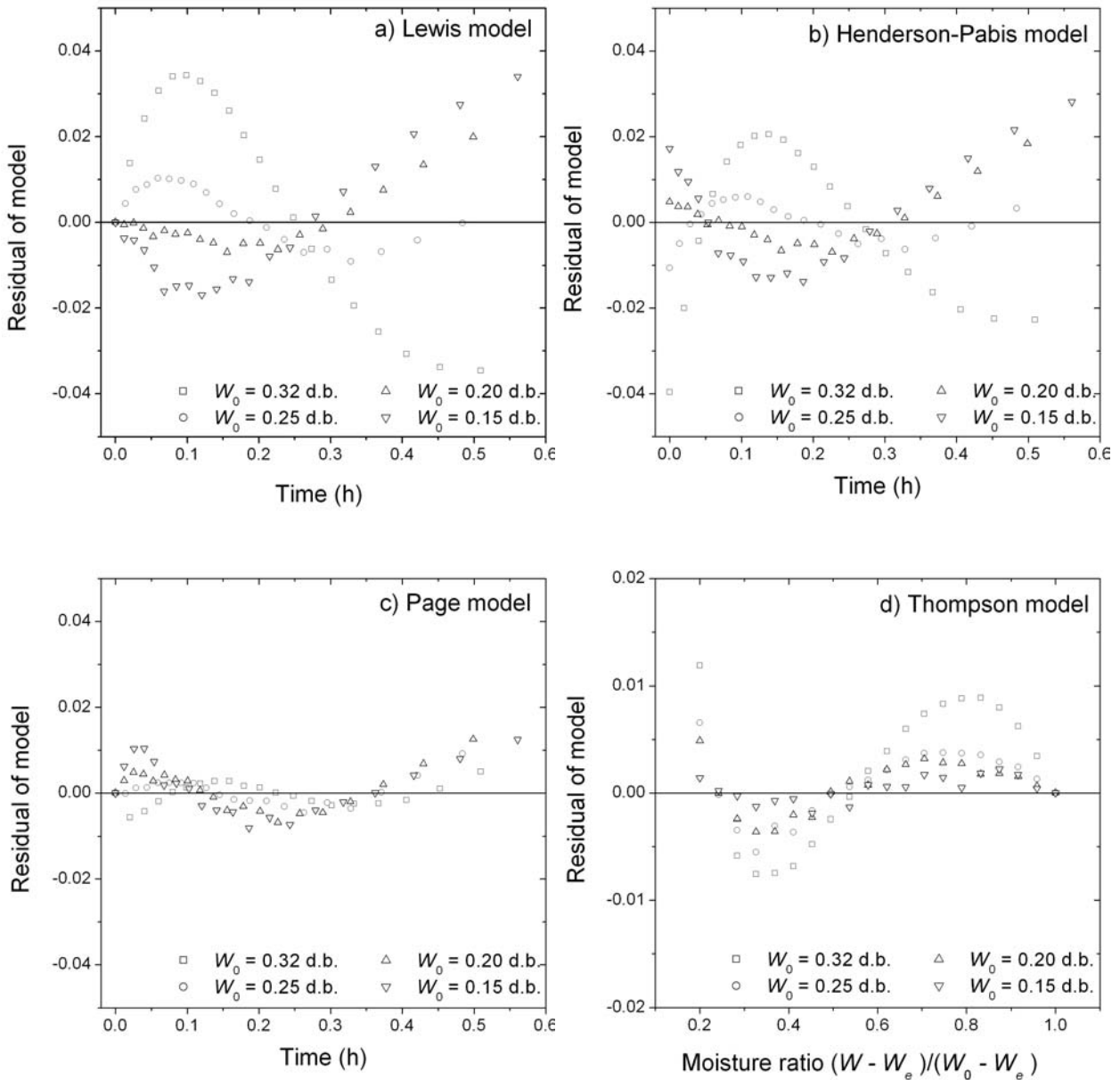


Fig. 1. Plot of moisture ratio residuals vs time for thin layer models. Experimental data at air temperature of 60C and relative humidity of 0.60 dec; a) Lewis model; b) Henderson and Pabis model; c)Page model; d) Thompson model

CONCLUSIONS

In this work the suitability of Lewis, Henderson and Pabis, Thompson and Page models to describe thin layer drying of amaranth (*Amaranthus cruentus*) was investigated. Comparison of the coefficient of determination R^2 , the standard error of the estimate SEE , the mean relative deviation MRD , and plot of residuals showed that Page model is the most adequate to fit the experimental data.

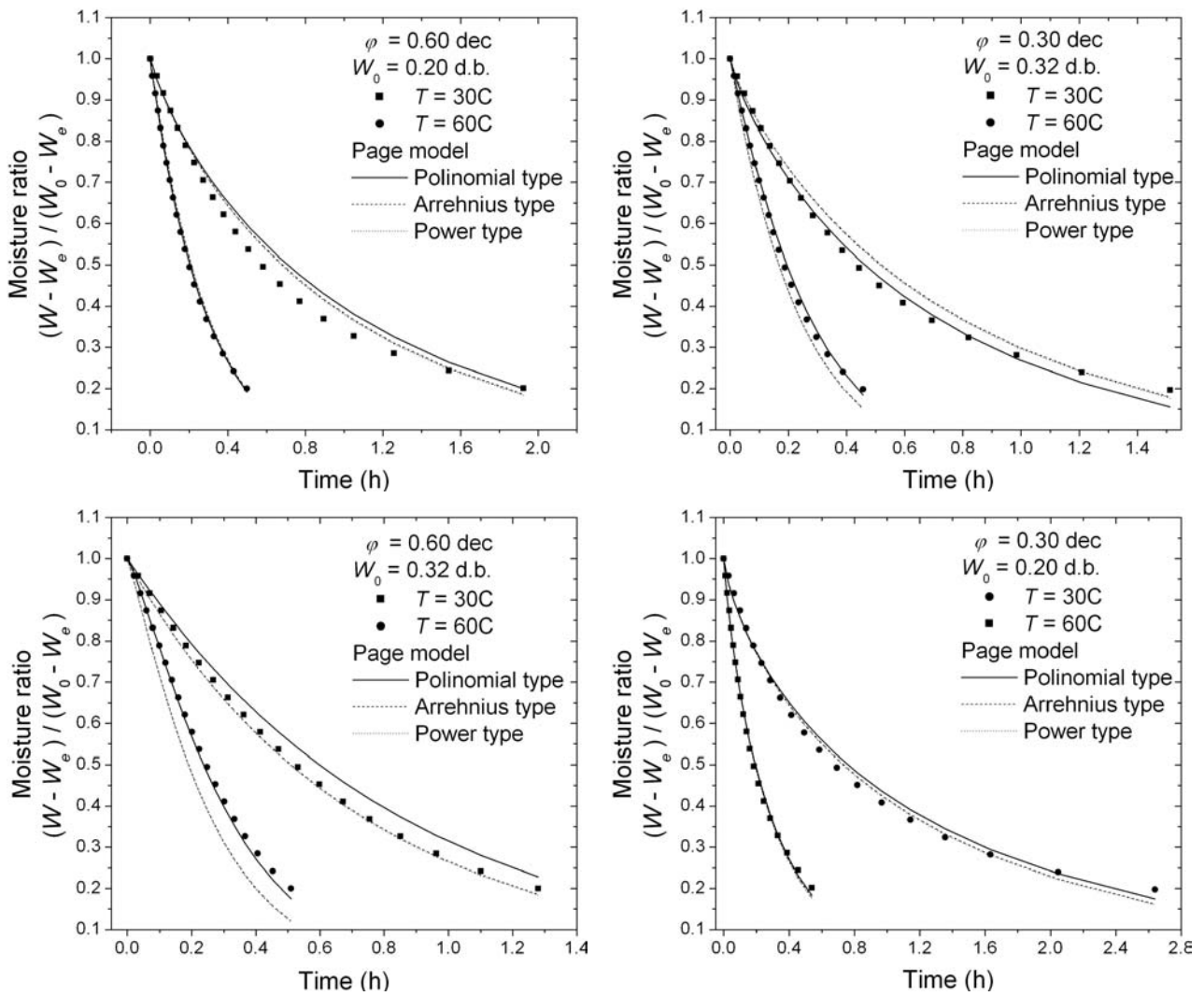


Fig.2. Comparison between experimental moisture ratio and predicted values with Page model for polynomial, Arrhenius and Power type relationships, at different drying conditions

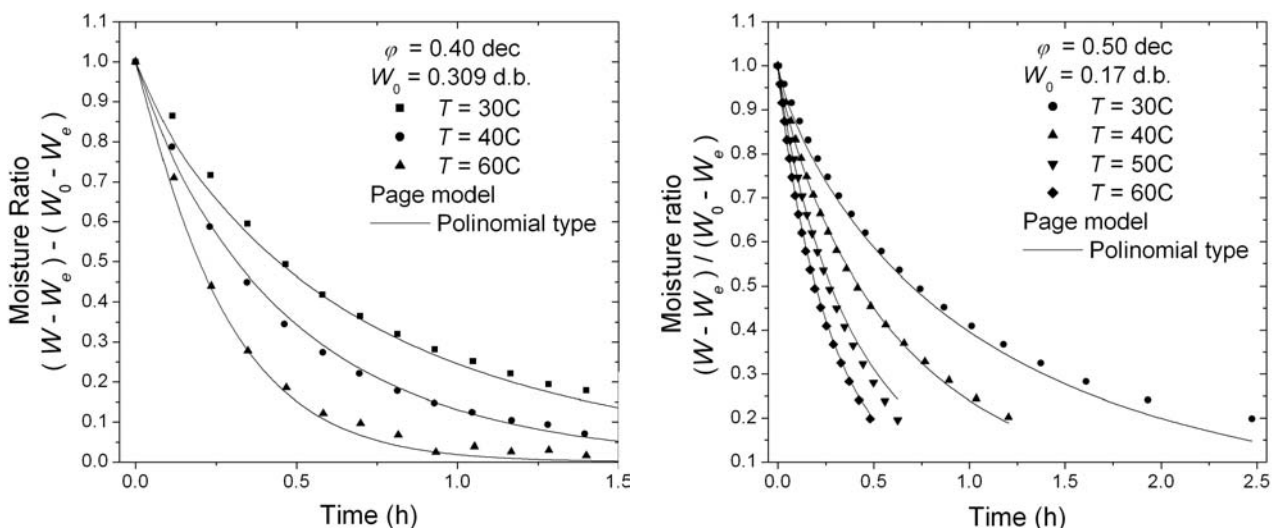


Fig. 3. Comparison between experimental moisture ratio and predicted values with Page model (Polynomial type) Set of experimental data not used in parameter estimation

Drying parameters of Page model were correlated with drying air temperature, relative humidity and initial moisture content applying three functional dependencies: polynomial, Arrhenius and Power type relationships. The best fitting to the experimental data was obtained with the polynomial correlation. For practical purposes, the other simpler correlations can be applied to predict the drying curves with similar accuracy.

BIBLIOGRAFIA

Abalone R; Cassinera A; Gastón A; Lara M A (2004a). Some physical properties of amaranth seeds. *Biosystems Engineering*, **89**(1), 109-117

Abalone R; Cassinera A; Gastón, A; Lara M A (2004b). Thin layer drying of amaranth seeds. CICyTA. 1º Edición – Córdoba: Agencia Córdoba Ciencia, ISBN 987-98379-7-5.

ASAE Standards (1984) S352.1. Moisture measurements. Grain and Seeds. Agriculture Engineer Yearbook ASAE, St Joseph, MI, USA.

Calzetta Resio A N; Aguerre R J; Suárez C (1999). Analysis of the sorptional characteristics of amaranth starch. *J. of Food Engineering*, **42**(1), 51-57

Calzetta Resio A N; Aguerre R J; Suárez C (2003). Study of some factor affecting water absorption by amaranth grain during soaking. *J. of Food Engineering*, **60**(4), 391-396

Calzetta Resio A N; Aguerre R J; Suárez C (2004). Drying characteristics of amaranth grains. *J. of Food Engineering*, **65**(2), 197-203

Covas G (1994). Perspectivas del cultivo de los amarantos en la República Argentina. [Perspectives of the cultivation of amaranths in Argentine]. INTA Estación Experimental Agropecuaria Anguil. INTA. Publicación Miscelánea 13, 1-10

Chen C; Jayas D S (1998). Evaluation of the GAB equation for the isotherms of agricultural products. *Transactions of the ASAE*, **41**(6), 1755-1760

Jayas D S; Cenkowski S; Pabis S; Muir W (1991). Review of thin layer drying and wetting equations. *Drying Technology* **9**(3), 551-588

Lema A; Palumbo D; Adaro J; Lara M (2001). Equilibrio de sorción para Amaranto. [Sorption equilibrium for Amaranth]. In *Memorias del 8º Congreso de Transferencia de Calor y Materia*. Veracruz, México. 184-189

Pagano A M; Mascheroni R H (2003). Water sorption of *Amaranthus cruentus L.* seeds modelled by GAB equation. *International J. of Food Properties* **6**(0), 1-22

Pagano A M; Mascheroni R H (2005). Sorption isotherms of Amaranthus grains. *J. of Food Engineering* **67**(4), 441–450

Paredes-López O (1994). Amaranth. Biology, chemistry and technology. CRC Press, Inc.

Tosi E; Ré E (1999). Amaranth grain drying in fluidised bed. *Drying Technology*, **17** (4&5),

909-914

Vizcarra Mendoza M G; Martínez Vera C; Caballero Domínguez F V (2003). Thermal and moisture diffusion properties of amaranth seeds. *Biosystems Engineering*, **86**(4), 441-446

Weber L E (1987). Amaranth grain production guide. Rodale Research Center. Rodale Press, Inc., PA

EFFECTO DE LA CONCENTRACION Y LA TEMPERATURA SOBRE PROPIEDADES FISICAS DE EXTRACTOS ACUOSOS DE YERBA MATE

LINARES, Andres R.; HASE Sandra, L; PAREDES Ana M.; VALDEZ Eusebia

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Felix de Azara N° 1552. Tel : 03752-422186 int 108. email: arl@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

El conocimiento de las propiedades físicas de los alimentos es fundamental para analizar las operaciones unitarias presentes en la industria. Estas propiedades fueron determinadas a concentraciones entre 24,40 % y 11,30 % y temperaturas entre 22°C y 56°C. Los datos experimentales fueron ajustados a varios modelos para describir el efecto combinado de la temperatura y el contenido de sólidos solubles. La viscosidad aparente (μ), la densidad (ρ), y el índice de refracción (IR) decrecen con el incremento de la temperatura y de la concentración de sólidos solubles.

ABSTRACT

The physical properties of food are very important to analyze the united operations that are been in the industry. This properties were determined at concentrations between 24,40% and 11,30% and temperatures between 22°C and 56°C . Experimental data were fitted to several models in order to describe the combined effect of temperature and soluble solids content. The apparent viscosity (μ), density (ρ), and refraction index (IR) decreased with an increase in temperature and soluble solids concentration.

Palabras claves: Extracto. Yerba mate. Propiedades físicas

INTRODUCCIÓN

El estudio de las propiedades físicas y sus respuestas a las condiciones de proceso son necesarias, porque influyen en el tratamiento recibido por el alimento durante el procesamiento y también porque son buenos indicadores de otras propiedades y calidades del mismo. Los fenómenos de transporte de momentum, calor y masa se podrán aplicar con eficiencia en los sistemas de alimentos, siempre que existan datos suficientes disponibles, tales como: densidad, viscosidad, Índice de refracción.

El objetivo del presente trabajo fue la determinación de estas propiedades y su comportamiento con la variación de la temperatura y de la concentración de sólidos

solubles. Los rangos de trabajo fueron: temperatura 22°C – 56°C y concentración de sólidos solubles 11,30 % – 25,40%, por ser condiciones normales de proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Muestra utilizada:

El trabajo fue realizado con muestras de yerba mate canchada, despalada, suministrada por la Cooperativa San Alberto de la Provincia de Misiones.

2.- Obtención del extracto

La obtención del extracto se realizó mediante técnicas de extracciones sucesivas: manteniendo la relación 4:1, (líquido extractor: yerba), se realizaron extracciones consecutivas. La primera extracción se realizó con 4 litros de agua y 1 kg de yerba mate. Esta suspensión bajo agitación constante, se colocó en baño maría durante 90 minutos, tiempo suficiente para alcanzar la máxima extracción de sólidos en esas condiciones. El mismo fue verificado por la determinación a diferentes tiempos del IR de la solución acuosa. El extracto (denominado primer extracto) se obtuvo mediante el prensado de la suspensión anterior. Este “primer extracto” se utilizó para extraer una nueva porción de yerba mate, siguiendo el mismo procedimiento anterior y manteniendo la misma relación 4:1. De esta manera se obtiene el segundo extracto, con una concentración de sólidos solubles (SS) mayor a la anterior.

El procedimiento se repite, para la obtención de un tercer extracto, alcanzándose así la máxima concentración de sólidos solubles que permite esta técnica, ya que una nueva extracción, no aumenta la concentración de sólidos solubles en el extracto.

3.- Determinación de las propiedades físicas.

3.1.- Determinación de la densidad

La determinación de la densidad se realizó por picnometría (Shamsudin R. et al, año). Se utilizó una balanza de analítica (precisión 10^{-4} g), para el registro de peso del agua y de los extractos. Para realizar las mediciones a distintas temperaturas, el picnómetro se sumergió en baño de agua termostatzado, por 30 minutos, previo a las pesadas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.- Determinación de la viscosidad

La determinación de la viscosidad se realizó con un viscosímetro capilar tipo Ostwald (Alvarado J. de D.et al), en el que se mide el tiempo requerido para que un volumen determinado de líquido fluya entre dos marcas por un capilar desde un reservorio. Para obtener la viscosidad en cp se multiplica el tiempo de escurrido en segundo, por la densidad relativa del líquido y por la constante del viscosímetro.

$$\eta = k * d * t$$

Para obtener las lecturas de los diferentes extractos a las diferentes temperaturas se sumergió el viscosímetro en un baño a la temperatura indicada de acuerdo al diseño. Cuando el líquido en el interior del viscosímetro alcanzaba la temperatura deseada se determinaba el tiempo de escurrido utilizando un cronómetro.

3.3.- Determinación del IR

La lectura del IR a las diferentes concentraciones, y diferentes temperaturas se realizó por Refractometría (Alvarado J. de D. et al). Las diferentes temperaturas fueron logradas, colocando el extracto en baño termostático para llevarlo a temperatura, previamente a la determinación. El refractómetro se termostató haciendo circular agua a la temperatura de la determinación. El baño utilizado regula la temperatura a $\pm 0,1$ °C . Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla N°1 se encuentran los valores de yerba mate utilizada, volumen y concentración de la solución extractante, volumen y concentración del extracto, para los extractos obtenidos en extracciones sucesivas.

Tabla 1: Valores de Yerba mate utilizada, volumen y concentración de la solución extractante, volumen y concentración de los extractos obtenidos en extracciones sucesivas

	Yerba Mate (g)	Volumen de solución (mL)	Concentración de la solución (°Brix)	Volumen del Extracto (mL)	Concentración del Extracto (°Brix)
Primer Extracto	1000	4000	0	2650	11
Segundo Extracto	663	2650	11	1830	19
Tercer Extracto	458	1830	19	1275	27

La variación del volumen del extracto y la cantidad de sólidos solubles extraídos en cada etapa de extracción, se grafica en la Figura 1. El tercer extracto tiene una concentración máxima de 25,40 g de sólidos solubles/ 100 ml de extracto. El rendimiento de la extracción de los sólidos solubles , expresado como : (g de SS que quedan en el residuo / g SS en la yerba inicial) * 100, se representa en la Figura 2.

A partir del gráfico de rendimientos, podemos ver que, con esta técnica de concentración, se pueden lograr concentraciones máximas de 25,40 % P/V de Sólidos Solubles en los

extractos, ya que los rendimientos de extracción disminuyen al aumentar el número de extracciones.

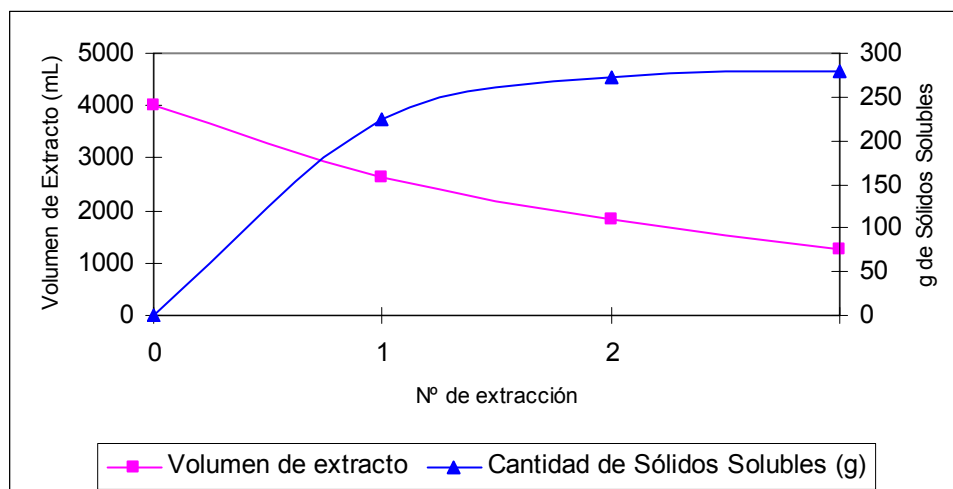


Figura 1: Variación del volumen de extracto y cantidad de sólidos solubles en los extractos obtenidos en extracciones sucesivas.

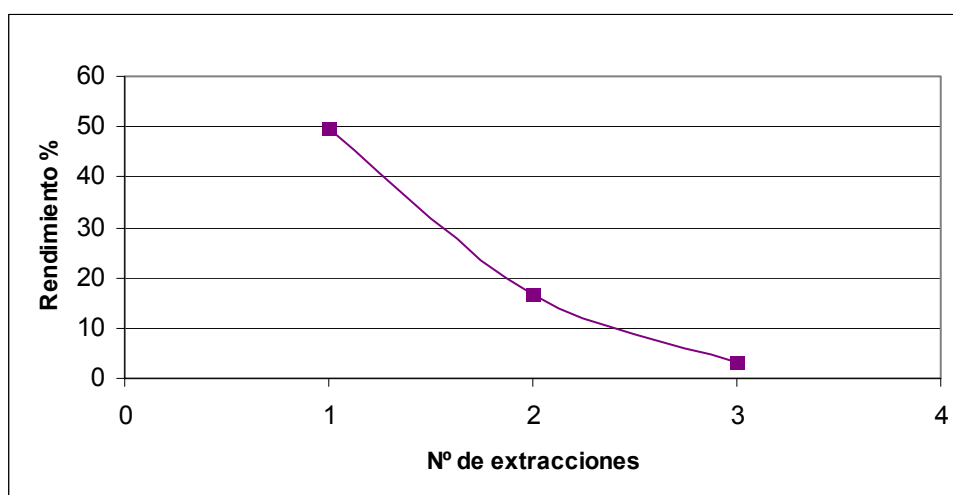


Figura 2: Rendimiento porcentual de sólidos solubles de las extracciones sucesivas.

Los resultados experimentales obtenidos para la densidad de los extractos acuosos a diferentes concentraciones de sólidos solubles y temperaturas se muestran en la Tabla 2. La figura 3 muestra la variación de la densidad con la concentración de sólidos solubles a las diferentes temperaturas.

El modelo matemático que mejor ajusta los valores experimentales obtenidos es un polinomio de tres términos donde la densidad varía linealmente con la temperatura y la concentración de sólidos solubles (Ramos A.M et al). La ecuación obtenida por el método de mínimos cuadrados, con su coeficiente de correlación, significativo para un nivel de probabilidad del 95%, es:

$$\rho = 1029.77 - 0.163096 * T + 2.54213 * C \quad (R^2 = 0.956)$$

Donde: ρ es la densidad en Kg m^{-3} , T es la temperatura de los extractos en $^{\circ}\text{C}$ y C es la concentración de sólidos solubles en $\text{g}/100 \text{ ml}$ de extracto.

La densidad aumenta con un incremento de la concentración de sólidos solubles de los extractos ($p < 0,05$) y disminuye levemente con el aumento de temperatura ($p < 0,05$), en el rango estudiado.

Los resultados experimentales obtenidos para la viscosidad de los extractos acuosos a diferentes concentraciones de sólidos solubles y temperaturas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2: Valores experimentales para la densidad de los extractos acuosos de yerba mate a diferentes concentraciones de sólidos solubles y temperatura

Concentración de Sólidos Solubles (% p/V)	11.30	18.35	23.35	25.40
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Densidad (Kg/m^3)			
22	1057.5	1075.50	1081.50	1088.00
26	1055.5	1076.00	1082.00	1089.00
36	1053.0	1073.00	1079.00	1090.00
46	1050.0	1070.00	1080.00	1090.00
56	1043.0	1067.50	1079.00	1091.00

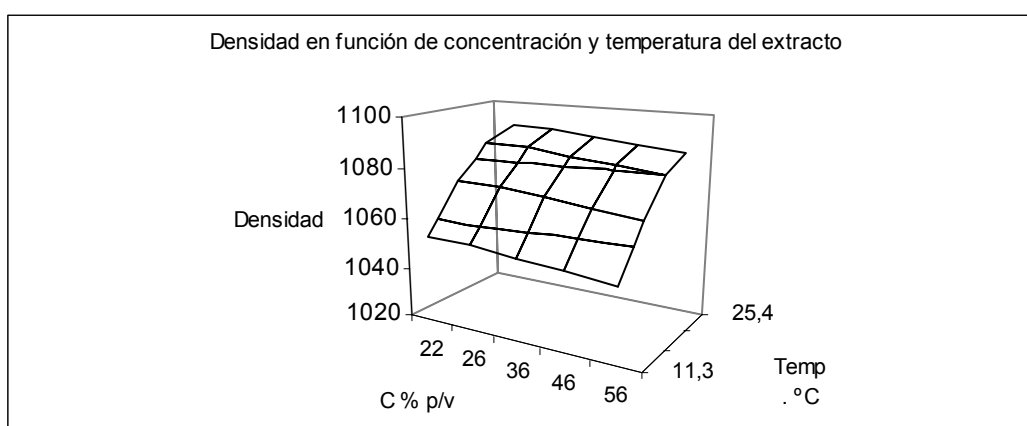


Figura 3: Efecto de la concentración de sólidos solubles sobre la densidad a diferentes temperaturas

Tabla 3: Valores experimentales para la viscosidad de los extractos acuosos de yerba mate a diferentes concentraciones de sólidos solubles y temperatura

Concentración de Sólidos Solubles (% p/V)	11.30	18.35	23.35	25.40
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Viscosidad ($\text{cp} = \text{mPa}\cdot\text{s}$)			
22	3.179	4.957	6.530	8.900
26	2.287	3.827	5.850	6.660
36	1.899	2.688	4.320	5.147
46	1.550	2.144	2.920	4.910
56	1.497	2.139	2.770	3.900

El modelo que mejor ajusta los valores experimentales (Giner J. et al), permite computar los valores de la viscosidad en función de los sólidos y la temperatura. El modelo propuesto es:

$$\eta = \eta_1 \exp (D_1 * C + E_a /RT) \quad (4)$$

Los valores experimentales de la viscosidad en función de los sólidos solubles y la temperatura fueron ajustados mediante regresión no lineal, por el método de mínimos cuadrados para obtener las estimaciones de los parámetros del modelo. El coeficiente de regresión, significativo para un nivel de probabilidad del 95%, se muestra en la ecuación. Así, para el intervalo de concentraciones y temperatura estudiadas, se propone la siguiente ecuación para evaluar la viscosidad de los extractos acuosos de yerba mate:

$$\eta = 0.308001 * \exp ((0.0773745 * C + (0.24536 / (0.008314 * T)))) \quad (R^2 = 0.966)$$

Donde: η es la viscosidad en cp, T es la temperatura de los extractos en °K y C es la concentración de sólidos solubles en g/100 ml de extracto.

La figura 4 muestra la variación de la viscosidad con la concentración de sólidos solubles a las diferentes temperaturas.

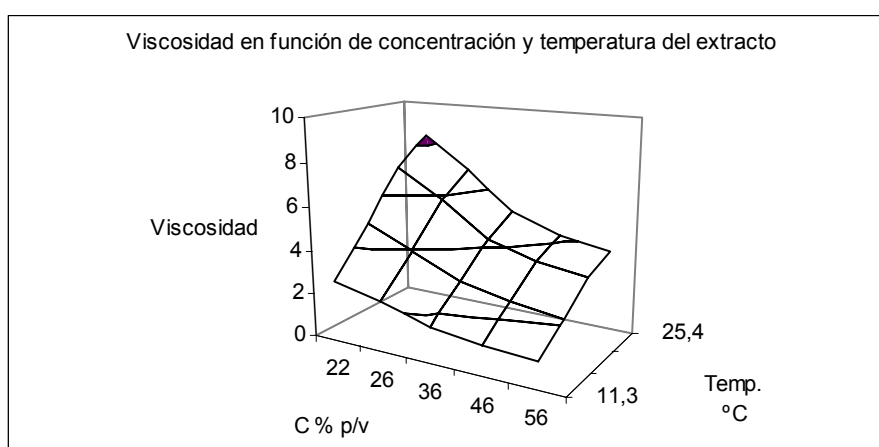


Figura 4: Efecto de la concentración de sólidos solubles sobre la viscosidad a diferentes temperaturas

La viscosidad aumenta con un incremento de la concentración de sólidos solubles de los extractos ($p < 0,05$) y disminuye levemente con el aumento de temperatura ($p < 0,05$), en el rango estudiado.

Los resultados experimentales obtenidos para el índice de refracción de los extractos acuosos a diferentes concentraciones de sólidos solubles y temperaturas se muestran en la Tabla 4. La figura 5 muestra la variación del índice de refracción con la concentración de sólidos solubles a las diferentes temperaturas.

Tabla 4: Valores experimentales para el índice de refracción de los extractos acuosos de yerba mate a diferentes concentraciones de sólidos solubles y temperatura

Concentración de Sólidos Solubles (% p/V)	11.30	18.35	23.35	25.40
Temperatura (°C)	IR			
22	1.354	1.364	1.372	1.377
26	1.354	1.363	1.362	1.375
36	1.353	1.363	1.370	1.375
46	1.351	1.361	1.370	1.374
56	1.350	1.361	1.371	1.375

La relación puede ser expresada como:

$$IR = 1.33674 + 0.00159616 * C - 0.0000758747 * T \quad (R^2 = 0.99)$$

Donde: IR: Índice de Refracción; T: Temperatura (°C); C: Concentración de sólidos solubles (g/100 mL de extracto).

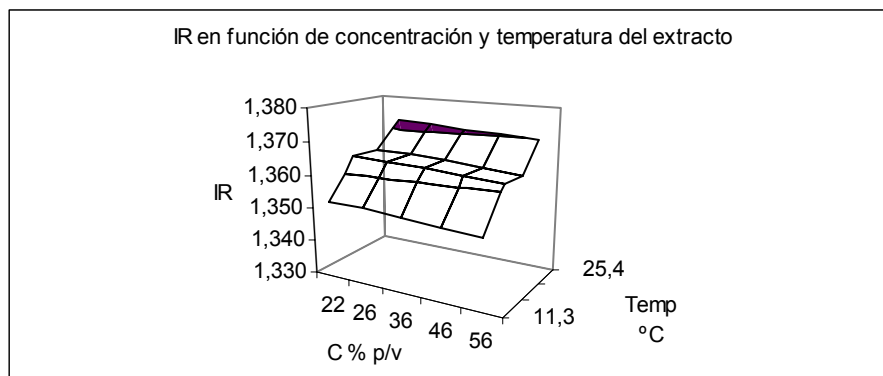


Figura 5: Efecto de la concentración de sólidos solubles sobre el índice de refracción a diferentes temperaturas

El índice de refracción aumenta con un incremento de la concentración de sólidos solubles de los extractos ($p < 0,05$) y disminuye levemente con el aumento de temperatura ($p < 0,05$), en el rango utilizado.

CONCLUSIONES

Los rendimientos de extracción disminuyen al aumentar el número de extracciones lográndose valores máximos de 25,40 % P/V de Sólidos Solubles en los extractos.

La densidad, la viscosidad y el índice de refracción aumentan con un incremento de la concentración de sólidos solubles de los extractos ($p < 0,05$) y disminuyen levemente con el aumento de temperatura ($p < 0,05$), en el rango estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

Shamsudin R., Mohamed I., Mohd Yaman N.K. (2005). Thermophysical properties of Thai seedless guava juice as affected by temperature and concentration. Journal of food Engineering 66.

Alvarado J. de D., Aguilera J. M. Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Editorial Acribia. año

Ramos A.M., Ibarz A., (1998). Density of juice and fruti puree as a function of soluble solids content and temperatura. Journal of food Engineering 35

Giner J., Ibarz A., Garza S., Xhian Quan S., (1996) Rheology of clarified cherry juices. Journal of food Engineering 30.

MODELADO DE LA COCCIÓN DE LASAGNA MEDIANTE ELEMENTOS FINITOS

OLIVERA, Daniela F.^{1,2} y SALVADORI, Viviana O.^{1,2}

¹CIDCA - Facultad de Ciencias Exactas, UNLP – CONICET. Calle 47 y 116 (B1900AJJ) La Plata – ARGENTINA. Tel./Fax: (0221) 4890741 / 4254853 / 4249287 - e-mail: vosalvad@ing.unlp.edu.ar

²MODIAL - Facultad de Ingeniería, UNLP

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue simular la cocción de lasagna en hornos convectivos. Este plato preparado está compuesto por varias capas de masa y relleno, con una cubierta superior de salsa y se dispuso en porciones individuales

Se propone un modelo matemático del sistema, que se resuelve mediante un software comercial de elementos finitos. Los valores de las propiedades termofísicas se calcularon a partir de ecuaciones de literatura y el coeficiente de transferencia calórica fue determinado experimentalmente. La malla de elementos finitos es generada en forma automática por el software. Debido a la simetría del sistema se trabajó sólo con un cuarto del mismo. Para validar los resultados numéricos, se realizaron determinaciones experimentales de historias térmicas durante la cocción de porciones individuales de lasagna. Los resultados numéricos presentaron una muy buena precisión al compararlos con los experimentales, demostrando la aptitud del software para resolver sistemas multicomponentes de geometría compleja.

Palabras clave: Cocción, Lasagna, Elementos finitos.

ABSTRACT

The objective of the present work was to simulate the cooking of lasagna in convective ovens. This ready-to-serve meal is made up of several layers of mass and filling, with a sauce upper deck and was arranged in individual portions.

A mathematical model of the system is presented, that is solved by means of commercial software of finite elements. The values of the termophysical properties were calculated from literature equations and the heat transfer coefficient was determined experimentally. The mesh of finite elements is generated in automatic mode by the software. Due to the symmetry of the system, only a quarter of it was solved. To validate the numerical results, thermal histories of lasagna cooking were measured. The numerical results showed a very

good precision when comparing them with experimental ones, demonstrating the aptitude of the software to solve multicomponent systems of complex geometry.

Keyword: Cooking, Lasagna, Finite elements.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se verifica a nivel mundial un marcado incremento en la producción de comidas precocidas. Las mismas son horneadas en equipos continuos o discontinuos y se comercializan refrigeradas o congeladas, listas para recalentar y consumir. Dentro de estos productos sabemos que los platos elaborados a base de pasta son muy populares y cuentan con un nivel de aceptación muy alto por parte de los consumidores, este hecho justifica la elección de lasagna como base para el estudio a desarrollar.

Una premisa fundamental de la etapa de cocción es que la misma debe realizarse en condiciones de mínimo abuso térmico. Para ello se debe dar especial énfasis al estudio de la transferencia de calor en el proceso que permita encontrar relaciones tiempo-temperatura que aseguren una cocción completa desde el punto de vista microbiológico, conservando las características organolépticas y nutricionales del alimento.

El modelado de la cocción se hace, en la actualidad, fundamentalmente, por medio de diferencias o elementos finitos. En este aspecto, la simulación de la transferencia de calor en bandejas de comidas preparadas tiene dos condicionantes que la dificultan fuertemente: el carácter heterogéneo y generalmente anisotrópico de los alimentos y la falta de información y dificultad en la determinación o cálculo de las propiedades físicas involucradas (Salvadori, 2003).

El objetivo presente trabajo es:

- estudiar la factibilidad de utilizar un software comercial de elementos finitos para modelar la cocción de lasagna.
- verificar los resultados numéricos con resultados experimentales propios, obtenidos en un horno eléctrico de temperatura controlada con convección forzada.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ALGOR

El modelado y simulación de la cocción de lasagna se llevó a cabo utilizando un software comercial de elementos finitos, ALGOR v. 13.36 (2003).

Este software está orientado principalmente a la simulación de eventos mecánicos, pero cuenta con módulos adicionales que permiten resolver problemas de transferencia de

calor tanto estacionaria como transiente, con la posibilidad de incorporar propiedades variables, condición indispensable para simular el sistema modelo propuesto.

El modelado y simulación se realiza cumpliendo varias etapas consecutivas:

- Preprocesamiento
- Procesamiento
- Post procesamiento

El entorno principal de ALGOR es el programa *FEMPRO*, donde al comienzo de la simulación se define el tipo de análisis a realizar. En la etapa de *Preprocesamiento* se utiliza el programa *Superdraw*, que cuenta con las herramientas necesarias para construir la geometría del modelo (menús Add, Construct y Modify) y luego generar el mallado para obtener los elementos finitos (menú Fea Mesh).

Se pueden generar modelos bidimensionales y tridimensionales, con distintos tipos de elementos (2-D, Brick, Tetrahedral, Rod Plate). El mallado puede realizarse manual o automáticamente, de acuerdo a distintas opciones estéricas (entre nodos o entre objetos). Mediante la definición de *Grupos* el usuario puede conferirle a la geometría zonas con distintas propiedades físicas o diferentes tipos de elementos.

Para asignar las condiciones de contorno se definen *Superficies* que comprenden los elementos del sistema que están en contacto con el medio externo.

En modelos complejos son útiles las *Capas*, ya que permiten con ayuda de las herramientas de visualización ocultar ciertas partes del dibujo, mejorando la perspectiva de trabajo en la construcción y optimización del modelo.

En el caso particular del sistema en estudio las características del modelo construido son las siguientes: Malla regular (Fea Mesh, 8 point), tridimensional, con elementos Brick de sección trapezoidal. La Figura 1 muestra un esquema del mismo.

Los pasos posteriores de la etapa de preprocesamiento, tales como definición de condiciones de trabajo, depuración de los errores, propiedades térmicas y las propias del modelo se realizan en *FEMPRO*, excepto el numerado de los nodos, que se realiza en el programa denominado *Superview*. Además *Superview* permite detectar errores de construcción en el modelo de elementos finitos y determinar los datos necesarios para el informe final de resultados.

La etapa de *Procesamiento* se inicia en el entorno *FEMPRO*. Consiste en la definición de los parámetros de análisis que permiten establecer, entre otros, el número de pasos, el incremento de tiempo, el tipo de condición de contorno, las curvas de carga para considerar condiciones de contorno variables en el tiempo, vincular simulaciones con corridas anteriores, especificar nodos cuyos resultados se imprimirán y el número de

pasos entre cada reformulación de la matriz de propiedades (Figura 2). Una vez asignados estos parámetros, comienza la etapa de cálculo propiamente dicha.

La ventana *Surface* permite establecer distintas condiciones de contorno, constantes o variables en el tiempo. En el sistema en estudio se consideró condición de contorno convectiva en todas las caras expuestas al ambiente, caracterizadas por un coeficiente de transferencia calórica h .

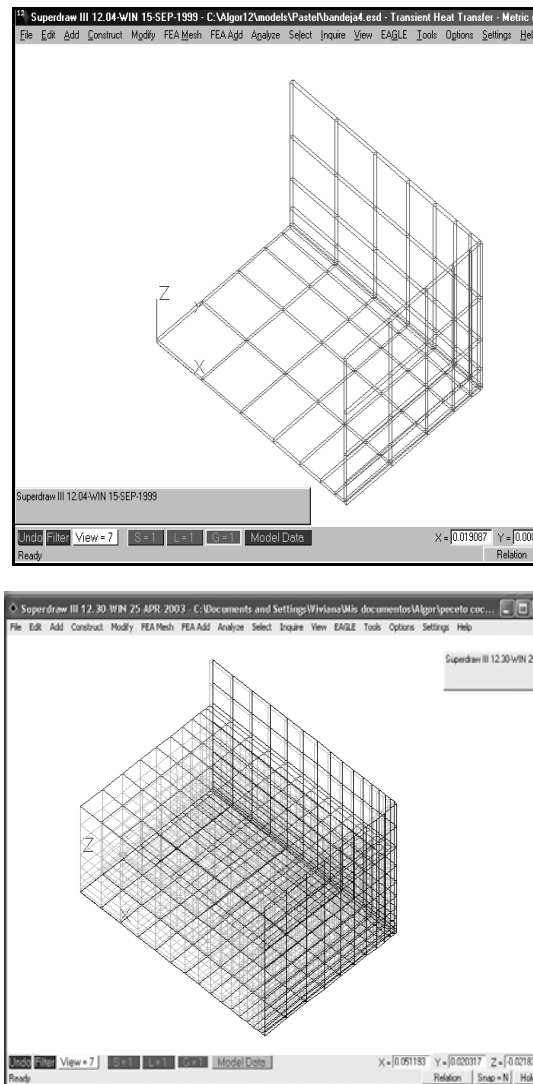


Figura 1. Esquema de la malla de elementos finitos del sistema estudiado.

La última etapa (*Postprocesamiento*) se completa en el entorno *Superview*. El mismo muestra sobre el modelo tridimensional los valores de temperatura o de flujo de calor en una escala de colores predeterminada. Otra herramienta de *FEMPRO*, *Monitor*, muestra las curvas temperatura vs. tiempo para los nodos especificados.

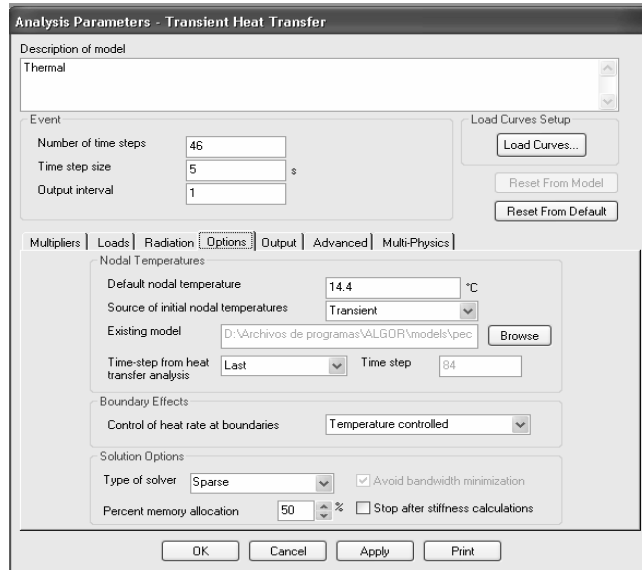


Figura 2. Pantalla de ingreso de los parámetros de análisis: números de pasos, incremento de tiempo, etc.

2.2. Propiedades físicas

El software tiene incorporada una biblioteca de propiedades físicas de distintos materiales (metales, cemento, etc.) que no incluye productos alimenticios. A través de la aplicación *Matlibs* se pueden generar bibliotecas de propiedades físicas de otros materiales isotrópicos u ortotrópicos (que incluye los dependientes de la temperatura).

En este trabajo fueron incorporadas a la biblioteca de propiedades físicas de alimentos los valores de las propiedades correspondientes a los tres grupos que componen el sistema en estudio (pasta, relleno de espinaca y salsa), los cuales se calcularon en función de la composición y temperatura de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Nicolai, 1995):

$$c_j = \sum_i x_{i,j}^m c_i \quad (1)$$

$$\rho_j = 1 / \sum_i x_{i,j}^m / \rho_i \quad (2)$$

$$k_j = \sum_i x_{i,j}^v k_i \quad (3)$$

$$x_{i,j}^v = x_{i,j}^m \rho_j / \rho_i \quad (4)$$

donde C_j , ρ_j y k_j son el calor específico, la densidad y la conductividad térmica de cada grupo (pasta, relleno de espinaca y salsa); c_i , ρ_i , k_i son el calor específico, la densidad y la conductividad térmica de cada componente (proteínas, lípidos, carbohidratos, etc.; Miles, 1983); $x_{i,j}^m$ y $x_{i,j}^v$ son la fracción másica y volumétrica del componente i en el grupo j . En la Tabla 1 se presenta la composición química de los tres grupos considerados.

Tabla 1. Composición química (kg kg^{-1} de producto) para la pasta, salsa y relleno de espinaca

Componente	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Humedad	Cenizas
Pasta	0.0584	0.0504	0.2683	0.62	0.0029
Salsa	0.0652	0.0565	0.0684	0.7867	0.0232
Espinaca	0.03	0.003	0.0382	0.9011	0.0277

La evaporación superficial se contempló a través de un calor específico aparente, que incluye el calor sensible y el calor latente:

$$c_{\text{eq},j} = c_j + \Delta H_w x_{w,j}^m / \Delta T \quad (5)$$

donde ΔH_w es el calor latente de vaporización del agua ($=2257 \text{kJ kg}^{-1}$) y $\Delta T = 5^\circ\text{C}$.

2.3. Experiencias de cocción

Con el objeto de validar los resultados obtenidos por el método numérico, se realizaron experiencias de cocción de porciones individuales de lasagna (Figura 3).

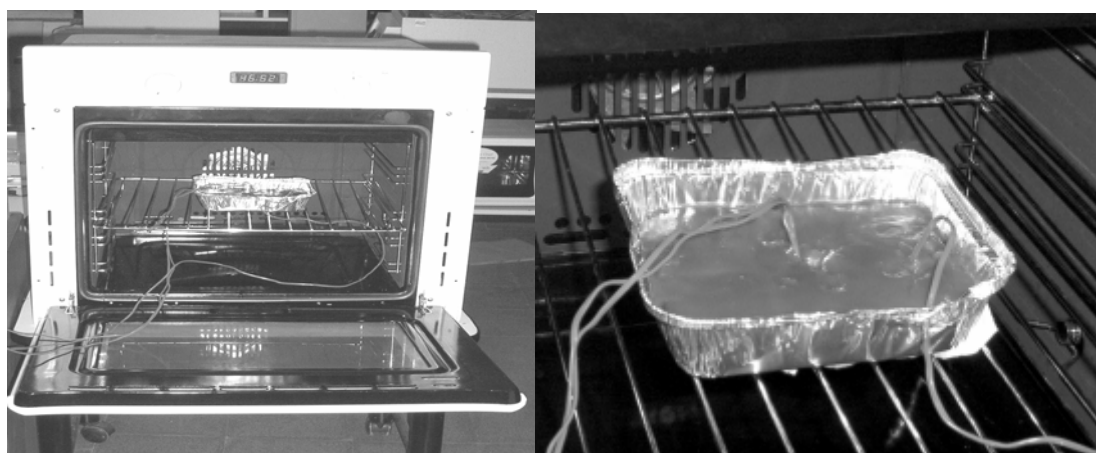


Figura 3. Fotos del ensayo de cocción de lasagna

Se utilizaron bandejas individuales de aluminio, de $0.14 \times 0.10 \times 0.045 \text{ m}$ en cuyo interior se dispuso el sistema modelo. El mismo consistía de tres capas de pasta y dos de relleno de espinaca intercaladas, cubiertas con salsa de tomate, tal como se muestra en la Figura 4.

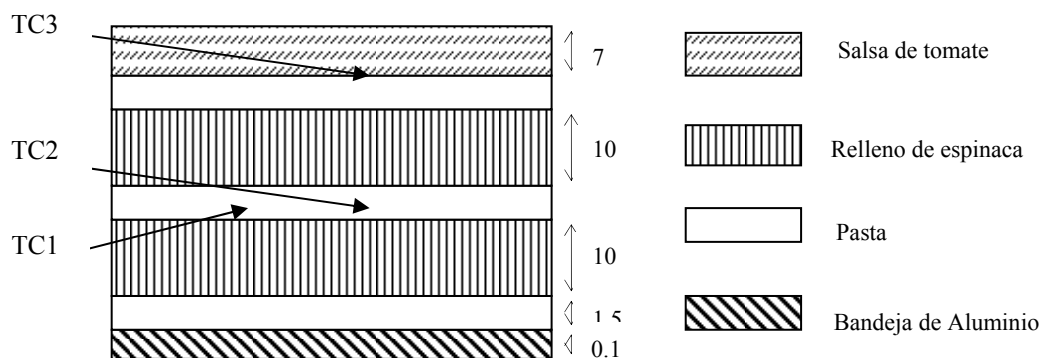


Figura 4. Esquema de la distribución de las capas de pasta y relleno de la lasagna modelo y sus dimensiones. Ubicación de las termocuplas.

La cocción se realizó en un horno eléctrico Ariston FM87. Este equipo tiene 7 modos diferentes de cocción (con y sin ventilación, con y sin grill, etc.) y muy buen control de la temperatura interna. Las muestras se procesaron en condiciones de convección forzada, fijando la temperatura del horno en 210°C. El coeficiente de transferencia de calor fue determinado mediante un sensor de flujo de calor Omega HS3, registrando un valor promedio de $40 \text{ Wm}^{-2}\text{C}^{-1}$. Se colocaron tres termocuplas tipo T en distintas posiciones del alimento para registrar la historia térmica en el interior, y una adicional para medir la temperatura del aire cerca de la muestra como se indica en la figura 4. Todas fueron conectadas a un adquirente de datos Keithley DASTC.

Las bandejas fueron colocadas sobre una rejilla ubicada en el nivel medio del horno. La cocción se consideró completa cuando el centro térmico de las mismas alcanza 72°C, de acuerdo a los criterios microbiológicos adoptados (FDA, 1997).

RESULTADOS

En la figura 5 se presentan las historias térmicas de tres posiciones del sistema estudiado: el centro térmico TC2, un punto intermedio ubicado sobre la diagonal principal TC1 y un punto intermedio entre el centro térmico y la superficie (sobre el eje vertical) TC3. En curva continua se graficaron las temperaturas experimentales y con símbolos los valores calculados numéricamente.

Los resultados presentados en esta figura indican que el modelo numérico planteado predice con buena precisión el comportamiento experimental del sistema: el error relativo porcentual promedio entre los valores de temperaturas experimentales y calculados, calculado para las tres posiciones TC1, TC2 y TC3, es de 10.58% con una desviación estándar de 9.2%.

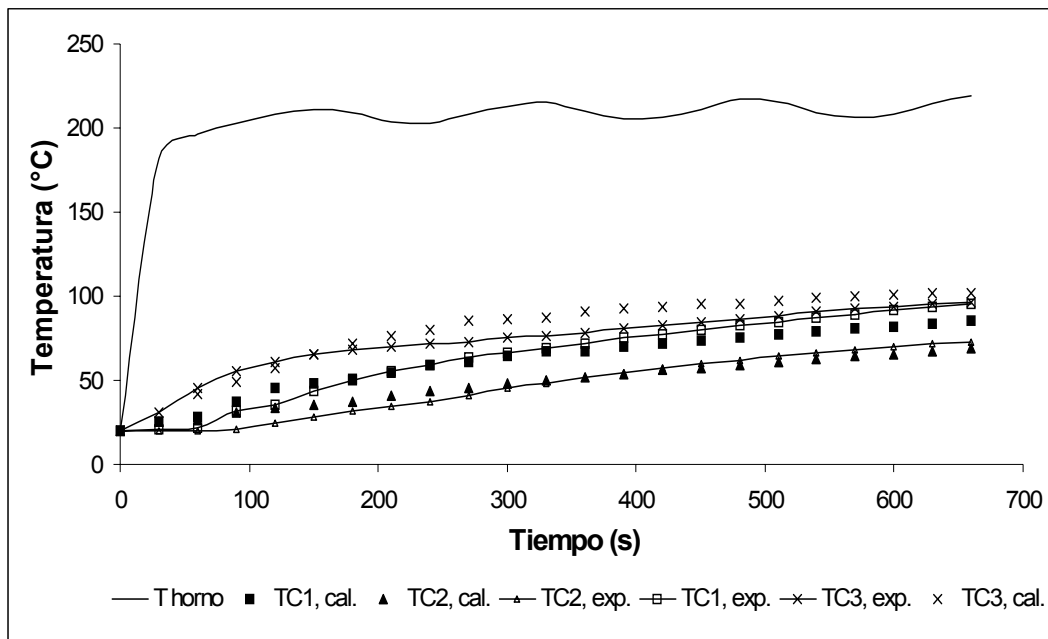


Figura 5. Historias térmicas medidas y calculadas para las diferentes ubicaciones de las termocuplas (TC).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con el software ALGOR indican que el mismo es una herramienta útil para estudiar el comportamiento transitorio de productos alimenticios de características complejas (anisotrópicos, multicomponentes y de propiedades variables), sometidos a un proceso determinado que involucre transferencia de calor como es el caso particular de la cocción.

Si bien se encontraron dificultades para considerar en forma directa la evaporación superficial debido a limitaciones propias del software (ya que no permite incluir en el modelo valores de generación interna de energía dependientes de la temperatura), la misma fue tomada en cuenta a través de la incorporación de un calor específico efectivo.

Los resultados numéricos obtenidos mostraron muy buena precisión al ser comparados con los perfiles de temperatura experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

Algor Fea software, (2003). Algor, Inc.

FDA (1997) Food Code, chapter 3, 3-401.11 <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fc-3.html>

Miles, C. A., van Beek, G., Veerkamp, C. H. 1983. Calculation of thermophysical properties of foods. Project COST 90, Physical properties of foods, Applied Science Publishers. London and New York.

Nicolaï, B., van Broek, P., Schellekens, M., de Roeck, G., Martens, T., Baerdemaeker, J. (1995). Finite element analysis of heat conduction in lasagna during thermal processing. *Int. J. Food Sci. Technol.* 30, 347-363.

Salvadori, V. O., Mascheroni, R. H. (2003). Uso de elementos finitos en la simulación de la cocción de alimentos en hornos convectivos. CIBIA IV, Chile, Trabajo M84.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con fondos provenientes de CONICET, ANPCyT (PICT 99/09-7134) y UNLP.

THIN-LAYER DRYING OF AMARANTH GRAINS

PAGANO, Ana M.¹, MASCHERONI, Rodolfo H.²

¹ Grupo Tecnología de Semillas (TECSE), Facultad de Ingeniería, UNCPBA Av. Del Valle 5737, B7400JWI Olavarría, Argentina, E-mail: apagano@fio.unicen.edu.ar ² CIDCA (UNLP-CONICET) - MODIAL (Facultad de Ingeniería, UNLP), Calle 47 y 116, (1900) La Plata, Argentina, E-mail rhasche@volta.ing.unlp.edu.ar.

RESUMEN

Se realizó la recopilación –de estudios previos y bibliográfica- de datos experimentales de secado de granos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) en capa delgada en el rango de 25-70°C de temperatura (T), 15-32.5% de humedad inicial (M_0) y velocidades de aire (V) de 0.2-3.0 m/s. Los datos (341 puntos) comprendieron valores de contenido de humedad (M) vs. tiempo (t) a diferentes condiciones. El contenido de humedad de equilibrio se estimó mediante el modelo de GAB modificado desarrollado previamente. Los datos fueron interpretados con modelos clásicos (Lewis, Page, Page modificado, Henderson-Pabis y Wang-Singh). Se compararon los ajustes de los modelos para determinar la ecuación que mejor describe los datos. Excluyendo Wang-Singh, los coeficientes de correlación de los modelos fueron adecuados ($R^2 > 0.96$), pero Page evidenció la mejor correlación con los datos ($R^2 > 0.997$) y un error estándar medio de la estimación ($S_y < 0.022$) considerablemente menor que el de los otros modelos. Consecuentemente el modelo de Page fue considerado el más apropiado para modelar el secado de granos de amaranto, mientras que el de Wang-Singh fue descartado. Se estudió estadísticamente la influencia de T, V y M_0 sobre la cinética de secado, proponiéndose una nueva expresión incluyendo estas variables en los parámetros de secado.

ABSTRACT

Compiling of experimental data for drying of amaranth grains (*Amaranthus cruentus* L.) from previous works and literature, in the ranges 25-70°C of temperature (T), 15-32.5% dry basis of initial moisture content (M_0), and 0.2-3.0 m/s of air velocity (V), was made. Data comprised values of moisture content (M) vs. time (t) at different drying conditions (341 points). A modified GAB equation previously developed was used to estimate the equilibrium moisture content. Drying data were interpreted with classical models (Lewis, Page, Modified-Page, Henderson-Pabis, Wang-Singh). Fitting of models was compared to determine the best one for describing amaranth drying. The correlation coefficients for all

the models –excluded Wang-Singh– were quite reasonable ($R^2 > 0.96$), but Page model evidenced the best correlation ($R^2 > 0.997$) and the mean standard errors of the estimation ($S_y < 0.022$) were considerably lesser than the other models. Consequently, Page model was chosen as adequate to describe the experimental data for the drying kinetics of amaranth grains, while Wang-Singh model was rejected. The influence of T , V and M_0 on drying kinetics was statistically studied, proposing a new expression, which includes the influence of these variables in the drying parameters.

INTRODUCTION

Drying is one of the most frequently used processes among the conservation methods of foods. Consequently, the study of drying process of different materials like agricultural products has been subject of interest by many years. There have been reported numerous works on drying of typical grains, but there is not available in literature an equivalent amount of information about drying of pseudo-cereals like amaranth grain.

Amaranth is an ancestral crop originated from Central America that has been recently re-discovered due its extraordinary nutritional-characteristics. In Argentina it is cultivated in the North-West regions and in the Central-South Pampas. The production is about 18-23 quintals per hectare, and exceptionally it can reach 45 quintals per hectare¹. Grains are usually harvested with high moisture contents, of about 50%¹, consequently they must be dried to warrant safe storage.

The study and modelling of thin-layer drying contribute to understanding of the heat and mass transfer phenomena and to develop simulation models useful for designing new or improving existing drying systems².

The aim of this work was to compile experimental information on amaranth drying kinetics and to determine the most appropriate thin-layer drying model for describing the experimental data.

MATERIALS AND METHODS

Thin-layer Drying Data

Compiling of experimental data for thin-layer drying of amaranth grains (*Amaranthus cruentus* L.) reported in literature^{3,4,5} was made (Table 1). The collected data comprised experimental values of moisture content (M) vs. time (t) at different drying conditions (T , M_0 , V) that summarise 341 points. All the data were original experimental points either read from previous work³ or from electronic figures^{4,5}.

Table 1. Sources of thin-layer drying data of amaranth grains (*Amaranthus cruentus* L.).

T °C	M ₀ % d.b.	V m/s	Type of Data	Points	Reference	Set
40	20	NA	electronic figure	12	4	#1
50	20	NA	electronic figure	11	4	#2
60	20	NA	electronic figure	9	4	#3
70	20	NA	electronic figure	8	4	#4
40	32.5	3	electronic figure	24	5	#5
50	32.5	3	electronic figure	20	5	#6
60	32.5	3	electronic figure	26	5	#7
70	32.5	3	electronic figure	27	5	#8
25	14.9	0.297	original point from previous work	48	3	#9
30	14.9	0.297	original point from previous work	22	3	#10
35	14.9	0.297	original point from previous work	32	3	#11
40	14.9	0.297	original point from previous work	25	3	#12
45	14.9	0.297	original point from previous work	36	3	#13
50	14.9	0.297	original point from previous work	21	3	#14
55	14.9	0.297	original point from previous work	20	3	#15

NA: not accounted.

Mathematical Modeling

Mathematical modelling of thin-layer drying is important for optimal management and prediction of the performance of drying systems. Semi-theoretical and empirical models are widely used because of their easy application for drying simulation and satisfactory fitting to the experimental data. Among them, those of Lewis⁶, Page⁷, Modified-Page⁸, Wang-Singh⁹ and Henderson-Pabis¹⁰ are frequently used (Table 2).

Table 2. Equations of thin-layer drying models.

Model	Expression	Eqn.
Lewis ⁶	$MR = (M - M_e)/(M_0 - M_e) = \exp(-k_L t)$	[1]
Page ⁷	$MR = (M - M_e)/(M_0 - M_e) = \exp(-k_p t^{n_p})$	[2]
Modified-Page ⁸	$MR = (M - M_e)/(M_0 - M_e) = \exp(-k'_p t^{n'_p})$	[3]
Wang-Singh ⁹	$MR = (M - M_e)/(M_0 - M_e) = 1 + at + bt^2$	[4]
Henderson-Pabis ¹⁰	$MR = (M - M_e)/(M_0 - M_e) = A_0 \exp(-K_0 t)$	[5]

A modified GAB equation developed in a previous study^{11,12} was used to estimate the equilibrium moisture content:

$$M_e = \frac{M_m A \exp\left(\frac{B}{T_a}\right) K a_w}{(1 - K a_w) \left(1 - K a_w + A \exp\left(\frac{B}{T_a}\right) K a_w\right)} \quad 6$$

where a_w is the water activity (dimensionless), T_a is the absolute temperature (K), and M_m (dimensionless, d.b.), A , B ($^{\circ}\text{K}$) and K are parameters of GAB isotherm for water desorption from amaranth grains, with values of 0.063, 19.3, 6.63 and 0.722, respectively ($R^2 > 0.99$).

Data analysis procedure

The collected data were analysed using the NonLin module of Systat package¹³. The goodness of fitting of the models to experimental data was quantified through the correlation coefficient (R^2) and the standard error of the estimation (S_y).

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental results of M vs. t were normalized as the moisture ratio. These data were then fitted to Lewis, Page, Modified-Page, Wang-Singh and Henderson-Pabis models. The results are shown in Table 3.

Table 3. Results of fitting obtained from different thin-layer drying models for amaranth grains (*Amaranthus cruentus* L) dried at different drying conditions.

LEWIS MODEL							
Set	T_a K	M_o %. d.b.	V m/s	Drying parameter k_L, s^{-1}	R^2	S_y^2	
#1	313	20.0	NA	0.000400	0.995	0.0126	
#2	323	20.0	NA	0.000553	0.990	0.0037	
#3	333	20.0	NA	0.000600	0.998	0.0041	
#4	343	20.0	NA	0.000812	0.999	0.0022	
#5	313	32.5	3.0	0.000948	0.996	0.0173	
#6	323	32.5	3.0	0.001425	0.994	0.0190	
#7	333	32.5	3.0	0.002051	0.960	0.0934	
#8	343	32.5	3.0	0.002655	0.975	0.0721	
#9	298	14.9	0.297	0.000137	0.994	0.0670	
#10	303	14.9	0.297	0.000133	0.999	0.0099	
#11	308	14.9	0.297	0.000164	0.999	0.0110	
#12	313	14.9	0.297	0.000154	0.999	0.0097	
#13	318	14.9	0.297	0.000213	0.998	0.0193	
#14	323	14.9	0.297	0.000259	0.998	0.0094	
#15	328	14.9	0.297	0.000264	0.992	0.0412	
PAGE MODEL							
Set	T_a K	M_o %. d.b.	V m/s	Drying parameters k_p, s^{-1} n_p		R^2	S_y
#1	313	20.0	NA	0.00165	0.8204	0.999	0.0017
#2	323	20.0	NA	0.00321	0.7709	0.997	0.0048
#3	333	20.0	NA	0.00120	0.9086	0.999	0.0023

#4	343	20.0	NA	0.00096	0.9773	0.999	0.0022
#5	313	32.5	3.0	0.00271	0.8520	1.000	0.0007
#6	323	32.5	3.0	0.00478	0.8185	1.000	0.0015
#7	333	32.5	3.0	0.02348	0.6173	0.998	0.0039
#8	343	32.5	3.0	0.02746	0.6187	0.998	0.0049
#9	298	14.9	0.297	0.00074	0.8118	1.000	0.0051
#10	303	14.9	0.297	0.00035	0.8902	1.000	0.0008
#11	308	14.9	0.297	0.00015	1.0069	0.999	0.0109
#12	313	14.9	0.297	0.00022	0.9614	0.999	0.0086
#13	318	14.9	0.297	0.00042	0.9210	0.998	0.0124
#14	323	14.9	0.297	0.00055	0.9098	0.999	0.0043
#15	328	14.9	0.297	0.00168	0.7743	0.999	0.0061

MODIFIED-PAGE MODEL

Set	T _a K	M _o %. d.b.	V m/s	Drying parameters		R ²	S _y
				k _L , s ⁻¹	n _p		
#1	313	20.0	NA	0.0966	0.0042	0.994	0.0147
#2	323	20.0	NA	0.0802	0.0069	0.990	0.0193
#3	333	20.0	NA	0.1109	0.0054	0.998	0.0041
#4	343	20.0	NA	0.1021	0.0080	0.999	0.0022
#5	313	32.5	3.0	0.1286	0.0074	0.996	0.0173
#6	323	32.5	3.0	0.1270	0.00112	0.994	0.0190
#7	333	32.5	3.0	0.1009	0.0203	0.960	0.0934
#8	343	32.5	3.0	0.1408	0.0189	0.975	0.0721
#9	298	14.9	0.297	0.0117	0.0117	0.994	0.0670
#10	303	14.9	0.297	0.0116	0.0115	0.999	0.0099
#11	308	14.9	0.297	0.0128	0.0128	0.999	0.0110
#12	313	14.9	0.297	0.0124	0.0124	0.998	0.0097
#13	318	14.9	0.297	0.0160	0.0133	0.998	0.0193
#14	323	14.9	0.297	0.0162	0.0160	0.998	0.0094
#15	328	14.9	0.297	0.0163	0.0163	0.992	0.0412

HENDERSON-PABIS

Set	T _a °K	M _o %. d.b.	V m/s	Drying parameters		R ²	S _y
				A ₀	K ₀ , s ⁻¹		
#1	313	20.0	NA	0.9954	0.00378	0.996	0.0096
#2	323	20.0	NA	0.9403	0.00052	0.992	0.0146
#3	333	20.0	NA	0.9876	0.00059	0.998	0.0039
#4	343	20.0	NA	0.9942	0.00081	0.999	0.0022
#5	313	32.5	3.0	0.9433	0.00089	0.998	0.0089
#6	323	32.5	3.0	0.9456	0.00133	0.996	0.0133
#7	333	32.5	3.0	0.8723	0.00170	0.970	0.0707
#8	343	32.5	3.0	0.9256	0.00240	0.979	0.0599
#9	298	14.9	0.297	0.9312	0.00013	0.997	0.0313
#10	303	14.9	0.297	0.9700	0.00013	0.999	0.0057
#11	308	14.9	0.297	0.9919	0.00016	0.999	0.0106
#12	313	14.9	0.297	0.9928	0.00015	0.999	0.0095
#13	318	14.9	0.297	0.9814	0.00021	0.998	0.0177
#14	323	14.9	0.297	0.9782	0.00025	0.998	0.0079
#15	328	14.9	0.297	0.9399	0.00024	0.994	0.0303

WANG-SINGH

Set	T _a K	M _o %. d.b.	V m/s	Drying parameters		R ²	S _y
				a, s ⁻¹	b, s ⁻²		
#1	313	20.0	NA	-0.00026	1.68.10 ⁻⁸	0.960	0.0995
#2	323	20.0	NA	-0.00033	2.62.10 ⁻⁸	0.937	0.1211
#3	333	20.0	NA	-0.00042	4.49.10 ⁻⁸	0.980	0.0377
#4	343	20.0	NA	-0.00054	7.12.10 ⁻⁸	0.983	0.0265
#5	313	32.5	3.0	-0.00070	1.29.10 ⁻⁷	0.979	0.0929
#6	323	32.5	3.0	-0.00085	1.74.10 ⁻⁷	0.933	0.2132
#7	333	32.5	3.0	-0.00089	1.88.10 ⁻⁷	0.736	0.6177
#8	343	32.5	3.0	-0.00094	2.01.10 ⁻⁷	0.723	0.8013
#9	298	14.9	0.297	-0.00010	2.90.10 ⁻⁹	0.982	0.2032
#10	303	14.9	0.297	-0.00010	2.85.10 ⁻⁹	0.992	0.0572
#11	308	14.9	0.297	-0.00012	3.77.10 ⁻⁹	0.994	0.0511

#12	313	14.9	0.297	-0.00012	$3.47 \cdot 10^{-9}$	0.992	0.0638
#13	318	14.9	0.297	-0.00015	$5.74 \cdot 10^{-9}$	0.980	0.1631
#14	323	14.9	0.297	-0.00018	$7.94 \cdot 10^{-9}$	0.981	0.0884
#15	328	14.9	0.297	-0.00016	$5.65 \cdot 10^{-9}$	0.947	0.2672

The correlation coefficients for all the models –excluded Wang-Singh– were quite reasonable ($R^2 > 0.96$), but Page model evidenced the best correlation ($R^2 > 0.997$). Also, the mean standard errors of the estimation for Page model ($S_y < 0.022$) were considerably lesser than the corresponding to Henderson-Pabis ($S_y < 0.054$), Lewis ($S_y < 0.061$), Modified-Page ($S_y < 0.062$) and Wang-Singh ($S_y < 0.179$) models. Based on these results, Page model was chosen adequate to describe the experimental data for the drying kinetics of amaranth grains, while Wang-Singh equation was rejected.

Following, statistical analysis was performed to study the influence of the variables T, V and M_o on drying kinetics. It was observed that T and M_o were significant on drying kinetics. Similar conclusions have been reported by other authors² for different grains. De Figueiredo et al.¹⁴ proposed an exponential dependence of k_p with T and M_o for quinoa grains (another pseudocereal similar to amaranth). On this basis, the following expression which takes into account the effect of the variables T and M_o on the Page parameter k_p , was proposed:

$$k_p = \exp\left(\frac{a_1}{T} + a_2 M_o\right) \quad [7]$$

where a_1 , a_2 are constants to be fitted to experimental data.

Equation [7] was replaced into Eqn. [2] and a generalized-Page model was obtained:

$$MR = \exp\left(-\left(\exp\left(\frac{a_1}{T} + a_2 M_o\right)\right)^{n_p}\right) \quad [8]$$

Parameters a_1 ($^{\circ}K$), a_2 and n_p were re-estimated from the whole pool of data grouped by airflow velocity, and the results are presented in Table 4. The proposed model has good agreement with the experimental data, as is shown in Figure 1 for some of the tested data sets.

Table 4. Parameters and statistics of the generalized-Page model (Eqn. [8]) for amaranth grains.

Sets	V (m/s)	a_1 ($^{\circ}K$)	ASE(a_1)	a_2	ASE(a_2)	n_p	ASE(n_p)	R^2	S_y
#1 to #4	NA	-53.871	3.889	-26.629	0.912	0.853	0.025	0.997	0.032
#5 to #8	3.0	-68.572	2.670	-10.471	0.264	0.739	0.014	0.996	0.032
#9 to #15	0.297	-26.810	1.314	-46.743	0.740	0.893	0.013	0.995	0.032

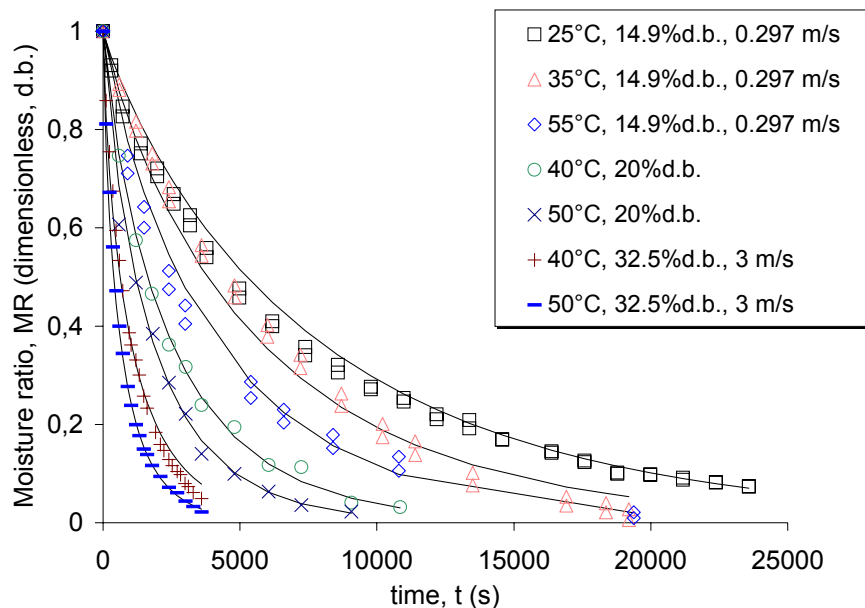


Figure 1. Experimental (points) and predicted by Eqn. [8] (lines) values of moisture ratio (MR) in function of time (t) for thin-layer drying of amaranth grains under different conditions.

CONCLUSIONS

Compiling of experimental data for drying of amaranth grains (*Amaranthus cruentus* L.) in the ranges 25-70°C of temperature (T), 15-32.5% dry basis of initial moisture content (M_0), and 0.2-3.0 m/s of air velocity (V), was made.

Drying data were adjusted by classical models (Lewis, Page, Modified-Page, Henderson-Pabis, Wang-Singh) and the fitting was compared to determine the best one for describing amaranth drying. Page model was chosen adequate, while Wang-Singh was rejected.

The influence of T, V and M_0 on drying kinetics was studied. A new expression, which includes these variables in the drying parameters was proposed.

BIBLIOGRAFIA

TOSI, E., RE, E.D. 2003. *Aposgran*, 82(2), pp. 15-16.

JAYAS, D.S., CENKOWSKI, S., PABIS, S., MUIR, W.E. 1991. *Drying Technol.*, 9(3), pp. 551-588.

TIRONI, A., CROZZA, D.E., PAGANO, A.M. 2003. *CD-ROM Proc. VII Congreso Argentino de Ing. Rural "CADIR 2003"*, Balcarce, Argentina.

VIZCARRA MENDOZA, M.G., MARTINEZ VERA, C., CABALLERO DOMINGUEZ, F.V. 2003. *Biosystems Engng.*, 86(4), pp. 441-446.

CALZETTA RESIO, A.N., AGUERRE, R.J., SUAREZ, C. 2004. *J. Food Eng.*, 65(2), pp.197-203.

LEWIS, W.K. 1921. *Ind. Eng. Chem.*, 13, pp. 427-432.

PAGE, G.E. 1949. *M.S. Thesis*, Purdue University, Lafayette, Indiana.

OVERHULTS, D.D., WHITE, G.M., HAMILTON, M.E., ROSS, I.J. 1973. *Trans. ASAE*, 16, pp. 195-200.

WANG, C.Y., SINGH, R.P. 1978. *Trans. ASAE*, 78, 6505.

HENDERSON, S.M., PABIS, S. 1969. *JAER*, 6(3), 169-174.

PAGANO, A.M., MASCHERONI, R. 2004a. *J. Food Eng.*, 67(4), pp. 441-450.

PAGANO, A.M., MASCHERONI, R. 2004b. *Int. J. Food Prop.*, 6(3), pp. 329-340.

WILKINSON, L. 1990. *Sytat: The System for Statistics*, Systat, Inc., Evanston, IL.

DE FIGUEIREDO, A.K., CROZZA, D.E., PAGANO, A.M., 2004. *CD-ROM Proc. CICTAL "Córdoba 2004"*, Córdoba, Noviembre 2004.

OBTENCIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS A PARTIR DEL BAGAZO DE MALTA CERVECERO

MUSSATTO, Solange I.*; DRAGONE, Giuliano; ROBERTO, Inês C.

Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena
Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5, CEP: 12600-970, Lorena / SP, Brasil
Tel: 0055 12 31595027; Fax: 0055 12 31533165; * E-mail: solange@debiq.fauenquil.br

RESUMEN

El bagazo de malta (principal subproducto de las cervecerías) fue sometido a un tratamiento químico con el objetivo de solubilizar los ácidos fenólicos, compuestos presentes en su fracción lignínica y que son de gran interés en la industria de alimentos. El tratamiento consistió en una reacción del material con ácido sulfúrico diluido y posterior reacción del residuo sólido obtenido con una solución de NaOH. El licor alcalino producido contenía los siguientes ácidos fenólicos: ferúlico, *p*-cumárico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico y vanílico, entre los cuales, ferúlico y *p*-cumárico fueron los más abundantes. Este trabajo demostró que es posible producir ácidos fenólicos a partir del bagazo de malta cervecero, posibilitando de esa forma el aprovechamiento de ese subproducto en la industria de alimentos.

ABSTRACT

Brewer's spent grain (the main brewery by-product) was submitted to a chemical treatment aiming to solubilize the phenolic acids, compounds that are present in its ligninic fraction and are of great interest in the food industry. The treatment was based in a previous reaction of the material with dilute sulfuric acid, and subsequent reaction of the obtained solid residue with a NaOH solution. The produced alkaline liquor contained the following phenolic acids: ferulic, *p*-coumaric, syringic, *p*-hydroxybenzoic, and vanillic, among of which, ferulic and *p*-coumaric were the most abundant. This work demonstrated that the phenolic acids production from brewer's spent grain is feasible. This makes possible the use of this by-product in the food industry.

Palabras claves: bagazo de malta, lignina, hidrólisis alcalina, ácidos fenólicos.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos vienen siendo cada vez más estudiados debido a su influencia en la calidad de los alimentos. Esos compuestos engloban una gran cantidad de sustancias, como por ejemplo los ácidos fenólicos, que debido a su constitución química, poseen propiedades antioxidantes tanto para los alimentos como para el organismo. Además, los ácidos fenólicos participan de procesos responsables por el color, astringencia y aroma en varios alimentos (Robbins, 2003; Soares, 2002).

La presencia de ácidos fenólicos en cereales es bastante común, y los ácidos ferúlico, cafeico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico y *p*-cumárico son normalmente los más encontrados. Todos esos ácidos ya fueron encontrados en los granos de cebada; estando presentes en mayor cantidad en la cáscara de este cereal (White y Xing, 1997). Para liberar los ácidos fenólicos de la estructura del cereal se debe emplear algún tratamiento, y entre los existentes, la hidrólisis con solución de NaOH ha sido uno de los más utilizados (Bonoli et al., 2004; Hernanz et al., 2001).

El bagazo de malta es el principal subproducto de las cervecerías, constituido principalmente por la cáscara de la cebada, la cual es resultante de la etapa de elaboración del mosto cervecero. Actualmente, el principal empleo del bagazo de malta es como ración para animales, aunque recientes estudios han sugerido su aprovechamiento en procesos biotecnológicos, como para el cultivo de hongos (Wang et al., 2001), o para la producción de compuestos de valor agregado como xilitol y arabitol (Mussatto y Roberto, 2005; Carvalheiro et al., 2005; Duarte et al., 2004). En el presente estudio fue evaluada la posibilidad de aprovechar el bagazo de malta para la producción de ácidos fenólicos, compuestos de gran interés en la industria de alimentos y que pueden inclusive ser empleados para el tratamiento y prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares (Soares, 2002; Duthie et al., 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Bagazo de malta: El bagazo de malta, suministrado por la Microcervecería de la Facultad de Ingeniería Química de Lorena, fue producido a partir de un proceso cervecero que utilizó 100% malta de cebada. Después de obtenido, el material fue lavado con agua y secado en estufa a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta alcanzar 10% de humedad.

Tratamiento con ácido sulfúrico diluido: Inicialmente el material fue tratado con ácido sulfúrico diluido, según metodología establecida por Mussatto y Roberto (2005). La reacción fue realizada en un reactor de acero inoxidable de 50 L de capacidad, el cual fue

alimentado con el bagazo de malta y una solución de ácido sulfúrico, manteniendo una proporción de 1 g de sólido/ 8 g de líquido, y 100 mg de ácido sulfúrico/ g de materia seca. Ese proceso fue mantenido por 17 min, a 120°C. Después de ese tiempo el material sólido resultante fue separado por centrifugación, siendo lavado con agua hasta pH neutro y secado nuevamente en estufa. Los compuestos presentes en el licor producido (hidrolizado hemicelulósico) fueron caracterizados y cuantificados por cromatografía líquida.

Hidrólisis alcalina: El residuo sólido obtenido del tratamiento con ácido sulfúrico diluido fue sometido a una reacción con solución de NaOH 2% (p/v), manteniendo una relación de 1 g de sólido/ 20 g de líquido. Ese tratamiento fue realizado en reactores de acero inoxidable de 200 ml de capacidad, a 120°C durante 90 min. Al término de la reacción todo el contenido fue rápidamente enfriado en baño de hielo y el material sólido fue separado por filtración. El licor alcalino producido fue analizado por cromatografía líquida para determinación de la concentración de ácidos fenólicos presentes.

Procedimientos analíticos: Las concentraciones de xilosa, glucosa, arabinosa y ácido acético fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución empleando un detector de índice de refracción y una columna Bio-Rad HPX-87H (300 x 7,8 mm), a 45°C, utilizando como eluente ácido sulfúrico 0,01 N, un flujo de 0,6 ml/min y volumen de muestra de 20 µl. Las concentraciones de furfural, hidroximetilfurfural, siringaldehído, vainillina y de los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico y vanílico también fueron determinadas por cromatografía líquida, pero empleando un detector UV (a 276 nm) y una columna Waters Resolve C₁₈ 5 µm (3,9 x 300 mm) a temperatura ambiente, utilizando como eluente acetonitrilo/agua (1/8 con 10 g/l de ácido acético; desgasificado y con el pH ajustado para 2,5 por la adición de H₃PO₄), un flujo de 0,9 ml/min y un volumen de muestra de 20 µl.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El bagazo de malta es un material lignocelulósico, y por lo tanto presenta en su composición tres fracciones principales: la hemicelulosa, la celulosa y la lignina. La hemicelulosa es un heteropolímero compuesto por xilosa y arabinosa en mayores proporciones, mientras que la celulosa es un homopolímero de unidades repetidas de glucosa. Por otro lado, la lignina es un componente no-carbohidrato de la pared celular de los vegetales, constituida básicamente por compuestos fenólicos. Además de celulosa,

hemicelulosa y lignina, el bagazo de malta también presenta en su composición, grupos acetil, cenizas, proteínas y extractivos, en menores proporciones. La composición química del bagazo de malta empleado en el presente trabajo es presentada en la Figura 1.

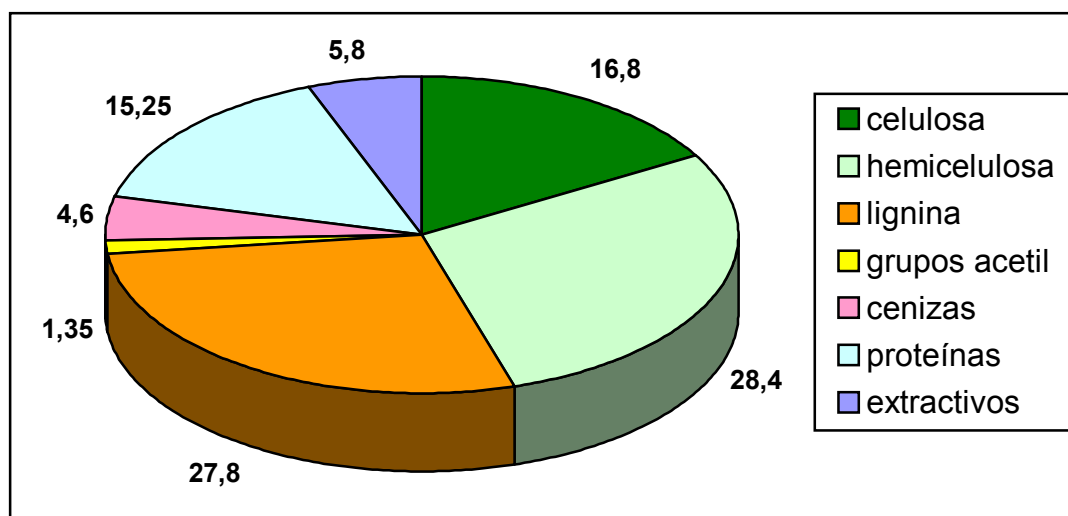


Figura 1. Composición química del bagazo de malta cervecero.

La lignina es una macromolécula compleja y que presenta gran resistencia a procesos de hidrólisis. Por ese motivo el bagazo de malta fue inicialmente tratado con ácido diluido con el objetivo de extraer la fracción hemicelulósica y tornar la lignina del residuo sólido más susceptible a reacción con NaOH en la etapa posterior. Además de eso, con la presencia de hemicelulosa en el residuo, una mayor cantidad de solución alcalina debería ser empleada pues una parte de ella sería usada para romper la hemicelulosa.

La hidrólisis con ácido diluido es normalmente empleada para romper la estructura de la hemicelulosa; sin embargo, a pesar de que la mayor parte de la lignina es insoluble en medio ácido (lignina Klason), una menor parte de ella puede ser solubilizada en condiciones ácidas. Ese hecho fue observado durante la reacción del bagazo de malta con ácido sulfúrico diluido. Se observa en la Tabla 1 que el hidrolizado hemicelulósico del bagazo de malta contenía en su mayor proporción, compuestos provenientes de la hemicelulosa (xilosa, arabinosa, glucosa, ácido acético y los compuestos furfural y hidroximetilfurfural, que son formados a partir de la degradación de los azúcares). Sin embargo, algunos compuestos procedentes de la lignina también estaban presentes, como el siringaldehído y la vainillina. Entre los ácido fenólicos, solamente fue observada la presencia de ácido ferúlico.

La presencia de ácido ferúlico en el hidrolizado hemicelulósico puede ser justificada en función de su localización en la estructura de la pared celular del cereal. La hemicelulosa

consiste en una estructura formada por unidades repetidas de xilosa, las cuales son unidas por uniones del tipo β -1,4. Esa estructura presenta también residuos de L-arabinosa que son unidos en el carbono 2 o 3 de las unidades de xilosa. A los residuos de L-arabinosa se encuentran unidas moléculas de ácido ferúlico (Sancho et al., 2001). Durante la hidrólisis del bagazo de malta con ácido diluido, xilosa y arabinosa fueron los principales azúcares liberados en el medio reaccional (Mussatto y Roberto, 2005). Es posible entonces, que parte del ácido ferúlico unido a la L-arabinosa haya sido liberado de la estructura y solubilizado junto con esos azúcares.

Tabla 1. Composición del hidrolizado producido por hidrólisis ácida del bagazo de malta.

	Compuesto	Concentración (g/l)
Azúcares, furanos y ácido acético (procedentes de la hemicelulosa)	Xilosa	25,58
	Arabinosa	11,40
	Glucosa	1,55
	Ácido acético	1,037
	Furfural	0,861
	Hidroximetilfurfural	0,052
Fenólicos (procedentes de la lignina)	Siringaldehído	0,182
	Vainillina	0,032
	Ácido ferúlico	0,061
	Ácido <i>p</i> -cumárico	nd
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	nd
	Ácido siríngico	nd
	Ácido vanílico	nd

nd = no detectado

Cuando el residuo del bagazo de malta, obtenido después de la reacción del material con ácido diluido fue sometido a hidrólisis alcalina, un licor rico en compuestos fenólicos fue producido (Tabla 2). En ese licor fue observada la presencia de varios ácidos fenólicos, entre los cuales el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico fueron los más abundantes. Segundo Bartolomé et al. (2002) los ácidos ferúlico y *p*-cumárico son los compuestos fenólicos presentes en mayor cantidad en el bagazo de malta, correspondiendo a 0,17 - 0,24%, y 0,068 - 0,121% en peso seco de ese material, respectivamente. Por ese motivo esos dos ácidos fueron los compuestos presentes en mayor concentración en el licor alcalino producido en el presente trabajo.

Tabla 2. Compuestos fenólicos presentes en el licor producido por hidrólisis alcalina del residuo del bagazo de malta.

Compuesto	Concentración (mg/l)
Ácido ferúlico	145,3
Ácido <i>p</i> -cumárico	138,8
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	26,9
Ácido siríngico	8,1
Ácido vanílico	3,1
Vainillina	8,4

CONCLUSIONES

Se concluye con este trabajo que es posible producir ácidos fenólicos a partir del bagazo de malta cervecero. Esto permite el reaprovechamiento de ese subproducto industrial en la industria de alimentos, constituyéndose una alternativa más ventajosa para su uso que ser simplemente suministrado como ración para animales.

BIBLIOGRAFÍA

Bartolomé, B., Santos, M., Jiménez, J.J., del Nozal, M.J., Gómez-Cordovés, C. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, 36, 51-58, 2002.

Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare L.*) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5195-5200, 2004.

Carvalho, F., Duarte, L.C., Lopes, S., Parajó, J.C., Pereira, H., Gírio, F.M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry* 40, 1215-1223, 2005.

Duarte, L.C., Carvalho, F., Lopes, S., Marques, S., Parajo, J.C., Gírio, F.M. Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113/116, 1041-1058, 2004.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79-106, 2000.

- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A.I., Faulds, C.B., Williamson, G., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C.** Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4884-4888, 2001.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C.** Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, in press, 2005.
- Robbins, R.J.** Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887, 2003.
- Sancho, A.I., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Williamson, G., Faulds, C.B.** Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science*, 34, 173-179, 2001.
- Soares, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* 15, 71-81, 2002.
- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M.,** Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* 78, 293-300, 2001.
- White, P.J., Xing, Y.** Antioxidants from cereals and legumes. In.: Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications. Shahidi, F. (Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, pp.25-63, 1997.

AGRADECIMIENTOS:

Capes, Fapesp, CNPq y Malteria do Vale.

EVALUACIÓN DEL DETERIORO DE ACEITE ESENCIAL (AE) DE *Citrus reticulata blanco*

ODETTI, Viviana L.; LUNA PIZARRO, Patricia; HEIT, Cecilia; VITURRO, Carmen I.
PRONOA,

Facultad de Ingeniería, UNJu Gorriti 237- Tel. 0388-4221592 viviodetti@hotmail.com;
degalli@imagine.com.ar

RESUMEN

Los aceites esenciales de cítricos son vulnerables a la luz, el oxígeno y la temperatura, originando alteraciones en su composición que los conducen a un envejecimiento y posterior deterioro, (Losing, 1998). Muestras de AE de *Citrus reticulata blanco*, de 0, 7 y 12 meses de almacenamiento, se sometieron a un envejecimiento acelerado exponiéndolas a la luz y el aire.

Se observó que los compuestos más volátiles disminuyeron su concentración relativa en cada caso, mientras que los oxigenados la aumentaron. El limoneno disminuyó su concentración paralelamente a la aparición de un compuesto posteriormente identificado como cumeno. El análisis del AE con CG/FID y CG/EM con dos columnas INNOWAX mostró la presencia de otro compuesto desconocido que se presume es un artefacto de degradación del limoneno.

Palabras claves: Aceite esencial (AE), composición, deterioro, limoneno.

ABSTRACT

Citrus peel oils are vulnerable at light, oxygen and temperature, causing variations in their composition that make them older and deteriorate. Samples of Essential Oils (EO) from 0, 7 and 12 months in storing of *Citrus reticulata blanco* were submitted to a process to make them old by exposing them to light and air.

At the end of the process, the most volatile compounds showed a lower relative concentration in every case, while the oxygen ones increased it. The limonene decreased its concentration parallel to the apparition of a compound after identified as cumene. The analysis of EO with GC/FID and GC/MS with two INNOWAX columns showed the presence of another unknown compound which is presumed to be a limonene degradation device.

INTRODUCCIÓN

Los AE de especies cítricas juegan un papel importante en la industria de los alimentos debido a su utilización como aditivos, específicamente como sustancias aromatizantes gracias a su valioso aporte de perfume y sabor.

El cultivo de cítricos es probablemente una de las actividades agrícolas industriales y comerciales más importante del mundo. La producción mundial de frutas frescas y sus derivados, tales como jugos y aceites esenciales está en constante crecimiento, en consecuencia es importante asegurar la alta calidad de los productos así como evaluar factores que puedan determinar su deterioro. (Kirbaslar *et al.*, 2001)

Los aceites esenciales presentan características y propiedades fisicoquímicas que se despenden de su composición química. Ejemplo de ello es la estabilidad (uno de los criterios de utilización) que varía de un producto a otro, y que depende de la proporción de hidrocarburos terpénicos presentes, algunos de los cuales pueden autooxidarse. (Pino, 1980, Lawrence, 2001, 2003).

Las modificaciones químicas de los auténticos componentes terpénicos de los aceites cítricos conocidos en las fuentes bibliográficas (p. ej. por la temperatura, la luz, el oxígeno del aire) se caracterizan habitualmente con ayuda de la cromatografía de gases. (Losing, 1998).

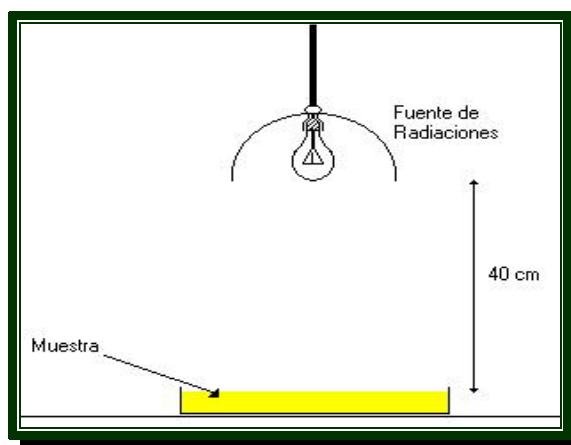
MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se trabajo con aceite esencial comercial de mandarina obtenido a escala industrial por prensado en frío de la cáscara de *Citrus reticulata blanco*. El AE fue provisto por una empresa cítrica de la Provincia de Jujuy.

MÉTODOS

Muestras de aceites esenciales de *Citrus reticulata blanco* almacenadas durante 0, 7 y 12 meses en frasco de vidrio color caramelo, en atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de refrigeración de 4 °C, se sometieron a un envejecimiento acelerado exponiéndolos a la luz y el aire con ayuda de un sencillo dispositivo de ensayo durante 3 a 6 días (Esquema 1).



Esquema 1: Dispositivo de evaluación del deterioro de AE

El Ensayo I se realizó con muestra de 0 meses de almacenamiento, tomando alícuotas para el análisis al iniciar y al finalizar la experiencia, a los tres días. En el Ensayo II se procedió de manera similar pero con aceites almacenados durante 7 meses. Por último, el Ensayo III se efectuó con AE almacenados durante 12 meses, con una duración de 6 días, tomando alícuotas al iniciar, a los tres días y al finalizar la experiencia (seis días).

De cada ensayo y su repetición se obtuvieron muestras por triplicado.

Las muestras blanco (tiempo cero de cada ensayo) y las expuestas se analizaron por Cromatografía Gaseosa. Se utilizó un CG HP 6890 MSHP5942A con detector de Espectrometría de Masas (CG/EM), programa de T° del horno 60 °C (0 min.) – 4 °C/min. – 280 °C (10 min.), inyector a 240 °C, con inyección en modo split. Gas Carrier: Helio, interfase a 280 °C; con columna capilar HP5/MS (5% fenilo) de 30 metros, 0,25 mm de diámetro y 0,25 µm de film, a los efectos de la identificación de los compuestos y un cromatógrafo gaseoso de Ionización de Llama (CG/FID) con columna capilar INNOWAX de 30 metros para la cuantificación de los mismos. También se analizaron idénticas muestras corridas en el CG/FID en un CG/EM con columna INNOWAX de 50 metros, ambas columnas de condiciones similares.

Al cabo de la exposición, se compararon los aceites esenciales sin envejecer con los envejecidos a distintos intervalos de tiempo. Se confirmó identidad de compuestos con sustancias puras. Se emplearon Espectros de Masa e Índices de Kovats cuando fue necesario (Adams, 2001, Jennings and Shibamoto, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Tabla 1 se registran los valores promedio de la composición de los compuestos principales de los distintos ensayos.

En forma general, los compuestos más volátiles disminuyen su concentración relativa, tal es el caso de α - tuyenol (Ensayo I: 39 %; Ensayo II: 22 %; Ensayo III: 33 %), sabinol (Ensayo I: 44 %; Ensayo II: 6 %; Ensayo III: 18 %) y mircenol (Ensayo I: 18 %; Ensayo II: 4 %; Ensayo III: 7 %).

Los compuestos oxigenados aumentan su concentración a lo largo de la experiencia: decanal (Ensayo I: 36 %; Ensayo II: 4 %; Ensayo III: 8 %) y linalol (Ensayo I: 28 %; Ensayo II: 0 %; Ensayo III: 6 %).

El limoneno disminuye su concentración entre los ensayos II y III en un 7 %, observándose en el mismo intervalo de tiempo la aparición de un compuesto de identidad desconocida, que se denominó desconocido A, el cual se comporta de manera análoga a los compuestos oxigenados durante la experiencia de deterioro, esto es respecto al incremento de su concentración con el tiempo. Además se observa en los CG/FID en los cuales se analiza el AE con columna INNOWAX, el incremento de un compuesto desconocido B, el cual aparece desde el inicio, pero aumenta su concentración desde un 0 % a un 22 % en el aceite, entre los tiempos de almacenamiento de los ensayos II y III.

A efectos de analizar la identidad de los compuestos desconocidos A y B que aparecen en los ensayos II y III, se procedió a analizar las muestras por CG acoplada al EM en dos columnas: INNOWAX de 50 metros y HP5, obteniéndose como resultado la aparición de los compuestos A y B en la primera columna pero no se observó el compuesto B en la segunda.

Se comprobó en las muestras que el porcentaje de limoneno disminuye y es proporcional al incremento del desconocido B en AE de citrus analizados por CG/FID con columna INNOWAX. Este compuesto también aparece en muestras de aceites de quimiotipos de *Schinus areira* analizados en otros trabajos con la misma columna, pero en menor porcentaje. Se señala que en el AE de *S. areira* analizado también es menor el porcentaje de limoneno respecto al determinado en AE de citrus.

El EM del compuesto B exhibe dos señales mayoritarias a $m/z = 43$ y $m/z = 59$. La señal de $m/z = 59$ podría corresponder al fragmento catión dimetilcarbinol estabilizado por resonancia (Figura 1), mientras que el de $m/z = 43$ es bastante común en los EM de compuestos alifáticos, pudiendo corresponderse con el catión terciario $(CH_3)_2C^+H$. Estos cationes podrían originarse a partir del limoneno (Figura 2). Este paso de hidratación del resto-isoprenilo conduciría a proporcionar uno de los fragmentos del compuesto desconocido B.

Tabla 1: Variación de la composición de AE de *Citrus reticulata blanco* en los ensayos de deterioro

Compuesto	Blanco I	Ensayo I	Blanco II	Ensayo II	Blanco III	Ensayo III
a-tuyeno	0,28	0,17	0,54	0,42	0,45	0,30
Sabineno	0,18	0,10	0,17	0,16	0,15	0,13
Mirceno	1,92	1,58	1,88	1,82	1,77	1,64
Cumeno	-	-	-	-	4,63	4,64
Limoneno	95,09	95,36	93,35	93,37	86,98	87, 26
Decanal	0,27	0,42	0,27	0,28	0,24	0,27
Linalol	0,13	0,18	0,13	0,13	0,15	0,16
Otros compuestos	2,13	2,19	3,66	3,82	5,63	5,60

Referencias: Blanco I, Blanco II y Blanco III: muestras de AE de citrus con 0, 7 y 12 meses de almacenamiento, respectivamente, antes de realizar la experiencia. Ensayo I, Ensayo II y Ensayo III: muestras de AE de citrus con 0, 7 y 12 meses de almacenamiento, respectivamente, luego de la exposición a la luz y el oxígeno.

Nota: En el ensayo III se exponen los resultados obtenidos al tercer día, ya que los del sexto son muy similares a estos y por eso no se exponen en el trabajo.

Este compuesto B no sería un compuesto preexistente en el AE que se produciría cuando se analiza el AE con una columna INNOWAX de largo uso, ya que a efectos de corroborar la hipótesis se analizó la misma muestra con una columna INNOWAX de 50 metros y también otras muestras de distintos AE que contenían limoneno o carecían de él. El compuesto B solo se registró en los AE con limoneno, decreciendo la intensidad del pico con el porcentaje de limoneno en la muestra original (porcentajes corroborados en la columna no polar).

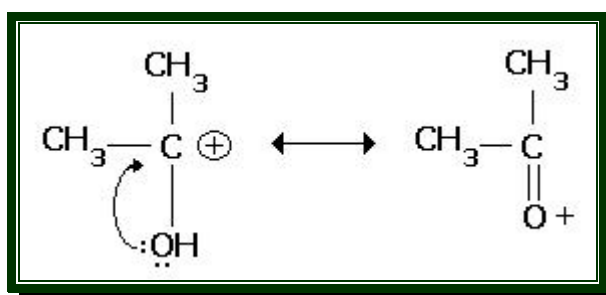


Figura 1: Posible fragmento del compuesto desconocido B de $m/z = 59$

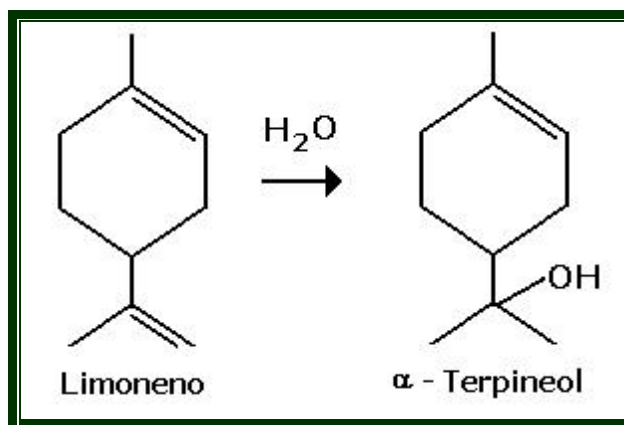


Figura 2: Posible degradación del limoneno a α -terpineol

CONCLUSIONES

Mediante el análisis de Espectrometría de Masas (EM) e Índices de Kovats (IK) (Mituki, S.; et al, 2002) se presume que el compuesto A corresponde al cumeno, un posible producto obtenido de la degradación del limoneno.

Con respecto al compuesto desconocido B, se puede suponer que en una columna INNOWAX envejecida, probablemente se exponen ciertos grupos funcionales que podrían actuar como catalizadores de reacciones de degradación del limoneno, ya que se pudo comprobar la aparición de este compuesto en análisis con columna INNOWAX sólo en muestras con algún contenido de limoneno pero no en aquéllas en donde este compuesto esta ausente.

Durante la experiencia el AE fue almacenado en frascos de vidrio color caramelo, conservados en atmósfera de nitrógeno y mantenidos en heladera a una temperatura de $4^{\circ}C$. En estas condiciones se pudo observar un tiempo de vida útil de 7 meses, antes de alterarse significativamente su composición, lo que origina un cambio indeseado en sus cualidades organolépticas. El factor de mayor influencia sobre el AE es el tiempo de almacenamiento, ya que a tiempos mayores el brusco cambio de composición resulta perjudicial para el AE. La luz y el aire influyen apreciablemente en muestras nuevas, originando un mayor grado de deterioro, mientras que en las almacenadas su incidencia es menor.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. P. 2001.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- Jennings, W., Shibamoto, T. 1980.** Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Capillary G. C. Academic Press. New York.

Kirbaslar, F.; Kirbaslar, S.; Dramur, U. 2001. The compositions of Turkish bergamot oils produced by cold-pressing and steam distillation. *J. Essent. Oils Res.* **15**: 411-415.

Lawrence, B. 2003. Essential Oils, 1995 – 2000. USA, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Lawrence, B.; Reynolds, R. 2001. Progress in essential oils. *Perfumer & Flavorist*, **26**: 36-43.

Losing, G.; Degener, M.; Matheis G. 1998. Investigación del envejecimiento de aceites cítricos con ayuda de la espectroscopia IR. *Dragoco Report*, **4**: 181-187.

Mitiku, S.; Sawamura M.; Njoroje S.; Koaze, H. 2002. Analytical discrimination of the cold-pressed oils of mandarins and their hybrids. *J. Essent. Oils Res.* **14**: 196-202.

Pino, J.; Tapanes, R. 1980. Utilización de los aceites esenciales de cítricos en la industria alimentaria y farmacéutica. *Rev Cub Farm* **14**: 51 –55.

AGRADECIMIENTOS

A la Lic. Ana Molina por su colaboración, al Ing. Luis Pérez Hernández por la donación de las muestras. A SecTER UNJu por el soporte económico.

POTENCIAL DE LOS FOSFATOS COMO NUEVOS ANTIMICROBIANOS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.

SUAREZ, Viviana B.¹, CARRASCO, Marta², FRISON, Laura², BASILICO, M. de², SIMONETTA, Arturo², RIVERA, Mauricio³ y REINHEIMER, Jorge A.¹

¹ Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Facultad de Ingeniería Química (UNL), Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe, Argentina. E-mail: vivisuar@figus.unl.edu.ar. ² Cátedra de Microbiología, Dpto. Ingeniería en Alimentos, FIQ (UNL). ³ SUDAMFOS S.A., Avda. Eva Perón 5251, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Se estudió la actividad inhibitoria de fosfatos comerciales sobre diferentes grupos microbianos presentes, como alteradores, en la industria de alimentos (hongos, levaduras, *Bacillus*). También se ensayó su influencia sobre bacterias lácticas, y se evaluó su posible uso como inhibidores de la propagación de sus fagos. Los fosfatos se utilizaron en concentraciones de entre 0.1% y 1.5% p/v y los ensayos se realizaron a pH neutro y pH natural (resultante del agregado de los fosfatos al medio de cultivo). Los polifosfatos fueron más eficientes como inhibidores a pH neutro sobre todos los grupos bacterianos estudiados. A pH natural, los fosfatos de reacción alcalina aumentaron notablemente su capacidad inhibitoria. La capacidad de interferir en el ciclo lítico de fagos de BAL fue eficiente cuando se utilizaron fosfatos con elevada capacidad de secuestrar cationes divalentes. De acuerdo con estos resultados puede concluirse que algunos de estos compuestos podrían ser utilizados como antimicrobianos en la industria de alimentos, eficientemente y a bajo costo.

ABSTRACT

Inhibition of the growth of food spoilage microorganisms (moulds, yeasts, *Bacillus*), by commercial phosphates was studied. The influence of these compounds on lactic acid bacteria and their possible ability to stop the infective cycle of their bacteriophages, was also investigated. Phosphates were used at concentrations from 0.1% to 1.5% w/v and assays were performed at neutral and natural pH values (resulting after addition of phosphates to culture medium). At a neutral pH, polyphosphates were more inhibitory than at natural pHs. At natural pH values, phosphates with alkaline reaction in culture media increased notably their inhibitory capacity. Phosphates with higher capacity for

sequestering divalent cations, were capable to interfere in the viral cycle of acid lactic bacteria bacteriophages. According to these results, some phosphates could be used, efficiently and with a low cost, like antimicrobial compounds in food industries.

Palabras claves: fosfatos – compuestos antimicrobianos – industria alimentaria

INTRODUCCION

Los fosfatos son aditivos ampliamente utilizados en la industria de alimentos (principalmente en la industria cárnica y láctea) para proteger el flavor e incrementar rendimientos debido a su capacidad de emulsificación y retención de agua. Hasta el momento no se han utilizado específicamente con el objetivo de inhibir microorganismos, aunque cierta actividad antimicrobiana y antibotulínica han sido informadas (9, 13, 15). Algunos estudios han demostrado que los efectos inhibitorios están ligados a la quelación de iones metálicos esenciales estructuralmente (1, 2, 4 – 5, 6, 8, 11).

La inhibición del crecimiento bacteriano por fosfatos ha sido motivo de algunas investigaciones (7, 10, 12) y, en general, las bacterias Gram-positivas han demostrado ser más sensibles que las Gram-negativas. En cuanto a la acción antimicrobiana de los fosfatos sobre hongos y levaduras, la información es escasa (2, 3). Por otra parte, su acción secuestrante de cationes les permitiría interferir en el ciclo lítico de algunos bacteriofagos, lo cual los haría potencialmente útiles para colaborar en el control de éstos, en la industria láctea fundamentalmente. El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad inhibitoria de fosfatos comerciales, sobre diferentes grupos microbianos de interés en alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos y medios de cultivo: Para el estudio se emplearon 17 cepas de hongos, 20 de levaduras, 9 del género *Bacillus* y 7 de distintas especies de bacterias lácticas (con sus respectivos bacteriofagos). Los medios utilizados fueron Agar Plate Count para hongos, Caldo Plate Count para levaduras y *Bacillus* y Caldo MRS/Elliker para bacterias lácticas (bacilos y cocos, respectivamente). Para este último caso, también se realizaron los ensayos en leche descremada reconstituída (LDR, 10% p/v).

Fosfatos: Se utilizaron para el estudio polifosfatos A y B (15 a 20 unidades de fosfato por molécula), tripolifosfato de sodio – alta solubilidad (TAS), tripolifosfato de sodio (TRI) ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), pirofosfato ácido de sodio (PAS) ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), pirofosfato neutro de sodio (N) ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), y tres mezclas de fosfatos denominadas M3001, M3017 y M3087 . Estos compuestos fueron provistos por la empresa SUDAMFOS S.A., Argentina.

Ensayos de inhibición: Los ensayos fueron realizados en medio líquido para levaduras, *Bacillus* y bacterias lácticas (7). Se estudió el efecto inhibitorio a pH neutro y natural (resultante del agregado de los fosfatos al medio de cultivo). Para el caso de levaduras, se agregó el estudio a pHs ácidos (2.5, 3.5 y 4.5).

Las concentraciones de fosfatos adicionadas a los medios fueron 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0% y 1.5% p/v. Los microorganismos se sembraron en tubos con caldo-fosfatos y se incubaron 24 horas o hasta desarrollo a 30°C (levaduras y bacterias lácticas mesófilas), 34°C (*Bacillus*) y 42°C (bacterias lácticas termófilas). Se calcularon las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs), considerando inhibición a una medida de absorbancia (600nm) inferior a 0.2. El ensayo de inhibición de hongos se realizó en medio agarizado, realizando el estriado según lo indicado por el Método Ecométrico (14), incubando 7 días a 28°C y calculando los Índices de Crecimiento Relativo (ICR) y las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (ICR<0.2).

Ensayos de lisis en medio líquido: En este caso, los medios fueron adicionados de fosfatos y Cl_2Ca (10mM). Los tubos se inocularon con la cepa (2% v/v) y el fago lítico (m.o.i. \geq 1) correspondiente, y se incubaron hasta observar lisis en el tubo control (cepa + fago sin agregado de fosfato). Los resultados se registraron como positivo / negativo (lisis o no de la cepa).

Ensayos de lisis en leche: Leche Descremada Reconstituída (LDR, 10% p/v) estéril fue adicionada de fosfatos a las concentraciones mencionadas e inoculada con las cepas y sus fagos líticos correspondientes. Se incubaron los tubos a la temperatura óptima de desarrollo de la cepa y se determinaron los valores de pH a intervalos de tiempo regulares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de inhibición:

Hongos: La resistencia de los hongos a los fosfatos fue dependiente de la especie (Tablas 1 y 2) siendo *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium proliferatum* las más resistentes y *Byssoschlamys nivea*, *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium glabrum*, las más sensibles. A pH neutro (Tabla 1), los fosfatos más inhibidores resultaron ser los de cadena larga (polifosfatos A y B), ya que una concentración de 1.0% (p/v) se inhibió el crecimiento del 76.4% (A) y el 88.2% (B) de las especies analizadas. A pH natural (Tabla 2), la actividad inhibitoria de los fosfatos que presentan reacción alcalina o ácida cuando se disuelven en el medio, cambió considerablemente. Los fosfatos TAS, TRI y N (reacción alcalina), la aumentaron notablemente. El fosfato TAS (1.5% p/v) inhibió un 70.6% de especies a pH=

7.0 y un 88.2% a pH= 7.5. Los fosfatos TRI y N fueron los más inhibidores, ya que lograron impedir el crecimiento de todas las especies a una concentración de 1.5% (p/v). Todos los hongos desarrollaron normalmente en el rango de pH ensayado.

Levaduras: Los resultados de la Tabla 3 muestran que, a pH neutro, los fosfatos más inhibidores resultaron los de cadena larga (A y B), para los cuales las CIMs se ubicaron entre 0.3% y 1.5%. Los restantes fosfatos mostraron una menor capacidad inhibitoria, en general (mayores valores de CIMs). A pH natural, los fosfatos que alcalinizan el medio (TAS, TRI y N), aumentaron su capacidad inhibitoria. Por ejemplo, el fosfato TAS (0.5%) elevó su capacidad inhibitoria desde un 5% (pH= 7.0) a un 70% (pH= 8.15) de cepas. El fosfato PAS (pH ácido), no inhibió ninguna de las cepas. Cuando los fosfatos más inhibidores (A y B) se ensayaron a pHs propios de jugos de frutas cítricas (entre 2.5 y 4.5, para jugos concentrados y exprimidos), se pudo observar una clara acción inhibitoria debida exclusivamente a los fosfatos adicionados (Tabla 4).

Bacillus: A pH neutro (Tabla 5), los polifosfatos A y B fueron los más inhibidores ya que, excepto para *B.macerans*, la CIM resultó 0.1%. Los otros tres polifosfatos fueron menos efectivos (3087<3017<3001). A pH natural, el fosfato que acidificó (M 3087), aumentó su capacidad inhibitoria

Tabla 1- Actividad inhibitoria de fosfatos sobre hongos aislados de industrias lácteas (pH neutro)

Género/especie	FOSFATO (% p/v)																			
	A				B				TAS			PAS			TRI			N		
	0.1	0.3	0.5	1.0	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Absidia corymbifera</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	-*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium sphaesperum</i>	+	+	+	-*	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
<i>Penicillium roquefortii</i>	+	+	+	-*	+	+	+/-	-*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium commune</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+/-	-*	+	+/-	-*	-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+	+/-
<i>Trichoderma viride</i>	+	+/-	-*	-	+	-*	-	-	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+/-	-*	+	+/-	-*
<i>Epicoccum nigrum</i>	+/-	-*	-	-	+/-	-*	-	-	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-*
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	-*	-	-	+/-	-*	-	-	+	-*	-	+	-*	-	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Aspergillus candidus</i>	+	+/-	-*	-	+	+/-	-*	-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+/-	-*	-	+	+	+/-
<i>Phoma glomerata</i>	+/-	-*	-	-	+	-*	-	-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+	-*
<i>Byssoclamyis nivea</i>	+/-	-*	-	-	+/-	-*	-	-	+/-	-*	-	+/-	-*	-	+/-	-*	-	+/-	-*	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-*	-	-	+	-*	-	-	-*	-	-	+/-	-*	-	-*	-	-	+	-*	-
<i>Penicillium glabrum</i>	+	-*	-	-	+	-*	-	-	+/-	-*	-	+	-*	-	+/-	-*	-	+	-*	-
% de especies inhibidas	17.6	47.0	59.0	76.4	17.6	53.0	82.3	88.2	17.6	52.9	70.6	11.8	41.2	64.7	23.5	47.0	64.7	5.9	29.4	53.0

+: crecimiento (ICR de 0.8 a 1); +/-: crecimiento débil (ICR de 0.2 a 0.8); -: ausencia de crecimiento (ICR < 0.2)

* CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

ICR: Índice de Crecimiento Relativo

Tabla 2- Actividad inhibitoria de fosfatos sobre hongos aislados de industrias lácteas (pH natural, resultante de la adición de los fosfatos al medio de cultivo)

Género/especie	FOSFATO (% p/v)											
	TAS			PAS			TRI			N		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-
<i>Absidia corymbifera</i>	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-*	+	-*	-
<i>Fusarium sp.</i>	+	-*	-	+	+	+	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Cladosporium sphaespermum</i>	+	+/-	-*	+	+	+	+	+/-	-*	+/-	-*	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+/-	-*	+	+	+	+	+/-	-*	+	-*	-
<i>Penicillium roquefortii</i>	+	-*	-	+	+	+	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Penicillium commune</i>	+	-*	-	+	+	+	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Aspergillus niger</i>	+/-	-*	-	+	+	+	+/-	-*	-	+/-	-*	-
<i>Trichoderma viride</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Aspergillus candidus</i>	+/-	-*	-	+	+	+	+/-	-*	-	+/-	-*	-
<i>Phoma glomerata</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Byssosclamyces nivea</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Penicillium glabrum</i>	+/-	-*	-	+	+	+/-	-*	-	-	-*	-	-
% de especies inhibidas	52.9	82.3	88.2	0	0	5.9	52.9	82.3	100	58.8	88.2	100

+: crecimiento (ICR de 0.8 a 1); +/-: crecimiento débil (ICR de 0.2 a 0.8); -: ausencia de crecimiento (ICR < 0.2) * CIM: Concentración Inhibitoria Mínima
ICR: Índice de Crecimiento Relativo

Tabla 3- Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs, % p/v) de fosfatos sobre levaduras, a pH neutro y (natural, resultante del agregado de fosfatos al medio de cultivo)

Cepa	Fosfato					
	A	B	TAS	TRI	N	PAS
<i>Cándida humicola</i> 108	1.5	1.5	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Geotrichum penicillatum</i> 105	1.5	1.5	>1.5 (>1.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cryptococcus laurentii</i> 67	1.5	1.5	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)
<i>Brettanomyces claussenii</i> 15	1.5	1.5	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida famata</i> 19	1.5	1.0	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)
<i>Cryptococcus heveanensis</i> 17	1.5	1.0	>1.5 (1.0)	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)
<i>Cryptococcus albidus</i> 14	1.5	1.0	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida parapsilosis</i> 36	1.5	1.0	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida famata</i> 11	1.0	1.0	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cryptococcus laurentii</i> 65	0.5	1.0	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Trichosporon sp.</i> 44	1.0	0.5	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida famata</i> 24	1.0	0.5	>1.5 (1.0)	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida famata</i> 22	1.0	0.5	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida famata</i> 16	1.0	0.5	>1.5 (1.0)	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (>1.5)
<i>Geotrichum sp.</i> 57	0.5	0.5	1.5 (0.5)	1.0 (0.5)	1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	0.5	0.5	>1.5 (1.0)	>1.5 (1.5)	>1.5 (1.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cándida famata</i> 32	0.5	0.3	1.5 (0.5)	1.5 (0.5)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Brettanomyces intermedius</i> 12	0.5	0.3	>1.5 (0.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (0.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	0.5	0.3	>1.5 (1.5)	>1.5 (1.0)	>1.5 (1.5)	>1.5 (>1.5)
<i>Trichosporon cutaneum</i> 10	0.3	0.3	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	1.0 (0.5)	0.5 (>1.5)

Tabla 4- Porcentaje de cepas de levaduras inhibidas (n= 20) a distintos pH, con y sin agregado de fosfatos (%p/v)

pH	Sin fosfato	Ffto. A		Ffto. B	
		0.5	1.0	0.5	1.0
7.0 (control)	0	35	60	50	80
4.5	10	85	100	100	100
3.5	55	100	100	100	100
2.5	80	100	100	100	100

Tabla 5- Concentraciones Inhibitorias Míminas (CIMs, % p/v) de fosfatos sobre cepas de *Bacillus*, a pH neutro y (natural, resultante del agregado de fosfatos al medio de cultivo)

Cepa	Fosfato				
	A	B	3001	3017	3087
<i>B. macerans</i> A	> 1.0	> 1.0	> 1.0 (> 1.0)	> 1.0 (> 1.0)	> 1.0 (> 1.0)
<i>B. macerans</i> NM5	> 1.0	> 1.0	> 1.0 (> 1.0)	> 1.0 (> 1.0)	> 1.0 (> 1.0)
<i>Bacillus</i> sp. 10R	0.1	0.1	0.5 (0.5)	0.1 (1.0)	0.1 (0.1)
<i>B. cereus</i> 11R	0.1	0.1	0.3 (0.5)	0.5 (0.3)	0.1 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 15R	0.1	0.1	1.0 (0.5)	0.5 (0.3)	0.3 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 17R	0.1	0.1	0.1 (0.5)	0.3 (0.3)	0.1 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 18R	0.1	0.1	0.3 (0.5)	0.3 (0.5)	0.3 (0.1)
<i>B. coagulans</i> 19R	0.1	0.1	0.5 (0.5)	0.3 (0.3)	0.1 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 22R	0.1	0.1	0.5 (1.0)	0.3 (0.5)	0.1 (0.1)

Tabla 6- Desarrollo (Caldo Elliker-cocos y Caldo MRS-bacilos) de bacterias lácticas en presencia de fosfatos.

Cepa	Fosfato (% p/v)								
	A			B			TAS		
	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5
Sth10^a	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Cly4^a	+	-	-	+	-	-	+	-	-
F4^a	+	-	-	+	-	-	+	-	-
LcCl2^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lc13-3^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lb Ib3^c	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A^d	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: desarrollo celular -: ausencia de desarrollo celular

^a *S. thermophilus*; ^b *Lc. lactis*; ^c *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; ^d *L. casei*

Ensayos de lisis en medio líquido: En caldo, el fosfato más inhibidor de la lisis fágica fue el TAS, ya que produjo este efecto en todos los sistemas estudiados (salvo para los fagos FcSth10 y Jch)(Tabla 7), a concentraciones variables. Para los fosfatos A y B se

demonstró un menor poder inhibitorio obteniéndose, para una concentración de 0.5%, la inhibición fágica en dos (ϕ 046 y ϕ MLC-A) de los cuatro sistemas estudiados.

Tabla 7- Inhibición del ciclo de lisis de fagos de bacterias lácticas en presencia de distintas concentraciones de fosfatos, en Caldo Elliker-Ca (cocos) y Caldo MRS-Ca (bacilos)

Fago	Cepa	Testigo		Fosfato (% p/v)								
				A			B			TAS		
				c/ca	s/Ca	0.1%	0.3%	0.5%	0.1%	0.3%	0.5%	0.1%
FcSth10	Sth10 ^a	+	-	+	nd	nd	+	nd	nd	+	nd	nd
Ly4	Cly4 ^a	+	-	+	nd	nd	+	nd	nd	-	nd	nd
Jch	F4 ^a	+	-	+	nd	nd	+	nd	nd	+	nd	nd
QF9	LcCl2 ^b	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-
046	Lc13-3 ^b	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Ib3	LbIb3 ^c	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MLC-A	A ^d	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+/-	-

+: lisis; +/-: lisis incompleta; -: ausencia de lisis ^a*S.thermophilus*; ^b*Lc. lactis*; ^c*L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; ^d*L.casei*
 nd: no determinado (inhibición del crecimiento de la cepa)

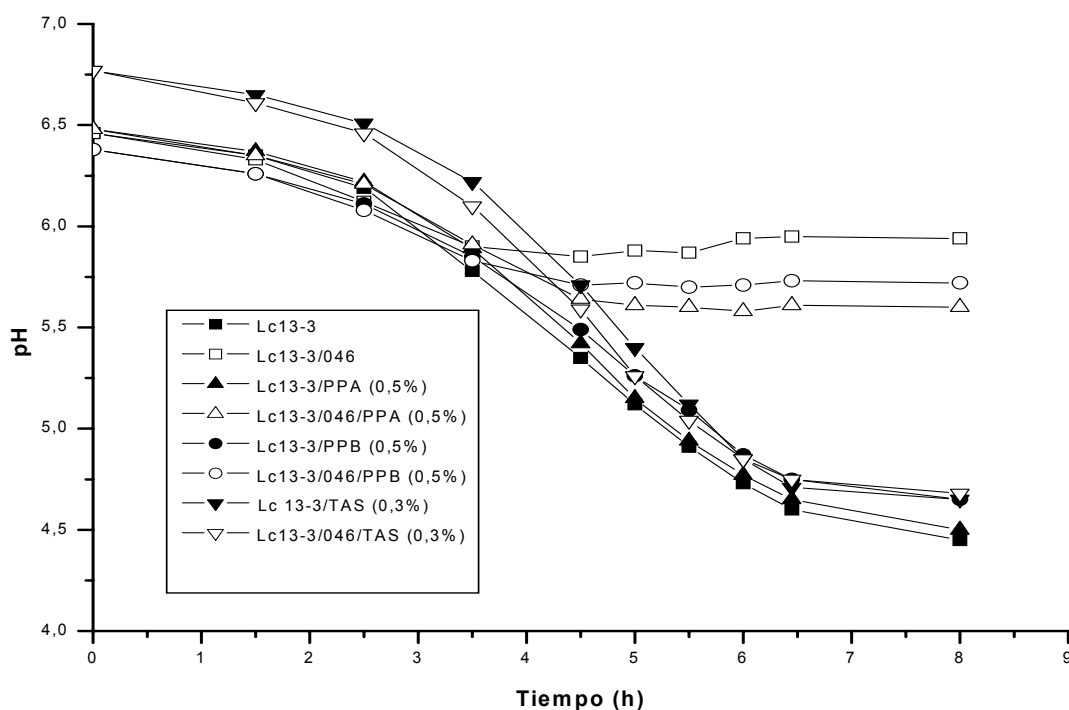


Figura 1: Efecto del agregado de fosfatos en la cinética de acidificación de *Lc.lactis* 13-3 en leche, en presencia y ausencia de su fago lítico 046

Ensayo de lisis en leche: Algunos resultados difirieron de los observados en medio líquido. Un 0.3% de fosfato TAS, no evitó la lisis de los fagos QF9 (datos no mostrados) y MLC-A (Fig. 2), hecho verificado en caldo, siendo necesario 0.5% para inhibirla. Los fosfatos A y B tampoco inhibieron el ciclo lítico de los fagos 046 y MLC-A a una concentración de 0.5% (Figs. 1 y 2), hecho demostrado en caldo (Tabla 7). La lisis del fago Ib3 sobre *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ib3 se inhibió en leche (Fig. 3) a causa del fosfato TAS, tal cual lo obtenido en caldo. Para el sistema Cly4 / Ly4 (*S.thermophilus*), la concentración de 0.1% de fosfato TAS no impidió la lisis en leche (Fig. 4), pero si en caldo, como ya se mencionó.

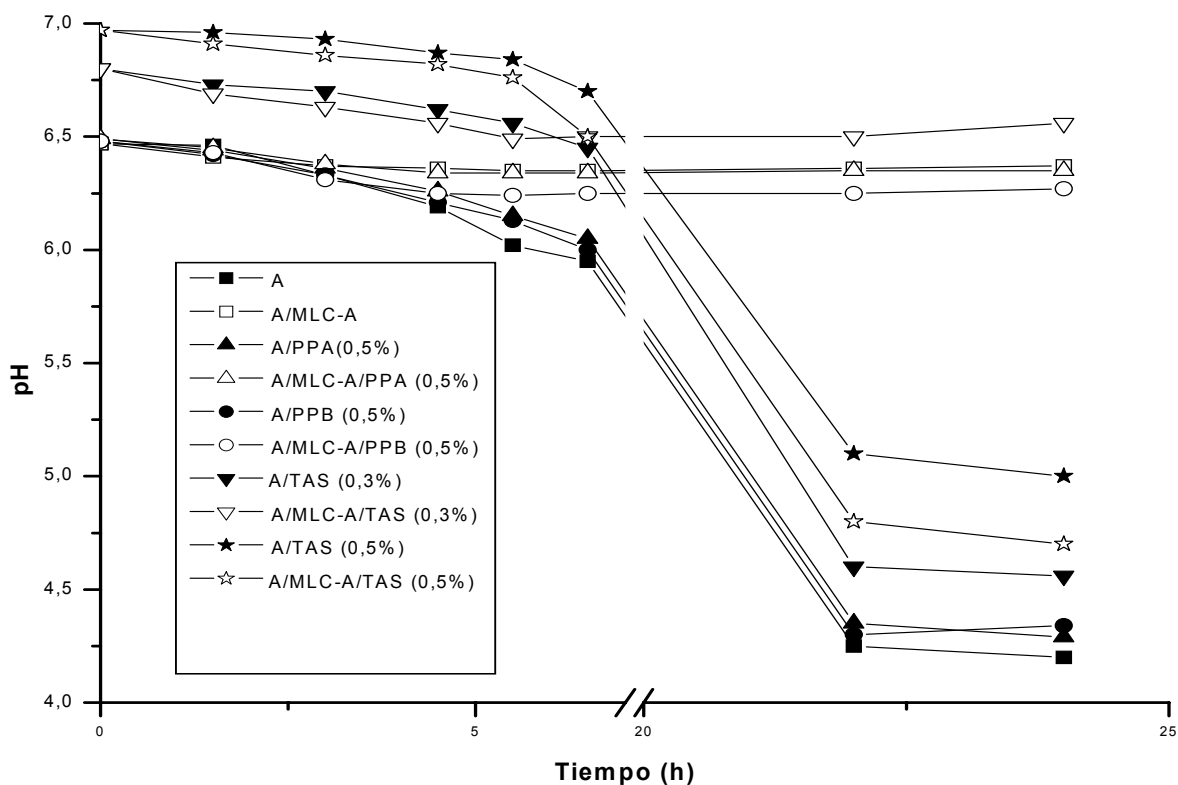


Fig. 2: Efecto del agregado de fosfatos en la cinética de acidificación de *L.casei* A en leche, en presencia y ausencia de su fago lítico MLC-A

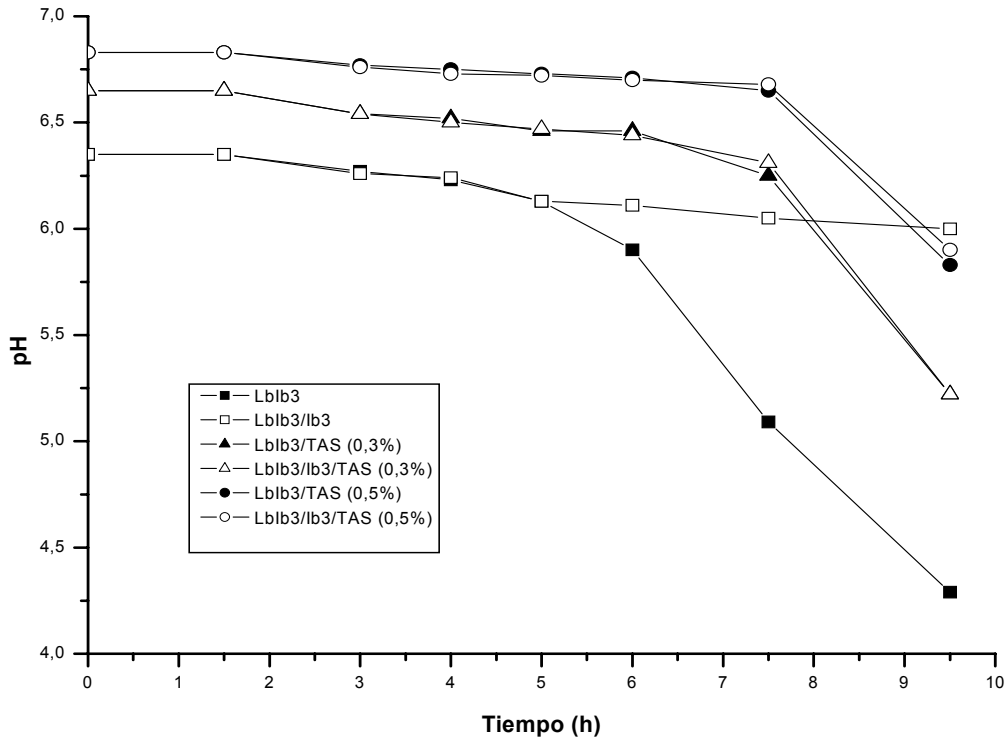


Fig. 3: Efecto del agregado de fosfatos en la cinética de acidificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lb3 en leche, en presencia y ausencia de su fago lítico lb3

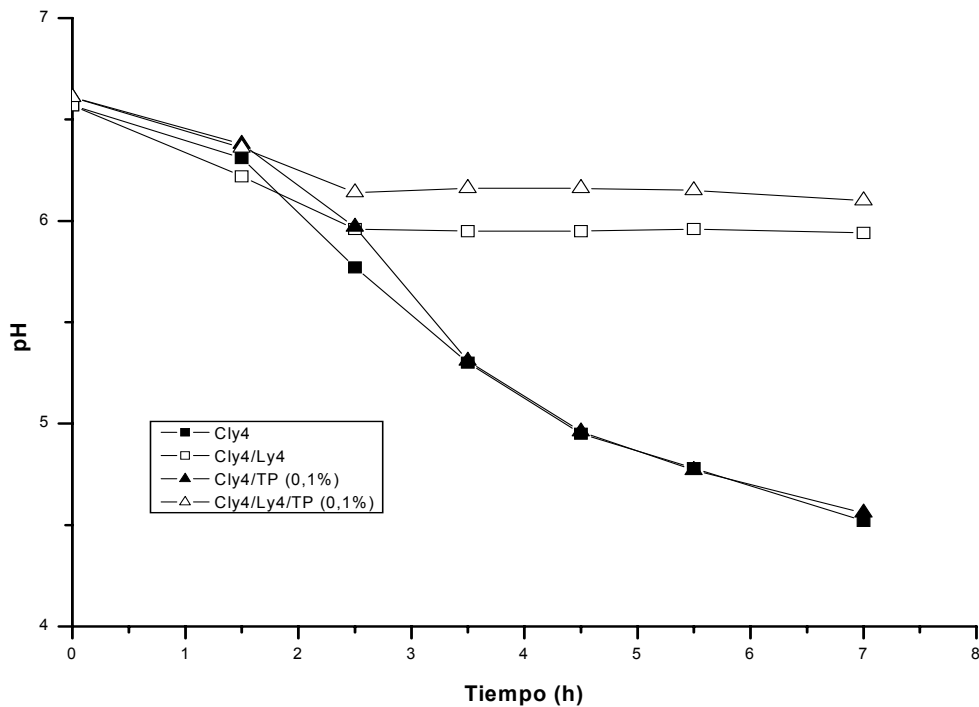


Fig. 4: Efecto del agregado de fosfatos en la cinética de acidificación de *S. thermophilus* Cly4 en leche, en presencia y ausencia de su fago lítico Ly4

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede inferir que algunos fosfatos podrían ser utilizados en la industria láctea para inhibir el crecimiento de hongos sobre la superficie de quesos durante el período de maduración. Por otro lado, algunos de estos compuestos se mostraron inhibidores de levaduras a pHs ácidos en bajas concentraciones, con lo cual podrían ser potencialmente adicionados a jugos de frutas cítricas como conservantes. Bajas concentraciones de ciertos fosfatos inhiben eficientemente una alta proporción de bacterias esporuladas aerobias (*Bacillus*) y podrían usarse en productos de larga vida, neutros o poco ácidos. Por último, se demostró que algunos fosfatos interrumpen el ciclo lítico de los fagos de bacterias lácticas por secuestro del catión Ca^{2+} , en concentraciones relativamente bajas. Esta propiedad los hace potencialmente útiles en el control de bacteriofagos Ca^{2+} dependientes en la industria láctea fermentativa.

BIBLIOGRAFIA

- Jen, C.M. and Shelef, L.A. 1986.** Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 842-846.
- Knabel, S.J.; Walker, H.W. and Hartman, P.A. 1991.** Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. *J. Food Prot.* 54: 360-365.
- Lebron, C.I.; Molins, R.A.; Walker, H.W.; Kraft, A.A. and Stahr, H.M. 1989.** Inhibition of growth and aflatoxin production of aspergilli in medium containing phosphates. *J. Food Prot.* 52 (1): 4-6.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Olson, D.G. and Williams, F.D. 1994a.** Bactericidal and bacteriolytic effects of selected food-grade phosphates, using *Staphylococcus aureus* as a model system. *J. Food Prot.* 57:276-283.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Olson, D.G. and Williams, F.D. 1994b.** Metal ions reverse the inhibitory effects of selected food-grade phosphates in *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* 57:284-288.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Stahr, H.M.; Olson, D.G. and Williams, F.D. 1994.** Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* 57:289-294.
- Loessner, M.J.; Maier, S.K.; Schiwiek, P. and Scherer, S. 1997.** Long-chain phosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. *J. Food Prot.* 60 (5): 493-498.

Maier, S.K.; Scherer, S. and Loessner, M. 1999. Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9): 3942-3949.

Molins, R.A. 1991. Phosphates in food. CRC Press, Boca Raton, FL.

Molins, R.A.; Kraft, A.A.; Olson, D.G. and Hotchkiss, D.K. 1984. Recovery of selected bacteria in media containing 0.5% food grade poly- and pyrophosphates. *J. Food Sci.* 49: 948-949.

Post, F.J.; Coblenz, W.S.; Chou, T.W. and Salumke, D.K. 1968. Influence of phosphate compounds on certain fungi and their preservative effects on fresh cherry fruit (*Prunus cerasus*, L.). *Appl. Microbiol.* 16 (1): 138-142.

Shelef, L.A. and Seiter, J.A. 1993. Indirect antimicrobials, p. 539-569. In P.M. Davidson (ed.), *Antimicrobials in foods*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Sofos, J.N. 1986. Use of phosphates in low-sodium meat products. *Food Technol.* 40 (9): 52-68.

Testing methods for use in quality assurance of culture media. 1997. In: *Pharmacopoeia of culture media for food microbiology.* *Int.J.Food Microbiol.* 5: 292-296.

Thompkin, R.B. 1983. Indirect antimicrobial effects in foods: phosphates. *J. Food Safety* 6: 13-27

COMPARACIÓN DE TECNICAS DE EVALUACIÓN DE HIDRÓLISIS DE WPC Y MODELADO CINETICO

CASTEL Virginia, SANTIAGO Liliana G., CARRARA Carlos R.

Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL. Paraje El Pozo, Ciudad Universitaria, cc 266 Santa Fe. Tel: 0342-4571150. Fax: 0342-4571148.
Email: ccarrara@fiqus.unl.edu.ar.

RESUMEN

Se estudio la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo (WPC) con una proteasa comercial, Multifect P-3000 (alcalina-serina-endoproteasa) bajo distintas condiciones de operación y aplicando dos métodos en el seguimiento de la reacción. Los resultados obtenidos pudieron ser ajustados con una ecuación del tipo exponencial de dos parámetros que los describe adecuadamente a través de la misma se puede modelar la reacción considerando: el grado de hidrólisis en función de la concentración inicial de sustrato y enzima, y el tiempo. Se encontró que el método más adecuado y sencillo para seguir el grado de hidrólisis del WPC es el método de pH-Stat.

Palabras claves: Hidrólisis enzimática, Proteínas, WPC, Cinética

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of dairy whey protein concentrate (WPC) with a commercial protease (Multifect P-3000) (alkaline-serine-endoprotease), with different operating conditions and applying two different methods to follow the reaction, was studied. The values were well fitted with an exponential equation with two parameters. The hydrolysis reaction could be model, with this equation, considering hydrolysis degree as a function of initial enzyme and substrate concentration and time. It was found that pH-Stat. was the more adequate method to follow WPC hydrolysis.

INTRODUCCIÓN

Las WPC son una importante alternativa en la formulación de alimentos no solo por su valor nutricional, si no también por sus propiedades funcionales (emulsificación, espumado y gelificación), siendo además generadoras de péptidos bioactivos (Briant, 1998). La modificación controlada de estas proteínas ha venido estudiándose desde hace algunos años. Un tipo de proceso ensayado es la hidrólisis enzimática, a través de la cual

pueden mejorarse las propiedades mencionadas o generar péptidos de fácil absorción intestinal destinados a dietas especiales; este proceso no disminuye el valor nutricional de las proteínas (Foegeding, 2002).

Por otra parte, la proteólisis de una mezcla de proteínas representa una serie de reacciones complejas a nivel molecular debido a distintos factores como: la especificidad de las proteasas, la existencia de diferencias en los entornos de los enlaces peptídicos, la distinta accesibilidad de los mismos al ataque enzimático, la generación de distintos productos, la reproducibilidad de los ensayos, etc. Estas circunstancias dificultan la interpretación de los resultados mediante las ecuaciones de cinética enzimática tradicionales y hacen perder el significado a los parámetros determinados. Varios autores han propuesto modelos cinéticos para estos sistemas (Constantinides, 1980; Camacho Rubio, 1993; Márquez, 1993; Margot, 1996, Márquez 1999), los cuales fueron ajustados para distintos tipos de proteínas. Los mismos en general indican la existencia de una inhibición del producto o sustrato y la desnaturalización simultánea de la enzima.

En este trabajo se estudió la hidrólisis enzimática de WPC con una proteasa comercial de origen bacteriano: Multifect P-3000 (Genecor S.A.), variando la concentración inicial de sustrato y la relación enzima/sustrato; se determinó el grado de hidrólisis (GH) que fue evaluado por los métodos del ortofenilaldehído (OPA) y el de pH-stat. A partir de los datos experimentales se ajustó un modelo del tipo exponencial considerando que se produce simultáneamente una desnaturalización de la enzima de segundo orden. Esto condujo a una ecuación integrada de velocidad que permitió evaluar el GH en función de las condiciones de operación: concentración inicial de enzima y sustrato, y tiempo de hidrólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como sustrato se utilizó un concentrado de suero lácteo, suministrado por Milkaut SA (Frank, Santa Fe) con 80% de proteínas y 6,0 % de humedad. La enzima fue una proteasa comercial de origen bacteriano (Bacillus Subtilis): Multifect P-3000 (Genecor S.A.) que es una alcalina-serina-endoproteasa, El intervalo óptimo de temperaturas para esta enzima se halla comprendido entre 20-65°C y actúa a pH entre 7,0 y 10,0; y se la suministra como un líquido de color ámbar y con una densidad de 1,0 g/ml.

Ensayos de hidrólisis: Los ensayos fueron llevados a cabo en un reactor discontinuo de 800 ml de capacidad, agitado, con control de pH y temperatura. Las concentraciones iniciales de sustrato fueron (S_0 : g/100g): 10,0-15,0 % y las concentraciones inicial de enzima (E_0) en relación a la concentración de sustrato E_0/S_0 (g/g): 0,5-1,0-1,5-2,0.

Disuelto el WPC de acuerdo a la concentración del ensayo se llevo la temperatura del reactor a 55°C y el pH a 8,5. Se agregó la enzima y para mantener el pH constante se adicionó la cantidad necesaria de una solución 2,0 M de NaOH mediante una microbureta mecánica Metrohm E485, registrándose el volumen adicionado en función del tiempo. También se tomaron muestras a distintos tiempos (100 µl) que se adicionaron a 900 µl de una solución al 5% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y luego esta muestra se calentó a 85°C por 5 min., para inactivar la enzima y se la almaceno a -18°C.

Para monitorear el avance de la reacción el parámetro ha evaluar fue el grado de hidrólisis (GH), que se define como (Adler-Nisen, 1986):

$$GH = \frac{\text{n}^\circ \text{de enlaces peptídicos hidrolizados}}{\text{n}^\circ \text{total de enlaces peptídicos}} \cdot 100 \quad (1)$$

Cuantificación de GH utilizando OPA: Este método se basa en la formación de isoindoles a ser cuantificados espectrofotométricamente a 340nm (Nielsen, 2001).

Reactivo de OPA: Se disuelve 7,62 de disodio tetraborato decahidratado con 200 mg de SDS en 150 ml de agua destilada, agregándose luego 160 mg de o-ftaldehido disuelto en 4 ml de etanol y 176 mg de ditioeritritol, enrasándose luego a 200 ml. Como patrón se utilizó l-serina (26,2mg/25ml; 9,94 10⁻⁴ meq/lit).

Procedimiento: Se colocan 3 ml del reactivo del OPA y 400 µl del patrón de l-serina (diluido 1/10) o de la muestra, se agita por 5 s y se espera 2 min para leer a 340 nm con un espectrofotómetro Genesis V (Milton Roy). Se trazó en cada serie de medidas una curva de calibrado de serina entre 0,0 y 3,0.10⁻⁴ meq/ml.

Luego el valor de GH se calcula con la siguiente ecuación:

$$GH_{OPA} = \left(\frac{\Delta \text{Abs} \cdot d}{\text{pend} \cdot M_p \cdot h_{\text{Tot}}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Donde ΔAbs es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el blanco, a 340nm, d el factor de dilución, pend es la pendiente de la curva patrón M_p es la masa de proteína que es hidrolizada y h_{tot} el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico, que para el caso de WPC es igual a 8,8 eq/kg de proteína (Spellman, 2003).

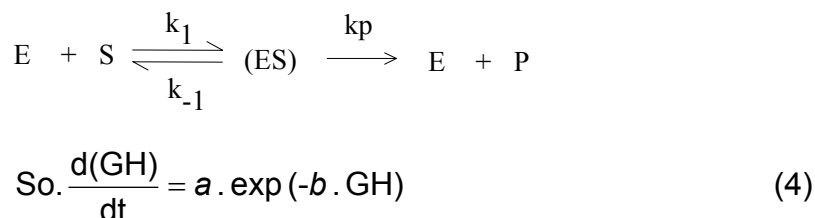
Cuantificación de GH utilizando pH-stat: Este se basa en la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a pH alcalino cuando se mantiene constante el pH en el medio de reacción y el GH se calcula con los volúmenes de base adicionados y mediante la Ec. 3 (Adler-Nisen, 1986):

$$GH_{\text{pH-stat}} = \left(\frac{B \cdot N_b}{\alpha \cdot M_p \cdot h_{\text{tot}}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

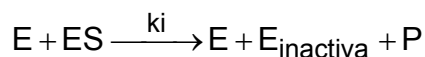
Donde B es el consumo de base en ml, N_b la normalidad de la base y $\alpha = 7,1$ es el grado de disociación de los grupos amino que es función de la temperatura y el pH.

Modelo cinético

Márquez (1999) partiendo del modelo cinético clásico de catálisis enzimática realizando algunas consideraciones llega a la Ec. 4.



Donde $a = k_p \cdot E_0 / So$, $b = k_i \cdot K_m / k_p$, $K_m = (k_{-1} + k_p) / k_1$ constante de Michaelis-Menten, t tiempo y k_i la constante de inactivación considerando un esquema de ataque de la enzima libre activa (E) entre si y a la enzima ligada al sustrato (ES) (cinética de segundo orden):



Integrando la Ec. 4, se llega a la Ec. 5, con la que se ajustaron los datos experimentales por regresión no lineal utilizando el software Scientis.

$$GH = \frac{1}{b} \cdot \ln(1 + a \cdot b \cdot t) \quad (5)$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en la evaluación del GH con los dos métodos aplicados se comparan en la Figura 1, se encuentran diferencias en la estimación de estos valores de hasta un 20 % siendo los valores del método del OPA inferiores al del pH-sat. Spellman (2003) obtuvo resultados similares con WPC atribuyendo esta diferencia a que el OPA produce intermediarios inestables con la cisteína, por la presencia de su grupo sulfidriilo, no así con los otros aminoácidos. Y la α -lactoalbúmina del WPC presenta relativamente una alta concentración de cisteína (6,5%), lo que explicaría este comportamiento. Por otra parte, el método del pH-sat, sería mas adecuado para este caso ya que el mismo presenta inconvenientes a altos grados de hidrólisis ó cuando se trabaja con exopectidasas en que se genera mayor cantidad de di y tripéctidos que modifican el grado de disociación α de los grupos amino (Adler-Nisen, 1986; Spellman, 2003). Además con el método del pH-stat puede seguirse la reacción mientras la misma se lleva a cabo y no requiere ningún tratamiento especial de la muestra como en el caso del OPA. Para el ajuste del modelo cinético se utilizó los datos obtenidos por este método.

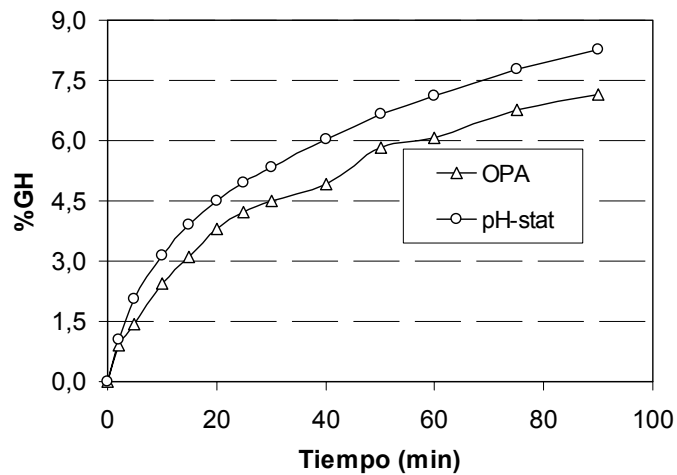


Figura 1: Comparación de los métodos de OPA y pH-stat en la determinación del GH (So: 10%, Eo/So:0,5%).

La Figura 2, muestra los datos obtenidos agrupando los ensayos por igual relación Eo/So y distinto So; en la misma puede observarse que la velocidad de reacción disminuye apreciablemente con el tiempo y aumenta el GH, tendiendo a un valor límite en función de la relación Eo/So. La desnaturalización de la enzima puede explicar este comportamiento ya que el GH tiende a un valor que depende de Eo y que es pequeño con respecto a la hidrólisis total.

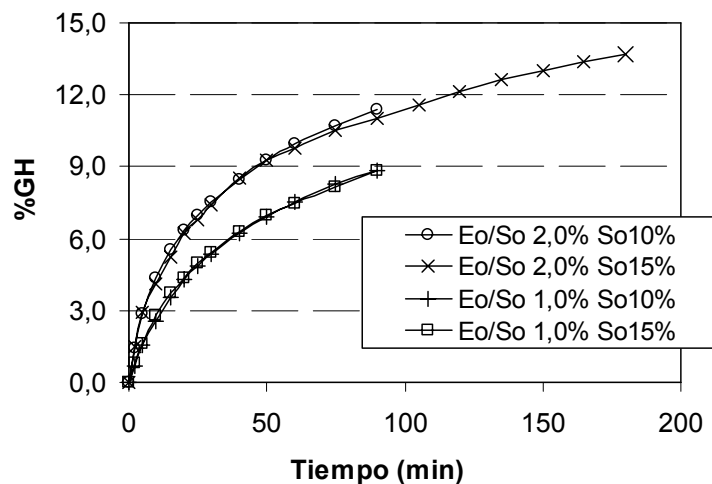


Figura 2: Comparación de ensayos a distintas So y relaciones Eo/So.

Para verificar en una primera instancia, la aplicabilidad del modelo propuesto a los datos experimentales se realizó la Figura 3, comprobándose que los mismos responden al modelo propuesto. Por lo tanto, se calculó los valores de a y b (Ec.5) en forma individual y para todos los ensayos realizados que se muestra en la Tabla 1. En la misma, se observa como lo citado para la Figura 2, que el GH final alcanzado depende de la relación Eo/So, las diferencias entre los ensayos repetidos se encuentra entre el 3 al 7%; b tiene poca

variación para todos los ensayos porque es una relación de constantes y a varía con E_o/S_o . Para calcular k_p se graficó a en función de E_o/S_o y la relación $(k_i \cdot K_m)$ se determinó de $(a \times b)$ en función de E_o/S_o (Figura 4). Posteriormente se aplicó las constantes determinadas al ajuste de los datos que se muestra en la Figura 5, pudiéndose observar la buena correlación entre los valores experimentales y el modelo aplicado.

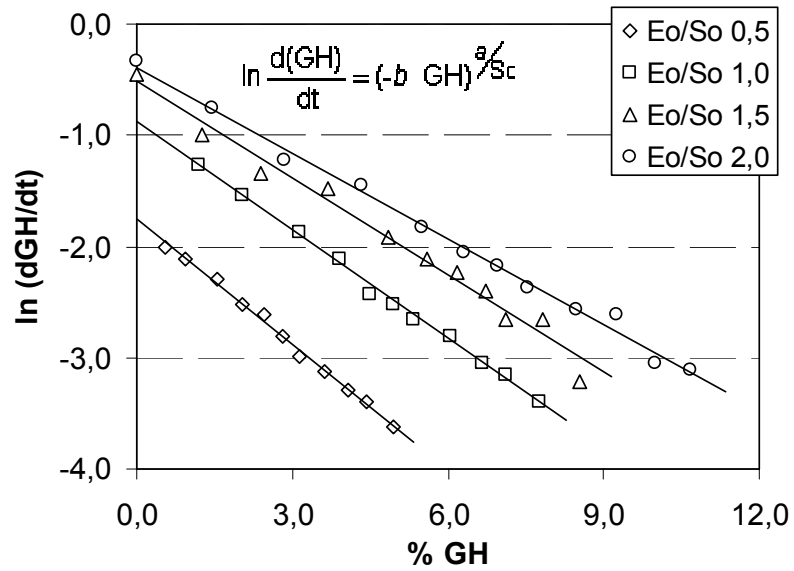


Figura 3: Verificación de la aplicación de la Ec. 4, a los datos experimentales (S_o : 10%).

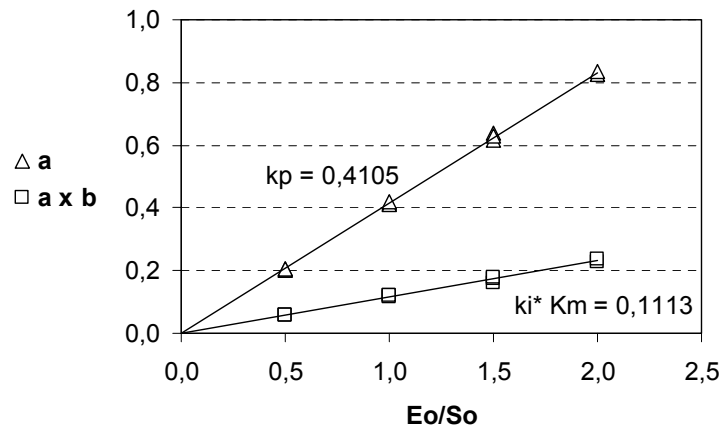


Figura 4: Obtención de k_p y $k_i \cdot K_m$.

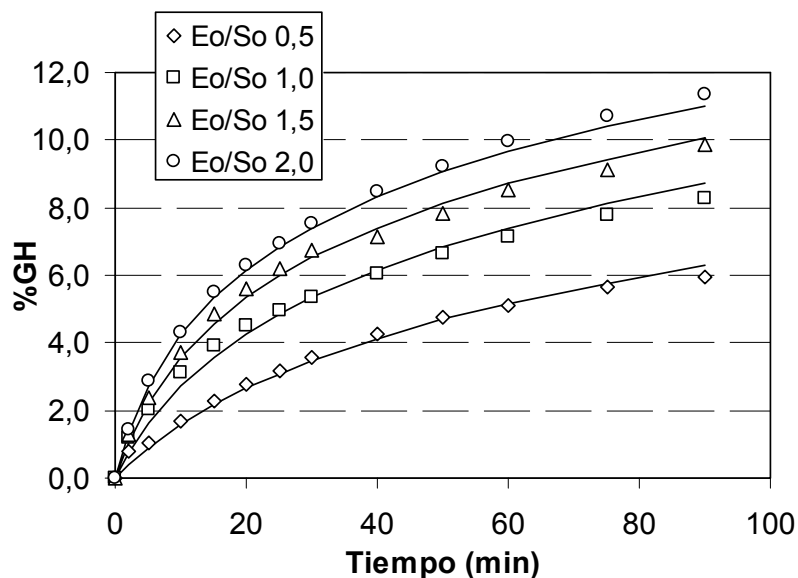


Figura 5: Ajuste del modelo a los datos experimentales (So: 10%).

Tabla 1: Valores de a , b y GH final alcanzado a los 90 minutos (el subíndice de Eo/So indica repetición de la experiencia).

			a (min^{-1})	b	%GH final
So=10	Eo/So ₁	0,5	0,201	0,292	5,97
	Eo/So ₂	0,5	0,198	0,278	5,42
	Eo/So ₁	1,0	0,416	0,285	8,85
	Eo/So ₂	1,0	0,418	0,286	8,62
	Eo/So ₁	1,5	0,638	0,250	10,83
	Eo/So ₂	1,5	0,576	0,265	10,16
	Eo/So ₁	2,0	0,837	0,275	11,20
So=15	Eo/So ₁	0,5	0,208	0,286	6,20
	Eo/So ₁	1,0	0,418	0,286	8,82
	Eo/So ₁	1,5	0,630	0,286	9,77
	Eo/So ₁	2,0	0,834	0,285	10,99

CONCLUSIONES

Se compararon dos métodos de evaluación del seguimiento de la reacción de hidrólisis de WPC encontrándose como más adecuado y sencillo el de pH-stat. La aplicación de una ecuación integrada de velocidad expresa la relación entre las condiciones de operación y el grado de hidrólisis alcanzado y puede utilizarse para optimizar las concentraciones iniciales de sustrato y de enzima y el tiempo de hidrólisis en función de las características requeridas del hidrolizado.

BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nisen J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier.

Camacho Rubio F., Gonzalez P. (1993). Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 33(1):59-70.

Bryant, C. M., McClements, D.J. (1998). Food Science and Technology, 9, 143 - 151.

Constantinides A., Adu-Amankwa B. (1980). Biotech. and Bioeng. 22:1543-1565.

Foegeding E. A , Davis J., Doucet D. (2002). Food Science & Technology. 13:151-159.

Margot A., Flaschel E., Renken A. (1996). Process Biochemistry. 32(3):217-233.

Marquez M.C. (1993). Process Biochemistry, 28:481-490.

Marquez MC, Vázquez MA. (1999). Process Biochemistry 35:111-117.

Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C. (2001). J Food Sci. 66(5):642-646.

Spellman D., McEvoy E., O'Cuinn G. (2003). Bioresource Technology 90:249-254.

AGRADECIMIENTOS: Se agradece los fondos del PROGRAMA CAI+D 2000-2004 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN Y EMULSIFICACIÓN DE UN COSECADO DE SUERO LACTEO /LAMBDA CARRAGENINA.

SANTIAGO, Liliana G, LIZARRAGA, Maria S; BAEZA*, Rosa, AÑÓN**, Maria C y PILOSOFF*, Ana M.R.

Instituto de Tecnología de Alimentos . FIQ (UNL). Ciudad Universitaria. (3000) Santa Fe-Argentina- Tel. 0342-4571150-Fax.0342-4571148. [Email-lsanti@fiqus.unl.edu.ar](mailto:lsanti@fiqus.unl.edu.ar)

* Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, (UBA). Ciudad Universitaria . Bs. As. Argentina. **Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos, CIDCA (UNLP – CONICET)

RESUMEN

Se estudiaron las propiedades texturales de los geles y la estabilidad de las emulsiones preparados con co-secado (CS) de suero lacteo (SL) y λ -Carragenina. Se evaluó el pH (6-7), la concentración de sólidos (S) (12-20 % w/w) y la temperatura de calentamiento (T) (75-90 °C) sobre las propiedades mecánicas de los geles preparados con CS. El CS gelifica a S= 5.74% mientras que el SL no gelifica para S< 7.41%. Los geles obtenidos con CS fueron geles agregados y los más cohesivos y duros se consiguieron tanto a alta T y baja S, como a baja T y alta S, a un pH de 6,5. El tamaño de partícula ($D_{4,3}$), el cremado y la coalescencia de las emulsiones con CS disminuyeron con el aumento de S y para S>2.5% son estables. Las emulsiones y los geles obtenidos con CS tuvieron mejores propiedades de estabilidad y textura que los obtenidos con SL.

ABSTRACT

The textural properties of gels and stability of emulsions prepared with a co-spray-dried (CS) mixture of dairy whey protein concentrate (SL) and λ -Carrageenan (λ -C) were studied. The effects of pH (6-7), solid content (S) (12-20%) and heating temperature (T) (75-90°C) on mechanical properties of CS gel, were analyzed. CS gelled at S=5,74% , while SL did not gel below S< 7,41%. The gels obtained were aggregated and the more cohesive and hard ones were obtained at high T and low S and at high S and low T, at pH = 6,5. It was pointed out that the droplet diameter ($D_{4,3}$), creaming and coalescence processes of CS emulsions decreased when S increased and for S>2,5% emulsions became stable. Both emulsions and gels prepared with CS had enhanced stability and textural properties than those prepared with SL.

Palabras claves: cosecado, proteínas de suero, carragenina, geles, emulsiones

Key words: co-dried, whey protein, carrageenan, gel, emulsion.

INTRODUCCION

El uso de mezclas de proteínas y polisacáridos ofrece muchas veces la ventaja de su interacción sinérgica que permite controlar y mejorar las propiedades texturales y la vida útil de muchos productos. Este fenómeno es en algunos casos debido a incompatibilidad termodinámica, comúnmente encontrado en soluciones de polisacáridos y proteínas a pH por encima del pH isoelectrico de la proteína y es la principal causa de los efectos sinérgicos (Baeza y otros, 2003). Las β -lactoglobulina (β -lg), uno de los mayores componentes de las proteínas de suero lácteo (SL), es el agente gelificante primario y domina el comportamiento térmico de las proteínas totales de SL. El efecto del pH sobre geles de β -lg ha sido previamente estudiado utilizando medidas viscoelásticas (Standing and Hermanson, 1991) y medidas texturales con grandes deformaciones (Standing and Hermansson, 1990; Baeza and Pilosof, 2001). Por otro lado los polisacáridos incorporados en emulsiones, modifican el comportamiento reológico de las mismas, pudiendo actuar como estabilizantes o desestabilizantes dependiendo del tipo de polisacárido, de la concentración utilizada y del tamaño molecular del mismo (Dickinson and Golding, 1997; Ibanoglu, 2002, Santiago y otros, 2002). Todos estos aspectos continúan teniendo interés para la industria de aditivos alimentarios, ya que son pocos los trabajos encontrados sobre interacción entre proteínas de SL comercial y polisacáridos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades texturales de los geles y la estabilidad de las emulsiones formuladas con co-secado (CS) de suero lácteo (SL) y λ -Carragenina obtenido en planta piloto.

MATERIALES Y METODOS

Materiales: Proteínas de suero lácteo (SL) (Milkaut S.A., Argentina), λ -Carragenina (λ -C) (Degussa Health and Nutrition Argentina S.A.) y una mezcla co-secada de SL/ λ -C (CS) (relación 8:1) obtenida en un secadero Spray Niro Atomizer de escala Planta Piloto, acorde a experiencias previas. El CS contenía 67,34 % proteína (base tal cual); 8,08 % de humedad y pH 6,5.

Métodos

1. Evaluación de parámetros texturales de geles

Se seleccionó un diseño en red de Doehlert para tres factores: pH, concentración de sólidos (S) y temperatura de calentamiento (T) (Tabla 1). Se utilizó un modelo polinómico cuadrático para describir las respuestas (dureza (D), cohesividad (C) y elasticidad (E)).

Para preparar los geles, se calentaron las dispersiones de CS en tubos de vidrio (19 mm de diámetro) a T constante en el rango de estudio (75-90 °C) durante 30 min. y luego se almacenaron a 5 °C durante toda la noche. Se realizó un test de compresión al 30 % de su altura original a una velocidad de compresión de 0,5 mm/s (probeta cilíndrica P/36 R 36 mm de diám., Stable Micro System TA-XT2i Texture Analyzer), por duplicado.

Tabla 1: Valores reales y codificados (entre paréntesis) de las variables estudiadas

Variab les	Valores reales y (codificados)
T (°C)	75 (-1); 78,75 (-0.5); 82,5 (0); 86,25 (0.5); 90 (1)
S (p/p%)	12 (-0,866); 13,33 (-0,5774); 14,66 (-0,2887); 16 (0); 17,33 (0,2887); 18,66 (0,5774); 20 (0,866)
pH	6 (-0.8165); 6.5 (0); 7 (0.8165)

2. Evaluación de las propiedades de las emulsiones

Se prepararon emulsiones aceite en agua (E) al 50 % (aceite de maíz) con SL (0,37 %, 0,73 %, 1,10 %, 1,46 %, 1,83 %, 2,20 %, 2,56 % y 2,93 % p/p proteína) y con CS (0,5 a 4,0% (p/p) sólidos totales (S)) con igual contenido de proteína al de las E con SL en Ultra Turrax (UT), 3 min. a 25.000 rpm. Se determinó el tamaño promedio y la distribución de tamaño de gotas de la emulsión con y sin SDS 0,1 % en equipo Coulter LS-230. La caracterización óptica se realizó utilizando un Analizador de Barrido Vertical (QuickSCAN). Los resultados se expresaron comparándolos con un perfil de referencia (t=0 min.) produciéndose los perfiles de Δ Transmisión y Δ Back-scattering. Además se evaluó el esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) (0,1–100 [s⁻¹]) de las E a 20 ± 0,1 °C, durante 5 min. de forma ascendente y descendente (Reómetro Haake Rheostress 600 Haake K15, geometría plato-plato de 60 mm de diámetro).

RESULTADOS Y DISCUSION

Respecto de las propiedades de gelificación se encontró que, a pH 6,5, el CS gelifica a S=5,74% mientras que el SL no gelifica para S<7,41%. Estos resultados estarían relacionados con la existencia de incompatibilidad termodinámica entre la proteína y el polisacárido (Baeza and Pilosof, 2001). En la Tabla 2 se puede apreciar que los factores

más importantes que afectan D y C de los geles son T y S. Los signos positivos de los coeficientes lineales de T y S indican que cuando estas variables aumentan, aumenta D y C del gel. Todos los términos cuadráticos son significativos para D en tanto que el pH es solo significativo para C. Los valores grandes y negativos de los términos de interacción de TxpH y TxS sugieren efectos antagónicos entre estas variables. También existiría un efecto antagónico entre S y pH para C, mientras que la interacción entre estas variables sería sinérgica para D. Se representaron los gráficos de contorno para D y C en función de T y S, para pH 6.5, dado que el pH es la variable de menor importancia (Figuras 1 y 2).

Tabla 2: Coeficientes estimados por la regresión lineal múltiple

	Coef Lineales			Cuadráticos			Interacción			R ²	
	K	T	S	pH	T ²	S ²	pH ²	TxS	TxpH		SxpH
D	44,6	22,9	7,08	4,81*	24,88	41,13	56,75	-92,44	-161,36	56,48	0,86
C	0,713	0,042	0,035	-0,0075	(-0,0018)	(0,0072)	-0,0161	-0,176	-0,212	-0,149	0,88

significativas (p<0,05), () no significativas * significativas p <0,1

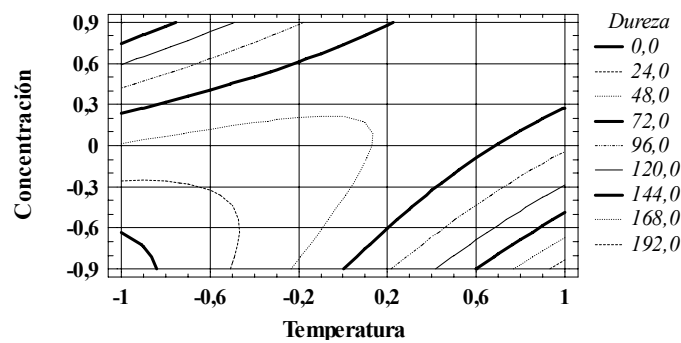


Figura 1. Gráfico de contorno de Dureza en función de T y S a pH=6,5

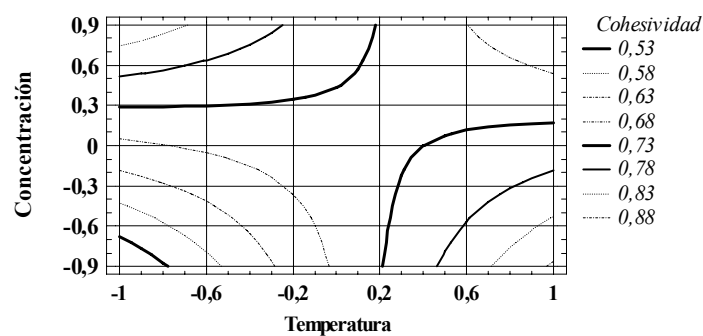


Figura 2. Gráfico de contorno de Cohesividad en función de T y S a pH=6,5

La Figura 1 muestra que la mayor dureza de los geles se obtiene tanto a alta S y baja T, como a baja S y alta T, mientras que los geles de menor D se obtienen a baja S y baja T alta S y alta T. En la Figura 2 se observa que la máxima C se obtiene para alta T y baja S, mientras que una baja C se consigue a muy baja S y T o muy alta S y T. La dureza y la

cohesividad están determinadas principalmente por T y S. Los valores de C obtenidos se encuentran en el orden de los valores obtenidos por Baeza y otros (2003) para geles de β -lactoglobulina+alginate de propilenglicol (β -lg+PGA), sin embargo los valores de D fueron muy superiores a los encontrados por estos autores. Los geles mas duros y cohesivos se obtuvieron a $T > 80 \text{ }^\circ\text{C}$ y baja S, resultante del alto nivel de desnaturalización de las proteínas del suero lácteo involucradas en la estructura del gel, resultados acordes con los obtenidos por Baeza y otros (2003), quienes encontraron un gran cambio en los valores de E y C para los geles calentados por encima de la temperatura de desnaturalización (T_d) de la β -lg ($75,4^\circ\text{C}$) y de β -lg+PGA ($77,9 \text{ }^\circ\text{C}$). Estos resultados se atribuyeron a la gran desnaturalización de la (β -lg) para $T > 76 \text{ }^\circ\text{C}$, lo que contribuiría a la formación de enlaces covalentes en la estructura del gel. Si bien, el efecto de las variables no resultó significativo sobre la elasticidad, esta respuesta tuvo valores altos y similares a los obtenidos para los mismos geles de β -lg+PGA calentados entre 80 y $88 \text{ }^\circ\text{C}$, lo cual podría estar asociado a estructuras más flexibles. En cuanto a las propiedades de la emulsiones se encontró que el diámetro de gota $D_{4,3}$ de las E con SL (Figura 3) disminuyó con el aumento de S y aún más significativamente en las emulsiones con CS. En ambos casos, el agregado de SDS a las E no produjo cambios en $D_{4,3}$ (datos no presentados). Las E con SL (Tabla 3) presentaron comportamiento newtoniano para todo el rango de S, variando muy poco la viscosidad, mientras que las E con CS (Tabla 4) presentaron comportamiento newtoniano a baja S y a partir de una $S \geq 1,5 \%$ comportamiento pseudoplástico y una ligera tixotropía para $S \geq 2,5 \%$.

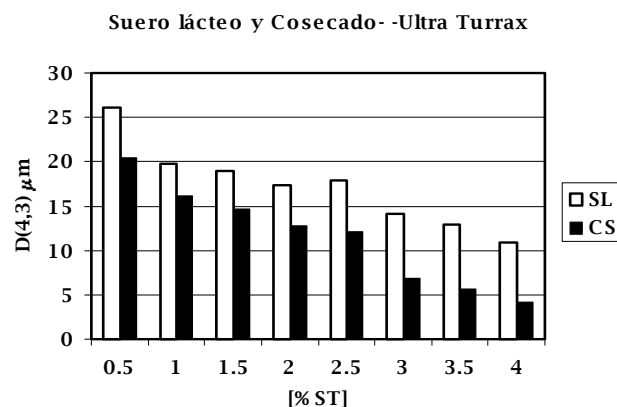


Figura 3. Medida del $D_{4,3}$ sin SDS de emulsiones o/w con SL y con CS a igual contenido de proteína

En la Figura 4 se muestra el cremado para las E con SL, el cual disminuyó con el incremento S, y la coalescencia, que no mostró relación con S. En las E con CS (Figura 5) se observó cremado, el cual disminuyó con S, y coalescencia, que al igual que con el

SL, no se modificó con la misma. Ambos comportamientos se presentaron hasta una concentración de 2,5 % S, lo cual coincide con la aparición de tixotropía para el caso del CS. El comportamiento pseudoplástico y la tixotropía observada en las E con CS podría ser debido a la presencia de flóculos formados por un mecanismo de depleción de la λ -C (İbanoğlu, 2002; Santiago y otros 2002, Dickinson and Golding, 1997), estructuras que se rompen con la aplicación del esfuerzo de corte

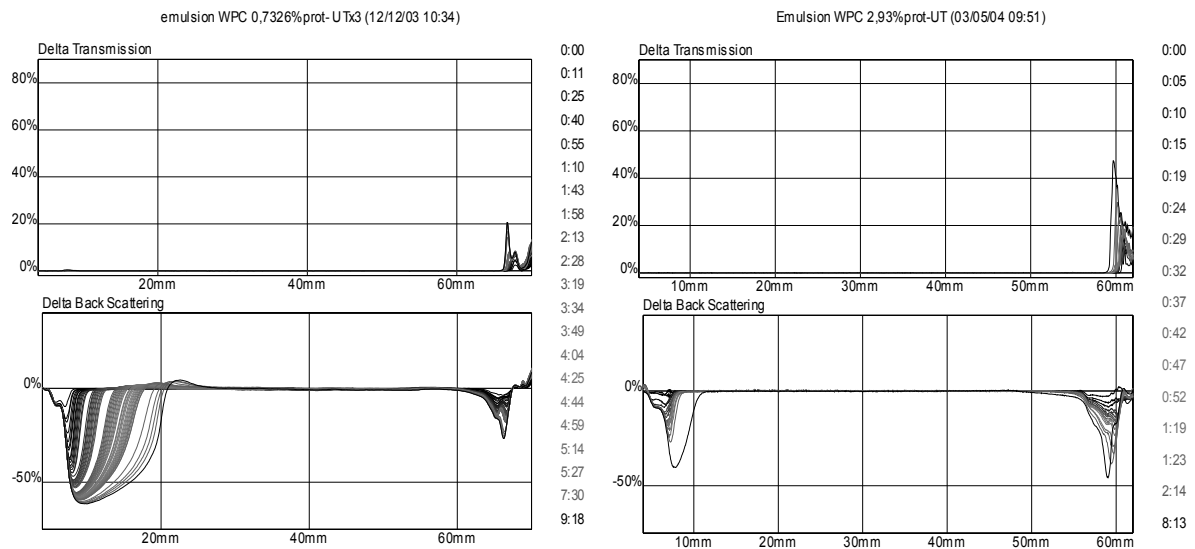


Figura 4. Perfiles de Δ transmisión y de Δ back-scattering para las emulsiones con SL 0,73 % y 2,93 % p/p de proteína.

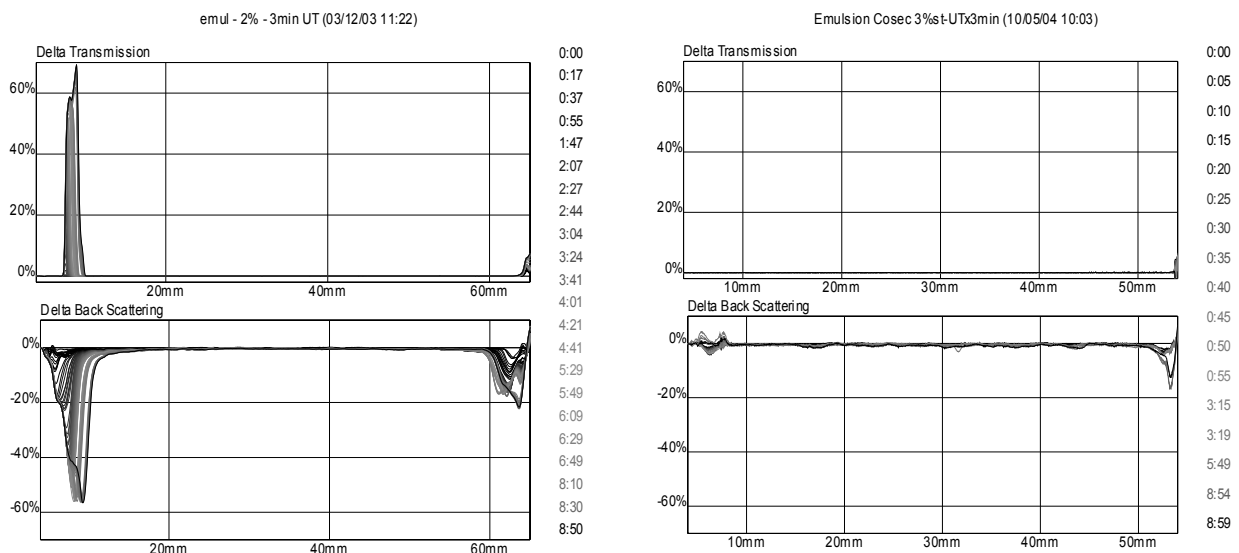


Figura 5. Perfiles de Δ transmisión y de Δ back-scattering para la emulsiones con CS 2,0 % y 3,0 % p/p st (1,46 % y 2,20 % proteína).

CONCLUSION

Los geles obtenidos en todas las condiciones fueron del tipo agregados. Los preparados con CS gelifican a menor S que los preparados con el SL. La modificación de T y S nos

permiten obtener un amplio rango de propiedades texturales de los geles obtenidos con el CS. Los geles con mayor carácter sólido se consiguen a mayor T, menor S y mayor pH. En las E tanto con SL como con CS, el $D_{4,3}$ disminuyó significativamente con el incremento de S. Las E con SL presentaron signos de inestabilidad en todo el rango de S, en cambio en las E con CS los mismos fueron menos significativos, sugiriendo que estructuras agregadas y/o floculadas así como el menor $D_{4,3}$ logrado con el CS estarían estabilizando las E al cremado. Tanto las emulsiones como los geles obtenidos con CS resultaron tener mejores propiedades de estabilidad y textura que los obtenidos con SL respectivamente. Los resultados indican que los productos cosecados en base a proteína y polisacárido tienen una potencial aplicación como ingredientes en alimentos.

BIBLIOGRAFIA

Baeza, R., Gugliotta, L. and Pilosof, A. M. (2003) Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: Kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 81-93.

Baeza, R., Pilosof, A. M. R. 2001. Mixed biopolymer gels systems of β -lactoglobulin and non-gelling gums. *Food Colloids-Fundamentals of Formulation*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 392-403.

Dickinson, E. and Golding, M. (1997) Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 11, 1, 13 – 18.

İbanoğlu, E. (2002): Rheological behaviour of whey protein stabilized emulsions in the presence of gum Arabic. *Journal of Food Engineering*, 52, 273 - 277.

Santiago, L.G., Gonzalez, R.J., Fillery-Travis, A., Robins, M., Bonaldo, A.G, Carrara, C. (2002): The influence of Xanthan and λ -Carrageenan on the creaming and flocculation of an oil-in-water emulsion containing soy protein. *Brazilian J Chem. Eng.*, 19, N°4, 411-417.

Standing, M and Hermanson, A M (1990) Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids* 4,2 .121-135.

Standing, M. and Hermanson, A. (1991) Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 5, 4, 339-352.

AGRADECIMIENTOS: Se agradece los fondos del PROGRAMA CAI+D 2000-2004 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL, Agencia Nacional de Promoción científica y Tecnológica, Universidad de Buenos Aires y CONICET. Se agradece también al Programa iberoamericano CYTED por su apoyo a través del proyecto XI .17 y A.1.2.

EFFECTO DEL AGREGADO DE AISLADO DE SOJA SOBRE LAS PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CÁRNICAS.

RODRIGUEZ, María P. GONZÁLEZ, Rolando J, BONALDO, Adriana G. SANTIAGO, Liliana G.

Instituto de Tecnología de Alimentos – Facultad de Ingeniería Química – U.N.L.- C.C.:266 (3000) Santa Fe .Tel/Fax: 0342-4571148 lsanti@fiquis.unl.edu.ar

RESUMEN

El uso de aislados de soja (AS) en emulsiones cárnicas es una práctica generalizada, aunque existen discrepancias acerca de la función que cumplen los mismos. En este trabajo se analizó el efecto del agregado de AS con diferentes características sobre las propiedades mecánicas de geles obtenidos a base de carne, a través de un ensayo de compresión realizado con un analizador de textura TA-XT2i.

Se utilizaron tres AS, uno comercial (AC) y dos obtenidos en planta piloto con distintos tratamientos (estandar y ácido). Se prepararon distintos geles: fórmula 1 (pasta de carne y sales); fórmula 2 (fórmula 1 + AS); fórmula 3 (fórmula 2 + grasa y tejido conectivo) y fórmula 4 (fórmula 3 + almidón). La dilución de las proteínas cárnicas con el agregado de los ingredientes provoca una caída en la resistencia del gel y el efecto de cada aislado difiere según sea la composición de la fórmula.

Palabras claves: emulsiones cárnicas, aislados de soja, textura.

ABSTRACT

Although there are some discrepancies about which is the roll of soy proteins into the meat emulsion structure, the employment of soy protein isolates (AS) in meat emulsion is widely used. The addition of AS having different characteristics on mechanical properties of meat gels were evaluated, using the TA-XT2i texture analyser.

Three AS were used, a commercial one (AC) and two obtained at pilot plant with different treatment (standard and acid). Gels with different composition were prepared: formula 1 (meat butter + salts); formula 2 (formula 1+ AS); formula 3 (formula 3+grease+ connective tissue) and formula 4 (formula 3 + starch). The addition of the different ingredients to the meat butter produces a decrease in the gel resistance and the effect of each soy protein isolates depend on the formulas composition.

Key words: meat emulsion, soy protein isolate, texture.

INTRODUCCIÓN

El uso de aislados de soja (AS) en emulsiones cárnicas es una práctica generalizada aunque existen discrepancias acerca de la función que cumplen los mismos en la estructura de emulsiones tipo “frankfurter”.

Varios investigadores han indicado que no es posible predecir el potencial de gelificación de un sistema formado por una mezcla de proteínas basándose solo en las propiedades de gelificación de cada uno de sus componentes, ya que el efecto de la mezcla no siempre es aditivo, como podría suponerse (Lin y col., 2000; Mc Cord y col., 1998).

Por otro lado se ha demostrado la interacción entre ciertas fracciones de la proteína de soja y las fracciones solubles de la carne (miosina) durante el calentamiento de estos sistemas (Peng and Nielsen, 1986; Feng y Xiong, 2003).

Existe escasa información acerca de la incidencia del agregado de proteínas de soja a las carnes en sistemas que contengan grasa y almidón y de su relación con las propiedades texturales y/o mecánicas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de agregado de AS con diferentes características sobre las propiedades mecánicas de pastas cárnicas gelificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron ingredientes que normalmente integran las formulaciones de salchichas tipo “frankfurter”. La carne magra comercial (corte tipo “pulpa”) fue adquirida en una carnicería local, mientras que las sales (polifosfato sodico y NaCl), la fracción grasa más tejido conectivo, el almidón y el aislado de soja comercial (AC) fueron provistas por un frigorífico de la ciudad de Rafaela.

Los aislados de soja estandar (AE) y ácido (AA) fueron obtenidos en planta piloto utilizando el procedimiento normal, modificado por González y col. (1995).

Los aislados fueron caracterizados mediante la determinación de la composición centesimal; del grado de desnaturalización (entalpía de desnaturalización determinada por calorimetría diferencial de barrido o DSC); la solubilidad en agua (S) y la absorción de agua (AbA) y ambas (S y AbA) reemplazando el agua por una solución salina 5% cloruro de sodio + 0,7% polifosfato sódico + 0,3% azida sódica.

Preparación de las pastas gelificadas

Se prepararon cuatro tipos de fórmulas procediendo de la siguiente manera: la fórmula nº 1 se preparó con carne mas la adición de sales (ClNa + polifosfato sodico); la fórmula nº 2 (fórmula 1 + aislado de soja); la fórmula 3 (fórmula 2 + grasa y tejido conectivo) y la fórmula 4 (fórmula 3 + almidón de mandioca). La proporción de los distintos ingredientes en las fórmulas fue constante (ver tabla1), de esta forma los cambios en la resistencia a la compresión de las pastas gelificadas podrán ser atribuidos al tipo de aislado utilizado.

Tabla 1: Proporción de los ingredientes utilizados para preparar las cuatro fórmulas.

Ingrediente	%
Carne magra	45
Sales	2
Agua	22
Mezcla de grasa + tejido conectivo	23,5
Aislado soja	1.5
Almidón de mandioca	6

Las distintas mezclas fueron preparadas en una picadora Moulinex, manteniendo la temperatura menor a 10 °C durante toda la preparación. La pasta obtenida fue colocada en un cilindro metálico (con tapa a rosca), de dimensiones similares a una salchicha y luego fue llenado y cerrado herméticamente. Cada muestra fue sometida a un proceso de calentamiento para provocar la gelificación y luego almacenada en heladera a 4 °C, durante 24 hs antes de la evaluación mecánica. El calentamiento se realizó sumergiendo el cilindro en un baño agua termostatzada a 85 °C. El tiempo de tratamiento se prolongó por 30 minutos, una vez que la temperatura alcanzó 80 °C, en el centro de la muestra, (requiriendo un tiempo total aproximado de 45 minutos). En todos los casos los pesos de las muestras sometidas a tratamientos térmicos fueron controlados antes y después para garantizar que no se hayan producido cambios de concentración. Cada fórmula se preparó por duplicado y se realizó el Análisis de Variancia (ANOVA) para determinar el grado de significación estadística de las diferencias entre muestras.

Ensayos mecánicos

Se utilizó un analizador de textura TA-XT2i. Las muestras de pastas gelificadas se cortaron en forma axial, obteniéndose trozos cilíndricos de 20 mm de longitud que se

ubicaron en posición uniaxial y centrados debajo de la placa de compresión, sin lubricar las superficies de contacto para su evaluación. La medida se realizó por compresión. Se utilizó una celda de carga de 25 kg \pm 1 g de capacidad. La velocidad de deformación (velocidad del cabezal) fue de 3.3 mm/s y se fijó una deformación máxima de 70% de la altura de la muestra. Se determinó el valor máximo de la fuerza en el momento de la ruptura en newton (N). Todas las muestras se ensayaron a una temperatura de 15 \pm 1°C por quintuplicado, informándose los respectivos valores medios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 2 muestra la composición y las características de cada aislado. Las diferencias que se observan son las siguientes: el menor contenido en proteínas de AC, se adjudica a que la etapa de lavado del precipitado en planta piloto es más eficiente que a escala industrial y el menor contenido de cenizas en AA porque en este caso no se realiza la neutralización. La calorimetría demuestra que AE presenta sus proteínas prácticamente en estado nativo, mientras que en AC y AA están desnaturalizadas. Esto queda confirmado por los valores de absorción de agua (AbA) y solubilidad (S), AE es la de mayor S y menor AbA, mientras que AC es la menos soluble y presenta la mayor AbA, lo cual es coherente con otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

Tabla 2: Características de los aislados de soja utilizados en las fórmulas: composición, grado de desnaturalización (\square H), solubilidad y absorción de agua (ambas en solución salina).

Aislado	Humedad (%)	Proteína (%)*	Cenizas (%)*	Abs. agua (g/g)	Solubilidad (%)	\square H (J/g)
AE	8,16	93,50	4,02	2,6	88,1	16,7
AA	6,71	91,80	2,50	4,5	45,1	-
AC	7,93	88,10	4,22	7,2	17,8	-

*base seca

En la figura 1 se muestran los valores de la resistencia a la compresión (fuerza de rotura) de las 4 fórmulas analizadas (con el resultado del ANOVA). La primera observación es que a medida que la dilución de la carne aumenta, esto provoca una caída en la resistencia de la pasta gelificada. El ANOVA indica que la fórmula 1 (carne sola) es significativamente más resistente ($p < 0,05$) a la compresión, que las otras tres y para cada uno de los aislados. Esto confirma que son las proteínas de carne las responsables de la estructura de la pasta gelificada. El debilitamiento de la estructura formada por las proteínas cárnicas, que causa el agregado de AS, ha sido ya demostrado por otros

autores (Peng y Nielsen, 1986; McCord y col., 1998; Peng y Nielsen, 1986; Feng y Xiong, 2003). No obstante se puede observar también en la figura 1, que el efecto de cada aislado difiere según sea la composición de la pasta.

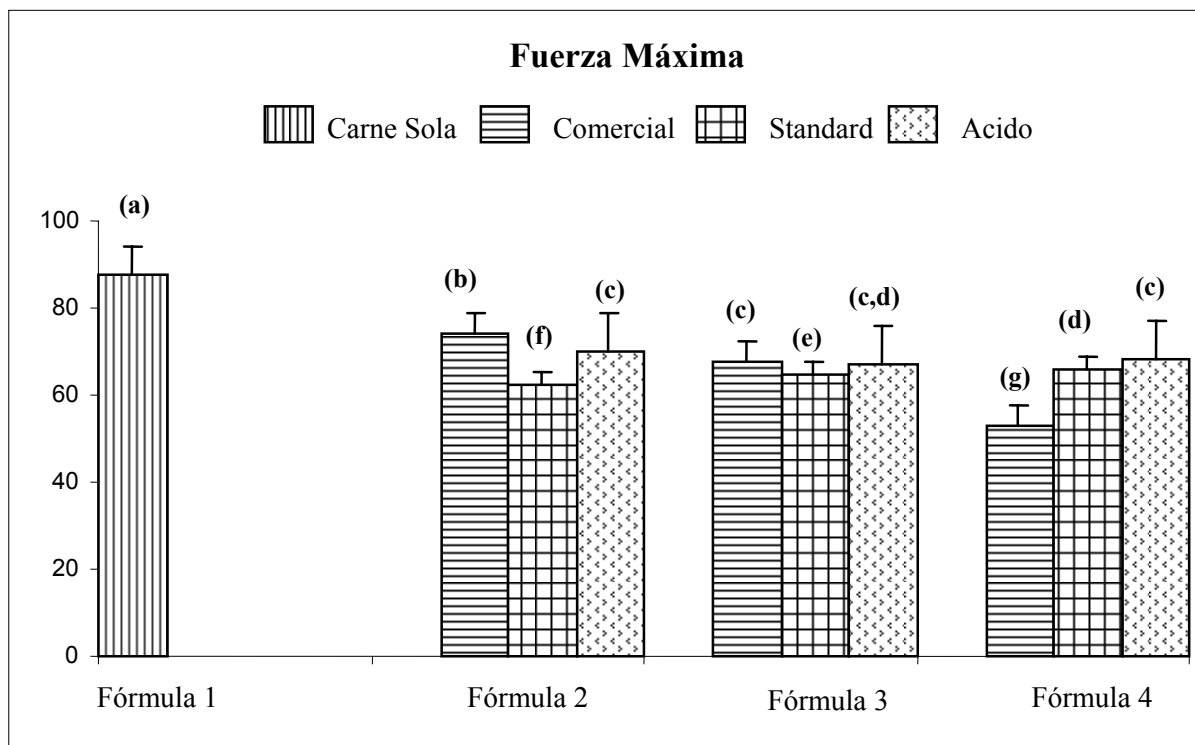


Figura 1: Resistencia a la compresión: valores promedios de la fuerza de ruptura de cada fórmula y para cada tipo de aislado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La bibliografía presenta resultados contradictorios con respecto al efecto de la adición de aislado de soja a productos cárnicos. Por un lado, algunos investigadores (Peng y Nielsen, 1986; McCord y col., 1998) demostraron que existe una reducción en la fuerza del gel debido al agregado de aislado de soja. Ellos observaron que la interacción entre la β -conglucina (fracción de la 7S) y la miosina disminuía la agregación de la cadena pesada de miosina durante el proceso de calentamiento. Otros (López Díaz y col., 2003), sin embargo encontraron el efecto contrario cuando se prepararon geles que contenían glicinina (11S) y proteína cárnica soluble.

Comparando el efecto del agregado de soja a la fórmula 1 (carne + sales) se observa que la resistencia cae mas con el AE, mientras que el AC es el que provoca la menor caída de la resistencia. A medida que se van agregando los otros componentes se observa que la resistencia de la fórmula con AE aumenta, mientras que la resistencia de la fórmula con AC disminuye hasta alcanzar el menor valor, luego del agregado de almidón. Es

interesante destacar que la resistencia de la fórmula con AA, prácticamente no es afectada por el agregado de los otros componentes (fórmula 3 y fórmula 4).

Estos resultados sugieren que el efecto del agregado de soja estaría relacionado por un lado con la absorción de agua (AbA) que cada aislado presenta y por otro a las posibles interacciones entre miosina y fracciones proteicas de soja. En el caso de la fórmula 2 la mayor resistencia de la pasta con AC se debería a su mayor AbA y además a un aporte adicional dado por la interacción entre la subunidad B (subunidad básica de la fracción AB de la 11S) y la miosina, durante el proceso de calentamiento (Feng y Xiong, 2003). Esta interacción solo se podría justificar para el AC y el AA, los cuales por estar totalmente desnaturalizados, la fracción AB puede estar dissociada, mientras que en el AE las fracciones 7S y 11S se encuentran prácticamente en estado nativo.

Cuando se agrega la grasa (fórmula 3), el efecto observado para cada aislado (disminución de la resistencia para el caso de AC, mantenimiento para el caso de AA y aumento para el caso de AE) podría atribuirse a las interacciones que se producirían entre las proteínas de soja y los componentes adicionados, en particular con la grasa y que contribuyen a la estructura de la fórmula gelificada. Estas interacciones serían más intensas cuanto mayor es la solubilidad del aislado de soja. Así, el AC (el menos soluble) es el que menos contribuye a la estructura, mientras que el AE (el más soluble) es que contribuye más. En el caso de AE, Santiago y col (2005), mostraron que la fracción proteica soluble se adsorbería en forma cooperativa con las proteínas de carne en el film interfacial y además que el proceso de estabilización de las emulsiones cárnicas se debería tanto a la microgelificación del film interfacial como también a la formación de un gel en la fase acuosa. Esta mayor contribución del AE a la estructura, permitiría compensar el efecto negativo de la menor AbA de este aislado. En el caso de los otros dos aislados (AC y AA), la contribución de ambos efectos reforzadores de la estructura (microgelificación del film interfacial y gelificación en la fase acuosa) depende en primer lugar de la formación del film interfacial (en el caso de AC y AA el film interfacial es muy inestable debido a una adsorción competitiva) y en segundo lugar de la disponibilidad de proteína soluble en la fase acuosa. El AA produciría interacciones de intensidad intermedia, pero suficiente para compensar el efecto del agregado de almidón.

Es interesante observar que el agregado de almidón no produce efectos positivos en la estructura, más aún, provocan una disminución de la resistencia del gel, lo cual pone en duda la idea de que al gelatinizar, colabora con la estructura. La adición de proteínas de soja, cuyas propiedades fisicoquímicas faciliten las interacciones con otros componentes, compensaría el deterioro provocado por el agregado de almidón.

CONCLUSIONES

La adición de aislados de soja en formulaciones tipo "frankfurter" produce un debilitamiento de la estructura formada por las proteínas cárnicas. Este debilitamiento se atenúa utilizando aislados con alta solubilidad, cuyas proteínas no solo puedan contribuir la estabilidad de la emulsión tanto a nivel del film interfacial, como a nivel de la fase acuosa gelificada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Litoral por el soporte financiero a través del Programa CAI+D 2000-2004.

BIBLIOGRAFIA

Feng J. and Xiong Y.L. (2003). Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins. *J. Food Sci.* 68: 803-809.

González J.R., Remondetto G.E., Coutaz R., Santiago L.G. and Bonaldo A.G. (1995). Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de aislados proteicos de soja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1: 77-91.

Lin S., Huff H.E. and Hsieh (2000). Texture and Chemical Characteristic of Soy Protein Meat Analog Extruded at High Moisture. *J. Food Sci.* 65 (2):264-269

Lopez-Diaz J.A., Rodriguez-Romero A., Hernandez-Santoyo A, Sotelo-Mundo R.R and Calderon de la Barca A.M. (2003). Effects of Soy Glicinin Addition on the Conformation and Gel Strength of Two Pork Myosin Types. *J. Food Sci.* 68 (9): 2724-2729

McCord A., Smyth A.B. and O'Neill, E.E. (1998). Heat-Induced Gelatin Properties of Salt-Soluble Muscle Proteins as Affected by Non-Meat Proteins. *J. Food Sci.* (63) 4: 580-582

Peng J.C And Nielsen S.S. (1986). Protein-Protein Interactions Between Soybean Beta-Conglycinin (B1-B6) And Myosin. *J. Food Sci.* 51 (3): 588-592

Rodríguez MP, Regue C, Bonaldo A, Carrara C, Santiago LG. (2005). Influence of thermal treatment and soy bean protein characteristics on meat emulsion stability. Enviada: *Food Science and Technology International*

Santiago L.G., Carrara C. and González R.J. (2005). Interaction of soy protein isolate and meat protein in a model emulsion system. Effect of emulsification order and of soy isolate used. *Food Science and Technology International* 11 (2): (in press).

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS TIPO MAILLARD SOBRE DIFERENTES SISTEMAS LIPÍDICOS

ROMERO, Ana M., DOVAL, Mirtha M., STURLA, Mario A. y JUDIS, María A.

Facultad de Agroindustrias- UNNE. Cdte. Fernández 755. Sáenz Peña, Chaco. Argentina. Te-Fax: 03732-420137. E-mail: judis@fai.unne.edu.ar

RESUMEN

La actividad antioxidante de compuestos tipo Maillard se evaluó mediante la formación de dienos conjugados (DC), el valor de peróxidos (VP) y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), sobre un sistema ácido linoleico puro y una emulsión ácido linoleico/agua. Para cada indicador se calculó el porcentaje de reducción de la peroxidación (%RP) con respecto a un control sin antioxidante. Para concentraciones del extracto antioxidante de 1% y 10% p/p, los %RP en la emulsión fueron 28% y 37% en DC, 68% y 75% para el PV, y 5% y 40% en TBARS; mientras que en el lípido puro alcanzaron valores de: 17% y 18 % en DC, 10% y 55 % en PV y 42% y 73% en TBARS. De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto ensayado fue efectivo en ambos sistemas utilizados, variando su efecto según la etapa de oxidación y el sistema modelo estudiado.

Palabras claves: antioxidantes; oxidación lipídica; productos tipo Maillard; ácido linoleico; emulsión linoleico/agua; malonaldehído.

ABSTRACT

The antioxidative activity of Maillard similar products was studied testing the conjugated dienes formation (CD), the peroxide value (PV), and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); in a pure linoleic acid system and in a linoleic oil- in water emulsion. For each indicator, a reduction percent of peroxidation (RP%) was calculated with a control containing no antioxidant being 0%. The RP% for the emulsion, at 1% and 10% w/w levels of antioxidant extract were 28 % and 37 % in CD formation, 68% and 75% in PV, and 5% and 40% in TBARS. While that for pure lipid the RP% reached the following values: 17% and 18 % in DC, 10% and 55 % in PV, and 42% and 73% in TBARS. The obtained results demonstrated that the extract assayed was effective on both models system and that the antioxidant effect was dependent of the analyzed oxidation step and the system composition.

Keywords: Antioxidants; lipid oxidation; Maillard similar products; linoleic acid;

INTRODUCCIÓN

En los últimos años y debido a la demanda de los consumidores por alimentos totalmente naturales, se llevaron a cabo varias investigaciones para evaluar la efectividad de antioxidantes naturales. Los antioxidantes son usados para prevenir o retardar la oxidación lipídica, y su actividad puede variar ampliamente dependiendo de la naturaleza de las sustancias en estudio y de la composición de los sistemas alimentarios (Wagner y otros, 2002).

Según Schwarz y otros (2000), los antioxidantes hidrofílicos, que son efectivos en sistemas lipídicos puros pueden no ser tan activos en emulsiones, mientras que en estos últimos sistemas, serían más efectivos para retardar la oxidación los antioxidantes lipofílicos. Además, un antioxidante en particular podría promover la formación de hidroperóxidos en una etapa temprana de la oxidación y al mismo tiempo inhibir la formación de los productos secundarios en una etapa posterior (Wettasinghe y otros, 1999). En la búsqueda de inhibidores naturales para la oxidación lipídica, diferentes estudios han demostrado la capacidad antioxidante de los productos de las reacciones de Maillard (PRMs). Las reacciones de Maillard que ocurren durante el procesado y almacenamiento de algunos alimentos e involucran azúcares reductores y aminoácidos o proteínas, son conocidas como responsables del amarronamiento (browning) no enzimático porque generan pigmentos conocidos como melanoidinas. (Jing y otros, 2002; Mastrocola y otros, 2000, Borrelli y otros, 2003). Además de los azúcares reductores, otros compuestos carbonílicos, incluyendo los productos de la peroxidación lipídica, son también capaces de reaccionar con grupos amino, formando compuestos macromoleculares marrones con propiedades similares a las melanoidinas.

Alaiz y otros en 1997 analizaron los productos de reacción entre lípidos oxidados y proteínas, que dieron en llamar OLARRP, sobre aceite de soja cruda, e informaron que la adición de estos OLARRP producían un descenso de las TBARS al final del ensayo. Si bien estos productos exhibían una buena actividad antioxidante, el antioxidante sintético usado como control (BHT) mostró ser más efectivo.

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados conduce a la formación de hidro y endoperóxidos, los que sufren fragmentación para dar un amplio rango de compuestos que incluyen alquenes, hidroxialquenes y malonaldehído (MAD) (Requena y otros, 1997). El MAD, uno de los principales productos finales de la oxidación de estos ácidos grasos, es un compuesto dicarbonílico que reacciona con grupos nucleófilos en las

proteínas para formar mono y di bases de Schiff, aniones enolatos y otras estructuras resonantes en una primera etapa. En una fase avanzada de la reacción se producen proteínas oligoméricas y pigmentos coloreados y/o fluorescentes que son generalmente usados como indicadores de la velocidad de la misma y del desarrollo de los productos análogos a los PRMs (Hidalgo y otros, 1993). (Fig. 1).

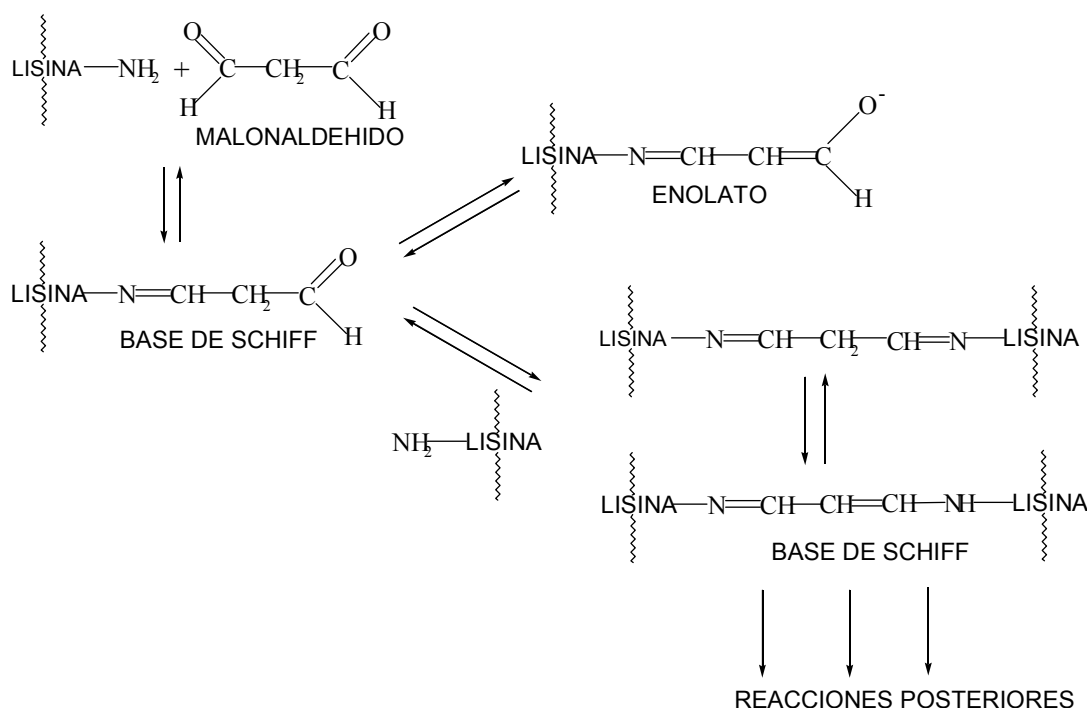


Figura 1 Formación de aductos de MAD-lisina en proteínas

Existen aún muy pocos estudios que reporten la actividad antioxidante de compuestos producidos entre lípidos oxidados y proteínas en emulsiones aceite/agua o en sistemas modelos alimentarios.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo del efecto antioxidante de productos solubles obtenidos de proteínas sarcoplasmáticas de carne bovina con malonaldehído (MAD) sometidos a calentamiento, sobre un sistema de ácido linoleico puro y una emulsión ácido linoleico/agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los PRMs: Una solución de proteínas sarcoplasmáticas de carne bovina, extraída según Wagner y Añón (1985), fue sometida a un tratamiento térmico de 80 °C durante 4 h con el aldehído malónico (MAD) preparado por hidrólisis ácida del 1,1,3,3-

tetraetoxipropano, en una proporción de 1: 3,5. El extracto seco de la fracción soluble de los MRPs formados, fue obtenido por concentración al vacío y utilizado en distintas concentraciones para los ensayos posteriores.

Evaluación de la actividad antioxidante de los PRMs: se realizó sobre los siguientes sistemas modelos: a) Ácido linoleico (ISN Biomedicals), fraccionado en recipientes abiertos con una relación superficie/peso de 1,56 cm²/g. b) Emulsión de ácido linoleico/agua preparada a partir de 0,285 g de ácido linoleico, 0,289 g de Tween 20 como surfactante y 50ml de buffer fosfato (pH 7.17). Los PRMs fueron adicionados en concentraciones de 0%, 1% y 10% p/p. La oxidación lipídica fue acelerada por calentamiento en estufa a 80 °C, durante 4 h en el caso del ácido puro y 5 h para la emulsión.

El seguimiento de la misma se efectuó midiendo la evolución de los siguientes parámetros: formación de Dienes Conjugados (DC) según la técnica de Aubourg y otros (1997) para el sistema lipídico puro y según la técnica de Yang y otros (2000) para la emulsión, los resultados fueron expresados en ml/mg de muestra. El Valor de Peróxidos (PV) fue determinado a través del método del tiocianato férrico adaptado de FIL-IDF 74A:1991, y expresado en mmol O₂/Kg de muestra; y la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron cuantificadas utilizando una solución de TBA-TCA (ácido tiobarbitúrico-ácido tricloroacético) expresándose los resultados en mg MAD/Kg de materia seca. El antioxidante sintético butirilhidroxianisol (BHA) al 0,01% fue usado como control.

La actividad antioxidante al tiempo final del ensayo fue calculada para cada indicador como porcentaje de reducción de la peroxidación (PR%) teniendo en cuenta un control sin antioxidante:

PR%=[(Valor del indicador de peroxidación sin antioxidante) - (Valor del indicador de peroxidación con antioxidante) / (Valor del indicador de peroxidación sin antioxidante)] x 100

Análisis estadístico: Para el análisis de los datos se utilizó el software STATGRAPHICS Plus Profesional Versión B 4.0 para Windows, realizando el análisis de la Varianza para la determinación de las diferencias significativas a p<0,01 entre factores y variables independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de reducción de la peroxidación se pueden apreciar en la tabla1.

En ella podemos notar que dependiendo del sistema modelo estudiado los mayores efectos inhibidores se produjeron a la mayor concentración adicionada, sobre la formación de sustancias reactivas al TBA en el ácido graso puro (72,92 %) y sobre la formación de hidroperóxidos (75,30 %) en la emulsión linoleico/agua.

Tabla 1. Porcentajes de reducción del producto de interacción **PROT-MAD** sobre los distintos modelos utilizados

Sistema modelo	Concentración	Dienos Conjugados (%)	Valor de Peróxido (%)	TBARS (%)
Acido linoleico	1 %	18,45	15,06	41,86
	10 %	19,13	56,95	72,92
	BHA	21,32	75,73	77,21
Emulsión Linol/Agua	1 %	27,78	68,14	5,14
	10 %	36,69	75,30	40,79

Esto nos estaría indicando que en la emulsión el extracto ejerció su mayor efecto como capturador de radicales (VP), mientras que en el lípido puro manifestó una mayor acción reductora. Es decir, en el lípido puro el equilibrio estaría desplazado hacia la forma no disociada del antioxidante estando su efecto ligado al poder reductor, mientras que en el caso de la emulsión (sistema hidrofílico) su forma disociada podría actuar como donadora de electrones capturando radicales libres (Madsen y otros, 2000).

Si analizamos la evolución de los distintos indicadores de la oxidación en el ácido linoleico puro y en la emulsión a través del tiempo (Fig 2 y 3), podemos apreciar que en ambos sistemas las muestras que contenían el extracto en estudio aumentaron la velocidad de formación de los dienos al inicio de cada ensayo, aunque la concentración máxima del alcanzada por el indicador disminuyó al final de los mismos. Este comportamiento coincide con lo informado hasta el momento por varios autores, quienes establecieron que las PRMS son poco efectivas sobre las especies de oxígeno reactivas responsables de la primera etapa de la oxidación lipídica.

Con respecto a la formación de hidroperóxidos los datos obtenidos muestran que el extracto preparado ejerció efecto inhibitorio durante toda la experiencia. En el sistema lipídico puro además de ser menos efectivo que en la emulsión, fue dependiente de la concentración utilizada, mostrando diferencias significativas entre el control y las dos concentraciones ensayadas. El efecto inhibitorio fue mayor en la emulsión aunque las dos

concentraciones ensayadas no mostraron diferencias significativas entre ellas. Es decir en medio acuoso la disolución del extracto favorece su poder atrapador de radicales libres por medio de la acción donadora de electrones.

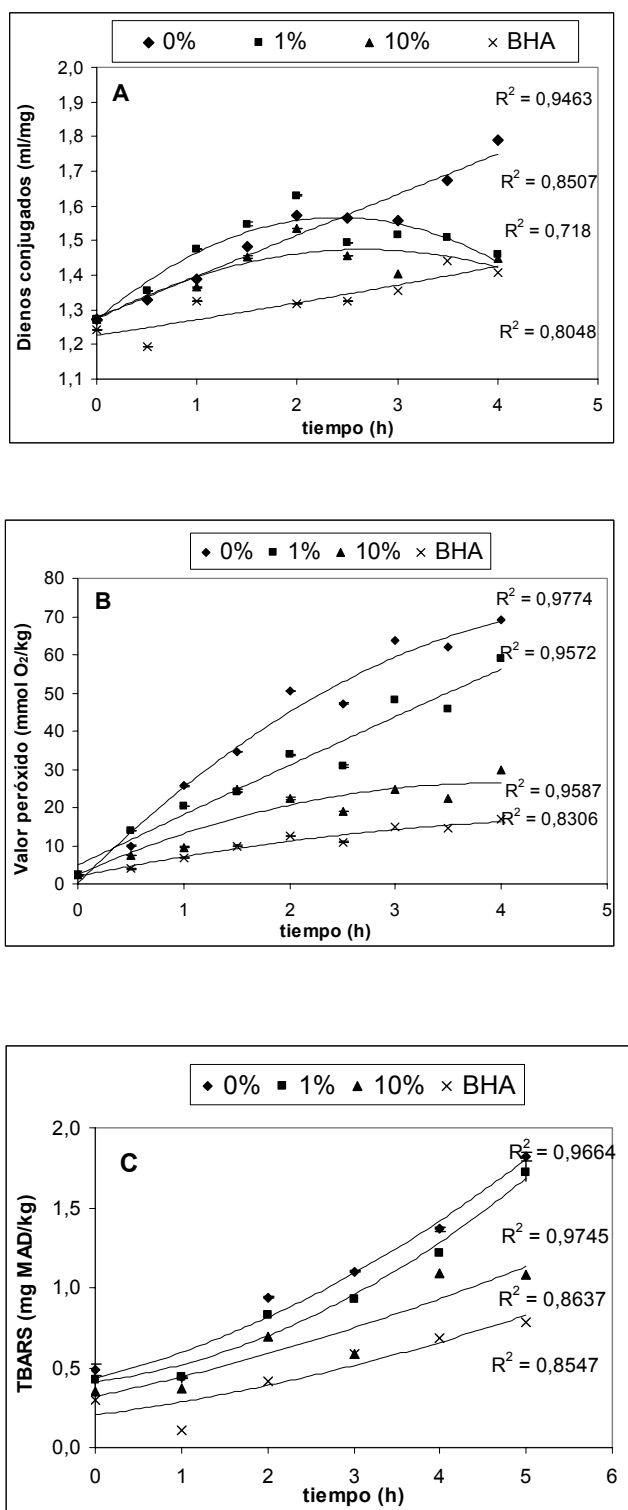


Figura 2. Efecto de la adición del extracto preparado (1% y 10%) sobre (A) Dienes conjugados (B) Valor de peróxido y (C) TBARS, en ácido linoleico a 80 °C

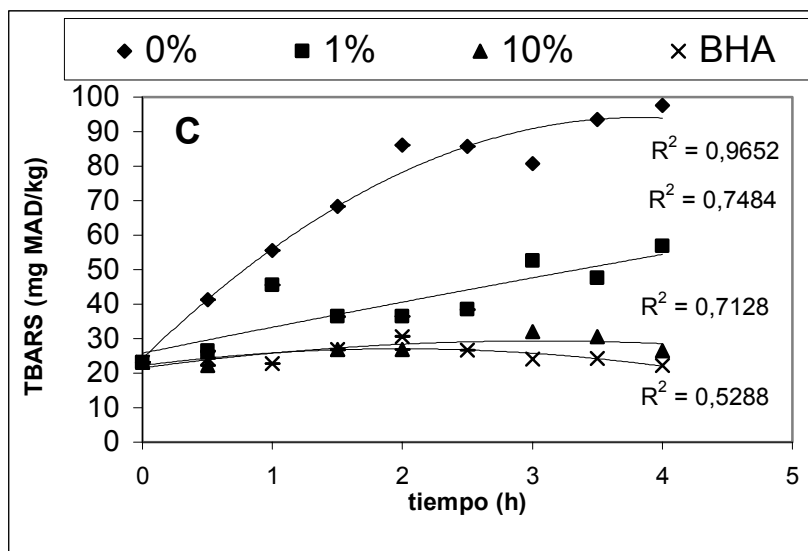
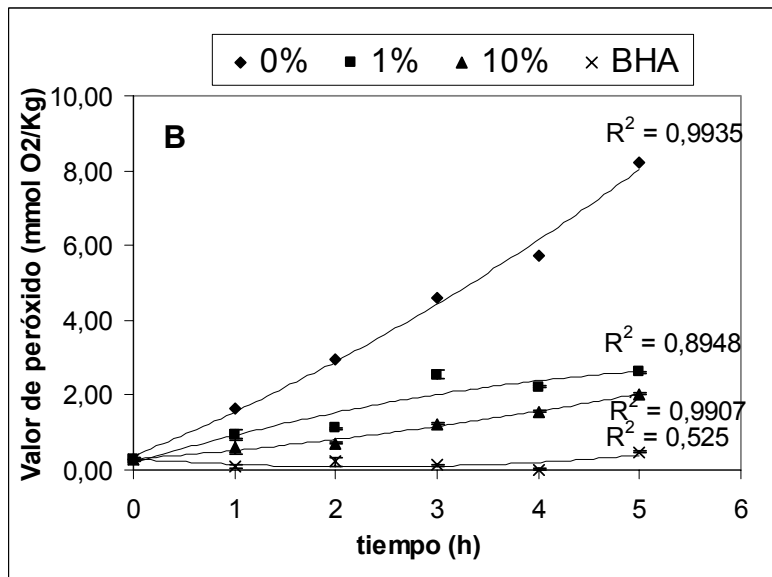
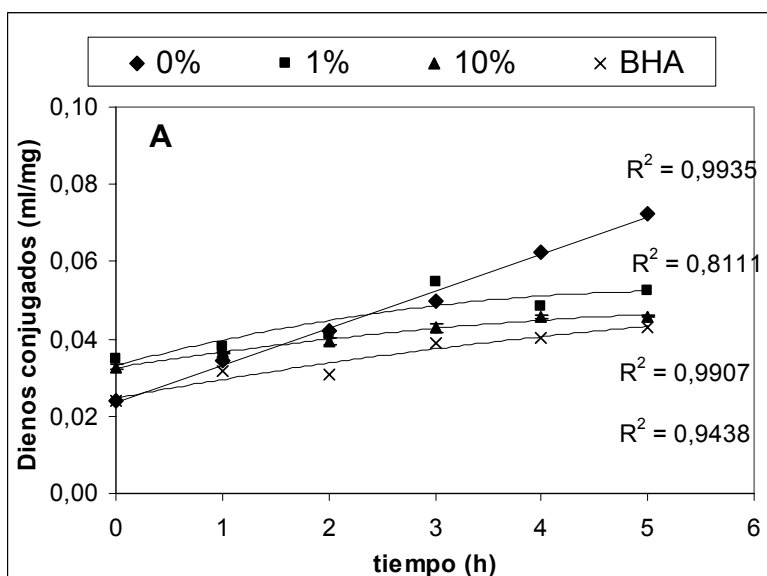


Figura 3. Efecto de la adición del extracto preparado (1% y 10%) sobre (A) Dienes conjugados (B) Valor de peróxido y (C) TBARS, en emulsión de ácido linoleico/agua



Si el análisis se realiza también, considerando la formación de sustancias reactivas al TBA a través del tiempo podemos observar que en los dos modelos lipídicos, las muestras que contenían antioxidante mantuvieron valores inferiores a los de la muestra sin aditivo, no encontrándose en el caso de la mayor concentración ensayada sobre el ácido graso puro, diferencias significativas entre éstas y el antioxidante sintético utilizado como control. Este efecto inhibitor de las sustancias reactivas al TBA estaría relacionado con el muy buen poder reductor que poseen los productos generados por la reacción de Maillard, ya que según lo informado por Wagner y otros (2002), los productos de reacción que contienen al menos un grupo hidroxilo en su estructura química podrían actuar como donadores de hidrógeno y de esa manera presentar efectos reductores. El medio lipídico puro favoreció en mayor medida dicho comportamiento aunque el mismo se pudo comprobar en ambos sistemas estudiados.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir, que el extracto ensayado fue efectivo en ambos sistemas utilizados, variando su efecto según la etapa de oxidación y el sistema modelo. En la emulsión el extracto ejerció su mayor efecto como capturador de radicales (VP), mientras que en el lípido puro manifestó una mayor acción reductora, esto nos estaría indicando que el antioxidante estudiado, actúa en su forma disociada o no disociada dependiendo del medio en que se encuentre.

BIBLIOGRAFIA

Alaiz, M., Hidalgo, F.J. & Zamora, R. (1997). Antioxidative activity of nonenzymatically browned proteins produced in oxidized lipid/proteins reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1365-1369.

Aubourg, S., Sotelo, C. & Gallardo, J. (1997). Quality Assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent Compounds. *Journal of Food Science*, 62 (2) 295-298 & 304.

Borrelli, R.C., Mennella, C., Barba, F. Russo, M, Russo, G.L., Krome, K., Erbesdobler, H.F. Faist, V. & Fogliano, V. (2003). Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1367-1374

Hidalgo, F.J & Zamora, R. (1993). Fluorescent pyrrole products from carbonyl-amine reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (22), 16190-16197.

- Jing, H. & Kitts, D.D. (2002).** Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1007-1015.
- Madsen, H.; Andersen, C.; Jorgensen, L. & Skibsted, L. (2000)** Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies. *European Food Research and Technology*. 211,240-246.
- Mastrocola, D., Munari, M., Cioroi, M. & Lerici, C.R. (2000).** Interaction between Maillard reaction products and lipid oxidation in Starch-based model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 684-690.
- Requena, J., Fu, M., Ahmed, M., Jenkins, A., Lyons, T, Baynes, J. & Thorpe, S. (1997).** Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidised human low-density lipoprotein. *Journal of Biochemistry*, 322, 317-325.
- Schwarz, K. ,Bertelsen, G., Nissen, L., Gardner, P., Heinonem, M., Hopia, A. ,Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L. & Tijburg L. (2001).** Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212, 319-328.
- Wagner, K.H., Derkits,S., Herr, M, Schuh, W. & Elmadfa, I. (2002).** Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. *Food Chemistry*, 78, 375-382.
- Wagner. J.R. & Añón, M.C. (1985).** Effect of freezing rate on the denaturation of miofibrillar proteins. *Journal of Food Technology* 20, 735-739.
- Wettasinghe, M. & Shahidi F. (1999).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chemistry*, 67, 399-414.
- Yang, J-H., Mau,J-L., Ko, P-T & Huang, L-C.(2000).** Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chemistry*, 71, 249-254.

MICROCAPSULAS DE ACEITE ESENCIAL DE OREGANO (*Origanum vulgare* sp hirtum) UN POTENCIAL ADITIVO ALIMENTARIO ANTIMICROBIANO NATURAL

GONZALEZ, Celia A (1), MOLINA, Ana C.(1); VITURRO, Carmen I.(1).; GROSSO, Carlos R. (2)

(1) Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Jujuy Gorriti 237. (4600) San Salvador de Jujuy – Argentina – celia_gonzalez@arnet.com.ar (2) Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato Cidade Universitaria – Barao Geraldo – Campinas SP – Brasil – grosso@fea.unicamp.br
Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Jujuy. Argentina Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. SP – Brasil

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es microencapsular aceite esencial (AE) de orégano (*Origanum vulgare*) cultivado en Jujuy, Argentina para utilizarlo vehiculizado como aditivo aromatizante antimicrobiano natural.

En estudios previos, se determinó experimentalmente que el AE de orégano (*Origanum vulgare* sp hirtum) posee actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de productos cárnicos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*).

Se encapsuló AE de orégano por secado por spray(SS) y por liofilización(L), utilizando goma arábiga(GA) y maltodextrina(M) como materiales de pared.

A las microcapsulas se les determinó: eficiencia de encapsulación, distribución y tamaño de partículas, morfología, humedad, aw y Tg, Se estudió la estabilidad a 10, 25 y 45°C durante 60 días. Sensorialmente se evaluó si la microencapsulación del AE influye en el sabor que ellos imparten a los alimentos.

Se concluye que: es posible formular como aditivo alimentario AE de orégano (*Origanum vulgare*) encapsulado con GA y por SS.

ABSTRACT

The aim of this research is to microencapsulate essential oil (EO) from *Origanum vulgare* grown in Jujuy, Argentina to be used as a natural antimicrobial flavoring additive.

Previous studies showed that Origanum EO has antimicrobial activity against pathogenic bacteria from meat products (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*).

Origanum EO was encapsulated by spray drying and freeze-drying using as coating material gum arabic and maltodextrin.

The microcapsules were tested on: flavor retention, particle size distribution and mean particle size, morphological characteristics, moisture content, water activity and Tg. Stability was studied at 10, 25 and 45°C during 60 days. Sensory evaluation was done to determine if encapsulation affects the flavor of EO in foods.

Spray dried encapsulated Origanum EO with gum arabic is an adequate food additive.

Palabras claves: Aditivo alimentario – aceite esencial – microencapsulación – actividad antimicrobiana – flavor

INTRODUCCIÓN

El orégano es bien conocido por su aroma, su sabor y su flavor. También posee actividad antimicrobiana.

Los componentes responsables del flavor son muy volátiles, reaccionan con otros componentes y son susceptibles al calor y la humedad.

La microencapsulación ofrece un método para proteger a los componentes responsables del flavor. En AEs previene degradación química o interacción con componentes incompatibles, permite incorporarlo en un sistema seco, moderar la liberación de olores y la pérdida de volátiles.

Las microcápsulas son formuladas para que el material encapsulado se libere de una manera gradual y controlada. Esta liberación depende del tipo y geometría de la microcápsula. De allí la necesidad de una buena elección de un método y condiciones de microencapsulación y del material de pared.

Medir las propiedades sensoriales y determinar la importancia de estas propiedades son una base para predecir la aceptación por el consumidor de un aditivo alimentario microencapsulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal de orégano, desarrollado en el Campo Experimental Severino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy, Argentina, fue recolectado a principios de diciembre de 2003.

El AE obtenido por hidrodestilación en un destilador a escala piloto fue secado con sulfato de sodio anhidro y guardado a 4°C en atmósfera de nitrógeno y en oscuridad hasta su uso.

Fue encapsulado por secado por spray y por liofilización, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared en un porcentaje de sólidos totales del 30% y con un 10% de AE. Se formó una emulsión con el material de pared disuelto en agua destilada y el AE en un homogeneizador Ultraturrax IKA T-18 basic. Esta emulsión fue secada por spray y por liofilización.

El spray dried utilizado fue un LAB – Plant modelo SD-05 Huddersfield, U.K., El liofilizador utilizado fue un EDWARDS de 4,5 L de capacidad, acoplado a una cámara de refrigeración VIRTIS. Los productos fueron guardados en freezer hasta su uso.

El AE total retenido en las microcapsulas se obtuvo por el método de hidrodestilación Clevenger. Los porcentajes de retención fueron calculados del volumen obtenido en cada destilación y la densidad del AE.

La estructura externa de las microcápsulas se evaluó por Microscopía de Barrido Electrónico en un Scanning Microscope JEOL, modelo JSM – 5800 LV, Tokio, Japón.

La distribución de tamaño y la medida del diámetro $D[v;0,5]$ de las microcápsulas obtenidas por secado por spray, se llevó a cabo en un Laser Scattering Spectrometer Master Sizer marca Malvern, modelo S-MAM 5005 Malvern Instrument, UK.

La humedad de los microencapsulados se determinó por el Método de Karl Fisher, utilizando un Analyzer KF 1000.

La a_w de los distintos microencapsulados se midió a 20 y 25 °C por triplicado. Para medir a_w a 20 °C se utilizó un AQUA LAB CX-2 Water Activity Measurement conectado a un Constant Temperature Circulator Polystat de Cole Parmer. Para medir a_w a 25 °C se utilizó un AQUA LAB Water Activity Meter Serie 3 TE. (Decagon Inc., Washington, EEUU)

La T_g se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un Equipo Mettler mod. 822, con Corridas dinámicas y a una Velocidad de barrido = 10°C/min

La estabilidad de los encapsulados obtenidos se evaluó durante 60 días como porcentaje remanente de la cantidad inicial presente a tiempo cero .de Timol y Carvacrol, responsables de la actividad antimicrobiana del AE y de p-cimeno, responsable de impartir sabor desagradable. Las muestras se colocaron a 10, 25 y 45°C. Cada 15 días se extrajo el AE de las microcapsulas con ciclohexano utilizando nonanal como standard interno y se analizó el extracto oleoso por CG.

Por Test de Diferencia de control de AEs encapsulados con goma arábica por secado por spray y por liofilización se evaluó si la encapsulación afecta el sabor característico que el AE libre imparte a una matriz alimentaria. Los resultados encontrados se analizaron por ANOVA y por Test de Dunnet.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se encuentran los valores de **propiedades físicas y fisicoquímicas de las microcapsulas**.

TABLA 1 Análisis físicos y químicos de aceites esenciales de *Origanum* sp.

Material de Pared y tipo de microencapsulado Propiedad	Goma Arábica		Maltodextrina
	<i>Secado por spray</i>	<i>Liofilizado</i>	<i>Secado por spray</i>
% Retención			
base húmeda	86 ± 0,86	78 ± 0.22	44 ± 0.03
base seca	94 ± 0,95	80 ± 0.23	46 ± 0.03
Diám.medio de part en .µm	22.0 ± 0.8		
Distrib.de tam. de part en µm.	3 – 90		
% Humedad	8.6 ± 0.59	2.90 ± 0.00	6.20 ± 0.30
Actividad de Agua			
a 25°C	0,513 ± 0,004	0.446 ± 0.002	0.338 ± 0.006
a 20°C	0,470 ± 0,003	0.349 ± 0.007	0.422 ± 0.019
Tg en °C	81,6	110	95

La liberación del agente activo en agua resultó controlada por un mecanismo combinado de difusión, hinchamiento y erosión de la matriz. Para la liberación total del componente activo es necesario el agregado de un secuestrante del ion calcio.

La menor **retención** alcanzada cuando los AE son encapsulados en maltodextrina, se atribuye a la escasa capacidad de formar film que tiene la maltodextrina. Las propiedades superiores de la goma arábica se deben a sus propiedades emulsificantes y a su tendencia a formar film en las interfases de las fases de la emulsión. La retención también es menor en microcapsulas obtenidas por liofilización.

La distribución del tamaño de partículas se puede considerar unimodal para todas las muestras. Los valores de tamaño de partículas ($D[v:0,5]$) y su distribución de tamaño son similares para los distintos AE encapsulados con el mismo material de pared.

Para los encapsulados con maltodextrina los tamaños y distribución de tamaños son menores.

Los valores de humedad son variables y mayores para los microencapsulados por secado por spray y con goma arábica como material de pared, esto indica la gran higroscopicidad de esos polvos.

Los valores de a_w son mayores en los encapsulados con goma arábica.

Las Tg muestran una buena estabilidad de los polvos e indican que son sólidos semicristalinos.

En las Figuras 1 y 2 se muestra la **morfología de las microcapsulas**.

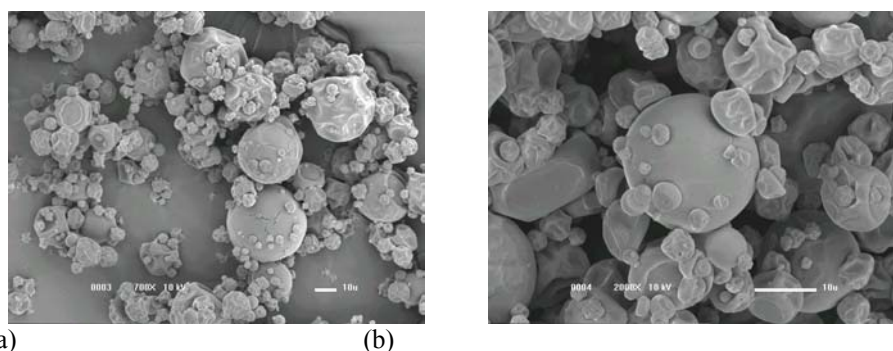


Figura 1: Morfología de microcapsulas de Oregano obtenidas con goma arábica como material de pared y secado por spray (a) 100 X , (b) 2000X

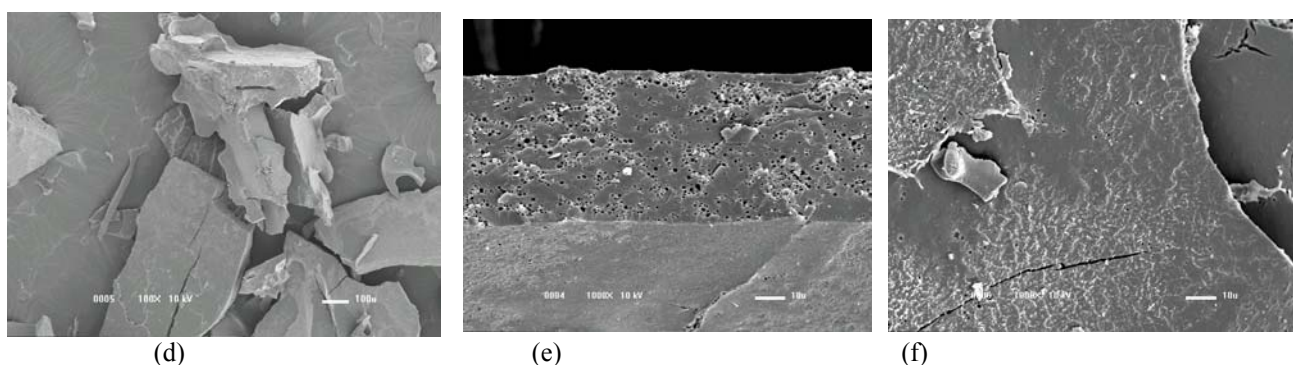


Figura 2: Morfología de microcapsulas de Oregano obtenidas con goma arábica como material de pared y liofilizado (d) 100 X ; (e) superficie y (f) espesor 1000 X

Las microcápsulas obtenidas por secado por spray con goma arábica son cuerpos esféricos. Tienen superficie externa libre de grietas y poros pero con hendiduras, lo que indica una buena protección del material encapsulado y explican su alto porcentaje de retención. Las microcápsulas con maltodextrina como material de pared, tienen superficies externas variadas, algunas son irregulares (ovales) con un tamaño de partícula menor.

La morfología de microcápsulas obtenidas por liofilización presenta forma de tejas. (Figura 2). Aquellas que se encapsularon con goma arábica como material de pared, tienen poros tanto en la superficie como en el espesor. Las microcápsulas encapsuladas con maltodextrina tienen estructura externa con menos poros tanto en la superficie como en el espesor y presentan grandes huecos. Esto explica su baja retención. La pérdida de volátiles puede haber ocurrido antes que la pared haya solidificado.

Los valores calculados de porcentajes remanentes de la cantidad inicial presente a tiempo cero para los componentes responsables de actividad antimicrobiana y sabor desagradable, para evaluar la **estabilidad de los polvos** a 10, 25 y 45°C durante 60 días, se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentajes remanentes de la cantidad inicial presente a tiempo cero de componentes de AE de Orégano encapsulado

COMPONENTE	AE de Oregano encapsulado en goma arábiga y secado por spray															
	10°C					25°C					45°C					
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	7	15	30	45	60
Timol	100	97	94	91	88	100	95	90	86	81	100	97	94	88	81	75
Terpinen-4-ol	100	100	100	100	100	100	92	85	77	69	100	100	99	98	98	97
p-cimeno	100	136	171	207	243	100	142	184	226	268	100	133	171	241	312	383
COMPONENTE	AE de Oregano encapsulado en goma arábiga y liofilizado															
	10°C					25°C					45°C					
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	7	15	30	45	60
Timol	100	95	89	84	78	100	89	78	68	57	100	98	96	91	87	83
Terpinen-4-ol	100	95	91	86	82	100	89	79	68	58	100	99	99	98	97	95
p-cimeno	100	154	207	261	314	100	64	49	55	82	100	106	113	127	140	154
COMPONENTE	AE de Oregano encapsulado en maltodextrina y secado por spray															
	10°C					25°C					45°C					
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	7	15	30	45	60
Timol	100	98	97	95	93	100	100	100	100	100	100	97	93	86	79	72
Terpinen-4-ol	100	96	93	89	85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
p-cimeno	100	109	117	126	135	100	136	172	208	245	100	122	148	196	244	292
COMPONENTE	AE de Oregano encapsulado en maltodextrina y liofilizado															
	10°C					25°C					45°C					
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	7	15	30	45	60
Timol	100	98	96	94	93	100	94	97	93	94	100	100	100	100	100	100
Terpinen-4-ol	100	100	100	100	100	100	98	89	83	78	100	100	100	100	100	100
p-cimeno	100	132	164	196	228	100	133	170	205	240	100	116	135	169	204	238

Se evidencia que la maltodextrina ofrece mayor estabilidad que la goma arábiga a los componentes del AE, debido a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo la retención de flavor por la goma arábiga es mayor. Los sistemas también son más estables a bajas temperaturas. El porcentaje remanente del terpinen-4-ol es mayor que el del timol en todos los casos estudiados y el porcentaje de p-cimeno aumenta en mayor proporción a 45°C.

En el **análisis sensorial** según el Test de Diferencia de Control, las muestras adicionadas con el AE encapsulado no difieren significativamente del control a un nivel de significancia del 5% .Algunos probadores hicieron voluntariamente la observación en la ficha sensorial, su preferencia por las muestras adicionadas con aceite esencial encapsulado, indicando que en tales muestras el sabor es mas suave que en las muestras preparadas con aceite esencial libre. Tal vez esto sea porque que el encapsulado enmascara productos off-flavor que se desarrollan en el aceite esencial libre.

Se puede inferir que los procesos de microencapsulación: secado por spray y liofilización aplicados a AE de Origanum sp, no afectan el sabor que ellos imparten a una matriz alimentaria

CONCLUSIONES

En general es posible utilizar el AE de orégano (*Origanum vulgare*) cultivado en Jujuy, Argentina, como aditivo aromatizante antimicrobiano natural. Es más eficiente encapsularlo con goma arábica y secado por spray. El polvo resulta ser un sólido semicristalino de color beige claro, muy higroscópico, con gran estabilidad a bajas temperaturas y a temperatura ambiente y conserva el sabor natural del orégano.

BIBLIOGRAFÍA

Leatherhead Publishing England. 2001. Microencapsulation of Food Ingredients. Edited by Per. Vilstrup.

Reineccius, G. 1989. Flavor Encapsulation, Food Review International, 5 (2); 147-176.

Meilgaard, Civille and Carr. 1999. Sensory Evaluation Techniques. 3rd Edition. CRC Press

Bertolini, A.C.; Siani, A. C. and Grosso, C. R.F. 2001. Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. J. Agric. Food Chem, 49; 780-785.

AGRADECIMIENTOS:

Al CAR Comité Académico Regional del Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. UNT, UNSA, UNJu, UNSE. Argentina

A la CAPES .Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Educação. Brasil

ESTABILIDAD Y REOLOGÍA DE MAYONESAS CON GOMAS ESPINA CORONA, XÁNTICA, GUAR Y GARROFÍN

RAMOS, Nelsi A. G. y FARÍAS María E.

Departamento de Tecnología. Universidad Nacional de Luján. Rutas 7 y 5 Luján. Provincia de Bs. As. TEL: 0.2323-423171. E-mail: nelsiran@unlu.edu.ar

RESUMEN

El uso de estabilizantes como las gomas Guar, Xántica y Garrofín en emulsiones es conocido, el alto costo de estos productos, lleva a la búsqueda de alternativas de origen nacional más económicas, como la goma espina corona. El objetivo fue evaluar la estabilidad y comportamiento reológico de las mayonesas elaboradas con Espina corona, Guar, Xántica, y Garrofín y mezclas (1:1) de Espina Corona-Xántica, Espina Corona-Guar y Espina Corona-Garrofín. La estabilidad se evaluó por la variación del área interfacial con un método turbidimétrico y por determinación de la viscosidad aparente.

No hubo variación significativa en el área interfacial con el cambio de hidrocoloide o concentración. Los resultados mostraron que a medida que aumenta la concentración de todos estos hidrocoloides se incrementa la viscosidad. Se observó sinergismo en las mezclas de Espina corona y X (1:1). Se concluye que la incorporación de Espina corona es tan efectiva como la Xántica y su efecto es superior al de Guar y Garrofín. Debido al sinergismo, la mezcla de Espina corona y Xántica es recomendable.

Palabras Claves: Hidrocoloides. Emulsiones. Estabilidad. Espina Corona. *Gleditsia amorphoides*

ABSTRACT

The use of hydrocolloids such as Guar gum, Xanthan gum and Locus Bean gum in emulsions is widely known. The high cost of imported products gets to search for a much cheaper alternative of national origin as Espina Corona gum. The objective was to evaluate the stability and rheological performance of mayonnaise with Espina Corona, Guar, Xanthan and Locus Bean gum and the mixtures (1:1) Espina Corona-Guar, Espina Corona-Xanthan and Espina Corona- Locus Bean gum. The stability was evaluated by the interfacial area change with a turbidimetric method and by the measurement of the apparent viscosity. The turbidimetric results demonstrated that there is not significant variation in the interfacial area with the change of hydrocolloid or concentration. The result

showed that when the concentration of the hidrocolloids increases the apparent viscosity also increases. An increase of apparent viscosity has been observed for a synergetic effect. The conclusion is that the Espina Corona gum incorporation in mayonnaises is as effective as Xanthan gum and its effect is better than Guar gum and Locus Bean gum in similar concentrations. The mixture Espina Corona-Xanthan is recommendable due to its synergetic effect.

Keywords: Hydrocolloids. Emulsions. Stability. Espina Corona. *Gleditsia amorphoides*.

INTRODUCCIÓN

Debido a la preocupación por la salud, se ha observado una creciente demanda de productos con bajo o nulo contenido de colesterol, incrementándose la preferencia por el consumo de alimentos de origen vegetal. Si se disminuye la concentración de yema de huevo, emulsificante natural en la mayonesa, se baja el nivel de colesterol del producto, pero se desestabiliza la emulsión. El alto porcentaje de aceite que componen las mayonesas (60 a 80%) favorece los fenómenos de floculación y coalescencia (aumento del tamaño de gotas) y llevan a la pérdida de sus características organolépticas y a la no aceptación del producto.

El reemplazo parcial de la yema de huevo por hidrocoloides es una alternativa posible para desarrollar emulsiones estables (Ramos y De Pauli , 1999).

Los hidrocoloides como goma xántica, guar y alginato han sido utilizados ampliamente en estabilización de emulsiones, los mismos actúan incrementando la viscosidad de la fase acuosa y suspendiendo en la red tridimensional que forman, las partículas sólidas y las gotas de aceite (Manchina y col., 2002) (Ma y Barbosa-Cánovas, 1959). Debido al alto costo de los hidrocoloides de origen importado se hace necesario buscar alternativas de origen nacional como la goma espina corona (*gleditsia amorphoides*).

En este trabajo se compararon los efectos en la estabilidad cuando se incorporaron las gomas espina corona, xántica, guar y garrofín. Se evaluó el efecto en el área interfacial por método turbidimétrico y en la viscosidad del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de Mayonesas: 5,00 g de yema de huevo, dispersiones acuosas 0,025 a 0,200% de las gomas espina corona (EC), guar (G), garrofín (Ga) o xántica (X) en 45,00 ml de agua destilada, 2,00 g. de sal de mesa, 1,0 ml de ácido acético, 140,00 ml de aceite refinado de girasol. Estas emulsiones se compararon con mayonesas patrones Y5 e Y10, preparadas con 5,00 y 10,00 g de yema de huevo respectivamente. Además se

elaboraron mezclas de EC con X, EC con G y EC con Ga en concentración 0,05% (1:1). Las muestras fueron homogeneizadas en Ultra Turrax a 20.000 rpm durante 10 min.

Medidas turbidimétricas: La medición de la absorbancia en las emulsiones de mayonesa es una estimación del tamaño de partícula de la fase oleosa. Cuando mayor es la absorbancia menor es el tamaño de las gotas en la fase dispersa y mayor el área interfacial. Se determinó la variación del área interfacial mediante la técnica adaptada para emulsiones de mayonesa por Ramos y col. (1999) y Ramos y col. (2002). Se determinó la absorbancia de las emulsiones diluidas en dodecil sulfato de sodio (0,1%) a 500 nm en un espectrofotómetro Shimadzu.

Observación Microscópica: Las mayonesas se extendieron directamente sobre un porta objeto y se cubrieron para su observación, a 10X y 40X (Flint, 1996), con un microscopio óptico Zeiss con digitalizador de imagen.

Medidas de Viscosidad aparente: Determinadas con Brookfield DV-II+ LV4, a 6 rpm a 25°C según Holcomb y otros (1990).

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El mecanismo mediante el cual los hidrocoloides estabilizan las emulsiones es por aumento de la viscosidad de la fase continua, ya que éstos no poseen actividad emulsificante, no aportan cambios importantes en el área interfacial.

Los resultados de las medidas turbidimétricas no demostraron variaciones significativas en el área interfacial con el cambio de hidrocoloide o concentración, tal como se esperaba (Figura 1). Sin embargo, se observó un leve aumento de la absorbancia con el incremento de la concentración de Ga.

Todas las emulsiones dieron valores de absorbancia superiores al control Y5 (0,44). Las muestras con EC 0,15% y Ga 0,10% y 0,20% dieron valores de absorbancia similares al control Y10 (0,82) las medidas se corresponden con las observaciones al microscopio.

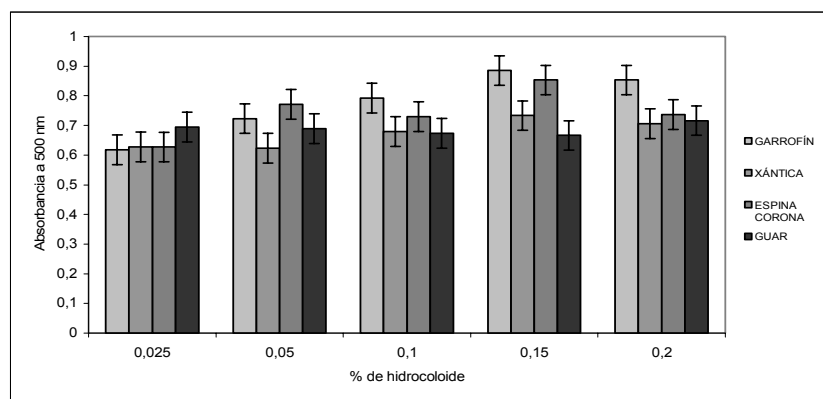


Figura 1: Absorbancia de mayonesas con Garrofin, Xántica, Espina Corona y Guar en función de las concentraciones de 0,025 a 0,200 %.

Las medidas de viscosidad aparente en función de la concentración de hidrocoloide, que se observan en la Figura 2, muestran que a medida que se aumenta la concentración de los hidrocoloides de 0,025 a 0,200%, se incrementa la viscosidad aparente en rangos de 40000-55000 a 80000-100000 cP. Las muestras con concentraciones de 0,050% de X, 0,100% de EC, 0,100 de G y 0,150% de Ga alcanzaron el rango de viscosidad de las mayonesas de marcas comerciales (66000-99000 cP). Todas las muestras superaron el valor de viscosidad aparente del control Y5 (24000 cP). El patrón Y10 presentó una viscosidad aparente de 72000 cP. La muestra con EC 0,100% resultó con viscosidad similar a Y10 y dio valores superiores a concentraciones mayores. Las mayonesas preparadas con 0,100 a 0,200% de EC, G y X dieron valores de viscosidad dentro del rango de las determinadas para las mayonesas comerciales.

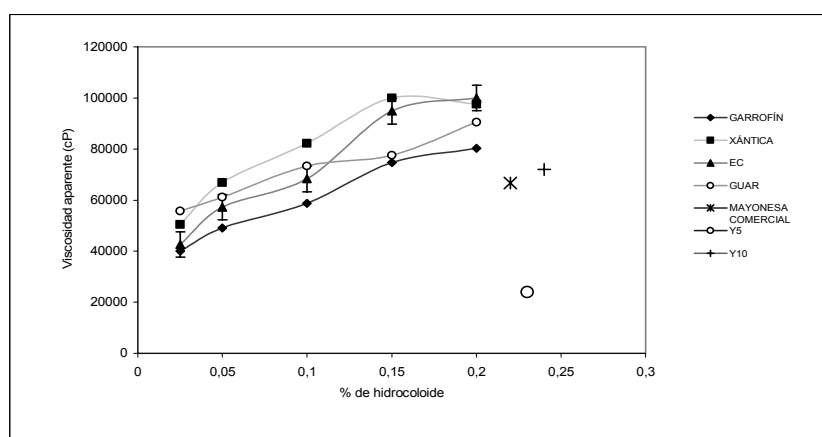


Figura 2: Viscosidad aparente de mayonesas con Garrofin, Xántica, Espina Corona y Guar en concentraciones de 0,025 a 0,200 %.

Las mayonesas preparadas con las mezclas de EC y X 0,05% (1:1) (Figura 3) dieron valores de viscosidad superiores a los de las muestras con EC sola y X sola, en

concentraciones de 0,025% a 0,500%, esto se debe al sinergismo que existe entre la goma espina corona y la goma xántica.

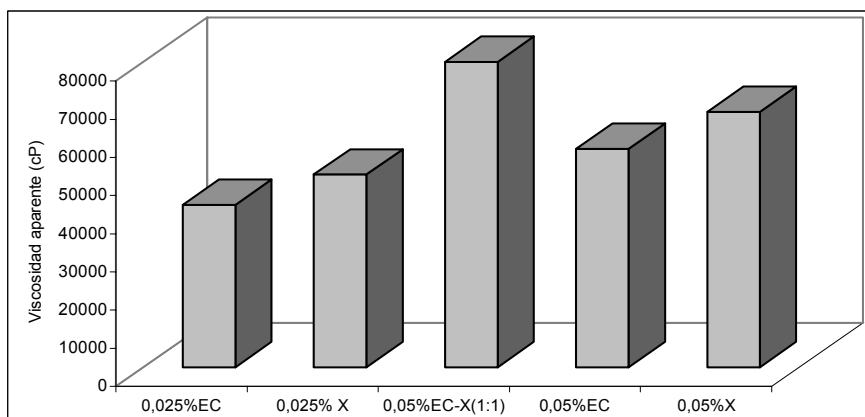


Figura 3: Viscosidad aparente de mayonesas con Espina Corona o Xántica sola y la mezcla Espina Corona-Xántica 0,05% (1:1).

En las emulsiones elaboradas con las mezclas de EC y Ga 0,05% (1:1) y EC y G 0,05% (1:1) no se observó sinergismo como se muestra en las Figuras 4 y 5 respectivamente. Las muestras realizadas con EC-X 0,05% (1:1) dieron valores de viscosidad aparente superiores a los patrones Y5 e Y10. En cambio, las muestras con EC-Ga 0,05% (1:1) y EC-G 0,05% (1:1) presentaron una viscosidad aparente superior a Y5 pero inferior a Y10 (Figura 6).

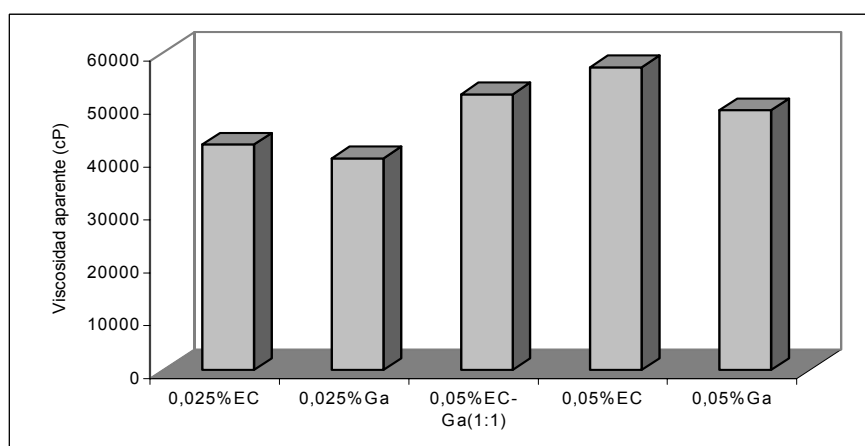


Figura 4: Viscosidad aparente de mayonesas con Espina Corona o Garrofin sola y la mezcla Espina Corona-Garrofin 0,05% (1:1).

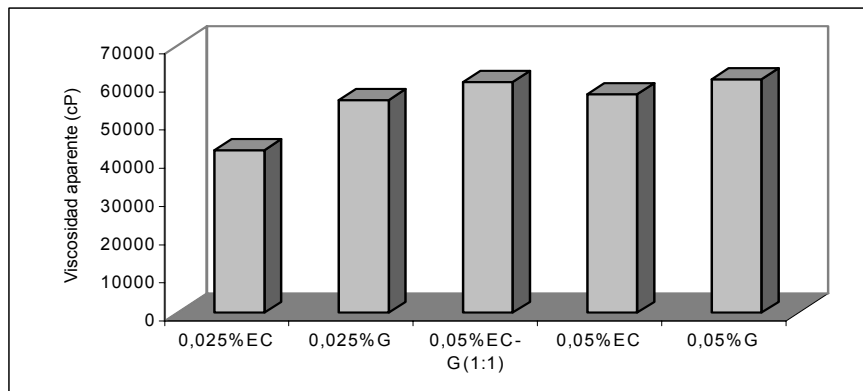


Figura 5: Viscosidad aparente de mayoneras con Espina Corona o Guar sola y la mezcla Espina Corona-Guar 0,05% (1:1)

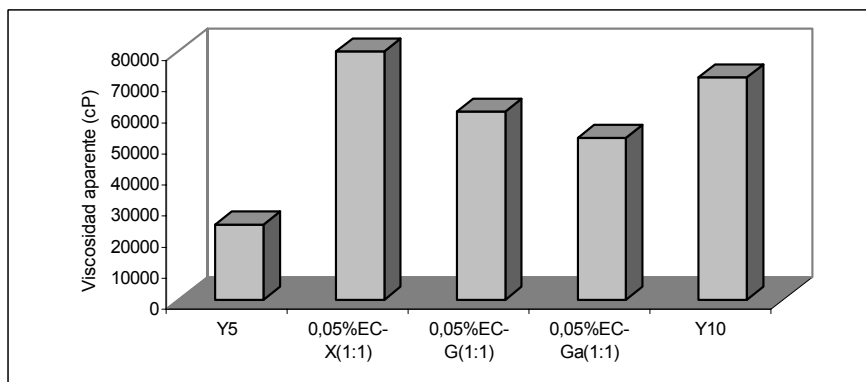


Figura 6: Comparación de la viscosidad aparente de las muestras con mezclas de Espina Corona-Xántica 0,05% (1:1), Espina Corona-Guar 0,05% (1:1) y Espina Corona-Garrofín 0,05% (1:1).

CONCLUSIONES

Se concluye que la incorporación de goma espina corona en mayoneras es tan efectiva para la estabilización como la goma xántica.

El efecto en la viscosidad de las mayoneras con goma espina corona es superior en concentraciones inferiores al de las gomas guar y garrofín.

La mezcla de EC y X es recomendable para la estabilización de este tipo de emulsiones, ya que con concentraciones menores (0,05%) se pueden alcanzar los valores de viscosidad de las marcas comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

Flint, O. Emulsiones. Microscopía de los alimentos. Ed. Acribia S.A. España. (1996)

Holcomb, D. N. Ford, L. D. y Martin, R. W. Dressings and Sauces. En Food Emulsions Ed.: Larsson, K. y S. Friberg Marcel Dekker. New York. (1990)

Ma, L. y G.V. Barbosa Cánovas. Reological Characterization of Mayonnaise. Part I: Slippage at Diferent Oil and Xanthan Gum Concentrations. Journal of Food Engineering 25. 397-408 (1991)

Manchina, F., L. Montanari, D. Peressini y P. Fantozzi. Influence of Alginate Concentration and Molecular Weight on Functional Properties of Mayonnaise. Lebensm Wiss. U.Technol.35,517-525(2002).

Ramos, N. A., M. Farías, M. Puppo y J. Wagner. Estabilidad y propiedades reológicas de mayonesas formuladas con sustitución parcial de yema de huevo por proteínas de soja, de trigo y de suero de leche. En “Proteínas y polisacáridos como ingredientes funcionales” Editores: Añón, M y A. Pilosof. CYTED. EDULP. 39-46 (2002).

Ramos, N. A. y C. De Pauli Estudio del Efecto de la Incorporación de Emulsificantes e Hidrocoloides en Emulsiones de Mayonesa. Información Tecnológica. Vol.10 (5):11-14. (1999).

EFFECTO DE ALGUNOS POLIOLES SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE *Zygosaccharomyces bailii* EN SISTEMAS MODELO

GLIEMMO, María F^{1,2}, CAMPOS, Carmen A^{1,3} y GERSCHENSON, Lía N^{1,3}

¹Departamento de Industrias, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA. Ciudad Universitaria, 1428, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. tel/fax 45763366 ce: carmen@di.fcen.uba.ar. ²Becaria de la Universidad de Buenos Aires. ³Miembro de la Carrera del Investigador Científico, CONICET.

RESUMEN

Se estudió el efecto del sorbitol, manitol y xilitol sobre el crecimiento y la inactivación térmica de *Z. bailii* en sistemas modelo acuosos de actividad de agua (a_w) 0,985 y pH 3,0. El crecimiento de la levadura se determinó por turbidimetría y la inactivación térmica a 50°C, se evaluó mediante el recuento de viables en placa. Las curvas de crecimiento y las de inactivación térmica se modelaron mediante la ecuación de Gompertz modificada y de Baranyi respectivamente.

En general, se observó que el agregado de los polioles disminuyó la velocidad de crecimiento, aumentó la extensión de la fase de latencia y provocó una disminución en la población de la fase estacionaria, con relación al sistema control ($a_w \cong 1$).

Los polioles no modificaron la velocidad de inactivación con relación al sistema control de $a_w \cong 1$.

Los resultados obtenidos destacan la importancia de la correcta elección del humectante para asegurar la estabilidad microbiológica del sistema.

Palabras clave: polioles, crecimiento, inactivación, *Z. bailii*, sistemas modelo

ABSTRACT

The effect of sorbitol, xilitol and mannitol on *Zygosaccharomyces bailii* growth and thermal inactivation was evaluated in aqueous model systems of water activity (a_w) 0.985 and pH 3.0. Yeast growth was determined by turbidimetry and thermal inactivation at 50°C was evaluated throughout the count of the viable population of *Z. bailii* by plating. Growth curves were model by means of modified Gompertz equation and thermal inactivation curves were fitted with Baranyi equation.

In general, addition of polyols decreased growth, extended the lag phase and promoted a decrease in the level of the population at the stationary phase in relation to the control system free of humectants ($a_w \cong 1$). Polyols produced no effect on the thermal inactivation.

Results obtained highlight the importance of the right selection of humectant in order to assure microbiological stability of the system.

INTRODUCCIÓN

Los polioles son aditivos que pueden ejercer varias funciones en los alimentos: actúan como edulcorantes, disminuyen la actividad de agua (a_w) y afectan la viscosidad. Se los emplea en la elaboración de productos de reducido tenor glucídico tales como jugos y mermeladas ya que permiten reducir la ingesta de calorías y, por otra parte, dan cuerpo al producto. Además, algunos polioles, como el xilitol presentan efectos benéficos sobre la salud al reducir la placa bacteriana (O'Brien, 2002)

Con relación al uso de los polioles como humectantes, se sabe que estos ejercen un importante efecto sobre el crecimiento y la muerte de los microorganismos. En particular, los polioles y los azúcares incrementan la resistencia al calor de bacterias, levaduras y esporas de hongos (Lenovich y col., 1988; Corry, 1976). Sin embargo, este comportamiento depende, en parte, del tipo de soluto y de la naturaleza del microorganismo (Almagro y col., 2000).

Cabe recordar que los alimentos dulces de reducido tenor calórico son susceptibles de deteriorarse por acción de levaduras osmofílicas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Zygosaccharomyces bailii* (Stiles y col., 2002).

Z. bailii es una levadura capaz de crecer a valores de pH tan bajos como 2,2 e inclusive en presencia de preservadores y de agentes depresores de la a_w (Praphailong y Fleet, 1997). No obstante, esta capacidad se ve afectada por el acidificante empleado así como por el tipo de humectante (Lenovich, y col., 1988).

Es de destacar que, no se conoce el efecto de los polioles sobre el crecimiento ni sobre la inactivación térmica de *Z. bailii*. En consecuencia, en este trabajo, se estudia el efecto de algunos polioles sobre el crecimiento y la inactivación térmica de dicha levadura en sistemas modelo acuosos que modelan alimentos ácidos de reducido tenor glucídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del inóculo

El inóculo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 se preparó en caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) y se incubó a 25°C hasta alcanzar la fase estacionaria (30 h).

Formulación de los sistemas modelo

Los sistemas modelo se prepararon en caldo Sabouraud al que se adicionó sorbitol, xilitol o manitol en una concentración tal que la a_w del sistema fuera 0,985.

Con fines comparativos también se preparó un sistema sin humectantes y otro empleando un 10 % (m/m) de glucosa.

La actividad de agua se determinó mediante el medidor electrónico de humedad relativa Aqualab (Decagon Devices Inc, Pullman, Washington, USA).

El pH se ajustó a 3.0 por adición de ácido cítrico.

Para la determinación de las curvas de crecimiento, se dispensaron alícuotas de los sistemas por duplicado en frascos y se los esterilizó. Luego se les adicionó un inóculo tal que permitiera obtener una población de $1 \cdot 10^7$ UFC/ml y se incubaron a $25 (\pm 1)^\circ\text{C}$.

Para la determinación de las curvas de inactivación térmica, se dispensaron alícuotas de los sistemas por triplicado en erlenmeyers y se los esterilizó. Luego, se templaron a $50.0 (\pm 0.5)^\circ\text{C}$ y se adicionó el inóculo obteniéndose una población de $1 \cdot 10^5$ UFC/mL. Los erlenmeyers se agitaron mediante un agitador orbital manteniéndose a $50.0 (\pm 0.5)^\circ\text{C}$.

Muestreo y análisis

Las curvas de crecimiento se evaluaron por turbidimetría siguiendo la evolución de la absorbancia a 540 nm de las muestras según la metodología sugerida por (Dalgaard y col., 1994). Las curvas de muerte se determinaron a través del recuento de viables en placas con ágar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

Análisis de los datos

Las curvas de crecimiento se modelaron usando la ecuación de Gompertz modificada (Dalgaard y col., 1994):

$$y = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[1 + \frac{\mu}{A} (\lambda - t) \right] \right\}$$

Esta expresa el cambio en la turbidez (y) que se produce como resultado del desarrollo de la levadura en función del tiempo (t). Los parámetros biológicos del crecimiento de la levadura son: la velocidad de crecimiento (μ), la fase de latencia (λ) y el valor de la asíntota (A).

Las curvas de inactivación se modelaron empleando la ecuación de Baranyi (Xiong, y col., 1999). La misma expresa la relación logarítmica entre N el número de microorganismos al tiempo t y N_0 el número de microorganismos al tiempo cero en función del tiempo (t) de tratamiento

$$\log \frac{N}{N_0} = \log \left[q_B + (1 - q_B) e^{-k(t-B(t))} \right]$$

Siendo $q_B = (N_{min}/N)$; N_{min} es la concentración remanente de células en la fase de cola; k es la máxima velocidad relativa de muerte y $B(t)$ es el tiempo de latencia.

Los parámetros de las curvas de crecimiento y muerte de cada sistema se estimaron por regresión no lineal de los datos. En todos los casos, la significatividad estadística se evaluó al nivel del 5 % ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los polioles sobre el crecimiento de *Z bailii*

Las curvas de crecimiento se modelaron en forma satisfactoria mediante la ecuación de Gompertz modificada y en la Figura 1 se detalla el efecto de los distintos solutos sobre la velocidad de crecimiento (μ), la extensión de la fase de latencia (λ) y la población máxima alcanzada en la fase estacionaria (A). El agregado de xilitol, manitol o glucosa disminuyó significativamente la velocidad de crecimiento con relación al sistema sin agregado de humectantes. Sin embargo, el empleo de sorbitol no ejerció efecto alguno sobre la velocidad de crecimiento. Esta última tendencia es coincidente con lo informado por Almagro y col., (2000) quienes observaron que la adición de sorbitol para disminuir la a_w a 0,982 no tenía efecto sobre el crecimiento de *D hansenii* y *S cerevisiae*.

En cuanto a la fase de latencia, los polioles incrementaron su extensión en igual medida. En cambio, la glucosa produjo un aumento significativamente mayor al registrado por acción de los polioles. (Figura 1).

El nivel máximo de crecimiento disminuyó cuando se adicionaron polioles. En particular, el xilitol fue quien ejerció un mayor efecto. (Figura 1) Es de destacar que el efecto inhibitorio del xilitol ya ha sido reportado en estudios previos, sobre otros microorganismos, por ejemplo, se lo utiliza en el tratamiento de dermatitis atópicas ya que inhibe a *Staphylococcus aureus* (Katsuyama, 2001).

En cuanto al efecto de la adición de glucosa, ésta permitió alcanzar un mayor crecimiento en relación con el observado tanto para los polioles como para el sistema sin humectantes. Este comportamiento podría ser ocasionado por la utilización de glucosa como fuente de carbono tal como se ha reportado en el caso del desarrollo de *Z rouxii* en un medio de cultivo de a_w 0.93 y pH 4.5 (Golden y Beuchat, 1992).

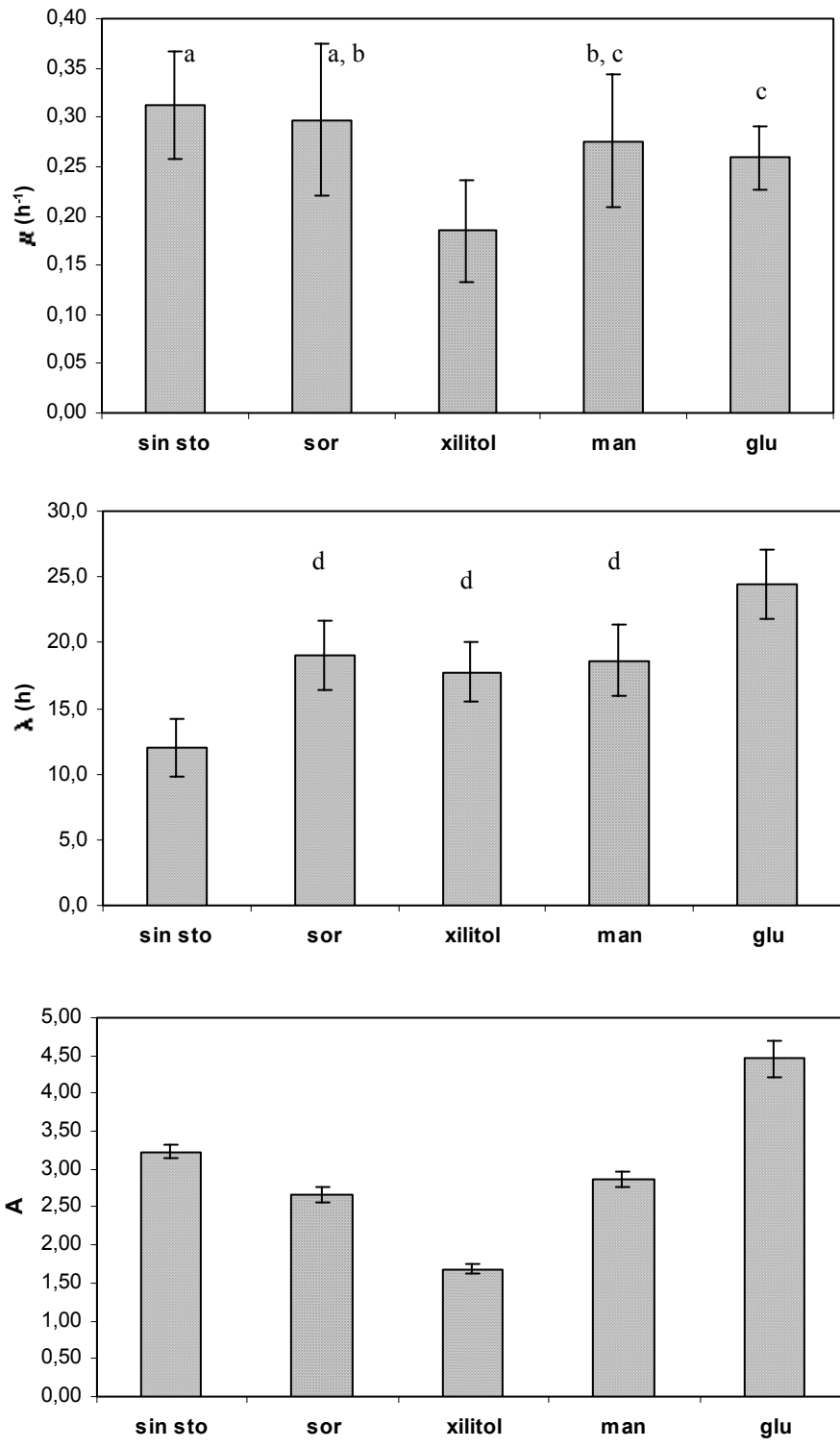


Figura 1. Efecto de los polioles sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii*. Sin sto: sin soluto; sor: sorbitol; man: manitol; glu: glucosa. Las barras verticales representan la desviación estándar del promedio de los datos. Las barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Efecto de los polioles sobre la inactivación térmica de *Z bailii*

Las curvas de inactivación térmica se modelaron satisfactoriamente mediante la aplicación del modelo de Baranyi, observándose que en la mayoría de los casos éstas no presentaban hombros, con excepción del sistema control sin el agregado de humectantes (Figura 2. a). En los restantes sistemas, se observó la existencia de una cola, la que sugiere la presencia de una subpoblación resistente al tratamiento térmico. En la figura 2.b, a modo de ejemplo, se muestra la curva de inactivación térmica del sistema conteniendo xilitol. La aparición de una subpoblación resistente al calor, probablemente se deba a la formación de una pequeña cantidad de ascoesporas las que presentan mayor resistencia térmica al calor que las células vegetativas (Corry, 1976).

La velocidad de muerte fue el parámetro más sensible y por lo tanto, el usado a fin de comparar el efecto que los distintos solutos analizados ejercen sobre las curvas de inactivación.

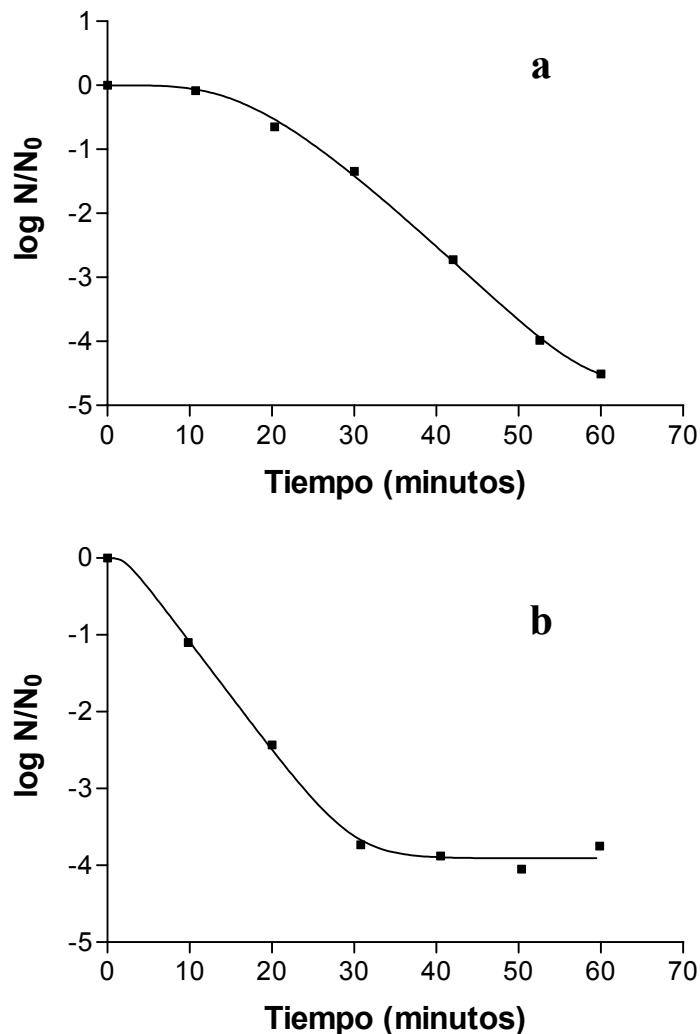


Figura 2. Curvas de inactivación térmica de *Z. bailii*. Panel a: sistemas control sin humectantes; panel b: sistema conteniendo xilitol. ■ datos experimentales, — ajuste del modelo.

Como se observa en la Figura 3, el empleo de sorbitol, xilitol o manitol no afecta en forma significativa la velocidad de muerte con relación al sistema control sin la adición de solutos. Sin embargo, el agregado de glucosa incrementó la velocidad de muerte.

Es de destacar que, en general, la adición de solutos depresores de la a_w exalta la resistencia al calor de los microorganismos (Golden y Beuchat, 1992; Corry y col., 1976). Pero también se debe tener en cuenta que la sensibilidad al calor en medios de a_w reducida depende también del tipo de microorganismo, del soluto usado como humectante y de su concentración. Por ejemplo, la depresión de la a_w de 0,995 a 0,980 por adición de sacarosa, no afecta la velocidad de inactivación a 55 °C de *Z. rouxii* y *T. globosa* (Gibson, 1973).

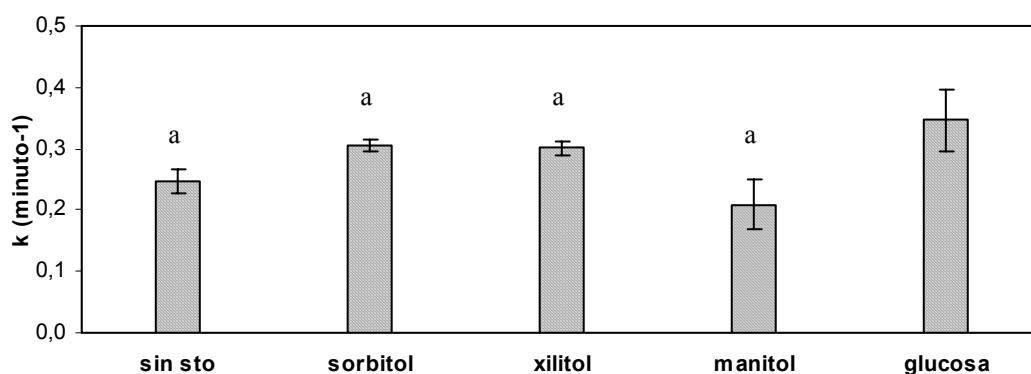


Figura 3 Efecto de los polioles sobre la velocidad de inactivación térmica de *Z. baillii*. Las barras verticales representan la desviación estándar del promedio de los datos.

Sin sto: sin soluto. Las barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

CONCLUSIONES

En general, la presencia de polioles disminuye la velocidad de crecimiento, extiende la fase de latencia y disminuye el nivel de la población alcanzado en la fase estacionaria. En particular, el xilitol fue el soluto que disminuyó en mayor medida la velocidad de crecimiento y el nivel de la población de la fase estacionaria.

En cuanto al efecto de los polioles sobre la inactivación térmica, estos no ejercieron un efecto significativo con relación al del sistema sin agregado de humectantes.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de realizar una correcta elección del humectante a fin de asegurar la estabilidad microbiológica del sistema.

BIBLIOGRAFÍA

Almagro, A, Prista C, Castro, S, Quintas, C, Madeira Lopes A, Ramos J., & Loureiro-Dias M.C. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 191-197.

Corry, J. 1976. The effect of sugars and polyols on the heat resistance and morphology of osmophilic yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 40, 269-276.

Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., & McMeekin, A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* 23, 391-404.

Gibson, B. 1973. The effect of high sugar concentrations on the heat vegetative microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 36, 365-37.

Golden, DA, & Beuchat, L.R. 1992. Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 524-530.

Katsuyama, K. 2001. US Patent 6, 328,984.

Lenovich, L. M., Buchanan, R. L., Worley, N. J. & Restaino, L. 1988. Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Food Science*, 53, 914-916.

O'Brien Nabors, L. 2002. Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. *Food technology*, 56, 28-34, 45.

Praphailong, W & Fleet, G.H. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14, 459-468.

Stiles Battey, A, Duffy, S., & Schaffner, D. 2002. Modelling yeast spoilage in cold filled ready to drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1901-1906.

Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. S., Linton, R. H. y Sheard, M. A. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology*, 16:269-279.

Agradecimientos

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

EFFECTIVIDAD DE PELICULAS COMESTIBLES CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE *Zygosaccharomyces bailii*

FLORES^{1,2} Silvia K, CAMPOS^{1,3} Carmen A, GERSCHENSON^{1,3} Lía N

- (1) Departamento de Industrias, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA. Ciudad Universitaria, 1425, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Tel/fax: 45763366 e-mail:lia@di.fcen.uba.ar
(2) Becaria de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT). (3) Miembro de la Carrera del Investigador Científico, CONICET

RESUMEN

Se estudiaron las características difusionales a sistemas líquidos (caldos nutritivos sembrados con *Z.bailii* y pH ajustado a 6,0, 4,5 o 3,0), del sorbato de potasio (KS) contenido en películas elaboradas con almidón de mandioca-glicerol y se evaluó su efectividad antimicrobiana.

El KS contenido en las películas fue liberado, prácticamente en su totalidad, independientemente del pH del medio. El tiempo requerido para ello fue de, aproximadamente, 0,25 h a pH 6,0, 1 h a pH 4,5 y 15 h a pH 3,0. En los medios conteniendo películas sin KS hubo crecimiento de la levadura a todos los pHs estudiados, mientras que en presencia de KS se observó: crecimiento a pH 6,0 debido a que el KS no resultó efectivo a dicho pH, a pH 4,5 el microorganismo creció más lentamente que en ausencia de KS, a pH 3,0 se observó inhibición del crecimiento y, luego de 48 h., disminución del recuento.

Palabras Clave Películas comestibles, sorbato de potasio, inhibición de *Z. bailii*

ABSTRACT

It was studied the diffusion features of KS supported in tapioca starch-glycerol edible films to liquid media constituted by nutritive broth inoculated with *Z.bailii* with pH adjusted pH to 6.0, 4.5 and 3.0. Antimicrobial efficiency of films was also evaluated.

KS incorporated into edible films was released quickly and almost completely and this release was no affected by media pH. Time involved in each case was approximately 0.25 h at pH 6.0, 1.0 h at pH 4.5 and 15 h at pH 3.0.

In systems containing free KS films, yeast grew at all pH. In systems with films containing KS, yeast growth was not affected at pH 6.0 since KS released was not effective at high pH values. At pH 4.5 *Z.bailii* grew more slowly than in free KS media. At pH 3.0 an

inhibitory effect was noted until 48 h and then a reduction of the population was observed.

INTRODUCCION

Películas y recubrimientos comestibles elaborados a partir de distintos hidrocoloides, (almidones, proteínas, gomas, etc.), que pueden ser aplicadas para recubrir tanto alimentos crudos como frutas y hortalizas, o bien, procesados como quesos y embutidos, han despertado creciente interés por su capacidad de impartir diversas propiedades funcionales: retardar la migración de humedad, el transporte de gases, la migración de grasas y aceites y el transporte de solutos, mejorar las propiedades involucradas en el manipuleo mecánico de los alimentos, impartir integridad estructural adicional, retener compuestos volátiles responsables del flavor, soportar aditivos alimentarios, por ejemplo antimicrobianos como el sorbato de potasio (KS) o el benzoato de sodio (Kester y Fennema, 1986; Krochta y col 1994).

Estas propiedades tienden, principalmente, a mejorar la calidad global y a prolongar la vida útil de dichos alimentos.

Por lo tanto, el estudio de las características físico-químicas como el de la capacidad antimicrobiana de las películas, es de suma importancia a fin de optimizar su performance.

Los objetivos del presente trabajo fueron: estudiar las características difusionales a sistemas líquidos del KS contenido en películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca-glicerol, y evaluar su efectividad para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, levadura típica deteriorativa de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de las películas

Las películas fueron preparadas a partir de una suspensión acuosa de almidón de mandioca (5 % w/w) y glicerol (2,5 % w/w), la cual fue tratada térmicamente a fin de gelatinizarla (80-82°C). En el caso del sistema con KS, el mismo fue agregado antes de la gelatinización (0,3 % w/w).

Luego de la desgasificación al vacío, la mezcla fue vertida sobre placas de vidrio y se inició el secado en estufa con circulación de aire a 50-52°C durante dos horas. El secado se completó sobre CaCl₂, luego de lo cual las películas fueron desmontadas, y finalmente, equilibradas a HR 57,5 % y a 25°C antes de la realización de los ensayos.

Medios y procedimiento de incubación

Películas con y sin KS fueron sumergidas dentro de sendos frascos erlenmeyers

conteniendo 100 ml de caldo nutritivo Saboureaud (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) sembrado con un inóculo *Zygosaccharomyces bailii* (NRRL 7256) y pH ajustado a 6,0, 4,5 y 3,0. La población inicial de microorganismos obtenida para todos los sistemas fue de, aproximadamente, 6×10^3 UFC/ml. Los sistemas se incubaron a 25°C y se agitaron en forma continúa a 150 rpm. A distintos tiempos se tomaron alícuotas para realizar el recuento de viables en placa sobre agar Saboureaud (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 25°C.

Determinación de la concentración de KS

Para seguir la cinética de liberación del KS, se tomaron alícuotas en el tiempo de incubación de los distintos sistemas (pH 6,0, 4,5 y 3,0) conteniendo películas con KS.

A fin de determinar el contenido inicial de KS en las películas estudiadas, como la concentración del KS liberado a los medios acuosos, se utilizó el método recomendado por la AOAC (1980), el cual involucra una extracción mediante destilación por arrastre por vapor y dosaje espectrofotométrico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de liberación del KS

La figura 1 muestra la cinética de liberación del KS contenido en las películas. En ella se observa la fracción de KS que difunde al medio líquido en función del tiempo. Los resultados muestran que el KS fue liberado prácticamente en su totalidad ($M_{KS\ t} / M_{KS\ T} > 0,9$) independientemente del pH del medio. Sin embargo, el tiempo requerido para ello dependió del pH del medio acuoso receptor: fue de aproximadamente 0,25 horas a pH 6,0, 1 hora a pH 4,5 y 15 horas a pH 3,0 (dato no mostrado).

Es de destacar que la liberación del preservador ocurre rápidamente, ya que luego de transcurridos cinco minutos de ensayo, se observó que más del 50% del contenido de KS de las películas fue liberado al medio. Esta tendencia es coincidente con la informada por Choi y col. (2005).

Inhibición del crecimiento de *Z.bailii*

En la figura 2 puede observarse el recuento de la levadura en función del tiempo para los sistemas estudiados. A pH 6,0 y en el medio conteniendo películas con KS se observó que la presencia del antimicrobiano no inhibió el crecimiento de los microorganismos, los cuales alcanzaron la fase estacionaria al cabo de 48 h (figura 2.a).

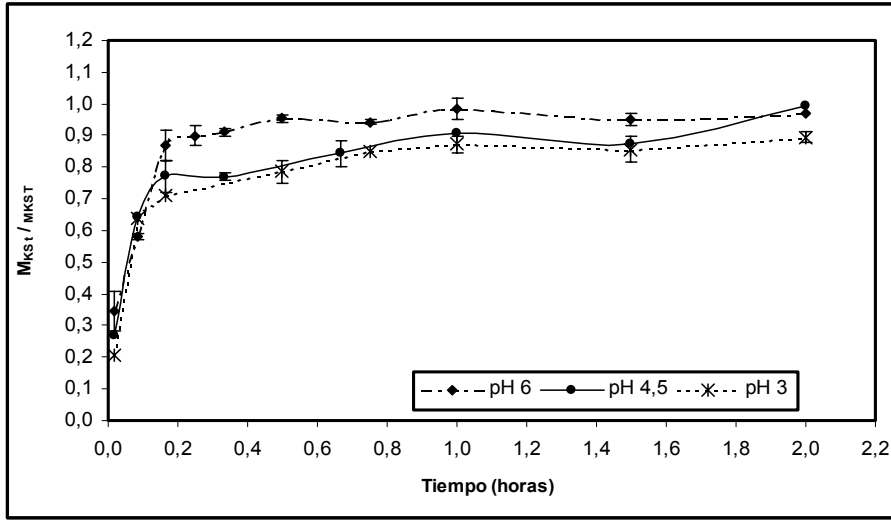


Figura 1: Liberación del KS al medio acuoso en función del tiempo. $M_{KS,t}$: cantidad de KS liberada al medio al tiempo t $M_{KS,T}$: cantidad total de KS contenido en el sistema

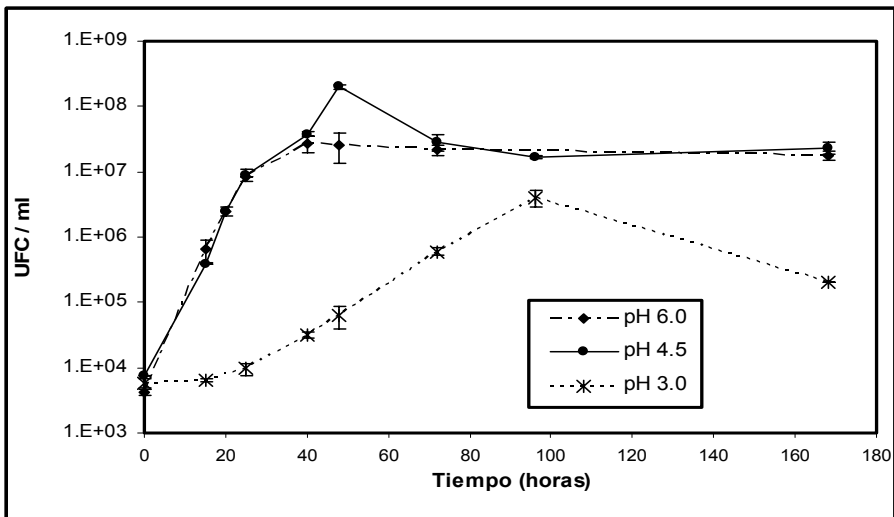
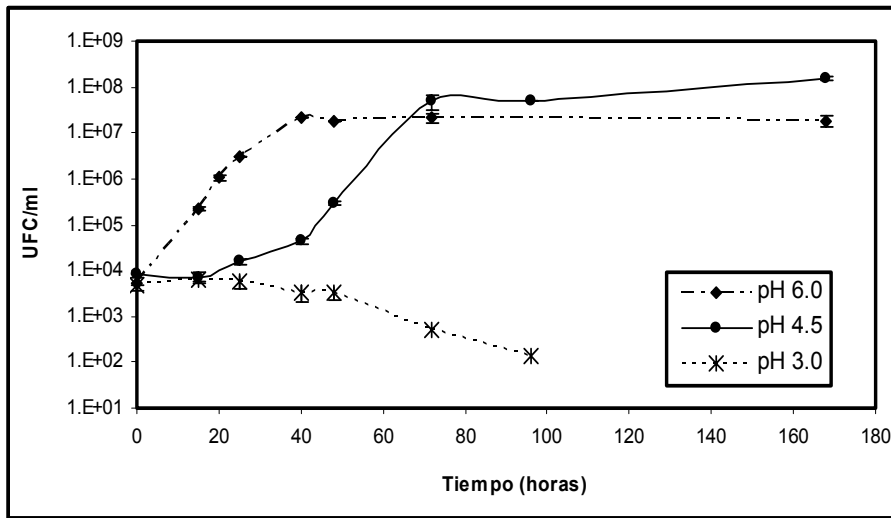


Figura 2: Crecimiento de *Z. bailii* en sistemas acuosos. **Panel a:** películas comestibles conteniendo KS. **Panel b:** películas comestibles sin KS

Esta falta de efectividad se debería a que el KS se encontraba en la forma disociada del ácido, la cual no actuaría como preservador, a pesar de estar disponible en el medio (Sofos, 1989). A pH 4,5, se observa crecimiento más lento hasta las 72 h, luego de las cuales el recuento fue similar al observado para el sistema a pH 6,0. Esta tendencia es la esperada si consideramos que en el sistema de pH 4,5 la concentración de la forma no disociada del ácido es de aproximadamente 300 ppm, la cual probablemente se encuentre por debajo de la mínima concentración inhibitoria (MIC) a dicho pH. De acuerdo con Praphailong y Fleet (1997) la MIC de *Z.bailii* a pH 5,0 es de 750 ppm. A pH 3,0, el KS presentó un efecto bacteriostático hasta las 48 h. de incubación. Posteriormente se observó una disminución del recuento. Este último resultado era predecible teniendo en cuenta que Gliemmo y col (2004), reportaron una MIC de 250 ppm para *Z.bailii* en un medio de composición y pH similar al utilizado en este trabajo. Debido a que el KS liberado superó dicha MIC, el microorganismo no pudo desarrollar.

Los sistemas con película libre de KS (Figura 2.b), mostraron crecimiento en todos los casos estudiados. Tanto a pH 6,0 como a pH 4,5, el crecimiento de la levadura no se vio afectado por la presencia del antimicrobiano, alcanzando la fase estacionaria luego de 48 h. Así, se pone de manifiesto que la sola depresión del pH a 4,5 no ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Z.bailii*. A pH 3,0, se observó una fase lag de aproximadamente 15 h, luego de las cuales la levadura crece lentamente hasta las 96 h.

CONCLUSIONES

El KS soportado en películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca – glicerol, se encuentra disponible para actuar como antimicrobiano, ya que es rápidamente liberado a sistemas acuosos. El pH del medio líquido receptor condiciona la efectividad del preservador y la velocidad de su liberación. Las condiciones en las cuales el KS incorporado a las películas estudiadas resulta más efectivo, fueron observadas a pH 4,5 y 3,0.

BIBLIOGRAFIA

AOAC.1980. Official Methods of Analysis (13 edn.) washington: Association Official Analytical Chemists.

Choi, J.H., Choi, W.Y., Cha, D.S., Chinnan, H.J., Park, H.J., Lee, D.S., Park J.M. 2005. Diffusivity of potassium sorbate in κ -carrageenan based antimicrobial film. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 38, 417-423.

Gliemmo, M.F., Campos, C.A. and Gerschenson, L.N. 2004. Effect of sweet humectants on stability and antimicrobial action of sorbates. *J Food Sci* 69, 2: 39-44.

Kester J.J., Fennema O.R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, 47-59.

Krochta J., Baldwin E., Nisperos-Carriedo M. 1994. Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa., U.S.A.

Praphailong W. and Fleet G.H. 1997. *Food Microbiology*, 14, 459-468.

Sofos J.N. 1989. Sorbate food preservatives. Boca Raton. Fla: CRC Press Inc.

AGRADECIMIENTOS

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

ENCAPSULACION DE ANTIOXIDANTES DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)

ANBINDER Pablo S., DELADINO Lorena, NAVARRO¹ Alba S. y MARTINO^{1,2} Miriam N.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. Ciencias Exactas¹, Dpto. Ing. Qca., Fac. Ingeniería², (UNLP), 47 y 116, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel./Fax (0221) 425-4853. E-mail: mmartino@ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se obtuvieron cápsulas de alginato de calcio con y sin tratamiento con quitosano. El tiempo de inmersión de las cápsulas en CaCl₂ y en quitosano influyó sobre la resistencia de las cápsulas a la compresión. Un mayor tiempo en CaCl₂ incrementó la dureza de éstas. El tiempo de inmersión en quitosano tuvo efecto sobre la textura y el tamaño de las cápsulas, se observó un máximo de dureza a los 30 minutos, disminuyendo a tiempos mayores. Las cápsulas de alginato de calcio con y sin quitosano tuvieron alto poder de retención (~90%) del compuesto activo en agua, incrementándose este valor a mayor tiempo en quitosano. Para liberar el compuesto activo es necesaria la desestabilización de las cápsulas. El citrato de sodio fue el agente más efectivo para desintegrar las cápsulas, requiriéndose un tiempo mayor para los sistemas con quitosano.

La encapsulación de extractos de yerba mate, ricos en antioxidantes, es una buena opción para su uso como suplementos alimentarios.

Palabras Claves: encapsulación, antioxidantes, yerba mate, alginato, quitosano.

ABSTRACT

Beads of calcium alginate with and without a chitosan layer were obtained to encapsulate yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. Texture properties of the capsules depended on immersion time in CaCl₂ and in chitosan solutions. At longer dipping times in CaCl₂, harder beads were obtained. Chitosan modified both texture and size of the capsules. A peak of maximum strength was detected at 30 minutes. Calcium alginate beads with and without chitosan were able to retain approximately 90% of the active component in water, increasing this value with dipping time in chitosan. To release the core ingredient, capsule destabilization is needed. Sodium citrate was the most effective agent. Longer times to disintegrate capsules coated with chitosan were needed.

Encapsulation of yerba mate extracts provided protection against environmental conditions, this being a good option for food supplementation with natural antioxidants.

INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es un proceso en el cual se aplican películas delgadas, generalmente poliméricas a pequeñas partículas sólidas o gotas de líquidos o gases. Esta técnica es apropiada para conservar una sustancia y liberarla controladamente (Jackson y Lee, 1991). Algunos materiales que han sido encapsulados en la industria de alimentos son: aminoácidos, vitaminas, minerales, antioxidantes, colorantes, enzimas y endulzantes. Los agentes encapsulantes estudiados fueron: quitosano y alginato. El quitosano es obtenido a partir del exoesqueleto de crustáceos. Presenta una estructura de polication, debido a los grupos amino presentes en su estructura. El alginato presenta grupos carboxílicos libres, los cuales reaccionan con cationes divalentes (principalmente calcio), para formar geles estables.

En el presente trabajo se procedió a la encapsulación de extractos liofilizados de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), los cuales tienen actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos polifenólicos (Filip y col., 2000).

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en un alimento o en el cuerpo en baja concentración, comparado con el sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho compuesto. Los antioxidantes evitan cambios de sabor, aroma, así como cambios en el valor nutricional de los alimentos. Además, el consumo de antioxidantes en la dieta o como suplemento dietario es aconsejable para disminuir el riesgo de contraer aterosclerosis, cáncer y retardar el proceso de envejecimiento (Filip y col., 2000).

Los objetivos del presente trabajo fueron: Seleccionar un método de encapsulación para los antioxidantes de yerba previamente obtenidos, con el fin de preservar su estabilidad y de utilizarlos como suplemento en productos alimenticios; Caracterizar las cápsulas a través de propiedades mecánicas y de difusión; por último, estudiar la liberación del componente activo de las cápsulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los agentes encapsulantes utilizados fueron quitosano (Sigma, E.E.U.U.) y alginato de sodio (Protanal, Noruega). El agente activo incorporado fue un extracto liofilizado de yerba mate, obtenido en el laboratorio.

Las cápsulas fueron preparadas haciendo gotear desde una bureta una solución de alginato de sodio al 1 y 2% p/v sobre un vaso de precipitado conteniendo 80 ml de una solución de CaCl_2 0,05M ó 0,1M. Las cápsulas se formaron bajo condiciones estandarizadas y permanecieron distintos tiempos en la solución gelificante. Luego fueron

filtradas, sumergidas en una solución de quitosano 1% y mantenidas durante 0, 15, 30 y 60 minutos en la solución del polication.

Para medir las propiedades mecánicas de las cápsulas se utilizó un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Reino Unido). Se realizó un ensayo de compresión, obteniéndose valores de fuerza en respuesta a una deformación constante aplicada. Se analizó el efecto del tiempo de inmersión de las cápsulas en CaCl_2 y en quitosano.

El efecto del quitosano sobre el tamaño de las cápsulas se determinó mediante fotografías digitales analizadas con el programa informático Global Lab (E.E.U.U.), determinando el radio, redondez y perímetro de al menos 50 cápsulas.

La difusión del compuesto activo se realizó colocando diez cápsulas de cada tratamiento (control sin quitosano, 15, 30 y 60 minutos en quitosano) en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de agua destilada. Se realizó un ensayo de Folin Ciocalteau (Schlesier y col., 2002) en función del tiempo hasta los 7 días para determinar fenoles totales liberados.

Se ensayaron diferentes agentes desestabilizantes de la matriz (pH, temperatura, agentes quelantes). Esto se realizó colocando en tubos de ensayo 10 ml de la solución del agente desestabilizante (citrato de sodio, ácido clorhídrico o hidróxido de sodio) y 10 cápsulas de cada tratamiento. En este estudio se utilizó un colorante (violeta de metilo) como material encapsulado, en vez de los antioxidantes, para permitir una mejor observación. En el caso de la desestabilización por calor, se realizó en un baño de agua a 50 y 100°C.

RESULTADOS

Se eligieron las cápsulas obtenidas con alginato de sodio al 2% y CaCl_2 al 0,1M, por presentar mejores condiciones de integridad y consistencia.

Los ensayos de fuerza de compresión en función del tiempo de inmersión en CaCl_2 mostraron que la dureza de las cápsulas de alginato de calcio aumentaba rápidamente en los primeros minutos y permanecía constante, siendo el valor asintótico de 38 N (Fig. 1). Según King (1983), cuando las soluciones de alginato y calcio entran en contacto el gel se forma inmediatamente en la interfase; además la gelificación depende de la difusión del calcio a través de la membrana del gel. A partir de los resultados se seleccionaron las condiciones de formación de las cápsulas de alginato de calcio para posteriores ensayos, siendo éstas de 15 minutos de inmersión en cloruro de calcio y 15 minutos de estabilización para alcanzar la dureza final.

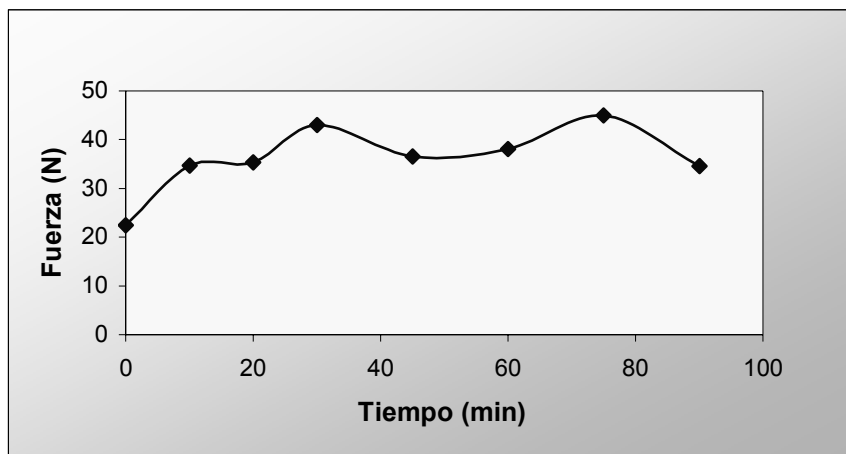


Fig. 1. Resistencia de las cápsulas a la compresión en función del tiempo de inmersión en cloruro de calcio.

En los ensayos de inmersión en quitosano (Fig 2) se observó que a mayor tiempo de inmersión aumentaba la fuerza de compresión hasta 30 y luego disminuía. La presencia del máximo en la curva se podría asociar a un efecto de la estructura de la cápsula, hasta los 30 minutos de inmersión en quitosano, se estaría reforzando la estructura del gel de alginato-calcio con uniones de quitosano a sitios de alginato que hubieran quedado libres. A tiempos mayores de inmersión, el quitosano podría desplazar al ión calcio formando un gel alginato-quitosano más débil, como se observó en ensayos preliminares.

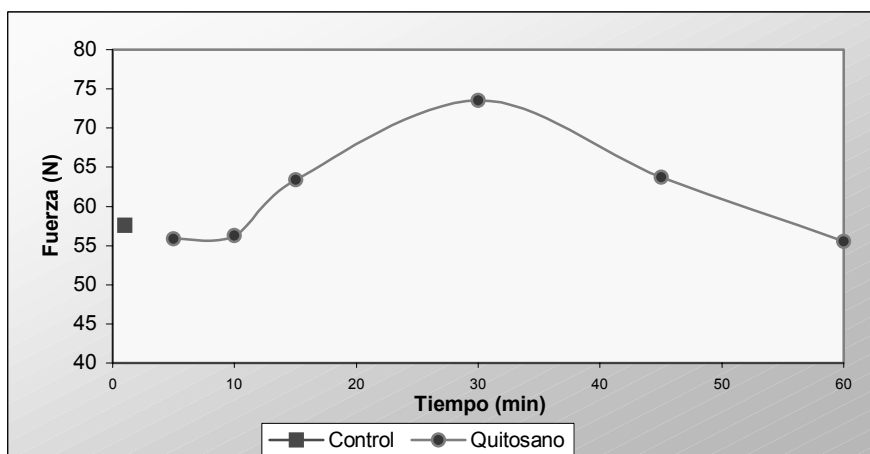


Fig. 2. Efecto del quitosano sobre la resistencia mecánica de las cápsulas.

Un mayor tiempo de inmersión en quitosano produjo una disminución significativa ($p < 0.05$) del tamaño de las cápsulas (Tabla 1, Fig 3). Este hecho puede atribuirse al desplazamiento progresivo del agua retenida en la matriz del gel de las cápsulas de alginato de calcio por parte del quitosano.

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en quitosano sobre el tamaño de las cápsulas

	Radio (cm)	Redondez (adim.)	Perímetro (cm)
Control	0,209 ± 0.005	0.96 ± 0.03	1.300 ± 0.032
15 minutos	0,210 ± 0.007	0.97 ± 0.06	1.304 ± 0.095
30 minutos	0,192 ± 0.039	0.97 ± 0.03	1.185 ± 0.026
1 hora	0,180 ± 0.005	0.92 ± 0.05	1.142 ± 0.043

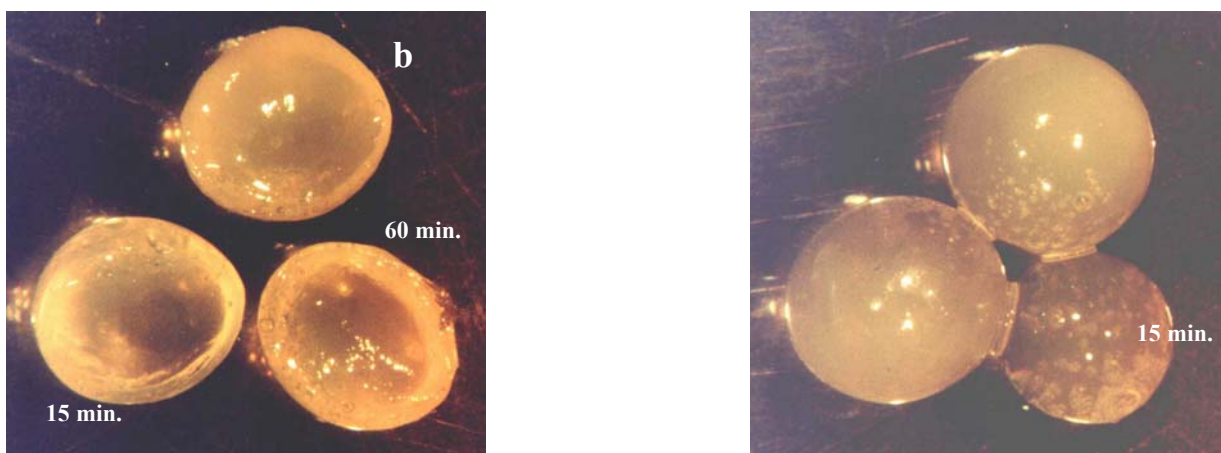


Fig. 3. Cápsulas de alginato de calcio (control) y alginato de calcio-quitosano (15 y 60 min.), enteras (a) y cortadas a la mitad (b).

Las cápsulas control (sin quitosano) liberaron mayor cantidad de agente activo desde un primer momento y a lo largo de todo el ensayo (Fig. 4). Por otro lado, se observa que a mayor tiempo de permanencia en la solución de quitosano menor es la liberación del liofilizado. A una semana de permanencia en agua la liberación del compuesto activo es de aproximadamente un 13% para el control y de entre 10 y 11% para las cápsulas recubiertas con quitosano, indicando la alta capacidad de retención de los sistemas de encapsulación empleados.

Cuando se requiere liberar el compuesto activo es necesario desestabilizar el sistema para ello se ensayaron diferentes medios: temperatura, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y citrato de sodio (Tabla 2).

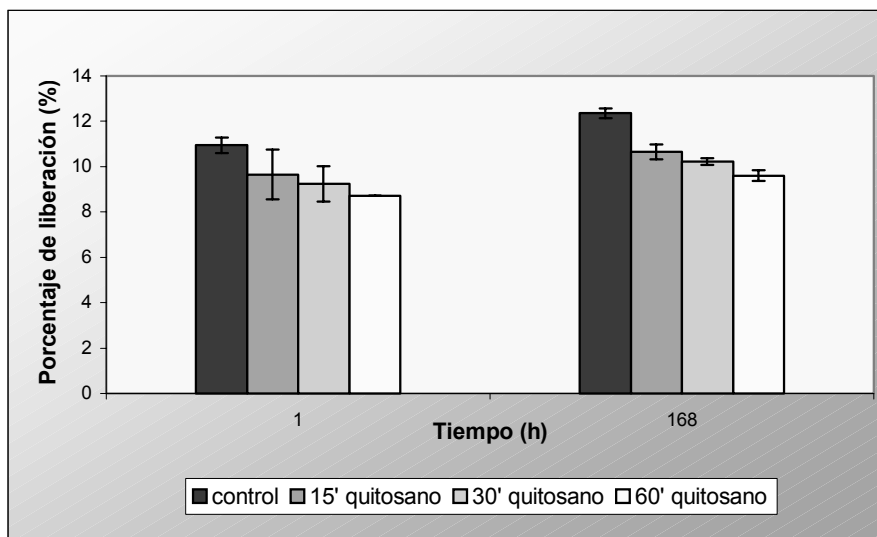


Fig. 4. Porcentaje de liberación del liofilizado a distintos tiempos de inmersión en agua.

Tabla 2. Efecto de diferentes agentes desestabilizantes sobre las cápsulas.

Tratamiento	Control	Con quitosano
Temperatura (50 y 100°C)	No hay efecto sobre la estructura. A mayor temperatura, mayor liberación.	No hay efecto sobre la estructura. Menor liberación que en el control.
pH ácido	No hay efecto sobre la estructura.	No hay efecto sobre la estructura.
pH alcalino	Pérdida de integridad a las 24 horas.	Capa externa débil con un interior líquido.
Citrato de sodio	Pérdida de integridad a las 3 horas.	A mayor tiempo en quitosano, mayor resistencia.

El quitosano retardó el efecto de todos los agentes desestabilizantes ensayados sobre las cápsulas. Este efecto fue más notorio en el caso del citrato de sodio, en el cual, luego de 3 horas de inmersión en esta sal, las cápsulas control se habían disuelto totalmente mientras que las cápsulas con tratamiento en quitosano se mantenían intactas (Tabla 2). El citrato de sodio desestabiliza el gel de alginato de calcio por medio de una sustitución de los iones Ca^{+2} del gel por iones Na^{+} de la sal. El hecho de que las cápsulas con quitosano sean más resistentes a la acción del citrato y se observe, en algunos casos, una membrana de gel con un interior líquido puede explicarse por la formación de uniones alginato-quitosano que no son desestabilizadas por el citrato (Gåserød y col., 1999).

CONCLUSIONES

La formación de las cápsulas de alginato y sus propiedades mecánicas dependieron del tiempo de inmersión en Ca^{+2} y de su posterior estabilización.

El recubrimiento de las cápsulas de alginato de calcio con quitosano tuvo influencia en el tamaño de las mismas, a mayor tiempo de inmersión en el polisacárido, menor tamaño.

El sistema de encapsulación utilizado fue capaz de retener el compuesto activo en una proporción mayor al 87% en medio acuoso.

El quitosano se asocia con el alginato para formar una segunda capa que ayudó a retener el compuesto activo y retardar la desestabilización del sistema.

El quitosano les otorgó a las cápsulas una protección extra frente al citrato, retardando el efecto secuestrante de éste sobre el calcio y la consiguiente desestabilización y degradación de las cápsulas.

BIBLIOGRAFÍA

FILIP, R., LOTITO, S. B., FERRARO, G. y FRAGA, C. G. 2000. Antioxidant activity of *Ilex Paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*. Vol. 20 N°10. 1437-1446

GÅSERØD, O., SANNES, A. y SKJÅK-BRÆK, W. 1999. Microcapsules of alginate-chitosan II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials*. 20. 773-783

JACKSON, L. y LEE, K. 1991. Microencapsulation and the food industry. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*. 24. 289-297.

KING, A.H. 1983. Brown Seaweed Extracts (Alginates). Cap. 3. En "Food Hydrocolloids Vol. 3. Glicksman M. (ed). CRC Press. Boca Ratón, Florida, E.E.U.U. 115-188.

SCHLESIER, K., HARWAT, M., BÖHM, V. y BITSCH, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*. 36 (2). 177-187.

ENCAPSULACION DE COMPONENTES ACTIVOS POR CO-CRISTALIZACION

DELADINO¹ Lorena, ANBINDER¹ Pablo S., NAVARRO¹ Alba S. y MARTINO^{1,2} Miriam N.

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. Ciencias Exactas, ²Dpto. Ing. Qca, Fac. Ingeniería, (UNLP), 47 y 116, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel./Fax (0221) 425-4853, e-mail: mmartino@ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Lactato de calcio, sulfato de magnesio y extractos de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) con propiedades antioxidantes fueron encapsulados por co-cristalización con sacarosa. Se evaluó el efecto de la concentración de las soluciones de sacarosa sobre el tiempo de cristalización. A los productos co-cristalizados se les determinó la solubilidad, higroscopicidad, densidad volumétrica, actividad acuosa (a_w), distribución de tamaño y ángulo de reposo. La cuantificación de los compuestos activos co-cristalizados se realizó por complejo-volumetría con EDTA para los minerales y por el método de Folin-Ciocalteu para determinar los polifenoles de los extractos de yerba. El rendimiento de la técnica varió según el compuesto activo incorporado, siendo el orden creciente de rendimiento: extracto de yerba < lactato de calcio < sulfato de magnesio. La distribución de tamaños, solubilidad, densidad y propiedades de fluencia dependieron principalmente de la matriz de sacarosa, mientras que la higroscopicidad y la actividad acuosa variaron según el compuesto activo adicionado.

Palabras claves: co-cristalización – sacarosa – aglomerados – antioxidantes - minerales

ABSTRACT

Calcium lactate, magnesium sulfate and yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts with antioxidants properties were encapsulated by co-crystallization in supersaturated sucrose solution. The effect of sugar concentration on crystallization time was studied. Solubility, hygroscopicity, bulk density, water activity (a_w), particle size distribution and repose angle of co-crystallized products were determined. The concentration of mineral components in co-crystallizates was quantified by a volumetric titration method with EDTA (Ethylenediaminetetraacetate); Folin-Ciocalteu method was used to determine total polyphenols of yerba extract in co-crystallized products. Process yield varied with the active compound added, being in increasing order: Yerba extract < calcium lactate < magnesium sulfate. Size distribution, solubility, density and flow properties strongly

depended on sucrose matrix, whereas hygroscopicity and a_w varied with the active component.

INTRODUCCIÓN

La co-cristalización es una técnica de encapsulación definida como un proceso donde un segundo ingrediente es incorporado a una solución sobresaturada de sacarosa para lograr una cristalización simultánea de ambos componentes (Hartel, 1993). La sacarosa granulada está compuesta por cristales densos y monoclinicos con superficie limitada. Por lo tanto, para ser utilizada como medio para la encapsulación de compuestos activos, su estructura debe ser modificada. Esta debe pasar del cristal perfecto a una forma irregular, aglomerada y de tamaño microscópico para aumentar el espacio intersticial y el área superficial total y así proveer una base porosa donde incorporar el compuesto activo.

En general, la co-cristalización mejora la solubilidad, humectabilidad, homogeneidad, dispersabilidad, hidratación, antiaglomeración, estabilidad y fluidez de distintos materiales. Chen y col. (1988) describieron la co-cristalización de saborizantes y otros ingredientes como minerales, sustancias volátiles, gomas, emulsificantes, ácidos, etc..

Los compuestos activos estudiados en el presente trabajo son antioxidantes de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y los minerales calcio y magnesio. Los antioxidantes, como los que presenta la yerba mate, pueden proteger al cuerpo contra el daño causado por radicales libres y enfermedades degenerativas (Schinella y col., 2000). Respecto al calcio, éste desempeña un papel importante en una amplia cantidad de procesos metabólicos y requerimientos fisiológicos que se manifiestan durante el desarrollo y manutención del crecimiento óseo (Fishbein, 2003). Por su parte, el magnesio interviene en al menos 300 pasos enzimáticos del metabolismo intermediario, por lo cual su deficiencia puede acarrear graves alteraciones bioquímicas y sintomáticas del organismo (Vormann, 2003).

Los objetivos del presente trabajo fueron mejorar las propiedades funcionales y fisicoquímicas de minerales y antioxidantes a través de la co-cristalización con el fin de utilizarlos como suplementos alimentarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó azúcar comercial, sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) y lactato de calcio ($C_6H_{10}CaO_6$), (Parafarm, China) ambos de grado alimenticio y un extracto acuoso liofilizado de yerba mate, obtenido en el laboratorio.

Se probaron tres concentraciones de solución de sacarosa: 71,5, 81 y 85°Bx (Grados Brix: gramos de sacarosa/100 gramos de solución). Para obtener los co-cristalizados, se

calentó a fuego directo la solución en un recipiente metálico, agitando constantemente con varilla de vidrio. El calentamiento se detuvo cuando se observó la aparición de turbidez en el jarabe, lo cual indicaba el comienzo de la cristalización. La mezcla se continuó agitando manualmente sobre una superficie fría, con varilla de vidrio hasta obtener un producto sólido. Se registró la curva de calentamiento mediante dos termocuplas de cobre-constantán.

Una vez obtenido el producto, éste se trasvasó a un cristizador de vidrio y se mantuvo durante 24 horas en desecador. Transcurrido este tiempo se procedió al secado en estufa, molido y tamizado de los aglomerados.

Para la obtención de los productos co-cristalizados se eligió la concentración inicial de 71,5°Bx; el segundo ingrediente era adicionado cuando se observaba el comienzo de la cristalización.

Para la cuantificación de los minerales en el producto co-cristalizado se realizaron complejo-volumetrías con EDTA y en el caso de los extractos acuosos de antioxidantes de yerba mate se determinó la concentración de polifenoles totales según el método de Folin-Ciocalteu (Schlesier y col., 2002).

El ángulo de reposo de los productos se determinó mediante un dispositivo que forma parte del equipo CEN: Banco para el estudio del manejo de sólidos (Armfield, Reino Unido). Para estudiar la higroscopicidad se almacenaron porciones de 1 g de muestras co-cristalizadas en frascos de vidrio con soluciones saturadas de sales de distinta humedad relativa (Fennema, 1975). El cálculo de la higroscopicidad porcentual (HG%) se realizó teniendo en cuenta el incremento en peso del polvo, el peso inicial de la muestra y la humedad posterior al secado en estufa. La medición de a_w se realizó utilizando un equipo Aqua Lab Serie 3 TE (E.E.U.U.). La solubilidad se midió como el tiempo que tardan 10 g de muestra en disolverse en 100 ml de agua destilada con agitación. Por último, la distribución de tamaños se obtuvo mediante el tamizado y pesado del polvo retenido en cada tamiz (tamaño de malla: de 2 a 0,250 mm).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa que las soluciones más concentradas poseen un punto de ebullición mayor. A medida que aumentó la saturación inicial de la solución, el tiempo necesario para que se produzca la cristalización disminuyó. También resultó menor el tiempo total para completar este proceso en los jarabes de mayor concentración debido a la menor cantidad de agua a evaporar (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la concentración del jarabe de sacarosa sobre las temperaturas y tiempos de ebullición y cristalización.

Concentración Inicial (°Bx)	Ebullición			Cristalización	
	Temp. (°C)	Tiempo (min)	Velocidad (°C/min)	Tiempo de cristalización (min)	Tiempo total de operación (min)
71,5	110,38	7,95	17,96	2,19	11,86
81,0	113,38	7,17	13,26	0,88	10,12
85,0	114,10	7,03	12,92	0,74	10,08

El estudio estadístico de la distribución de tamaños demostró que los distintos compuestos activos adicionados no influyeron ($p < 0,05$) sobre la granulometría del sistema modelo azúcar-agua (Fig. 1). La mayor proporción ($\approx 30\%$) de los aglomerados tienen un tamaño comprendido entre 1 y 2 mm y alrededor del 45% un tamaño entre 1 y 0,355 mm.

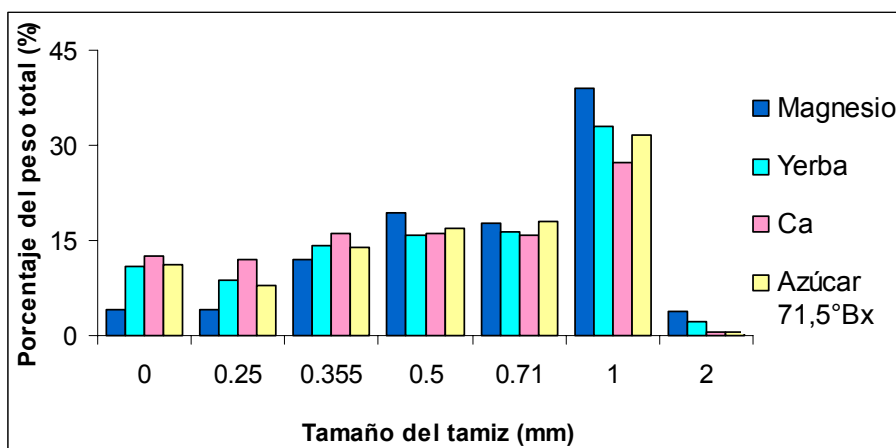


Fig. 1. Distribución de tamaños de los productos co-cristalizados molidos.

La ganancia de peso en agua en función del tiempo aumentó con la humedad relativa; a bajas humedades relativas (33 y 65%), ésta fue menor al 1% para todas las muestras. A altas humedades relativas (75 y 85%) hubo una mayor diferenciación entre los distintos productos co-cristalizados (magnesio > calcio > yerba > azúcar). Por su parte, las sales puras (sin co-cristalizar) no son higroscópicas y al aplicarles el mismo tratamiento que a las muestras co-cristalizadas, no absorbieron agua en ninguna de las humedades relativas estudiadas. En las curvas de sorción (Fig. 2) se observa una gran diferencia entre los co-cristalizados con magnesio respecto al resto de los productos, la cual podría atribuirse a que la sal haya cambiado su estructura de cristalina a amorfa durante el proceso de co-cristalización absorbiendo mayor cantidad de agua en este estado.

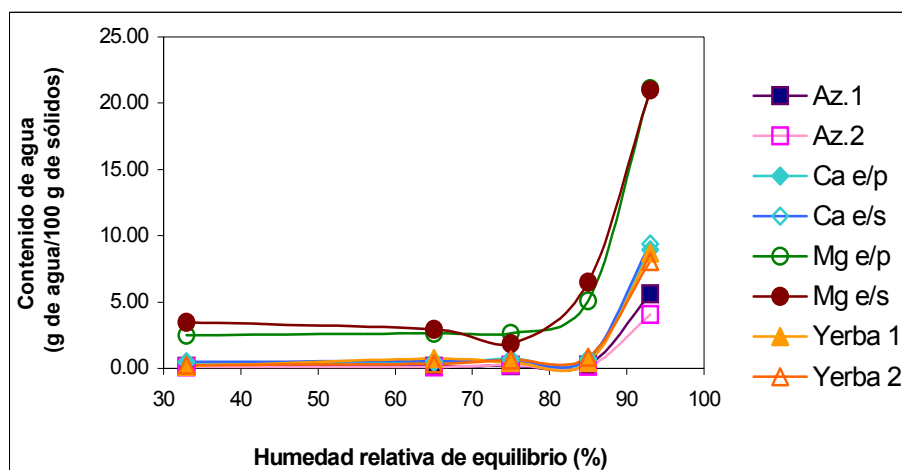


Fig. 2. Curvas de sorción de los productos co-cristalizados; Az.1: Azúcar 71,5°Bx; Az. 2: Azúcar 85,5°Bx; Ca e/p: Lactato de calcio en polvo; Ca e/s: Lactato de calcio en solución; Mg e/p: Sulfato de magnesio en polvo; Mg e/s: Sulfato de magnesio en solución; Yerba 1: 0,350 mg extracto; Yerba 2: 0,7 mg extracto.

Con respecto al extracto de yerba mate sin co-cristalizar, este polvo era muy higroscópico, tornándose una pasta gomosa en poco tiempo, por lo que el proceso resultó beneficioso para este material. En general, los productos presentan buena estabilidad frente a la humedad ambiente por debajo de humedades relativas de 75%.

Por su parte, el análisis estadístico de los resultados de actividad acuosa mostró que no había diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos productos co-cristalizados, hallándose valores de a_w menores a 0,53.

Las propiedades de fluencia, medidas como ángulo de reposo, dependieron también de la matriz de sacarosa, ya que los productos con distintos compuestos activos no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos ni con respecto al control de 71,5°Bx (Fig. 3). Los polvos con ángulos de reposo de 40 grados o menos son no-cohesivos y los polvos que exhiben ángulos de reposo de 50 grados o más presentan problemas de fluidez (Peleg, 1977). Los co-cristalizados de yerba mate pueden considerarse de libre fluidez. El $MgSO_4$ sin co-cristalizar presentó un ángulo de reposo de 40,7; no existiendo diferencias significativas con respecto a los co-cristalizados. La capacidad de fluir de la sal de calcio se mejoró marcadamente ya que se redujo el ángulo de reposo de 66 en la sal pura a aproximadamente 40 en el co-cristalizado (Fig. 3).

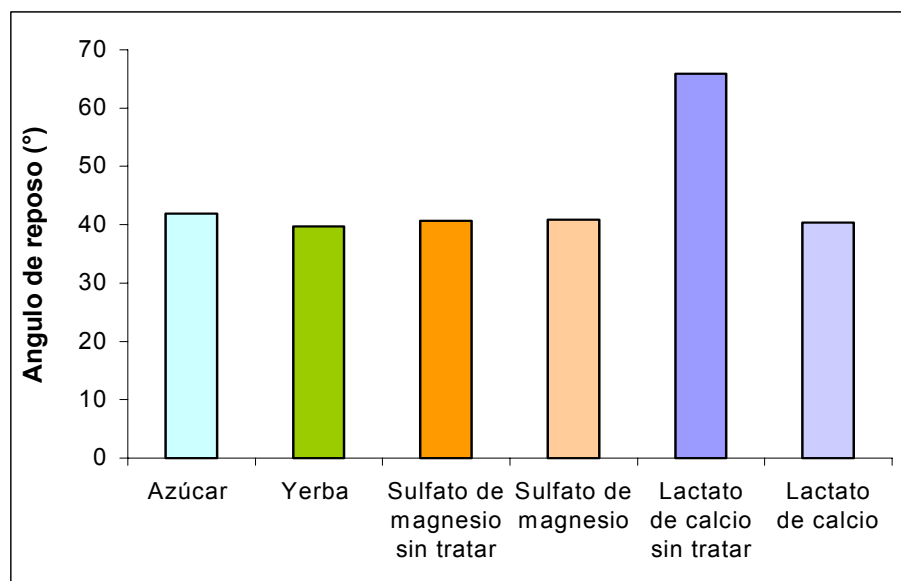


Fig. 3. Angulo de reposo de los productos co-cristalizados.

La solubilidad de los co-cristalizados varió entre 1,33 y 1,75 minutos para todos los casos. No se vio mejorada esta propiedad con respecto a las sales, sin embargo, en el caso del extracto de yerba se redujo el tiempo de solubilización.

La concentración final del lactato de calcio en el producto fue de 14,7 mg/g de co-cristalizado y el rendimiento de la técnica fue próximo al 70%. En el caso del sulfato de magnesio, la concentración final fue de 21,3 mg/g de co-cristalizado y el rendimiento fue mayor que para el calcio, llegando a un 90%. Por último, los co-cristalizados con antioxidante resultaron con una concentración final promedio de 2,52 mg de extracto liofilizado/g de producto co-cristalizado. El rendimiento promedio fue del 72%.

CONCLUSIONES

Al estudiarse los sistemas modelos azúcar-agua se comprobó que a mayor concentración de jarabe de sacarosa, el tiempo de cristalización para la nucleación es menor, por lo tanto se reduce el tiempo total de proceso.

La matriz de los aglomerados, independientemente del tipo de compuesto adicionado, tiene una fuerte influencia sobre las propiedades de los co-cristalizados, como las de fluencia, solubilidad y granulometría. En cambio, las propiedades relacionadas con el agua, como a_w e higroscopicidad, dependen principalmente del material activo adicionado. La sal de calcio empleada, luego del proceso de co-cristalización, pasó de ser un producto cohesivo a uno no-cohesivo, con las consecuentes ventajas de manejo del material.

En cuanto al extracto liofilizado de yerba mate, la técnica de co-cristalización mejoró las propiedades de higroscopicidad manteniendo una alta solubilidad.

La técnica desarrollada permitió obtener un producto co-cristalizado con una alta retención del compuesto activo, siendo mayor al 70 % en todos los casos.

BIBLIOGRAFÍA

CHEN A.C., VEIGA M.F y RIZZUTO B. (1988). Cocrystallization: An encapsulation process. Food Technology, N°11, 87-90.

FENNEMA O. (1975). Principles of food science. Part 2. Physical principles of food preservation. Marcel Dekker Inc 782 p.

FISHBEIN L. (2003). Multiple sources of dietary calcium-some aspects of its essentiality. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 39, 67-80.

HARTEL R.W. (1993). Controlling sugar crystallization in food products. Food Technology, 11, 99-107.

PELEG M. (1977). Flowability of food powders and methods for its evaluation – A review. Journal of Food Process and Engineering 1, 303-328.

SCHINELLA G.R., TROIANI G., DAVILA V., de BUSCHIAZZO P.M. y TOURNIER H.A. (2000). Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 268, 357-360.

SCHLESIER K., HARWAT M., BOHM V., y BITSCH, R. (2001). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Radical Research, 36 (2), 177-187.

VORMANN J. (2003). Magnesium: nutrition and metabolism. Molecular Aspects of Medicine 24, 27-37.

EFFECTO DE LA FORMULACION SOBRE LAS PROPIEDADES MECANICAS Y DIFUSIONALES DE UN SISTEMA DE ENCAPSULACION COLORANTE-ALGINATO DE CALCIO

BANFI, Julieta; URRIZA¹, Marina; GARCIA¹, María A. y MARTINO^{1,2} Miriam.

¹ CIDCA. CONICET, Fac. Cs. Exactas. ² Fac. de Ingeniería, UNLP. 47 y 116, La Plata. e-mail: magarcia@quimica.unlp.edu.ar, mmartino@ing.unlp.edu.ar, Tel/Fax 0221-4254853.

RESUMEN

Se encapsuló un colorante (violeta de metilo) mediante la técnica de gelación química con alginato de calcio con el propósito de analizar el efecto de la formulación de la matriz sobre las propiedades mecánicas y difusionales de las cápsulas y de evaluar la capacidad de retención del colorante. Las condiciones de secado de las cápsulas dependieron de la estabilidad del colorante. Por análisis de imágenes se determinó el diámetro medio y la distribución de tamaños de las cápsulas.

La liberación del agente activo en medio acuoso se determinó espectrofotométricamente y los resultados se modelaron matemáticamente utilizando dos modelos cinéticos empíricos. La concentración de CaCl_2 fue el factor más significativo; la mayor concentración aumentó la fuerza máxima de compresión y disminuyó el tamaño de las cápsulas y la capacidad de retención del colorante. La liberación del agente activo en agua resultó controlada por un mecanismo combinado de difusión, hinchamiento y erosión de la matriz.

Palabras claves: Encapsulación, alginato, textura, mecanismos de liberación, capacidad de retención.

ABSTRACT:

Methyl violet was encapsulated with calcium alginate to analyze the effect of matrix formulation, mechanical and diffusional properties of alginate beads. The retention of the colorant was also evaluated. Drying conditions depend on the stability of the colorant. Mean diameter and size distribution varied with composition and conditions of bead preparation. Active compound release in water was determined spectrophotometrically. Mechanical properties, colorant release and capsule size highly depended on CaCl_2 concentration. Percentage released of colorant was lower for dried capsules than for hydrated ones. Two empirical kinetic model were applied to evaluate colorant release in water. A satisfactory

fitting to experimental data was obtained with both models. Release was controlled by a combination of diffusion and matrix erosion.

INTRODUCCIÓN

La encapsulación tiene por objeto proteger ingredientes como nutrientes, vitaminas, esencias, etc., sensibles a la oxidación, pH, luz o calor, con recubrimientos de diferentes características y liberar el agente activo en condiciones controladas bajo un estímulo específico. Consiste en un proceso en el que se recubre al agente activo con materiales tales como hidrocoloides y lípidos para formar una cápsula, y que además puede otorgarle propiedades fisicoquímicas y funcionales de interés tecnológico (Reineccius, 1994; Shahidi y Qin-Han, 1993, King, 1995).

Para la obtención de las cápsulas se utilizan tanto procesos físicos como químicos, la selección depende de las propiedades fisicoquímicas del componente activo y de material encapsulante, del tamaño de cápsula deseado, del mecanismo de liberación y de las aplicaciones. Dentro de los procesos químicos de encapsulación una de las técnicas más utilizadas es la gelación química que requiere que las macromoléculas del hidrocoloide formen una red tridimensional; en el caso de alginato esta red se estabilizada con la presencia de iones calcio (King, 1983).

En el presente trabajo se encapsuló un colorante en alginato de calcio con el propósito de analizar el efecto de la formulación de la matriz encapsulante sobre las propiedades mecánicas y difusionales de las cápsulas, de evaluar el mecanismo de liberación del colorante y la forma de desestabilizar las cápsulas para liberar totalmente al agente activo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó violeta de metilo (Merck, USA) como agente activo en una concentración de 0.1%P/V. Las cápsulas se obtuvieron por goteo de soluciones de alginato de sodio (Protanal, Noruega) (1-3%) sobre soluciones de CaCl_2 (Merck, USA) (1 y 10%) desde una bureta con orificio de salida variable.

Las cápsulas obtenidas se secaron en condiciones ambientales y en estufa (37°C y 105 °C) para evaluar el efecto de las condiciones de secado en la estabilidad de las cápsulas obtenidas.

Observación microscópica. Determinación del tamaño de cápsulas

Las cápsulas se analizaron por microscopía óptica en un estereomicroscopio Leitz Ortholux II (Alemania) equipado con una cámara Leica para determinar su diámetro. Los

resultados se analizaron estadísticamente para estudiar la distribución de tamaños de las cápsulas obtenidas utilizando el programa Systat Versión 5 (SYSTAT Inc., 1992, USA).

Textura de las cápsulas

Se realizaron ensayos de compresión en un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Inglaterra), utilizando una sonda SMS P/75 de 7.5 cm de diámetro. Las muestras contenidas en cajas de Petri se comprimían hasta 2 mm aplicando una fuerza a velocidad constante de 0.5 mm/seg. Las curvas de fuerza en función de la deformación se registraron automáticamente mediante el software Texture Expert Exceed instalado en una PC conectada al equipo. Los resultados informados corresponden a un mínimo de 5 determinaciones.

Análisis de la liberación del agente activo encapsulado.

Los ensayos de difusión del colorante en medio acuoso se realizaron por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Shimadzu Double Bean Spectrophotometer UV-150-02 (Seisakusho Ltd., Kyoto, Japón).

Las cápsulas se pesaron y se colocaron en vasos de precipitados que contenían un volumen de agua destilada exactamente medido, midiéndose la absorbancia a 589 nm en función del tiempo. A través de la ley de Lambert-Beer se determinó la concentración del colorante liberado.

Los resultados se modelaron matemáticamente utilizando dos modelos cinéticos empíricos.

Modelado matemático de la liberación del agente activo

Los resultados de difusión del componente activo se modelaron matemáticamente utilizando dos modelos empíricos (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995). El primero asume que la liberación del agente activo tiene lugar mediante un mecanismo de hinchamiento de la matriz

$$M_t = M_0 \times k_a \times (t^m)$$

donde M_0 es la masa inicial de agente activo que puede liberarse (g), t es el tiempo (min) k_a es la constante de velocidad de liberación ($1/\text{min}^m$) y m es un parámetro que depende de la naturaleza del sistema.

El segundo asume que la liberación tiene lugar mediante un mecanismo combinado de difusión, biodegradación de las cápsulas por erosión heterogénea e hinchamiento de la matriz. Para éste modelo, la cantidad de agente activo liberado esta dada por:

$$M_t = M_\infty \left(1 - \left(1 - \frac{k t}{C_0 r} \right)^n \right)$$

donde M_∞ es la cantidad total de agente activo que puede liberarse (g), t es es tiempo

(min) k es la constante de velocidad de retención (cm/min^n), C_0 es la concentración inicial de agente activo en la matriz (g de colorante/g cápsulas), r es el radio de la cápsula (cm) y n es un parámetro del sistema que depende de la naturaleza de la interacción polímero-penetrante-agente activo al igual que la constante k .

Los datos experimentales se modelaron matemáticamente con los modelos empíricos propuestos utilizando el programa estadístico Systat y se estimaron los valores de los parámetros k y n y la bondad del ajuste (r^2) del modelo a los datos experimentales.

Estabilidad de las cápsulas frente a distintos agentes físicos y químicos

Las cápsulas fueron sometidas a distintas condiciones de pH (1.17 y 12.8), temperatura (50 y 100° C) y agregado de iones secuestrantes del Ca^{+2} (Citrato de sodio al 0.1; 0.5; 1 y 10% y Bicarbonato de sodio al 1 y 5%) para evaluar la estabilidad del sistema y explorar formas de liberación total del agente activo.

Se colocaron 10 cápsulas en tubos de ensayo conteniendo 10 ml del agente desestabilizante y mantenidos a temperatura ambiente o en agua y calentados a las temperaturas indicadas. El efecto se observó a diferentes tiempos. Se realizó un control visual, y la desestabilización se midió mediante la liberación del violeta de metilo por espectrofotometría a 490 nm.

Eficiencia

La eficiencia de la liberación del agente activo encapsulado se calculó como el porcentaje de material activo que se liberó de las cápsulas a las 24 hs respecto de la cantidad inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se descartó la utilización de soluciones de alginato al 1% debido a que las cápsulas obtenidas no tenían la integridad adecuada.

Los histogramas correspondieron a una distribución de tamaños homogénea; se obtuvieron cápsulas con dos tamaños diferentes según la forma de preparación, (Tabla 1). Además, se observó que al aumentar la concentración de Cl_2Ca disminuyó el diámetro de partícula; esto se atribuye a una mayor interacción entre el hidrocoloide y el calcio. La concentración de alginato no afectó notablemente el tamaño de las cápsulas. Cuando las cápsulas están secas los efectos de la concentración de Cl_2Ca , diámetro de las cápsulas húmedas y concentración de alginato no fueron significativos.

Tabla 1: Diámetro medio de las cápsulas

Alginato (%)	Cl ₂ Ca (%)	Tamaño	Diámetro (cm)
2	1	Bureta	0.424±0.025
2	1	Tip	0.337 ± 0.048
2	10	Bureta	0.4 ± 0.039
2	10	Tip	0.298 ± 0.016
3	1	Bureta	0.415 ± 0.037
3	1	Tip	0.315 ± 0.02
3	10	Bureta	0.401 ± 0.026
3	10	Tip	0.292 ± 0.021

Las condiciones de secado de las cápsulas dependen de la estabilidad del agente activo. En el caso del violeta de metilo 105°C no resultó apropiado ya que se destruye el colorante.

La concentración de CaCl₂ fue el factor más significativo sobre la textura de las cápsulas; la mayor concentración aumentó la fuerza máxima de compresión (Figura 1a). Al aumentar las interacciones entre alginato e iones Ca⁺², la matriz es más rígida y aumenta la dureza de las cápsulas. No se observaron diferencias significativas en la textura de las cápsulas con 2 y 3% de alginato, (Figura 1b).

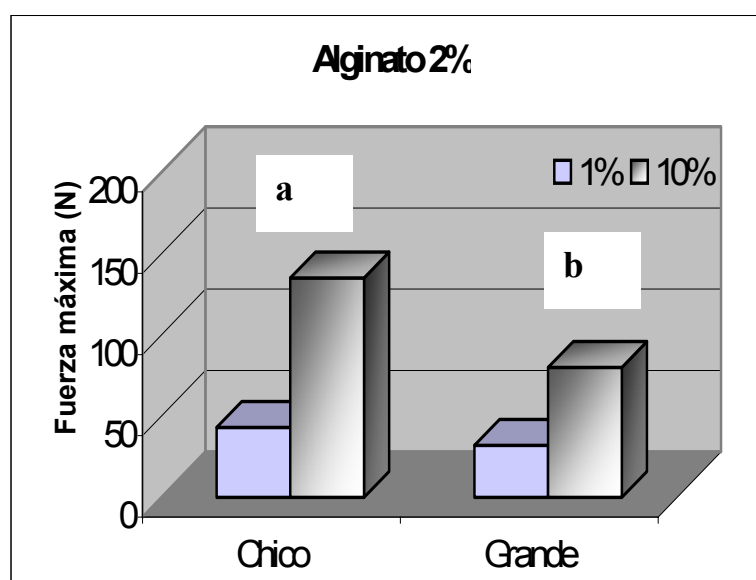


Figura 1: Fuerza máxima a la compresión de cápsulas húmedas de a) alginato al 2% con 1 y 10% de CaCl₂ y b) alginato al 2 y 3% con 10% de CaCl₂.

Los modelos empíricos propuestos ajustaron satisfactoriamente los datos experimentales obteniéndose coeficientes de correlación mayores para el segundo modelo propuesto (r^2

>0.968). Los valores obtenidos para los parámetros n y m coinciden, esto se atribuye a que ambos dependen de la naturaleza del sistema. Así, la liberación del agente activo en agua resultó controlada por un mecanismo combinado de difusión, hinchamiento y erosión de la matriz.

En general, al aumentar la concentración de CaCl_2 , aumentan las interacciones polímero-iones Ca^{+2} y polímero-polímero, por lo que el colorante se libera más rápido y se alcanza un valor asintótico mayor (Figura 2a).

Un efecto equivalente se produce al aumentar la concentración de alginato debido a que en este caso, disminuyen las interacciones polímero-agente activo (Figura 2b).

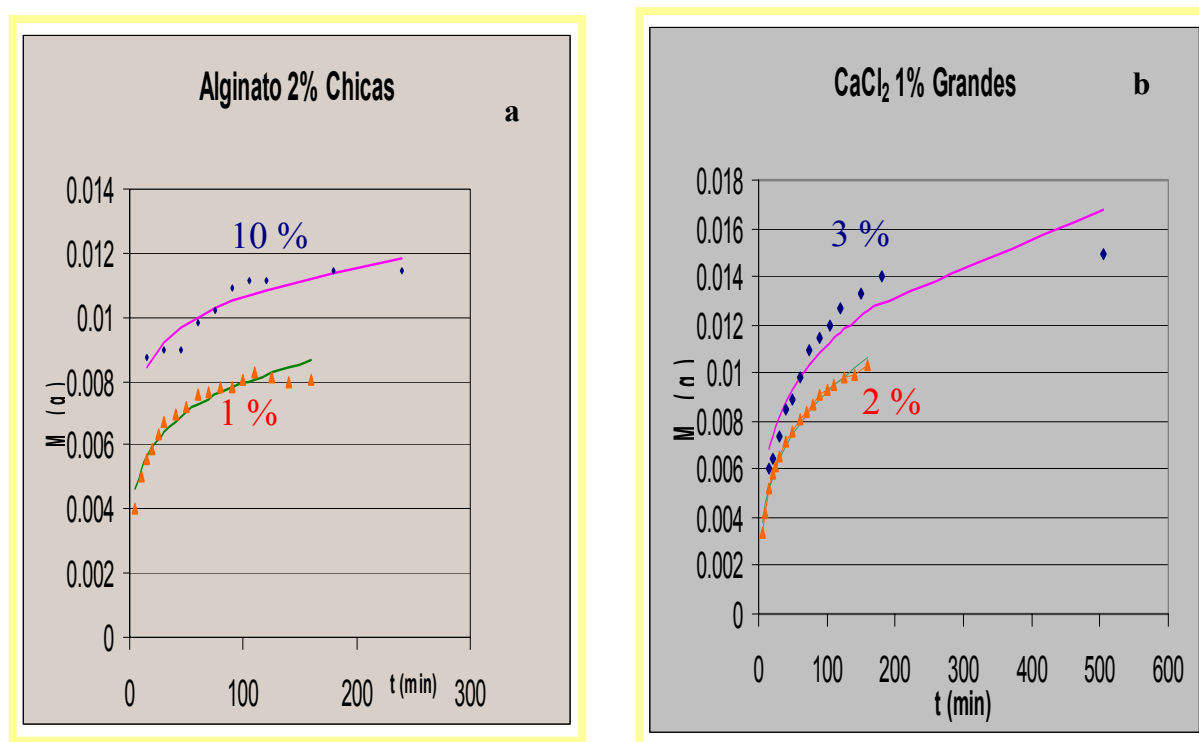


Figura 2: Comparación del modelo matemático de liberación utilizado con los datos obtenidos experimentales a) cápsulas de alginato al 2%, efecto del contenido de CaCl_2 y b) cápsulas obtenidas con 1% de CaCl_2 , efecto del contenido de alginato de las cápsulas.

La influencia de la concentración de Ca^{+2} y de alginato se evidencia también en el porcentaje de liberación del agente activo; se observó además, que éste es mayor en las cápsulas húmedas que en las secas (Figura 3). Este tipo de cápsulas, con bajo porcentaje de liberación, podrían ser utilizadas como agentes de retención de colorantes u otros componentes activos en sistemas con alto contenido de agua. El violeta de metilo presenta además, la ventaja de ser indicador de pH.

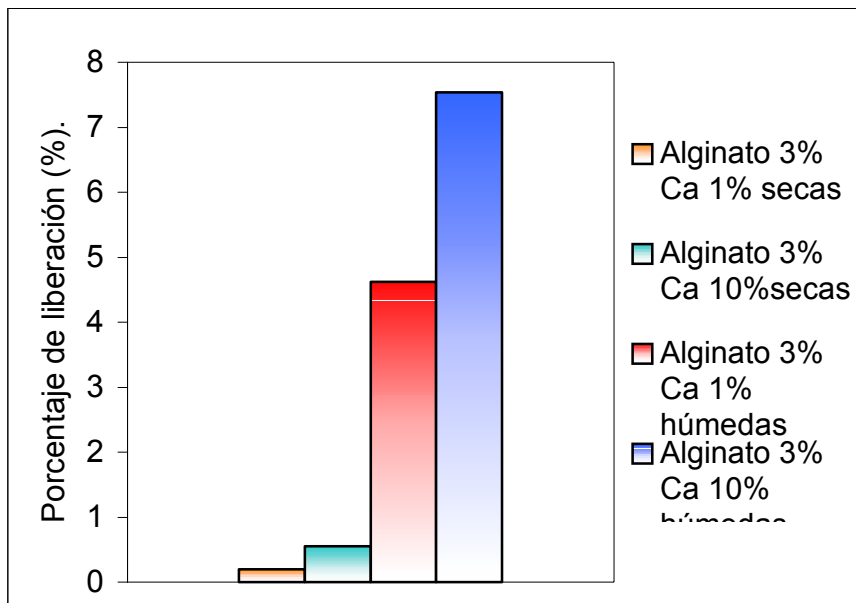


Figura 3: Porcentaje de liberación del agente activo para cápsulas grandes, secas y húmedas de alginato al 3% con 1 y 10% de CaCl_2 .

Para aplicaciones donde se requiera la liberación del componente activo será necesario modificar las condiciones del medio para promover este proceso, principalmente composición, temperatura y tiempo.

De las condiciones ensayadas en el laboratorio: cambio de pH, temperatura y agregado de iones secuestrantes del Ca^{+2} , ésta última fue la más efectiva.

El agregado de soluciones diluidas de citrato de sodio promovió la pérdida de la integridad de las cápsulas y la liberación total del agente activo sin modificarlo. Esto se atribuyó a que el ion citrato, al combinarse con los iones calcio, desestabiliza la matriz del gel que necesita de las uniones calcio-alginato para mantenerse.

CONCLUSIONES

La concentración de alginato de 1% se descartó debido a que las cápsulas formadas perdían rápidamente su integridad. No se observaron diferencias significativas en la textura de las cápsulas con 2 y 3% de alginato.

La concentración de CaCl_2 fue el factor más significativo; la mayor concentración aumentó la fuerza máxima de compresión y disminuyó el tamaño de las cápsulas y la capacidad de retención del colorante. Estos resultados se atribuyeron a la mayor interacción entre el hidrocoloide y el ion calcio que refuerza la estructura del gel. La liberación del agente activo en agua resultó controlada por un mecanismo combinado de difusión, hinchamiento

y erosión de la matriz. Para la liberación total del componente activo es necesario el agregado de un secuestrante del ion calcio.

BIBLIOGRAFÍA

King, A.H. (1983). Brown seaweed extracts (alginate). Cap. 6 en “Food Hydrocolloids”. Tomo II. M. Glicksman (Ed).pp: 115-181.

King, A.H. (1995). Encapsulation of food Ingredients. Cap. 3 en “Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients”. Risch A. and Reineccius G. (Eds.), ACS Symposium Series 590 American Chemical Society, Washington D.C. USA. pp: 26-39.

Pothakamury U., Barbosa-Canovas G. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. Trends in Food Science & Technology, 33: 397-405.

Reineccius, G.A. (1994). Flavor encapsulation. En “Edible coatings and films to improve food quality.” Eds: Krochta, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M. Technomic Pub. Co., Lancaster, Pa, pp 105-120.

Shahidi F.y Qin-Han, S. (1993). Encapsulation of Food Ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33, (6): 501-547.

EFFECTO DE LOS HIDROCOLOIDES SOBRE LA CALIDAD DE LOS PANES OBTENIDOS POR DIFERENTES METODOLOGÍAS DE PANIFICACIÓN

FERRERO, Cristina¹; AGUIRRE, Alicia²; CAMPAÑA, Leda³; CARDÓS, Miguel³; CUYEU, Romina⁴; LEÓN, Alberto E.^{2,5}; PÉREZ, Gabriela²; PUPPO, Cecilia^{1,4}; RIBOTTA, Pablo^{2,5}; AÑÓN, María C.¹

¹CIDCA-Fac.de Cs. Exactas, Universidad Nac. de La Plata, 47 y 116 (1900) La Plata, Pcia. Buenos Aires. ²Facultad de Cs. Agropecuarias, Universidad Nac. de Córdoba, Av. Valparaíso s/n (5000), Córdoba. ³Molino Campodónico Ltda, 58 e/ 1 y 2 (1900), La Plata. ⁴Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nac. de La Plata, 60 y119 (1900), La Plata. ⁵CEPROCOR, Agencia Córdoba Ciencia SE (5164) Santa María de Punilla, Córdoba. e-mail: aeleon@agro.uncor.edu

RESUMEN

Se estudió el efecto de distintos hidrocoloides (carrageninas, alginatos, goma xántica, pectina y goma guar) sobre la calidad de panes obtenidos por diferentes metodologías. En la metodología 1 (MP1) se utilizó una proporción de agua constante, se hicieron dos pasadas por sobadora, no se incluyó ácido ascórbico y se utilizó 1,25% de levadura. En la otra (MP2) se usó el porcentaje de agua del farinograma, se hicieron seis pasadas por sobadora, se incluyó ácido ascórbico y se utilizó 3% de levadura. Sobre los panes se determinó volumen específico, textura inicial y aspecto de la miga. La goma guar y la pectina mejoraron la calidad de los panes, la goma xántica produjo una disminución en el volumen específico y las carrageninas y alginatos tuvieron efectos diferentes según el método de panificación utilizado. Estos resultados indican que la metodología de panificación incide en el efecto de estos aditivos sobre la calidad panadera.

Palabras clave: hidrocoloides, calidad panadera, panificación, textura

ABSTRACT

The effect of different hydrocolloids (carrageens, alginate, xanthan gum, pectin and guar gum) on quality of breads obtained by two methodologies was studied. In bread making methodology 1 (BM1) a constant proportion of water was used, dough was laminated twice, ascorbic acid was not included in formulation and 1.25 % yeast was added. In the other one (BM2) farinograph percentage of water was applied, dough was laminated six times, ascorbic acid was included and 3% yeast was employed. Bread specific volume, initial texture and aspect of crumb were evaluated. Pectin and guar gums improved bread

quality, xanthan gum decreased specific volume and carrageen and alginate had different effects depending on bread making methodology.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades únicas de la harina de trigo de formar una masa viscoelástica al ser mezclada con agua se deben a las características de las gliadinas y gluteninas, proteínas presentes en el grano (Lindsay y Skerritt; 1999, Shewry y col. 2001). Estas proteínas son capaces de absorber prácticamente dos veces su peso en agua y de constituir una red elástica y extensible capaz de retener CO₂ durante la fermentación y posterior cocción. Durante el amasado se producen numerosas interacciones, no sólo entre las proteínas y el agua para formar la red de gluten sino también interacciones con otros componentes presentes en la harina: almidón, polisacáridos no almidonosos (arabinosilanos, arabinogalactanos) y lípidos (neutros y polares: fosfo y glicolípidos) (Carr y col., 1992; Bettge y Morris, 2000; Lee y col., 2001).

La calidad panadera de una harina se determina por el volumen y calidad de pan que se puede obtener de ella. Existen además diversos ensayos tradicionales (relación gluten húmedo/gluten seco, cantidad de proteína, ensayos reológicos (alveograma, farinograma, extensograma, entre otros) que permiten predecir su comportamiento en la panificación posterior. De todas las determinaciones, la de volumen de pan a partir de una cierta cantidad de harina en condiciones estandarizadas es la que más certeza da sobre la aptitud de una harina.

Las harinas de trigo cultivados en Argentina difieren notablemente en calidad industrial, según la zona de procedencia del cereal, condiciones ambientales y causas genéticas. Una harina de trigo de buena calidad panadera no debería necesitar de aditivos para lograr un producto de buen volumen, textura y aspecto. Sin embargo, muchas veces se requiere del uso de aditivos de diverso tipo para mejorar el rendimiento de harinas de calidades inferiores. Entre estos aditivos se encuentran emulsificantes, oxidantes, enzimas y en los últimos años han comenzado a utilizarse hidrocoloides como una alternativa. Estos aditivos son hidratos de carbono de alto peso molecular que proceden de diversas fuentes (semillas, algas, microbianos, etc) y son de amplio uso en alimentos debido a las características funcionales que imparten.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de distintos hidrocoloides sobre la calidad del pan obtenido a partir de una harina 000, utilizando dos metodologías de panificación diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de las harinas

Gluten húmedo y seco: se determinó en un Glutomatic bajo norma IRAM 15684.

Ensayos reológicos: se realizó la caracterización reológica de la harina a través de ensayos con farinógrafo de Brabender (IRAM 15855) y alveógrafo de Chopin (IRAM15857), en ausencia y presencia de aditivos. De los farinogramas se determinó el % de absorción agua (% abs), tiempo de desarrollo (td), estabilidad (te) y aflojamiento (af), mientras que de los alveogramas se calculó la tenacidad (P), la extensibilidad (L), la relación P/L y el trabajo de extensión (W).

Formulación y obtención de las piezas

Como fórmula base se utilizó una de pan tipo francés. Se utilizaron dos metodologías de panificación diferentes, que se comparan en la Tabla 1. La panificación se realizó utilizando una harina 000 (S.A. Miguel Campodónico Ltda.) En la metodología de panificación 1 se agregó una cantidad de agua constante (55 ml de agua cada 100 g de harina); en la metodología 2 se varió la cantidad de agua de acuerdo a los resultados farinográficos (Tabla 2). Los hidrocoloides agregados fueron carrageninas, alginato de sodio, goma guar, xántica y pectina (Saporiti Hnos), en dos niveles, 0.5 % y 1 % (p/p).

El tiempo de amasado empleado fue de 7,5 a 11,5 minutos según la formulación. Luego del amasado se dejó reposar la masa 15 minutos a temperatura ambiente. Se armaron las piezas y fueron llevadas a cámara de fermentación durante 1 h 30 min. El horneado se realizó a 180°C durante 15 minutos.

Caracterización de las piezas de pan

Volumen de pan: por desplazamiento de semillas de nabo.

Color de la miga: se evaluaron los parámetros de color (H^*), intensidad de color (C^*), luminosidad (L^*) con un colorímetro Chroma Meter CR-300C (Minolta).

Dureza: se analizó la dureza de las migas de pan con un equipo TA-XT2i Texture Analyzer, a través de ensayos de compresión. Se tomó como dureza la fuerza máxima.

RESULTADOS

Efecto de los hidrocoloides sobre las propiedades de la masa

Los valores de gluten húmedo y seco para la harina sin agregado de hidrocoloides fueron 25,8 y 9% respectivamente. Al agregar hidrocoloide no se formó la red de gluten, en ningún caso, lo que indica que el hidrocoloide podría estar compitiendo por el agua disponible afectando la hidratación de las proteínas.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros farinográficos obtenidos para la harina sin y con agregado de los diferentes hidrocoloides.

Tabla 1. Comparación de las diferentes formulaciones y metodologías de panificación

	Metodología 1	Metodología 2
formulación	agua constante sin ác. ascórbico 1,5 % de levadura	agua variable (según farinógrafo) con ác. ascórbico (0,015%) 3 % de levadura
tiempo de amasado	10 minutos (promedio)	
laminado	2 veces	6 veces
fermentación	1h 30 min	
horneado	18 min 180°C	

Tabla 2. Caracterización de la harina sin y con aditivos

Muestra	%	Farinograma				Alveograma			
		abs (%)	td (min)	te (min)	afl (UB)	P	L	P/L	W
Control	0	57,3	9	15	40	98	72	1,36	266
+ xántica	0,5	59,7	15	23	25	112	55	2,05	238
	1,0	62,4	22	28,5	10	161	35	4,63	240
+ carragenina	0,5	60	10	21	30	104	62	1,66	247
	1,0	60	11	18	30	115	54	2,14	246
+ guar	0,5	56,4	12	26	20	102	57	1,79	230
	1,0	57	14	39	20	113	40	2,83	192
+ alginato	0,5	58	9	18	40	98	70	1,4	261
	1,0	59,5	9	15	50	108	71	1,53	281
+ pectina	0,5	58,5	8,5	13	50	88	81	1,08	251
	1,0	59,3	7,5	11	50	90	71	1,28	244

Los valores de absorción del farinograma muestran que la capacidad de absorber agua aumentó en presencia de hidrocoloide. La goma xántica, el carragenano y la goma guar presentaron tiempos de desarrollo (td) mayores y una estabilidad (te) significativamente mayor a la obtenida con el control. La pectina presentó td y te semejantes al control aunque con menor aflojamiento.

Los parámetros alveográficos muestran que los hidrocoloides, a excepción de la pectina, formaron masas más tenaces (mayor P) y menos extensibles (menor L), especialmente cuando se utilizaron en una concentración del 1%. La masa que presentó mejores propiedades alveográficas fue la preparada con pectina.

Efecto de los hidrocoloides sobre las características de los panes obtenidos

En la Figura 1 se muestran los volúmenes específicos relativos según la metodología de panificación y el aditivo agregado.

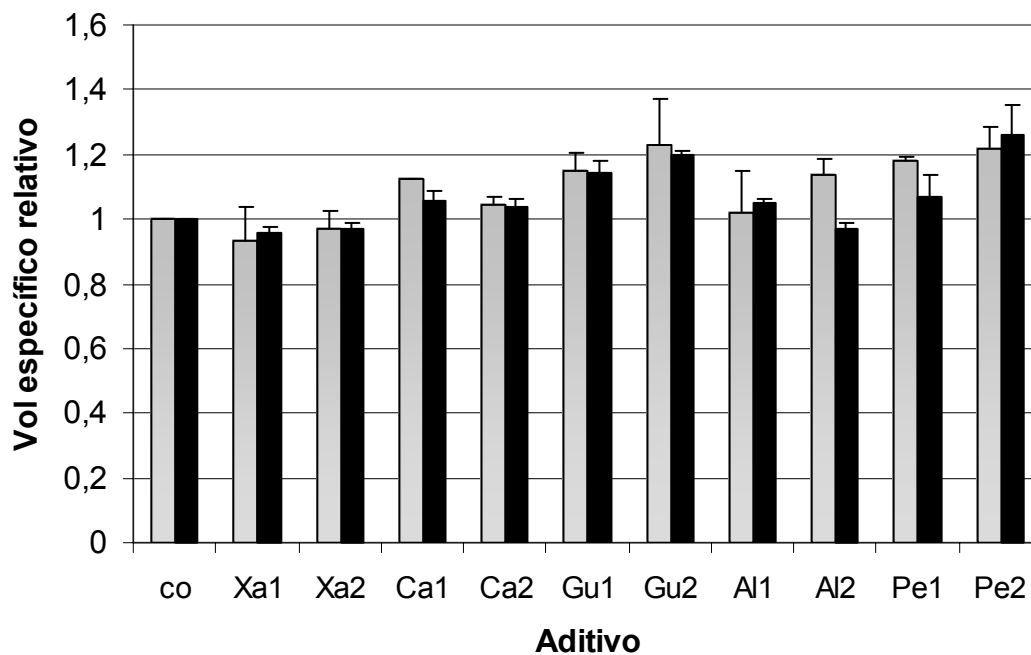


Figura 1. Volúmenes específicos obtenidos por las distintas metodologías de panificación Gris: MP1 y Negro: MP2. co: control, Xa: con xántica, Ca: con carragenina, Gu: con guar, Al: con alginato, Pe: con pectina. 1: 0,5 % de hidrocoloide, 2: 1% de hidrocoloide. Las barras corresponden al error típico

La goma guar y la pectina mejoraron la calidad de los panes obtenidos por una u otra metodología, la goma xántica produjo una disminución en el volumen específico y las carrageninas y alginatos tuvieron efectos diferentes según el método de panificación utilizado.

Estos resultados se relacionan con los mostrados en la Figura 2 en donde se observa cómo varía la dureza relativa de la miga en función de la metodología y el tipo de aditivo utilizado.

La metodología 1 dio como resultado panes con miga de mayor dureza relativa siendo los menores valores obtenidos los correspondientes a panes con goma guar (0,5 % y 1 %),

pectina (0,5 y 1 %) y alginato 0,5 %. Sin embargo, en ningún caso se obtuvieron menores valores de dureza que en el control. En los panes obtenidos según la metodología 2, la dureza de la miga fue mayor o igual que la del control salvo en el caso de los aditivados con goma guar (1 %), pectina (0,5 y 1 %) y carragenanos (0,5%). Las diferencias en la calidad del pan observadas entre las dos metodologías estarían relacionadas principalmente a la cantidad de agua utilizada durante el amasado debido a que los hidrocoloides interactúan con las proteínas del gluten (Ribotta y col, 2005) y por lo tanto el agua disponible afectaría estas interacciones incidiendo directamente en el volumen y dureza de la miga.

Estos resultados indican que la goma menos adecuada para mejorar la calidad de los panes es la xántica y que la pectina resultaría la más eficaz ya que se obtienen buenos resultados independientemente de la metodología de panificación utilizada. Por otro lado, si se comparan las Figura 1 y 2 se observa que la dureza de la miga presenta una gran variación frente al agregado de hidrocoloides cuando se emplea la metodología de panificación 1.

El color de los panes obtenidos no fue afectado significativamente por el agregado de hidrocoloide.

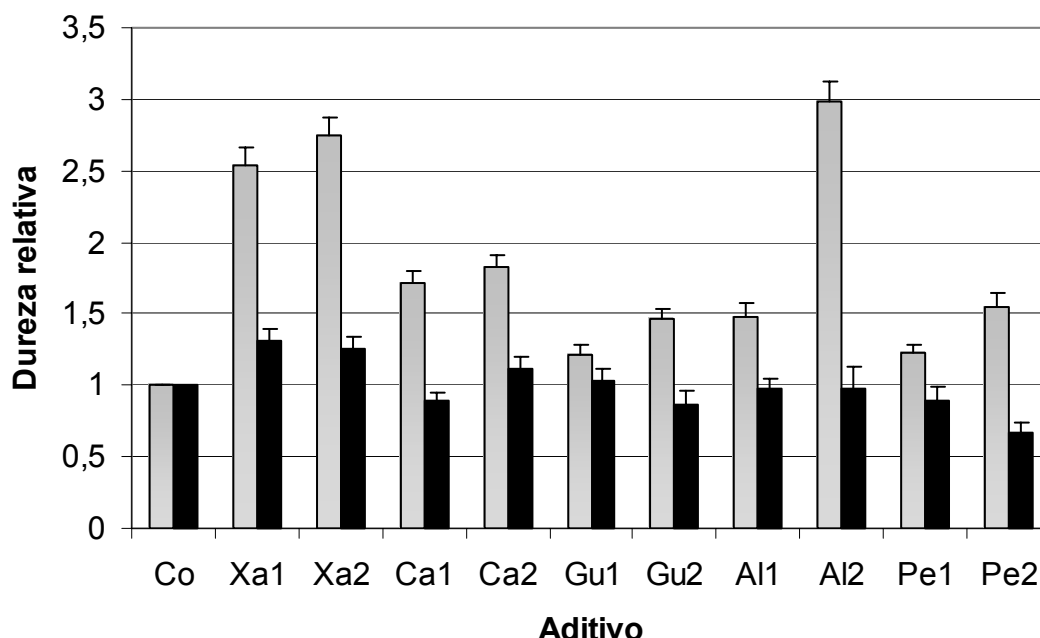


Figura 2. Dureza relativa (respecto al control negativo) de las migas de panes obtenidos por los distintos métodos de panificación. Gris: MP1 y Negro: MP2. co: control, Xa: con xántica, Ca: con carragenina, Gu: con guar, Al: con alginato, Pe: con pectina. 1: 0,5 % de hidrocoloide, 2: 1% de hidrocoloide. Las barras corresponden al error típico

CONCLUSIONES

Los hidrocoloides incrementaron la capacidad de absorber agua de la masa. Las masas resultaron más tenaces y menos extensibles en presencia de hidrocoloide. Comparando ambos métodos de panificación se observó que la goma guar y la pectina mejoraron la calidad de los panes, la goma xántica produjo una disminución en el volumen específico y las carrageninas y alginatos tuvieron efectos diferentes según el método de panificación utilizado. Estos resultados indican que no solo el aditivo utilizado incide en los resultados obtenidos sino también la metodología de panificación.

Los mejores resultados obtenidos en general con el método de panificación 2 (MP2) se pueden atribuir a un efecto combinado de mayor cantidad de agua agregada y una mayor cantidad de levadura. Los hidrocoloides son moléculas altamente hidrofílicas que pueden competir con las gliadinas y gluteninas por el agua presente, lo que queda de manifiesto cuando se quiere determinar gluten, ya que no se forma la red. Sin embargo, algunos de los hidrocoloides ensayados (goma guar, pectina) mostraron ser efectivos como mejoradores bajo diversas condiciones de panificación.

BIBLIOGRAFIA

Bettge AD, Morris CF. 2000 Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry* 77: 241-247.

Carr NO, Daniels NWR, Frazier PJ. 1992. Lipid interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 31: 237-258.

Lee MR, Swanson BG, Baik BK. 2001. Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry* 78:701-706.

Lindsay MP, Skerritt JH. 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trend in Food Science & Technology* 10:247-253.

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

Shewry, PR, Popineau, Y, Lafiandra, D, Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. *Trend in Food Science & Technology* 11:433-441.

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE GLIADINAS MEDIANTE RP-HPLC

VALDEZ José R., MARTÍNEZ María M., MILDE Laura B.

Cátedra Qca. Biológica. Módulo de Bqca. y Fcia. CIDET. F.C.E.Q. y N. UNaM. López Torres 1375 - Posadas – Misiones (3300)- TE-FAX 435118. ricardovald@arnet.com.ar

RESUMEN

Las gliadinas son proteínas que, junto a las gluteninas, determinan la calidad panadera de la harina. Las condiciones de extracción, la estabilidad en el tiempo y temperatura de almacenamiento de los extractos, son etapas críticas en los procedimientos analíticos. Se evaluó la estabilidad en el tiempo a varias temperaturas de extractos etanólicos de gliadinas de harina variedad Buck Guapo, sin agregado de agentes reductores, comparando los perfiles proteicos mediante RP-HPLC y ANOVA. La mejor temperatura de almacenamiento para estos extractos fue 20°C; temperaturas extremas (4°C y 35°C) provocaron alteraciones cuali-cuantitativas en las fracciones prolaminicas antes del segundo día. Las ω -gliadinas modificaron los tres factores analizados a las tres temperaturas en menor tiempo, siendo las α/β -gliadinas las más estables a 20°C. No obstante, es importante realizar un análisis inmediato de los extractos, pues el cambio en los perfiles proteicos ya es evidente a partir del cuarto día a 20°C.

ABSTRACT

Gliadins are monomeric proteins present in the wheat kernel, that help determining the breadmaking quality in the flour. Extraction conditions, time and storage temperature of the extracts, are critical points of analytical procedures. The stability of gliadins etanolic extracts, without chemical reduction, was evaluated at three temperatures in the Buck Guapo flour variety. Protein patterns were compared by RP-HPLC. The best storage temperature was 20°C, while extreme temperatures (4°C and 35°C) caused several changes in the prolaminic fractions before the second day. The α/β -gliadins showed more stability at 20°C, and the ω -fraction was the most unstable at all temperatures. Nevertheless, extracts must be analyzed immediately because changes in protein patterns are evident at 20°C after the fourth day.

Palabras Claves: estabilidad-tiempo-temperatura-harina-gliadinas-RP-HPLC.

INTRODUCCIÓN

Las gliadinas son un grupo de proteínas monoméricas que se encuentran en el endospermo del grano de trigo, y que tras el proceso de molienda – junto a las gluteninas - determinan la calidad panadera de la harina (Callejo González, 2002). Son un complejo y heterogéneo conjunto de proteínas homólogas, que poseen en su estructura gran cantidad de enlaces disulfuro intramoleculares y puentes de hidrógeno, hecho que sumado a la presencia de residuos hidrofóbicos expuestos explican su solubilidad en solventes de baja polaridad (Lookhart y Bietz, 1994).

Para el análisis de las gliadinas, es crítico poder extraerlas evitando groseras alteraciones en su conformación, pues del estudio de los perfiles de las fracciones obtenidas es posible obtener información relevante no solamente sobre las propiedades reológicas de las proteínas, sino también sobre las características genotípicas, las condiciones de cultivo del grano, etc. (Huebner y Bietz, 1994).

Las condiciones relacionadas al proceso de extracción y la estabilidad de los extractos obtenidos son etapas críticas en los procedimientos analíticos. Actualmente no hay definición sobre las condiciones óptimas de extracción, y la modificación de Wiesser (1987), que no difiere mucho de las establecidas inicialmente por Bietz (1983), es aceptada por gran número de laboratorios para el análisis de gliadinas.

La estabilidad en el tiempo de las proteínas aisladas en los extractos, es también un punto crítico para el proceso de análisis, pues un retraso en la fase analítica puede derivar en interpretaciones erróneas del patrón de proteínas presentes en el grano o la harina de trigo. Al igual que para las condiciones de extracción, no existe definición sobre el período de tiempo durante el cual las proteínas mantienen sus estructuras conformacionales estables en solución. Algunos autores (Lookhart et al., 1982; Bietz et al., 1984) coinciden que las proteínas extraídas en condiciones no reductoras no sufren modificaciones significativas dentro del mes a temperatura ambiente; mientras que con el uso de agentes reductores la estabilidad es mucho menor, necesitando incluso la presencia de alquilantes para poder analizar las muestras dentro del día.

La temperatura de almacenamiento puede ser un factor importante en la definición de la estabilidad, pues modifica la solubilidad de las proteínas en solución (Cheftel et al., 1993); además durante el año la temperatura ambiente sufre grandes variaciones en las distintas regiones, pudiendo llegar a más de 30°C en lugares cálidos, como ocurre en el norte de nuestro país.

En este trabajo, se evaluó la estabilidad en el tiempo a varias temperaturas de extractos etanólicos de gliadinas de harina variedad Buck Guapo, mediante la comparación de

perfiles proteicos obtenidos por RP-HPLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se utilizó harina de la variedad Buck Guapo, correspondiente al grupo Trigo Duro Argentino 1 Superior, que se obtuvo de la Estación Experimental Marcos Juárez, Córdoba, dependiente del Instituto Nacional de Tecnología Alimentaria.

Extracción de Gliadinas

Se procedió a extraer la fracción prolaminica mediante solubilización en etanol 70%(v/v), en baño ultrasónico (42kHz) durante 30min a 20°C (Singh et al.,1990); previamente se realizó tres etapas sucesivas de desgrasado, con 1-butanol y eliminación de albúminas y globulinas con Cloruro de Sodio 0,85M (Wiesser, 1987). Los extractos etanólicos se filtraron utilizando membrana de Nylon de 0,45µm y se inyectaron al cromatógrafo para su separación.

Condiciones Cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución modelo HP-1100, constituido por un sistema automatizado de inyección, termostizador de columna y detector de arreglo de fotodiodos y fluorescencia como sistema de detección. Se inyectó 50µl del extracto etanólico, en una columna Hypersil ODS-5 de 125 x 4 x 5µm, estabilizada a 80°C. Como fase móvil se usó agua: acetonitrilo con agregado de 0,1%(v/v) de ácido trifluoroacético en un gradiente de 25-75% y a un flujo constante de 1ml/min. La detección fue realizada a 210 nm (ancho de banda 8 nm) con referencia a 400nm (ancho de banda 100nm) (Valdez y Chirido, 2001).

Estabilidad de Extractos

En una primera etapa, se analizaron los perfiles proteicos del extracto fresco (día 0) y los almacenados a 4 y a 20°C, a los 10, 20 y 30 días realizando cada separación por triplicado. Se evaluaron las diferencias encontradas en número de picos, eficiencia y concentración, tanto en gliadinas totales, como en las fracciones α , β , γ y ω mediante ANOVA usando el software StatGraphycs Plus 7.1.

La cuantificación de las gliadinas totales y de las diferentes fracciones se realizó mediante HPLC, usando un extracto estándar cuantificado previamente por el método de Kjeldhal, con detección colorimétrica por Berthelot modificado (Martínez et al., 2004).

Posteriormente, se evaluaron las mismas diferencias en los perfiles proteicos y por fracción a tres temperaturas (4, 20 y 35°C), por triplicado tras la inyección de un extracto fresco (día 0) y a los 2, 4, 6, 8 y 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto etanólico de gliadinas evidenció turbidez creciente y aparición de grumos al transcurrir el tiempo de almacenamiento, que no se redisolvieron por agitación con vórtex. Del análisis de varianza de los perfiles de gliadinas totales se encontró diferencias significativas en el número de picos a los 4 y 20°C ($p=0,0001$ y $p=0,0125$), en la eficiencia ($p=0,0016$ y $p=0,000$) y concentración ($p=0,0006$ y $p=0,011$); presentándose cambios importantes en los perfiles proteicos al décimo día a ambas temperaturas (Figura N°1).

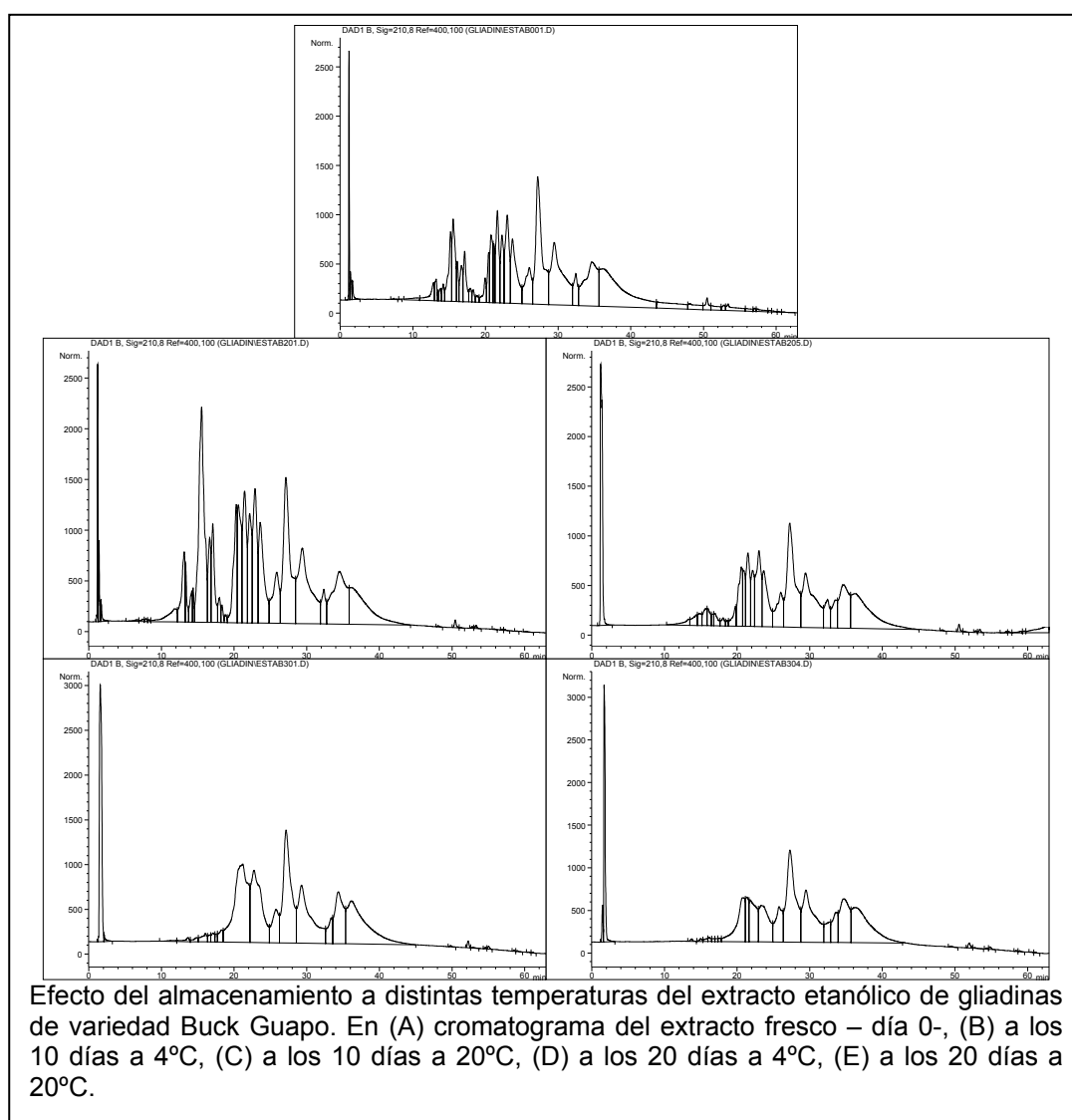


FIGURA N°1. Estabilidad dentro de los 30 días

Al realizar el estudio por fracción, en las ω -gliadinas se observó a las dos temperaturas diferencias en el número de picos ($p=0,001$ y $p=0,013$), en la eficiencia a 20°C ($p=0,0056$)

y en la concentración a 4°C ($p=0,006$).

En la fracción α/β - a 4°C se observó diferencias en el número de picos ($p=0,037$) y en la concentración ($p=0,0006$), mostrando mayor estabilidad a 20°C.

En las γ -gliadinas a 4 y 20°C se observaron diferencias en la cantidad de picos eluidos ($p=0,0191$ y $p=0,048$), en la eficiencia ($p=0,0013$ y $p=0,000$) y concentración ($p=0,025$ y $p=0,021$).

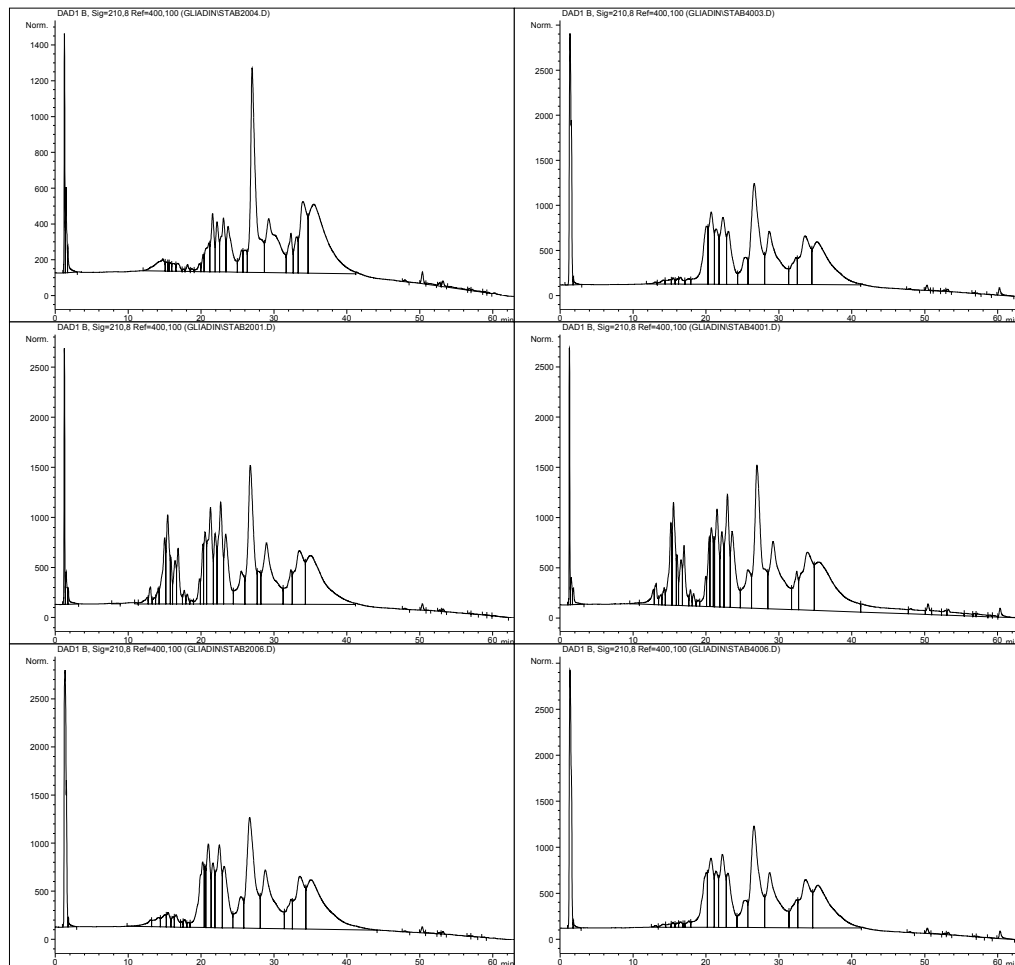
La fracción más estable fue la α/β - a 20°C; las demás variaron al décimo día a las dos temperaturas.

Para identificar el día a partir del cual se evidenció los cambios en el extracto, se analizó la estabilidad de las gliadinas totales dentro de los 10 días y se observó diferencias significativas en el número de picos al variar la temperatura ($p=0,038$) y los días ($p=0,0002$), disminuyendo el número de picos antes del segundo día a 35°C ($p=0,0033$), después del segundo día a 4°C ($p=0,0032$) y después del cuarto día a 20°C ($p=0,0218$). Al estudiar la variación de la concentración de las gliadinas totales durante el almacenamiento se observaron diferencias significativas a 20°C a partir del cuarto día ($p=0,0074$) y a 35°C antes del segundo día ($p=0,0003$). En la eficiencia de los picos se observaron diferencias significativas a 35°C antes del segundo día ($p=0,0031$) (Figura N°2).

En el estudio de las fracciones, las ω -gliadinas mostraron diferencias significativas en el número de picos tras el almacenamiento a las tres temperaturas, disminuyendo antes del segundo día a 4°C ($p=0,0158$) y a 35°C ($p=0,0002$); después del cuarto día a 20°C ($p=0,021$).

La concentración de la fracción presentó diferencias significativas a las tres temperaturas, disminuyendo antes del segundo día a 4°C ($p=0,0029$) y a 35°C ($p=0,0000$); y después del cuarto día a 20°C ($p=0,0073$). Por el contrario, la eficiencia de los picos mostró mayor estabilidad, observándose una disminución de número de platos antes del segundo día a 35°C ($p=0,0046$).

Las α/β -gliadinas presentaron diferencias significativas en el número de picos, disminuyendo después del segundo día a 4°C ($p=0,0004$) y antes del segundo a 35 °C ($p=0,0243$). La concentración disminuyó después del cuarto día a 20°C ($p=0,006$) y después del sexto día a 35°C ($p=0,0006$); en la eficiencia, se observaron diferencias significativas después del segundo día a 4°C ($p=0,0007$) y a 35°C($p=0,0032$).



Efecto del almacenamiento a distintas temperaturas del extracto etanólico de gliadinas de variedad Buck Guapo. En (A) cromatograma del extracto 2 días a 4°C, (B) 4 días a 4°C, (C) 2 días a 20°C, (D) 4 días a 20°C, (E) 2 días a 35°C y (F) 4 días a 35°C.

FIGURA N°2. Estabilidad dentro de los 10 días

Las γ -gliadinas mostraron diferencias significativas en el número de picos, disminuyendo después del cuarto día a 20°C ($p=0,0030$), mientras que aumenta después del segundo día a 35°C ($p=0,0080$). La concentración de la fracción no presentó diferencias a las tres temperaturas; por el contrario, la eficiencia de los picos mostró cambios a 35°C ($p=0,0009$), disminuyendo significativamente durante el almacenamiento antes del segundo día.

Las diferencias encontradas en los valores de número de picos, eficiencia y concentración, tanto de gliadinas totales como de cada fracción prolamínica, podría explicarse considerando la turbidez y formación de grumos observada durante el almacenamiento del extracto. Estos podrían ser causados por la reestructuración de las interacciones proteína - solvente en nuevas uniones proteína – proteína (Cheftel et al.,

1993). Así se modificaría diferencialmente la solubilidad de las distintas fracciones afectando los perfiles proteicos, pues en el proceso de análisis sólo 50µl del extracto heterogéneo son inyectados al azar al cromatógrafo. En el presente trabajo la solubilidad de las gliadinas fue afectada significativamente por la temperatura de almacenamiento, mostrando modificaciones más tempranas a temperaturas extremas. No obstante, se encontraron diferencias con los resultados de Bietz y col. (1984) sobre la estabilidad de las gliadinas a 20°C, pues a esta temperatura se observaron severas alteraciones a partir del cuarto día.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten definir que la mejor temperatura de almacenamiento para los extractos etanólicos de gliadinas, sin agregado de agentes reductores fue 20°C. Temperaturas extremas (4°C y 35°C) provocaron alteraciones cuali-cuantitativas en las fracciones prolamínicas antes del segundo día; las ω-gliadinas modificaron los tres factores analizados a las tres temperaturas en menor tiempo, mientras que las α/β-gliadinas fueron más estables a 20°C.

No obstante, es importante realizar un análisis inmediato de los extractos, pues el cambio en los perfiles proteicos fue evidente a partir del cuarto día a 20°C.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Marta Cuniberti por la donación de harina de la variedad Buck Guapo; a los auxiliares Karina González, Carlos Oliveira, y Alexis Rybak, por la colaboración técnica; al Director de Criminalística Crio. Insp. Juan Jesús Rodríguez[†], por el permiso para la utilización del Laboratorio Químico a su cargo.

BIBLIOGRAFÍA

Callejo González M. J., 2002. Industria Panificadora en Industria de Cereales y Derivados; 1º Edición 2002. Ed. A. Madrid Vicente y Mundi Prensa. Madrid- España. Cap. 11, p199-200.

Lookhart, G. L. and Bietz, J. A., 1994. Protein extraction and sample handling techniques en High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. AACC. St.Paul,MN. P.52-55.

Huebner, F. R. and Bietz, J.A., 1993. Improved Chromatographic Separation and Characterization of Ethanol-Soluble Wheat Proteins, Cereal Chem. Vol.70, N°5, p506-511.

Wieser H.; Moeld A.; Seilmeier W and Belitz HD, 1987. Phase High-Performance Liquid Chromatography of gliadins from different wheat varieties: Aminoacid composition and N-terminal aminoacid sequence of component. *Z Lebensm. Unters Forsch.* 185:371.

Bietz J. A., 1983. Separation of Cereal proteins by Reversed-Phase High-Performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* Vol . 255, p. 219-238.

Lookhart G. L., Jones B. L., Hall S. B. and Finney K. F, 1982. An Improved method for Standardizing Polyacrylamide gel Electrophoresis of Wheat Gliadin Proteins. *Cereal Chem.* Vol.59, p. 178-181.

Bietz J. A.; Burnouf, T.; Cobb, L. A. and Wall, J. S.,1984. Gliadin Analysis by Reversed –Phase High-Performance Liquid Chromatography: Optimization of Extraction Conditions in American Association of Cereal Chemists,Inc. , Vol. Nº 61 , p. 124-129.

Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D., 1993. Aminoácidos, péptidos y proteínas en *Química de los Alimentos*; Fennema O. R. p.303-309. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.

Singh N.K.; Donovan, J.R.; Batey, L. L. and MacRitchie, F., 1990. Use of Sonication and Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the Study of Wheat Flour Proteins.Dissolution of Total Proteins in the Absence of Reducing Agents, *Cereal Chem. Assoc. Am. Cereal Chem.* Vol 67,Nº2,p. 150-161.

Valdez J.R.; Chirido F.G., 2001. Optimización de la Separación de Prolaminas de Trigo por Cromatografía Líquida en Fase Reversa. X Encontro Estadual de Farmacéuticos e Bioquímicos. p. 99. Florianópolis, Brasil

Martínez M, Robledo L, González K, Valdez J, Milde L. ,2004. Comparación de Métodos Alternativos para Cuantificación de Proteínas. XXV Congreso Argentino de Química. P. 1675-1678. UNCPBA – Bs.As. Argentina

APLICACIÓN DE SDS-PAGE A LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATERIAS PRIMAS PROTEICAS Y ALIMENTOS PROCESADOS.

LOPEZ Laura B., GRECO Carola B. y VALENCIA Mirta E.

Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. Buenos Aires. Argentina. Tel/Fax: 01149648243. e-mail: laulop@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Con el objeto de identificar las proteínas constituyentes se analizaron 34 muestras de distinto origen: harinas para elaborar fainá, materias primas para embutidos, productos derivados de cereales, productos extrudidos, levadura seca, relleno de raviolos y fideos comerciales. Se utilizó SDS-PAGE según el sistema de Laemmli y se emplearon dos solventes de extracción: 1) buffer que contiene dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol y 2) isopropanol 55° + 2-mercaptoetanol. Esta metodología permitió identificar proteínas de garbanzo y de trigo en las harinas para fainá; proteínas de suero lácteo, de plasma bovino y de soja en las materias primas para embutidos; proteínas de trigo pan o de avena en los productos derivados de cereales; proteínas de soja en productos extrudidos; proteínas de levadura en levadura seca; proteínas de trigo pan y de suero lácteo en relleno de raviolos y proteínas de trigo pan y de trigo candeal en fideos comerciales. El presente trabajo permitió confirmar la utilidad de esta metodología para identificar las proteínas que constituyen a muestras de diverso origen.

PALABRAS CLAVES: Proteínas, identificación, SDS-PAGE.

ABSTRACT

To identify the proteins present 34 samples were analysed: flours to elaborate fainá, raw materials for meat products, cereals products, extruded products, dry yeast, ravioli filling and dry pasta. Polyacrylamide slab gel electrophoresis with sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was used for protein identification. Solvents used for protein extraction were: 1) buffer containing SDS and 2-mercaptoethanol and 2) propan-2-ol 55 % (v/v) plus 2-mercaptoethanol. This methodology allowed the identification of chick-pea and wheat proteins in flours to prepare fainá; dairy whey, bovine plasma and soy proteins in raw materials for meat products; wheat or oat proteins in cereals products, soy proteins in extruded products, yeast proteins in dry yeast, dairy whey and wheat proteins in raviolis landfills and durum wheat and common wheat in dry pasta. This work allowed to confirm

the usefulness of this methodology to identify the proteins presents in samples of different origin.

INTRODUCCIÓN

En un alimento, ya sea una materia prima proteica o un producto semielaborado o terminado, además de conocer el porcentaje de proteínas totales y el valor biológico de las mismas, cada vez interesa más determinar las proteínas que lo constituyen. Desde el punto de vista industrial es importante para el control de materias primas proteicas y para la identificación de especies vegetales y animales. Desde el punto de vista legal bromatológico, es útil para el cumplimiento de leyes vigentes (declaración de la lista de ingredientes, identificación de especies vegetales y animales y utilización de nuevas materias primas proteicas). Desde el punto de vista nutricional es útil para la evaluación del límite máximo de proteínas extrínsecas de bajo valor biológico permitido, por ejemplo, en productos cárnicos en donde parte de las proteínas cárnicas son reemplazadas por proteínas vegetales. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio es una metodología apta para la identificación de proteínas en materias primas proteicas y en alimentos procesados (1 - 4). En el presente trabajo se analizaron 34 muestras de distinto origen con el objeto de identificar las proteínas constituyentes de cada muestra.

MATERIALES Y METODOS

Muestras: harinas para elaborar fainá (harinas 1, 2, 3, 4, 5 y 6); materias primas para embutidos (M.P. 1, 2, 3 y 4); productos derivados de cereales: avena en granos, harina de avena, avenas arrolladas (A.A. 1, 2, 3, 4, 5 y 6), producto tipo "sémola" a base de trigo y maíz, semita proteica (alimento para salmones), pellets de afrechillo y premezcla para rancho; productos extrudidos (P.E. 1 y 2); levadura seca, relleno de ravioles (R.R. 1 y 2) y fideos secos (fideos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7).

Se utilizaron como controles de las muestras analizadas todas las materias primas proteicas declaradas en los rótulos o cuya inclusión se sospechaba.

Desgrasado/deshidratado de las muestras: se realizó sobre las muestras previamente molidas con acetona por agitación en homogeneizador VirTis modelo 23 durante 5 minutos y posterior centrifugación a 1200 rpm durante 20 minutos. La relación muestra/acetona fue 1/10.

Extracción de proteínas totales: Se realizó con buffer Tris-HCl (pH: 6,8) con 3 % de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2 % de 2-mercaptoetanol (solución extractiva de proteínas totales). La relación proteína de la muestra/ solución extractiva fue 10 mg/mL.

Las mezclas se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos.

Extracción de prolaminas: Se realizó con isopropanol 55 % (v/v) + 2% de 2-mercaptoetanol (ISO 55 % + 2-ME) por agitación en homogeinizador VirTis modelo 23. La relación proteínas de la muestra/ solvente de extracción fue: 10 - 25 mg/mL. Las mezclas se disgregaron en homogeinizador a baja velocidad durante 5 minutos, se dejaron en reposo 1 hora y se agitaron nuevamente en homogeinizador durante 5 minutos. Luego se centrifugaron 15 minutos a 5000 rpm.

Electroforesis: Se realizó la electroforesis en placas de 10 % de acrilamida según el sistema de Laemmli (5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Harinas para elaborar fainá:

se analizaron seis muestras de harinas para elaborar fainá con el objeto de identificar en ellas la presencia de harina de garbanzo y/o de otras harinas presentes. Se efectuó la extracción de proteínas con los dos solventes de extracción, solución extractiva de proteínas totales que permite evidenciar la presencia de proteínas de garbanzo entre otras e ISO 55% + 2-ME que permite evidenciar la presencia de proteínas de trigo, avena, cebada, centeno y maíz, ya que las proteínas de garbanzo no son solubles en este solvente (1). Con solución extractiva de proteínas totales (Figura 1) se confirmó la presencia de proteínas de garbanzo en las seis muestras analizadas. Con ISO 55% + 2-ME (Figura 2) se determinó la presencia además de proteínas de trigo en las muestras 3, 4, 5 y 6, las cuales sólo declaraban harina de garbanzo en sus respectivos rótulos, de manera que en estas cuatro muestras se detectó la adulteración con harina de trigo.

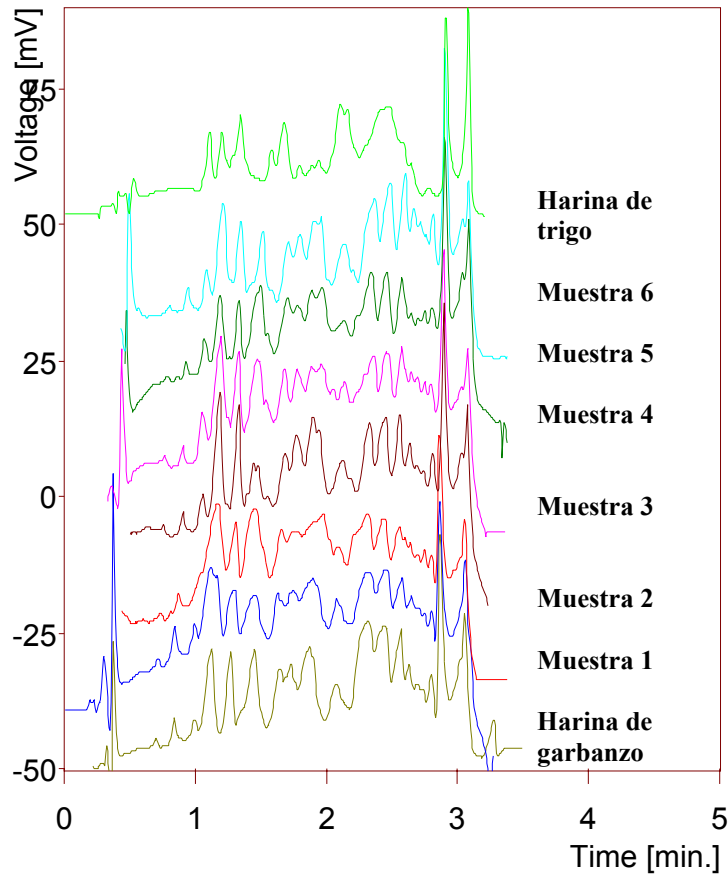


Figura 1: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de harina de trigo, harina de garbanzo y de las harinas para elaborar fainá analizadas, separadas por SDS-PAGE

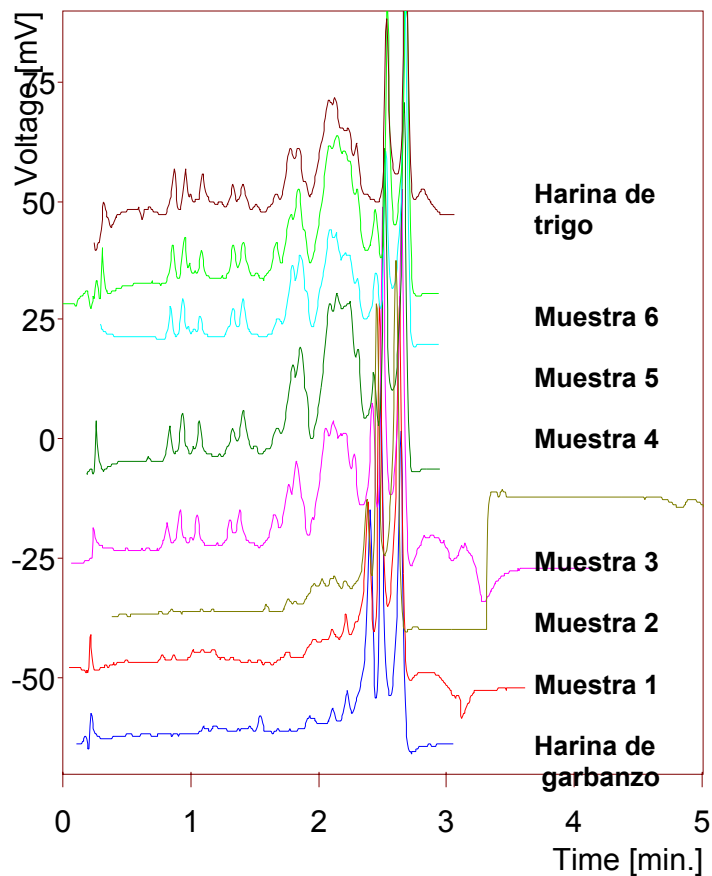


Figura 2: Densitogramas correspondientes a proteínas solubles en ISO 55 % + 2-ME de harina de trigo, harina de garbanzo y de las harinas para elaborar fainá analizadas, separadas por SDS-PAGE

Materias primas para embutidos: el objetivo del análisis fue la identificación de proteínas de origen animal, vegetal o sus mezclas en cuatro muestras. Se realizó la extracción de proteínas totales y se corrieron controles de leche en polvo, harina de trigo, aislado de soja y plasma bovino, posibles materias primas para la elaboración de embutidos (3). A modo de ejemplo en la figura 3 se presentan los densitogramas correspondientes a proteínas totales de leche y de las materias primas 1 y 3. En el cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos.

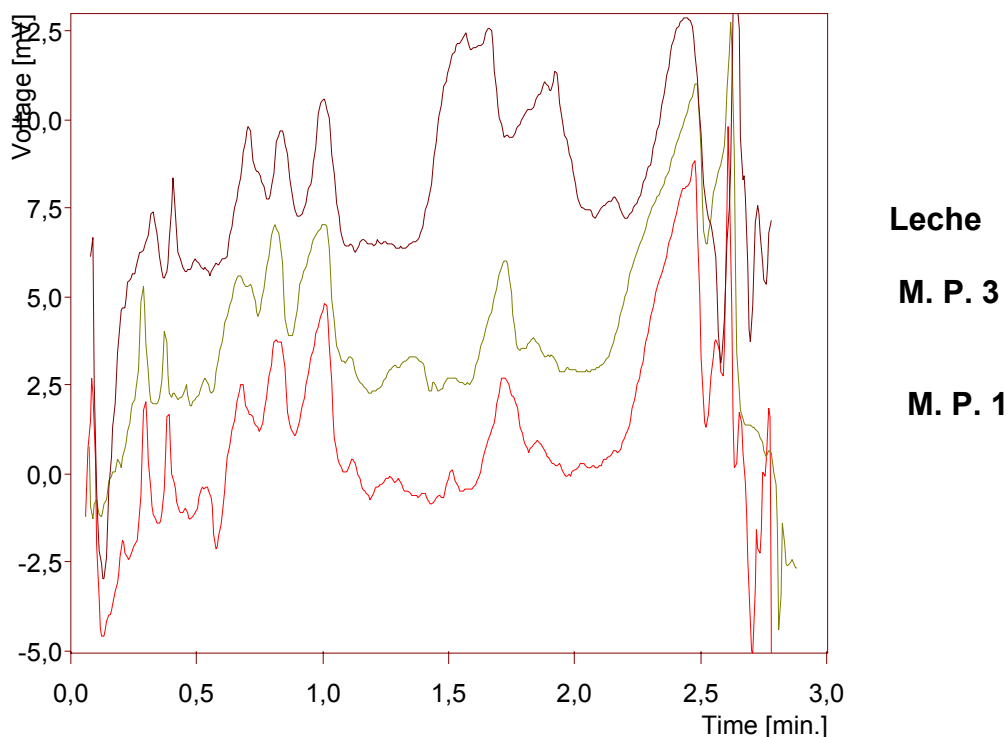


Figura 3: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de leche y materias primas para embutidos (M.P.) 1 y 3, separadas por SDS-PAGE

CUADRO 1

Muestras	Proteínas detectadas con solución extractiva de proteínas totales
M. P. 1	Suero lácteo
M. P. 2	Plasma bovino
M .P. 3	Suero lácteo
M. P. 4	Proteínas de soja

Productos derivados de cereales: se analizaron ocho productos derivados de avena con el objeto de corroborar la presencia de este cereal, en forma exclusiva, en dichas muestras. Se analizó un producto tipo “sémola”, por su granulometría, para identificar

proteínas de trigo y de maíz, una semita proteica (alimento para salmones) y pellets de afrechillo, para identificar las proteínas presentes y una premezcla para rancho para identificar proteínas de trigo, de maíz y de cebada. En el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos.

CUADRO 2

Muestras	Proteínas detectadas con solución extractiva de proteínas totales
Avena en granos	Avena
Harina de avena	Avena
Avena arrollada 1	Avena
Avena arrollada 2	Avena
Avena arrollada 3	Avena
Avena arrollada 4	Avena
Avena arrollada 5	Avena
Avena arrollada 6	Avena
Producto tipo "sémola"	Trigo pan
Semita proteica	Trigo pan
Pellets de afrechillo	Trigo pan
Premezcla para rancho	Trigo pan

PROTEÍNAS TOTALES

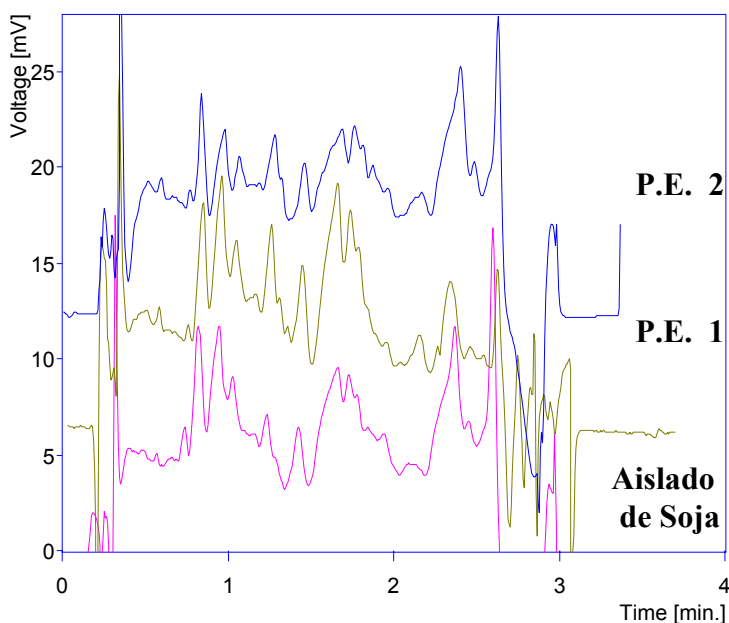


Figura 4: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de aislado de soja y de productos extrudidos (P.E.) 1 y 2, separadas por SDS-PAGE

Productos extrudidos: se analizaron dos productos extrudidos con el objeto de identificar proteínas de soja en su composición. En la figura 4 se presentan los

densitogramas correspondientes a las muestras P.E. 1 y P.E. 2 y a aislado de soja utilizado como control. En ambas muestras se observa el perfil característico de proteínas de soja

Levadura seca: se analizó una muestras de levadura seca con el fin de corroborar el origen de las proteínas presentes. Se utilizó como control levadura seca en gránulos comercial. La muestra analizada presentó el perfil característico de proteínas de levadura.

Relleno de ravioles: se analizaron dos muestras de relleno de ravioles con el fin de identificar las proteínas presentes. Dichos rellenos declaraban entre sus ingredientes proteicos rebozador y ricota. Se utilizaron como controles pan rallado y ricota de leche entera. Al realizar la corrida electroforética se observó que ambas muestras contenían proteínas de trigo y proteínas lácteas en su composición, sin embargo las proteínas lácteas de los rellenos de ravioles presentaban una relación proteínas del suero/caseínas mayor a la de la ricota de leche entera utilizada como control. De acuerdo con los resultados la ricota utilizada en los rellenos correspondería a ricota de suero lácteo. Si bien ambas muestras estaban elaboradas con los mismos ingredientes las resoluciones electroforéticas permitieron determinar que el relleno 2 contenía mayor proporción de ricota que el relleno 1.

Fideos secos: se analizaron siete muestras de fideos con la finalidad de identificar en los mismos proteínas de trigo pan, de trigo candeal o la mezcla de ambos tipos de trigo. En las muestras en que se detectó la mezcla de ambos trigos se realizó la cuantificación de trigo pan utilizando sistemas modelos de mezclas de fideos 100 % trigo pan con fideos 100 % trigo candeal. En el cuadro 3 se presentan las materias primas proteicas declaradas en los respectivos rótulos, las proteínas detectadas y el porcentaje de trigo pan cuantificado en cada muestra.

CUADRO 3

Muestras	Materias primas proteicas declaradas	Proteínas detectadas con solución extractiva de proteínas totales	Cuantificación de trigo pan
Fideos 1	Sémola de trigo candeal	Trigo pan	100 %
Fideos 2	Sémola de trigo candeal	Trigo pan/trigo candeal	73 %
Fideos 3	Sémola-harina fortificada con hierro	Trigo pan	100 %
Fideos 4	Harina fortificada con hierro -Sémola	Trigo pan/ trigo candeal	75 %
Fideos 5	Sémola de trigo candeal	Trigo candeal/ trigo pan	15 %
Fideos 6	Trigo candeal	Trigo candeal/ trigo pan	10 %
Fideos 7	Harina fortificada con hierro -Sémola	Trigo pan	100 %

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió confirmar la utilidad de esta metodología para identificar las proteínas que constituyen a muestras de diverso origen.

BIBLIOGRAFÍA

López L.B., Olivera Carrión M. y Valencia M.E. 1997. “Extracción selectiva de proteínas para la identificación por electroforesis de cereales y leguminosas en alimentos ”. ALIMENTARIA de Tecnología e Higiene de los alimentos. 283, 77 - 80.

López L.B. y Valencia M.E. 2000. "Identificación de proteínas en alimentos: Utilización de SDS-PAGE como método de screening". ALIMENTARIA de Tecnología e Higiene de los alimentos. 317, 83 – 88.

López L.B. y Valencia M.E. 2001. “Detección de proteínas extrínsecas en productos cárnicos comerciales por SDS-PAGE”. Revista Chilena de Nutrición. 28. 3. 447 – 456.

López L.B, Samillán Becerra S. y Valencia M.E. 2005. “Detección y cuantificación de triticum aestivum L. (trigo pan) en fideos comerciales de triticum durum Desf. (trigo candeal) por SDS-PAGE”. ALIMENTARIA de Tecnología e Higiene de los alimentos. En prensa.

Laemmli U. K. 1970. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4”. Nature. 227, 680 - 685.

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NIVALENOL (NIV) Y DEOXINIVALENOL (DON) EN HARINA DE MAÍZ

ROMAGNOLI, Romina A.¹, FERNÁNDEZ, Eduardo L.¹, LÓPEZ, Tomás A², DANIEL, Peter³

1-FCA / UNMdp, 2- Laboratorio de Toxicología Veterinaria, EEA INTA Balcarce. 3- PROPAPA, EEA INTA Balcarce.

Laboratorio de Toxicología Veterinaria. EEA INTA Balcarce. Ruta 226 KM 73.5, CC 276 (7620) Balcarce. Tel: 02266-439122. E-mail: rominaromagnoli27@hotmail.com

RESUMEN

El trabajo se basó en la determinación y puesta a punto de una metodología rápida y sensible para la detección simultánea de DON y NIV, en muestras de harina de maíz. Para ello se realizó una extracción con solventes, seguido de una limpieza de la muestra, en columna de florisil (60-100 mesh, Anedra); posteriormente se prosiguió a la realización de un análisis en cromatografía en capa delgada (TLC) bidimensional.

La cuantificación y subsiguiente calculo del porcentaje de recuperación de las toxinas se llevó a cabo por comparación visual respecto de la fluorescencia emitida por los estándares, bajo luz UV de onda larga ($\lambda=365$ nm). Los porcentajes de recuperación de estas toxinas utilizando éste método, arrojaron un valor de 106,53% en el caso de DON y de 64,62% para NIV.

Palabras claves: DON, NIV, porcentaje de recuperación, TLC.

ABSTRACT

A rapid and sensitive method has been developed for simultaneous detection of NIV and DON, in flour corn samples. The *Fusarium* mycotoxins were extracted with solvents, defatted, and purified by a florisil column (60- 100 mesh, Anedra). The followed step included a two-dimensional thin layer chromatography technique.

The determination and subsequently recoveries of the toxins were established by visual comparison respect to the fluorescence of standards, in long wave UV light ($\lambda 365$ nm). The main recoveries of this *Fusarium* mycotoxins obtained with this method were of a value of 106, 53% for DON and 64, 62% for NIV.

Keywords: DON, NIV, main recoveries, TLC.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son definidas como metabolitos secundarios, producidos por los hongos (gr: *mykes*, hongo; gr: *toxikón*, veneno o ponzoña). Muchos son los factores que interactúan en la formación de micotoxinas, como situaciones de estrés hídrico, sequías, siembras tardías y cosechas retrasadas, almacenamiento y manejo inadecuados del producto (Kamimura, H. 1989; Ramakrishna et al., 1990; Hussein, S. H. and Brasel, J.M. 2001; Seglar, B., 2003).

La determinación de micotoxinas en raciones para animales y en alimentos, es de suma importancia debido a la variedad de efectos tóxicos que producen en humanos y animales (Krska, R. 1998). A su vez, las metodologías utilizadas para el análisis de las mismas requieren procedimientos específicos, debido a la diversidad química de éstas sustancias y la complejidad que representa un alimento como matriz (Richard, J. L. et al., 1993). A causa de esto, las metodologías de análisis varían considerablemente, según sea un alimento de consumo humano, o una ración animal; o bien, por las características químicas de cada toxina en particular.

La contaminación en el ámbito mundial de alimentos y piensos con micotoxinas es un problema de reconocida importancia, diversos estudios demuestran que la misma se lleva a cabo tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, y se estima que el 25% de los cultivos a nivel mundial, se encuentran afectados. En una escala global se sabe que tanto los cereales, como piensos, son sujetos de múltiples contaminaciones con tricotecenos. Estas son consideradas las principales toxinas producidas por el género *Fusarium*, junto con la zearalenona y fumonisinias. Esta contaminación es inevitable, debido a que muchas de éstas especies de hongos toxigénicas son, también, fitopatógenos, produciendo daños durante el cultivo, los cuales son difíciles de controlar (Placinta et al., 1999). Así, dentro de los tricotecenos, deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV), aparecen con mayor frecuencia, con valores inaceptablemente altos en granos de cereales. Mas aún, se tiene evidencia de que tanto el maíz como el trigo, son los dos cereales mayormente contaminados con deoxinivalenol (Richard et al., 1993).

Teniendo en cuenta que ambas toxinas representan potenciales riesgos, tanto para la salud humana como para la animal, numerosos países han creado normas reguladoras, que establecen límites de tolerancias para éstas toxinas en raciones y alimentos.

En orden de monitorear productos sospechosos, se establecen numerosas metodologías para el análisis regular de las micotoxinas.

En este contexto, el presente trabajo intenta establecer una metodología rápida, sensible y económica, para la determinación simultánea de las toxinas tricotecénicas DON y NIV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió a la extracción de una muestra de harina de maíz. Teniendo en cuenta que se debía calcular el porcentaje de recuperación de DON y NIV con éste método, se generó un positivo seguro. Para ello se pesaron 20 g de la muestra molida, y se agregaron 24,49 ppm de DON y 17,55 ppm de NIV; se agregó una mezcla de 200 ml acetonitrilo: agua (3:1) y se agitó durante 30 min. Luego se filtraron 125 ml (filtro Whatman n° 4) y se procedió a la delipidación con 100 ml de n- hexano. Posteriormente se agregaron 240 ml de etanol y se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo se recogió con 5 ml de metanol, de los cuales 4 ml fueron llevados a una columna de florisil (60-100 mesh; Anedra), para la subsiguiente “limpieza” de la muestra. La columna se preparó pesando 20 g de florisil, disueltos en n-hexano (aproximadamente 40 ml). Se continuó con un lavado de la muestra con 100 ml de n-hexano; seguidamente se eluyó la muestra con 250 ml de una mezcla cloroformo: metanol (9: 1) y, nuevamente, se evaporó a sequedad. Finalmente el residuo se recogió con 1 ml de metanol, se colocó en un tubo de hémolisis y se almacenó en freezer a -18°C , hasta el momento de la siembra en cromatofolios. En la figura 1 se muestra un esquema del procedimiento de extracción.

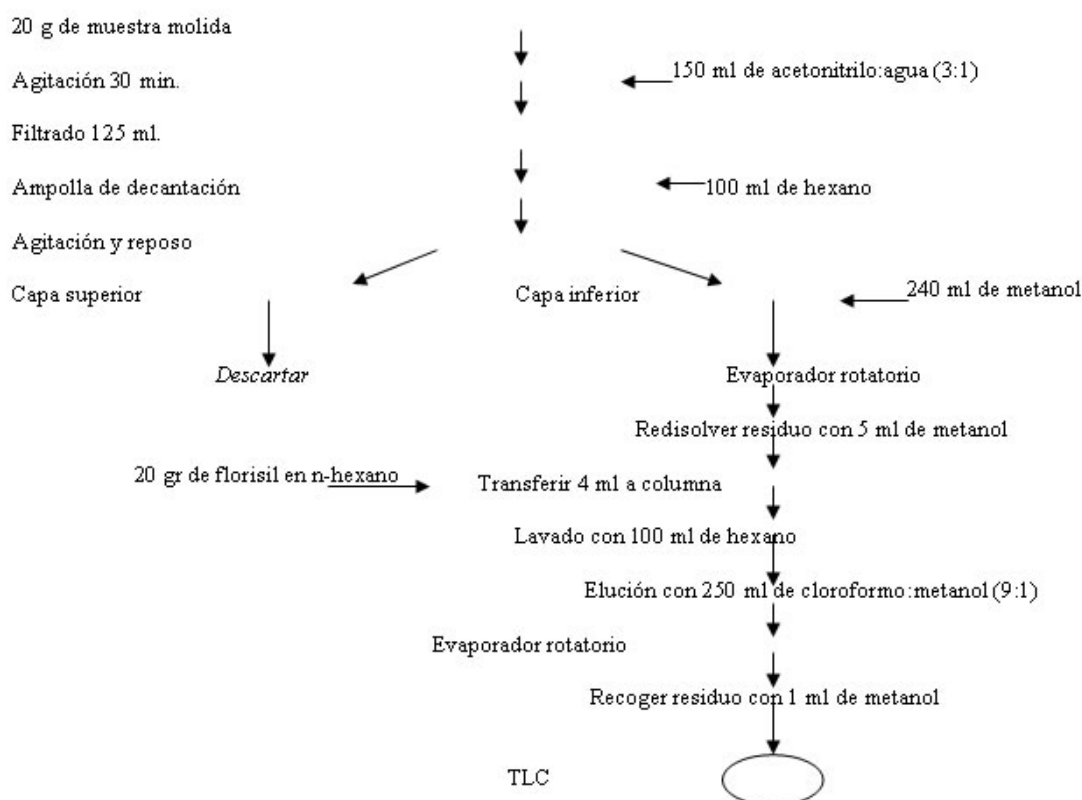


Figura 1: Procedimiento analítico para la extracción y cuantificación de las toxinas nivalenol y deoxinivalenol

Para las determinaciones cromatográficas, se aplicaron 15 μl de extracto en la intersección de dos líneas imaginarias ubicadas a 1 cm de la base y de los costados de un cromatofolio de 10 x 10 cm. Estándares de las micotoxinas se colocaron sobre las mismas líneas que la muestra, pero más cerca de las dos esquinas laterales. En la *figura 2* se ve un esquema del procedimiento de siembra.

Se llevó a cabo la TLC bidimensional; los solventes seleccionados fueron cloruro de metileno: metanol (24:6) en la primera dirección, y acetato de etilo: n-hexano (30:10), en la segunda dirección. Por último la placa se roció con una solución de cloruro de aluminio en metanol al 4%, y se llevó a estufa (115 °C) durante 5 minutos. La detección de las toxinas se realizó por comparación visual de la fluorescencia emitida por los estándares, bajo luz UV de onda larga ($\lambda=365\text{ nm}$).

El cálculo del porcentaje de recuperación se determinó por comparación visual de la intensidad de la mancha de la muestra que coincidía con los estándares, y a partir de ese valor (dado en μl), se procedió al cálculo, mediante una fórmula que toma en cuenta la concentración del estándar sembrado (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y las pérdidas de muestra durante el proceso de extracción.

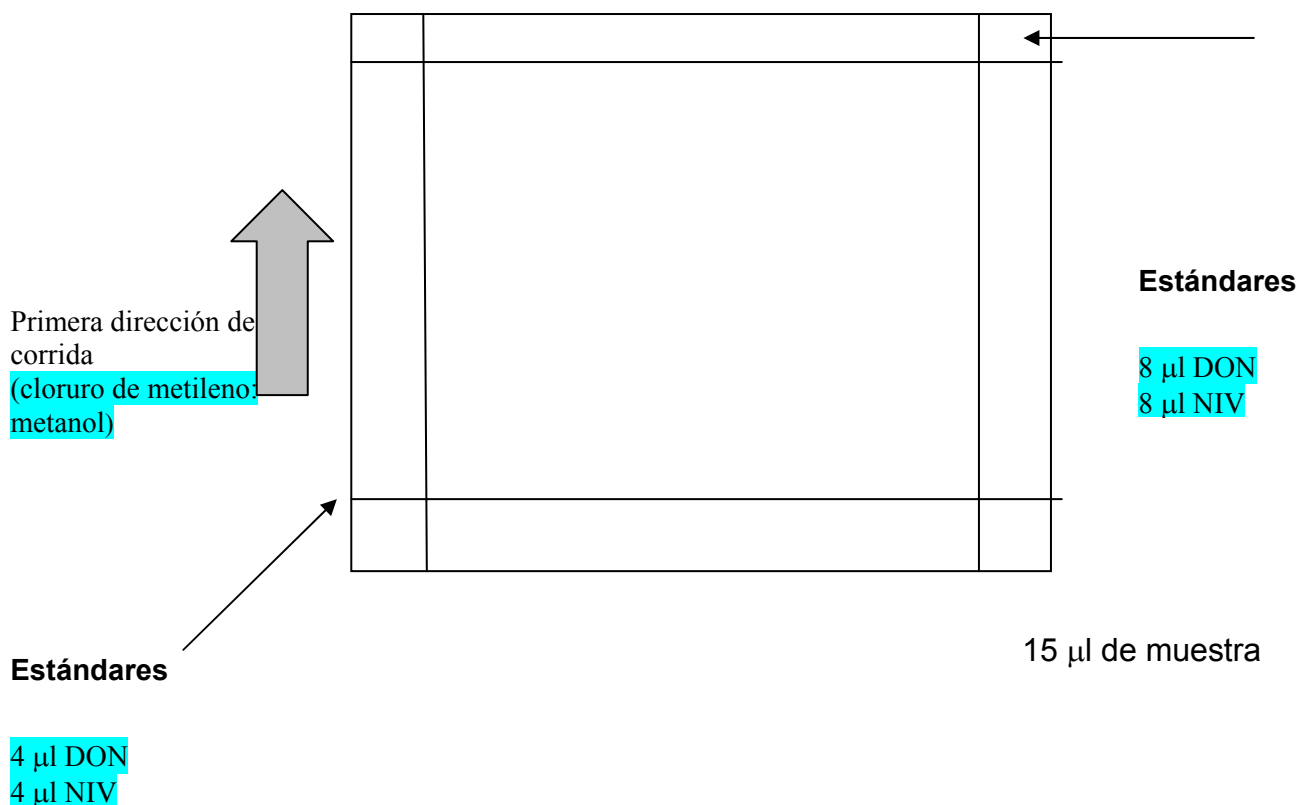


Figura 2: Diagrama esquemático de la localización de los puntos de siembra de estándares y muestra en una placa cromatográfica de 10 x 10 cm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de la extracción de la muestra utilizando el método descrito anteriormente, se procedió a calcular el porcentaje de recuperación de las micotoxinas: DON y NIV. Estos resultados arrojaron un valor de 106,53% y de 64,62% respectivamente. Debe resaltarse el hecho de que éstos valores concuerdan con los obtenidos en otro trabajo (Krska, 1998), en él que se describen varios métodos de preparación de muestras para la posterior utilización en el análisis de micotoxinas de *Fusarium spp.* Uno de los métodos descrito utiliza una columna comercial (Mycosep) que contiene varios adsorbentes como relleno; entre ellos celite, carbón vegetal y resinas de intercambio iónico.

Sería interesante ensayar el método con un sistema diferente de solventes de extracción para lograr un mayor porcentaje de recuperación de NIV. Si bien esta alternativa podría implicar una disminución en los porcentajes de recuperación de DON, las cantidades de esta toxina extraída por el método permiten pensar en una modificación. Existen trabajos en los cuales se han ensayado distintos solventes (Mycotoxins and Phycotoxins, 1998) para la extracción de tricotecenos.

Queda claro que el sistema de solventes elegido dependerá de las necesidades puntuales de cada estudio.

CONCLUSIÓN

A partir de éste trabajo se puede concluir que la especificidad del método, conjuntamente con los bajos costos de extracción han quedado demostrados.

Sin embargo, como se expresó anteriormente, la técnica se podría ensayar cambiando las relaciones de los solventes extractantes, y eventualmente conseguir una mayor recuperación de NIV. Este punto en particular, no pudo llevarse a cabo por cuestiones económicas y por falta de tiempo.

A su vez, cabe destacar que el estudio se realizó únicamente en muestras de harina de maíz.

Los autores consideramos necesaria la puesta a punto del método para otros sustratos, dado que en estudios aún no publicados, hemos hallado niveles importantes de estas toxinas en forma natural, en alimentos derivados de cereales.

BIBLIOGRAFÍA

Hussein, H. S. And Brasel, J. M. 2001. Toxicity, Metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.

Kamimura, H. 1989. Removal of Mycotoxins During Food Processing. En *Mycotoxins and Phycotoxins '88. Vol. 10* Eds. Natori,S.; Hashimoto, K.; Ueno, Y.

Krska, R. 1998. Performance of modern preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A.* 815: 49-57.

Placinta, C. M.; D`Mello; J. P. F.; Macdonald; A. M. C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins.. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 21-37.

Ramakrishna, Y.; Bhat, R. V. And Vasanthi, S. 1990. Natural Occurrence of Mycotoxins in Staple Foods in India. (1990). *J. Agric. Food Chem.* 38: 1857-1859.

Richard, J. L.; Bennett, G. A.; Ross, P. F. and Nelson, P. E. 1993. Analysis of Naturally Occurring Mycotoxins in Feedstuffs and Food.. *J. Anim. Sci.* 71: 2563-2574.

Seglar, B. (2003). Efectos de Micotoxinas en ganado lechero. En *Aceitas y Grasas* 53. Tomo 13. 4:530-541.

Tanaka, T. and Ueno, Y. Worldwide. 1989 natural occurrence of Fusarium Mycotoxins, Nivalenol, Deoxynivalenol and Zearalenone.. En *Mycotoxins and Phycotoxins '88. Vol. 10* Eds. Natori,S.; Hashimoto, K.; Ueno, Y.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FENOLES PROVENIENTES DE HARINA DE GIRASOL POR ESPECTROSCOPIA UV Y RP-HPLC.

SALGADO, Pablo R.; CAMPANA, Aldo H.; MOLINA ORTIZ, Sara E.; MAURI, Adriana N.; PETRUCCELLI, Silvana.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA) – Fac. Ciencias Exactas, UNLP–CONICET-CIC-PBA, 47 y 116, 1900. La Plata, Tel/Fax: (0221)424-9287. psalgado@cidca.org.ar

RESUMEN

El ácido clorogénico (CGA) es el mayor componente fenólico en semillas de girasol. Durante el procesamiento de harinas desgrasadas, estos componentes pueden interaccionar con proteínas disminuyendo su valor nutricional y produciendo coloración desagradable, por lo que es recomendable su eliminación.

En este trabajo nos propusimos comparar los métodos espectrofotométricos y cromatográficos para determinar compuestos fenólicos totales y utilizarlo para seguir el proceso de aislamiento de proteínas de girasol libres de fenoles.

Se utilizó harina desgrasada, la eliminación de fenoles se efectuó por extracciones sucesivas con agua, etanol-70% o metanol-80%. Por espectroscopía UV, se obtuvo un ϵ_M del CGA de 14090. En RP-HPLC, el CGA mostró un pico a t_R de 15min y representa el 55% de los fenoles totales en la harina. Se obtuvo una correlación lineal entre ambas técnicas $[Fenoles]_{UV}=A+Bx[Fenoles]_{RP-HPLC}$. Esto permitiría utilizar una técnica sencilla y rápida, como la espectroscopía UV, para estimar el contenido de fenoles totales aún en presencia de proteínas.

Palabras claves: Girasol- fenoles – espectroscopia UV, RP-HPLC.

ABSTRACT

Chlorogenic acid (CGA) is the major phenolic component present in sunflower seeds. During the processing phenolic components interact with proteins decreasing its nutritional value and causing unwanted dark color, therefore it is recommended the elimination of these components. The aim of this work was to compare two different methods used for quantification of total phenols: spectrophotometric and chromatography. In addition these methods were used to follow the isolation process of phenolic-free sunflower proteins.

Phenols from defatted sunflower flour were eliminated by consecutive extractions with water, ethanol-70% or methanol-80%. To quantify the CGA by UV measures, the molar

extinction coefficient (ϵ_M) of CGA at 354nm was determinate ($\epsilon_M = 14090$). By RP-HPLC, CGA showed one peak with a retention time of 15 minutes, and represent 55% of total phenolic components present in sunflower flour. There is a lineal correlation between both methods: $[\text{Phenols}]_{UV} = A + Bx[\text{Phenols}]_{RP-HPLC}$. By measuring phenols by UV spectrophotometry, that is a simple, economic and fast techniques and applying this corrections it is possible to estimate the total phenolic content in samples with proteins.

Keywords: SUNFLOWER, PHENOLS, UV SPECTROPHOTOMETRY, RP-HPLC.

INTRODUCCIÓN

Las semillas de girasol se utilizan principalmente para la producción de aceite. El subproducto de esta actividad es una fuente importante de proteínas (35.64%), pero la presencia de los compuestos fenólicos (4.7%) restringe su uso en la industria de alimentos, siendo uno de los mayoritarios el ácido clorogénico, 2.5% de CGA en harinas (González-Pérez et al., 2002).

Durante el procesamiento de harinas desgrasadas de girasol, estos componentes, principalmente ácido clorogénico, se pueden oxidar a o-quinonas, compuestos altamente reactivos que interaccionan con las proteínas disminuyendo su valor nutricional y produciendo coloración desagradable (Shamanthaka Sastry et al., 1990).

Es de interés desde el punto de vista del conocimiento y de la aplicación en la industria de subproductos del girasol, la cuantificación de fenoles por métodos rápidos, económicos y confiables. La determinación de fenoles totales se puede realizar por medio de una reacción colorimétrica, según el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965); pero esta técnica es destructiva y requiere de muchos pasos previos. También se pueden hacer medidas espectrofotométricas rápidas (UV: 200-400 nm), basándose en la absorción del ácido clorogénico a 324 nm (Moore et al., 1948). Además, es posible realizar cromatografía líquida de alta presión con fase reversa (RP-HPLC), técnica rápida que permite determinar y cuantificar compuestos, pero que posee un elevado costo (Dreher y Holm, 1983).

El objetivo de este estudio fue comparar los métodos espectrofotométricos y cromatográficos para determinar compuestos fenólicos totales (basados en mg de CGA) y utilizarlo para seguir el proceso de aislamiento de proteínas de girasol libres de fenoles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras de Girasol: Como material de partida se utilizó harina desgrasada de girasol (dp < 0.5 mm) proveniente de una industria aceitera.

Inicialmente, se solubilizaron las proteínas a pH 9, se separó el sobrenadante por centrifugación y se liofilizó; se la denominó “Concentrado con Fenoles” (Conc c/F).

Además se ensayaron tres métodos de eliminación de fenoles con distintos solventes (agua, etanol acuoso 70% v/v o metanol acuoso 80% v/v) por medio de cuatro extracciones sucesivas. Seguidamente se solubilizaron las proteínas, en todos los casos, con agua a pH 9. Se separaron los sobrenadantes por centrifugación y se liofilizaron. A estas muestras se les dio el nombre de “Concentrado con bajo contenido de Fenoles” (Conc s/F).

Espectroscopía UV: Se utilizó un equipo Beckman DU 650 Spectrophotometer. Se realizaron diluciones de las muestras en buffer fosfato de sodio 0.1M pH 7.5 y se obtuvo el espectro UV entre 200 y 400 nm. Se realizó la curva de calibración con soluciones de CGA (Acido clorogénico hemi-hidratado, Fluka, pureza>98%) en agua.

RP-HPLC: Las muestras se pasaron por un equipo Waters Millipore. Se utilizó una columna Symmetry C₁₈ (4.6 x 150 mm, 5 um, 100 A), temperatura ambiente y velocidad de flujo de 0.95 ml/min. El eluente fue una mezcla de A (4% CH₃COOH, 6% CH₃OH, 90% H₂O) y B (4% CH₃COOH, 90% CH₃OH, 6% H₂O). Se modificó el protocolo descrito por González-Pérez et al. (2002); 5 min de 100% A, gradiente lineal de 100% A a 70% A en 10 min, elución isocrática por 10 min, gradiente lineal de 70% A a 100% B en 10 min, elución isocrática por 10 min, gradiente lineal de 100% B a 100% A en 20 min. La detección de CGA se realizó con espectroscopía UV (280 y 324 nm) por medio de 996 Photodiode Array Detector. Como patrón se utilizaron soluciones de CGA (Chlorogenic acid hemihydrate, Fluka, pureza>98%) en metanol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros UV del ácido clorogénico patrón (CGA), de un extracto acuoso de la harina de girasol, y del concentrado con bajo contenido de fenoles obtenido luego de las extracciones con agua. Se observa que el CGA presenta un pico máximo a 324 nm, otro menor a 290 nm y un mínimo a 260 nm. Debido a que las proteínas presentan su máxima absorción a 280 nm y no presentan una absorbancia a 324 nm, se seleccionó esta última longitud de onda para cuantificar fenoles en las muestras de girasol a estudiar. En el espectro UV del concentrado con bajo contenido de fenoles, se observa un pico a 280 nm debido principalmente a las proteínas, además la baja absorbancia a 324 nm, hace suponer un bajo contenido de fenoles.

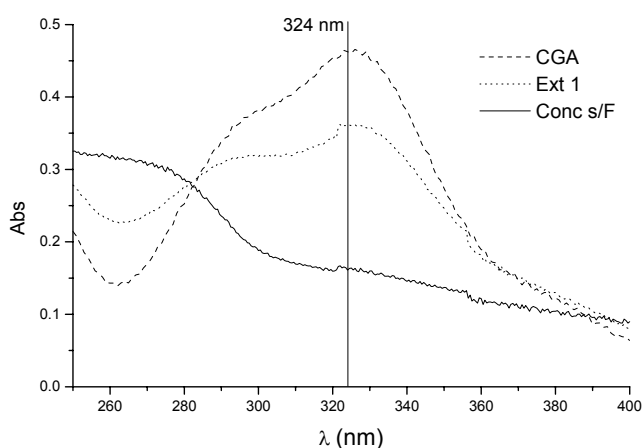
Se analizó el comportamiento de CGA a diferentes concentraciones y se determinó el coeficiente de extinción molar en agua, que fue de 14090 ± 941 (n=12), similar al obtenido

por Dao y Friedman (1992) a partir de muestras de papas. Por medio de la curva de calibración obtenida con el ácido clorogénico en medio acuoso, se calcularon las concentraciones de fenoles totales para las muestras de girasol, que corresponden a las extracciones de fenoles (en medio acuoso, con etanol 70% y metanol 80%) y a los concentrados proteicos con bajo contenido de fenoles.

En la figura 2 se muestran los cromatogramas obtenidos en RP-HPLC, allí se puede observar que el CGA patrón presenta un único pico aproximadamente 15 minutos de tiempo de retención que coincide con un cambio en el gradiente. Las muestras de girasol con fenoles (figura 2, curva Ext 1) presentaron perfiles cromatográficos con un pico atribuible al CGA a los 15 minutos; además de otros que corresponderían a diversos componentes fenólicos presentes. Comparando el área del pico de CGA con la sumatoria de las áreas de todos los picos presentes a 324 nm, se puede decir que el CGA representa aproximadamente el 55% de los componentes fenólicos en las muestras analizadas.

El cromatograma del concentrado con bajo contenido de fenoles mostrado en la figura 2, concuerda con lo señalado a partir del análisis por UV (figura 1, Conc s/F), y muestra que la metodología seguida para la obtención de concentrados proteicos de girasol con bajo contenido de fenoles fue efectiva.

1



2

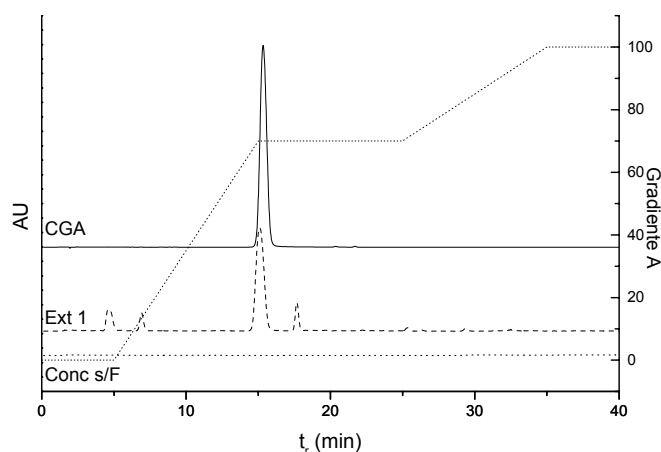


Figura 1. Espectros UV del patrón ácido clorogénico (CGA), concentrado proteico de girasol con alto contenido de fenoles (Conc c/F) y bajo contenido de fenoles (Conc s/F).

Figura 2. Perfiles cromatográficos RP-HPLC del patrón ácido clorogénico (CGA), concentrado proteico de girasol con bajo contenido de fenoles (Conc s/F) y primera extracción de fenoles con agua (1Extr).

Se relacionaron las cantidades de fenoles totales obtenidas por UV y RP-HPLC para las muestras de girasol correspondientes a las extracciones con los tres solventes. En la

figura 3 se muestra que los resultados obtenidos por ambas técnicas se correlacionan linealmente según las siguientes regresiones:

$$[\text{Fenoles}]_{\text{UV}} = 12.063 + 2.177 \times [\text{Fenoles}]_{\text{RP-HPLC}} \quad \text{para agua}$$

$$[\text{Fenoles}]_{\text{UV}} = -12.173 + 1.752 \times [\text{Fenoles}]_{\text{RP-HPLC}} \quad \text{para etanol}$$

$$[\text{Fenoles}]_{\text{UV}} = -16.095 + 1.758 \times [\text{Fenoles}]_{\text{RP-HPLC}} \quad \text{para metanol}$$

Siendo: $[\text{Fenoles}]_{\text{UV}}$: Cantidad de fenoles (mg CGA) obtenida por espectroscopía UV.

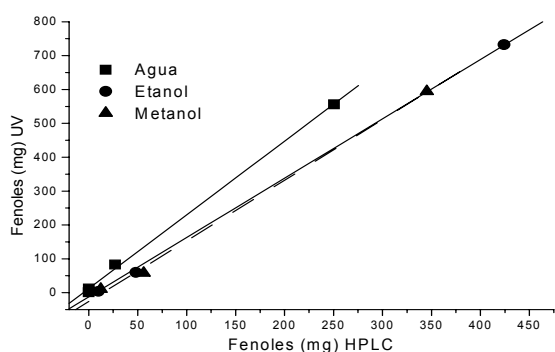
$[\text{Fenoles}]_{\text{RP-HPLC}}$: Cantidad de fenoles (mg CGA) obtenida por RP-HPLC.

Se observa que las curvas correspondientes a etanol y metanol coinciden, pero estas difieren de la obtenida para agua; posiblemente debido a diferencias en los índices de refracción.

En la figura 4 se muestran las concentraciones de fenoles totales medidas experimentalmente por las dos técnicas de los concentrados proteicos de girasol con alto y bajo contenido de fenoles. Se utilizaron las relaciones lineales obtenidas a partir de los extractos para estimar la cantidad de fenoles totales de RP-HPLC, a partir de las medidas en UV, siendo ésta una técnica sencilla y rápida, pero por sobre todo de menor costo, requiriendo solamente un espectrofotómetro UV. Se observa que la estimación es buena para las muestras con alto contenido de fenoles, los de contenido muy bajo están por debajo de los límites inferiores de sensibilidad de ambos métodos considerándose, por lo tanto, libre de fenoles.

Para las muestras de girasol en general se puede relacionar que un valor de absorbancia a 324 nm inferior a 0.60 (dilución 1:10) corresponde a menos del 1% de fenoles totales.

3



4

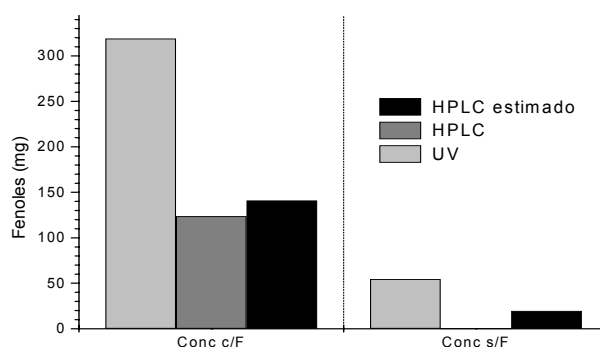


Figura 3. Relación entre la cantidad de fenoles determinado por espectros UV y RP-HPLC, curvas obtenidas a partir de los extractos fenólicos en agua (■), etanol 70% (●) y metanol 80% (▲).

Figura 4. Contenido de fenoles en concentrados con alto y bajo contenido fenólico, determinados por espectros UV, HPLC-RP y el estimado utilizando las relaciones en agua.

CONCLUSIONES

Se cuantificó la concentración de fenoles totales por dos técnicas de diferente complejidad. Se encontró una correlación entre ambas metodologías para las muestras de girasol estudiadas, que permitirá a partir de ensayos simples, rápidos y económicos por medidas de absorbancia en el UV, estimar los contenidos de fenoles por RP-HPLC. Fue efectivo en el seguimiento de la eliminación de fenoles en el proceso de obtención de concentrados proteicos de girasol a partir de los métodos utilizados y relaciones obtenidas. La utilización de las correcciones a las cantidades de fenoles determinadas por medidas de absorbancia en UV permitirá una determinación más confiable del contenido de fenoles en muestras de girasol.

BIBLIOGRAFÍA

- Dao, L.; Friedman, M.** Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 2152-2156.
- Dreher, M. L.; Holm, E. T.** A high performance liquid chromatographic method for chlorogenic acid determination in sunflower seeds. *J. Food. Sci.* 1983, 48, 264-265.
- González –Pérez, S; Merck, K. B.; Vereijken, J. M.; van Koningsveld, G. A.; Gruppen, H.; and Voragen, A. G. J.** Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1713-1719.
- Moore R.G.; McDermott, D. L.; Wood T. R.** Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal. Chem.* 1948, 20, 7, 620-624.
- Shamanthaka Sastry, M. C.; Narasinga Rao, M. S.** Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 12, 2103-2110.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965, 16, 144-158.

LA TEXTURA DEL QUESO GOYA. COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO SENSORIAL Y MÉTODOS REOLÓGICOS.

CASTAÑEDA, Roberto; CAÑAMERAS, Carlos; ARANIBAR, Germán F.; MONTERO Haydee.

INTI-Lácteos. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL - Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea. Av. General Paz 5445, casilla de correo 157 (1650) San Martín, Buenos Aires, Argentina. Telefax: 11-4754-4068, correo electrónico: lacteos@inti.gov.ar

RESUMEN

Las propiedades de textura de un queso pueden ser determinadas a través del análisis sensorial descriptivo cuantitativo (QDA) y/o a través del análisis instrumental por medio de un analizador de textura.

El objetivo del trabajo es comparar el método de análisis sensorial con los métodos instrumentales para la determinación del perfil de textura.

Se realizaron determinaciones instrumentales sobre 5 muestras de queso Goya, elaborado por distintas empresas nacionales, utilizando tasas de compresión de 20% y 25% en el método Texture Profile Análisis (TPA) y 80% en el método compresión uniaxial a desplazamiento constante.

Se realizó la comparación entre los resultados obtenidos para los parámetros instrumentales y aquellos obtenidos para las propiedades sensoriales. Se observó que el método de compresión uniaxial permite diferenciar un número mayor de muestras, por ende posee mejor resolución. La utilización de tasas de compresión de 20% y 25% no produce cambios en la resolución del método TPA. Los métodos instrumentales para el análisis de textura presentan la ventaja de ser reproducibles y repetibles, pudiendo ser utilizados rápidamente con independencia del panel de análisis sensorial.

Palabras Claves: Queso Goya, Reología, Análisis Sensorial, QDA, TPA, Compresión uniaxial.

ABSTRACT

The properties of cheese's texture can be determined through the quantitative descriptive sensory analysis (QDA) through instrumental analysis using a texture analyzer. The objective of this work is to evaluate the relationship between sensory properties and instrumental parameters. Instrumental determinations, using compression rates of 20% and 25% in Texture Profile Analysis (TPA) method and 80% in the uniaxial compression at constant displacement rate method, were made on 5 Goya cheese samples elaborated by different national companies.

A comparison between the results obtained for the instrumental parameters and those obtained from sensory properties was made. It was observed that the uniaxial compression method allows differentiate a greater number of samples; this method has the best resolution. The use of compression rates of 20% and 25% do not produce changes in the TPA method resolution. The instrumental texture analysis methods present the advantage of having a good repeatability and reproducibility, thus being able to be used with celerity and independence of the sensory analysis panel.

INTRODUCCIÓN

El queso Goya es un queso de pasta dura, cuyo contenido de humedad se encuentra comprendido, según el Código Alimentario Argentino (C.A.A.), entre 27-35% y la materia grasa entre 25-39% (semigraso) y 40-59,9% (graso). Se presenta en el mercado con un mínimo de tres meses de maduración en hormas cilíndricas de faces planas, de perfil ligeramente convexo, cuyas medidas son aproximadamente de 23 cm de diámetro y 10 cm de altura.

El mercado de los Estados Unidos de Norteamérica representa el 90% del destino de los quesos de pasta dura, esto se debe a la existencia de una cuota de acceso preferencial asignada a la Argentina por el gobierno norteamericano, de aproximadamente 7000 tn de quesos duros "tipo italiano".

Ante la insuficiente información sobre las propiedades reológicas del queso Goya, se estimó conveniente realizar este estudio que incluyó a las 5 empresas que elaboraron dicho producto en el año 2002

Las propiedades reológicas de un queso pueden ser determinadas a través del análisis sensorial descriptivo cuantitativo (QDA) y/o a través del análisis instrumental por medio de un analizador de textura.

El perfil sensorial de textura consiste en el análisis individual de las propiedades a través de un panel entrenado de evaluadores.

Para poder realizar las determinaciones instrumentales de textura se han desarrollado numerosos métodos, siendo el "Texture Profile Analysis- TPA" y el de "Compresión Uniaxial a desplazamiento constante" los de mayor importancia para quesos de pasta dura y semidura (*Creamer y col, 1991*)

El objetivo de este trabajo es obtener datos sobre las propiedades de textura del queso Goya y comparar el método de Análisis Sensorial con los métodos instrumentales para la determinación del perfil de textura.

El aporte innovador de este estudio consiste en la obtención y publicación de información muy específica sobre las características de uno de los pocos quesos argentinos que hacen referencia a un lugar geográfico de nuestro país y además de poder diferenciarlo eventualmente de otros quesos, con el mismo nombre, elaborados en otras partes del mundo.

MATERIALES Y METODOS

Queso Goya

Las hormas analizadas fueron suministradas por las 5 empresas argentinas elaboradoras de este tipo de queso durante el año 2002 y se encontraban dentro del período de consumo establecido en el C.A.A. (tres meses de maduración). Durante el período de análisis las hormas se conservaron a 5 ± 1 °C.

Análisis de textura con un panel sensorial

El Análisis Sensorial de la textura se realizó mediante un panel seleccionado y entrenado (*IRAM 1995 - 1996*) integrado por 12 personas del INTI. Se utilizó la técnica QDA (*IRAM 2001; Lavanchy y col, 1994*)

Se emplearon escalas crecientes de 1 a 7 para expresar la intensidad percibida en cada propiedad de textura. Los panelistas trabajaron en forma individual con un número de 3 muestras por sesión, analizando cada muestra por cuadruplicado.

Antes de realizar la evaluación, las muestras fueron estabilizadas, durante 1 hora a 14-16°C y fueron presentadas dentro de una caja de Petri cerrada, cortadas en forma de paralelepípedo de 1,5x2x7 cm.

Las muestras se identificaron con números de 3 dígitos elegidos al azar y el código utilizado fue diferente para cada ensayo.

El Perfil Sensorial de Textura comprendió las propiedades de:

Elasticidad: aptitud de la muestra de queso de recuperar rápidamente su espesor inicial después de haber sido comprimido y deformado.

Firmeza: resistencia que presenta la muestra a un pequeño desplazamiento de las mandíbulas.

Friabilidad: aptitud que presenta la muestra de generar numerosos trozos desde el principio de la masticación.

Deformabilidad: facilidad que presenta la muestra situada en la cavidad bucal para deformarse de forma sucesiva o estirarse antes de romperse.

Adherencia: trabajo que es necesario realizar con la lengua para despegar un producto pegado en el paladar y los dientes.

Análisis de textura con métodos instrumentales

Las determinaciones instrumentales se realizaron en un Analizador de Textura TA-XT2i (Stable Micro Systems).

Para la obtención de las curvas Tensión -Deformación, se utilizó una velocidad de desplazamiento constante de 0.8 mm/s.

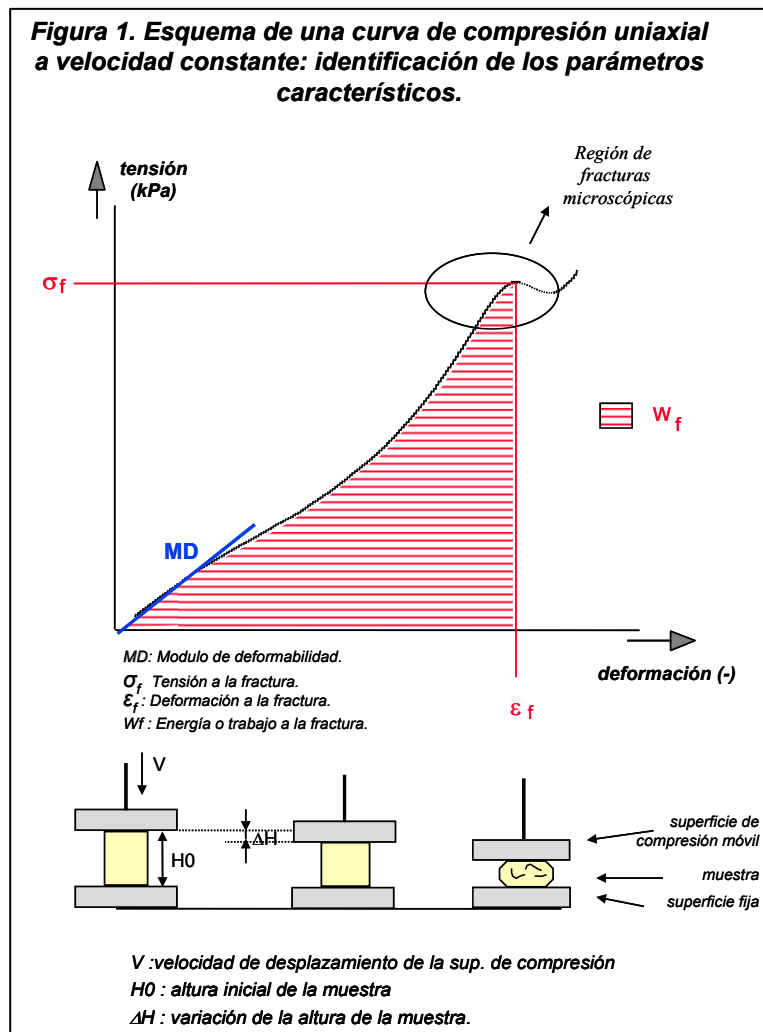
Se utilizaron probetas cilíndricas de queso de 14 milímetros de diámetro por 18 milímetros de alto, termostalizadas a $15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las muestras se analizaron por quintuplicado.

a) Compresión uniaxial a desplazamiento constante (*Creamer y col, 1991; ISO/FIL-IDF, 2003 y Castañeda, 2002*). El método consiste en comprimir una probeta de queso mediante un plato descendente a velocidad constante, hasta un nivel de deformación superior al punto de fractura. Los parámetros reológicos a medir a través de este método son: El Módulo de deformabilidad (M_D), estimado como la regresión lineal de la parte inicial de la curva, la Tensión o Esfuerzo (σ_f), la Deformación (ϵ_f), la energía (W_f) a la fractura. En la *Figura 1* se esquematiza una curva de compresión y se identifican los parámetros reológicos obtenidos.

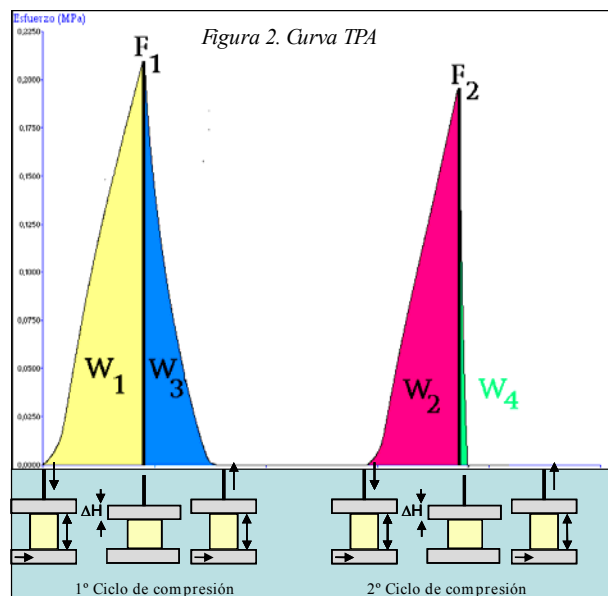
b) Texture Profile Analysis (TPA) (*Creamer y col, 1991, Friedman y col, 1963*). El método consiste en someter a la probeta de queso a un doble ciclo de compresión a desplazamiento constante.

Se realizó el ensayo evaluando dos tasas de compresión distintas 20% (*Raphaelides y col, 1995*) y 25% (*Inocente y col, 2000*). Los parámetros a medir a través de este método son: la firmeza dada por la fuerza máxima registrada durante el 1º ciclo de compresión (F_1), la Fuerza máxima registrada durante la compresión en el 2º ciclo (F_2), el Trabajo registrado hasta F_1 (W_1) y el Trabajo registrado hasta F_2 (W_2). Luego se calculan las siguientes relaciones: Cohesividad (*Creamer y col, 1991; Friedman y col, 1963*). Trabajo durante el 1º ciclo de compresión dividido el trabajo realizado en el 2º ciclo de compresión (W_1+W_3/W_2+W_4), la dureza estimada como el cociente F_2/F_1 , y el grado de elasticidad

(Kaletunc y col, 1991) calculado como el cociente porcentual entre el trabajo recuperado (W_3) sobre el trabajo total (W_1+W_3) en el 1º ciclo de penetración.



En la *Figura 2* se esquematiza una curva de TPA y se identifican los parámetros reológicos obtenidos.



Análisis de resultados:

Se utilizó el Análisis de Varianza de un factor (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas para cada propiedad entre las muestras. Luego se procedió a calcular, mediante el test de Tukey, la Mínima Diferencia Significativa [$MDS = q; l; n-l$. Raíz (CMD/J)]

Se utilizó un $\alpha = 0.05$ en todos los análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* y en el *Figura 3* se presenta los valores de textura obtenidos para el Análisis Sensorial del queso Goya.

Por medio del Análisis Sensorial se diferenciaron dos grupos (a, b) en las propiedades de firmeza, elasticidad, deformabilidad y adherencia, no pudiéndose encontrar diferencias en la propiedad friabilidad.

TABLA 1. Valores de textura de queso Goya obtenidos a través del Análisis Sensorial

Muestra	Firmeza	Elasticidad	Deformabilidad	Friabilidad	Adherencia
G1	4.4 ^a ±0.3	2.4 ^a ±0.4	3.9 ^a ±0.4	4.0±0.3	2.2 ^a ±0.2
G2	4.8 ^a ±0.3	2.3 ^a ±0.4	4.4 ^a ±0.4	3.7±0.4	1.9 ^a ±0.2
G3	4.8 ^a ±0.4	2.2 ^a ±0.3	4.2 ^a ±0.2	4.1±0.3	2.2 ^a ±0.1
G4	2.3 ^b ±0.2	3.5 ^b ±0.3	2.7 ^b ±0.3	3.6±0.4	3.5 ^b ±0.3
G5	4.7 ^a ±0.2	2.4 ^a ±0.3	4.4 ^a ±0.3	3.6±0.3	2.0 ^a ±0.2
<i>MDS</i>	0.6	0.7	0.7	<i>N/S</i>	0.4

Test de Tukey: Para una propiedad dada, los promedios que se presentan con la misma letra (a, b), no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

MDS: Mínima Diferencia Significativa (indica la mínima diferencia, en valor de intensidad, para que las muestras se consideren distintas)

N/S: No Significativo (en dicha propiedad las muestras no presentan diferencias en intensidad)

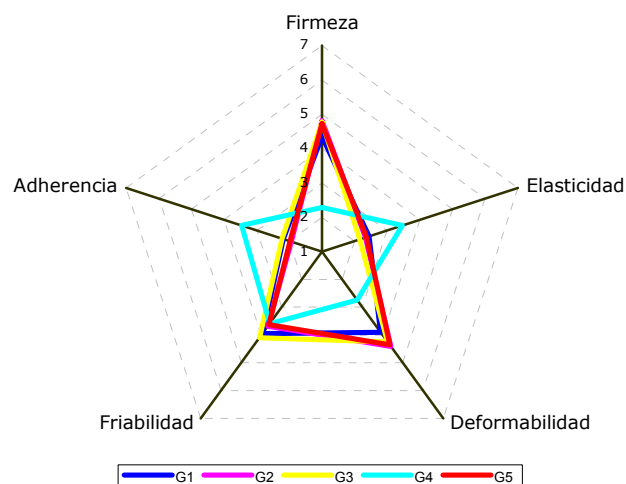


Figura 3. Perfil de textura sensorial del queso Goya

En la *Tabla 2* y en el *Figura 4* se presentan los valores de textura obtenidos para el queso Goya según el ensayo instrumental utilizando el método de compresión uniaxial.

Por medio de la Compresión Uniaxial, se diferenciaron cuatro grupos (a, b, c, d) en los parámetros de esfuerzo, deformación, módulo de deformabilidad y trabajo a la fractura. Los valores obtenidos a través del método de compresión uniaxial para el queso Goya son similares a los valores presentados por Castañeda (2002)

TABLA 2. Valores de textura del queso Goya obtenidos a través del método de compresión uniaxial.

Muestra	Esfuerzo aparente en la fractura σ_{af} (KPa)	Esfuerzo corregido en la fractura σ_{cf} (KPa)	Deformación relativa en la fractura (Cauchy) ϵ_f (-)	Deformación verdadera en la fractura (Hencky) ϵ_f (-)	Módulo de Deformabilidad (KPa/Cauchy)	Trabajo a la fractura W_f (KJ/m ³)
G1	364 ^a ±8	291 ^a ±6	0,382 ^a ±0,003	0,323 ^a ±0,002	1155 ^a ±81	74 ^a ±1
G2	341 ^b ±17	273 ^b ±14	0,376 ^a ±0,004	0,319 ^a ±0,003	1124 ^a ±85	69 ^a ±4
G3	264 ^c ±10	211 ^c ±8	0,313 ^b ±0,009	0,272 ^b ±0,006	1312 ^b ±93	48 ^b ±3
G4	119 ^d ±3	95 ^d ±3	0,230 ^c ±0,007	0,207 ^c ±0,006	764 ^c ±41	17 ^c ±1
G5	267 ^c ±11	213 ^c ±9	0,354 ^d ±0,009	0,303 ^d ±0,007	1030 ^a ±65	52 ^b ±3
<i>MDS</i>	19.4	15.5	0.012	0.009	133	5

Test de Tukey: Para una propiedad dada, los promedios que se presentan con la misma letra (a, b, c, d), no son significativamente diferentes ($\alpha= 0.05$).

MDS: Mínima Diferencia Significativa (indica la mínima diferencia, en valor de intensidad, para que las muestras se consideren distintas)

N/S: No Significativo (en dicha propiedad las muestras no presentan diferencias en intensidad)

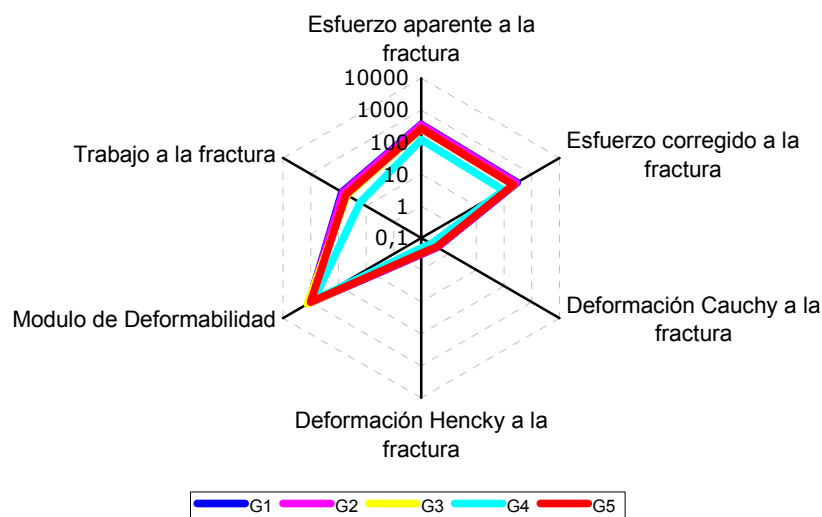


Figura 4. Perfil de textura Compresión Uniaxial

En la *Tabla 3* y en el *Figura 5* y *6* se presentan los valores de textura obtenidos para el queso Goya según el ensayo instrumental utilizando el método TPA a una tasa de compresión del 20% y del 25%.

Por medio del análisis TPA 20%, se diferenciaron tres grupos (a, b, c) en los parámetros de F_1 , F_2 , F_2/F_1 . Cuatro grupos (a, b, c, d) en el *grado de elasticidad* y no se pudo encontrar diferencias en la *cohesividad*.

Por medio del análisis TPA 25%, se diferenciaron tres grupos (a, b, c) en los parámetros de F_1 , F_2 . Dos grupos (a,b) en el grado de elasticidad, cohesividad y F_2/F_1 .

TABLA 3. Valores de textura obtenidos a través del método de TPA 20 y 25% de compresión.

Muestra	Tasa de compresión	Fuerza 1 (KPa)	Fuerza 2 (KPa)	Grado de elasticidad	Cohesividad W_{2+4}/W_{1+3}	F_2/F_1
G1	20%	222 ^a ±17	206 ^a ±16	48,8 ^a	0,588	0.929 ^a
	25%	281 ^a ±8	259 ^a ±18	52,1 ^a	0,574 ^a	0.920 ^a
G2	20%	227 ^a ±19	211 ^a ±18	48,8 ^a	0,597	0.931 ^a
	25%	267 ^a ±20	246 ^a ±21	53,3 ^a	0,577 ^a	0.921 ^a
G3	20%	207 ^{ac} ±46	191 ^{ac} ±46	53,0 ^b	0,596	0.925 ^a
	25%	234 ^{ac} ±77	213 ^{ac} ±54	53,7 ^a	0,580 ^a	0.915 ^a
G4	20%	105 ^b ±10	095 ^b ±10	56,1 ^c	0,576	0.905 ^b
	25%	93 ^b ±6	115 ^b ±13	64,7 ^b	0,511 ^b	0.806 ^b
G5	20%	175 ^c ±06	162 ^c ±6	50,2 ^d	0,59	0.927 ^a
	25%	193 ^c ±11	178 ^c ±7	51,6 ^a	0,580 ^a	0.922 ^a
MDS	20%	32	30	1.1	N/S	0,009
	25%	70	61	8	0.040	0.039

Test de Tukey: Para una propiedad y tasa de compresión dada, los promedios que se presentan con la misma letra (a, b, c, d), no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

MDS: Mínima Diferencia Significativa (indica la mínima diferencia, en valor de intensidad, para que las muestras se consideren distintas)

N/S: No Significativo (en dicha propiedad las muestras no presentan diferencias en intensidad)

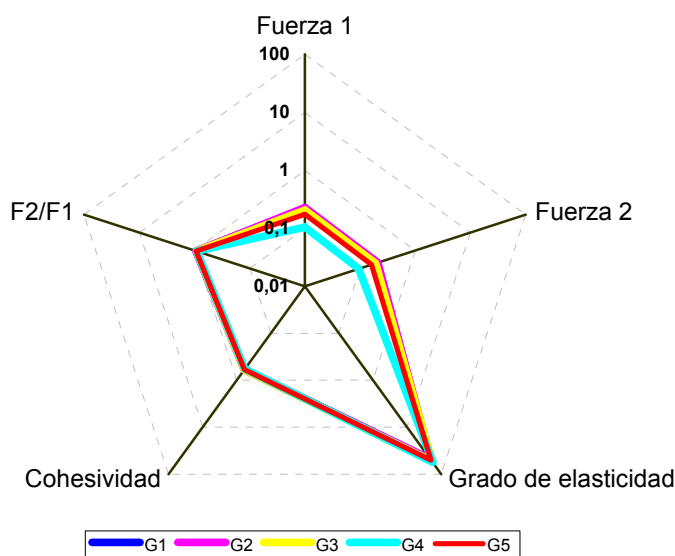


Figura 5: Perfil TPA 5%

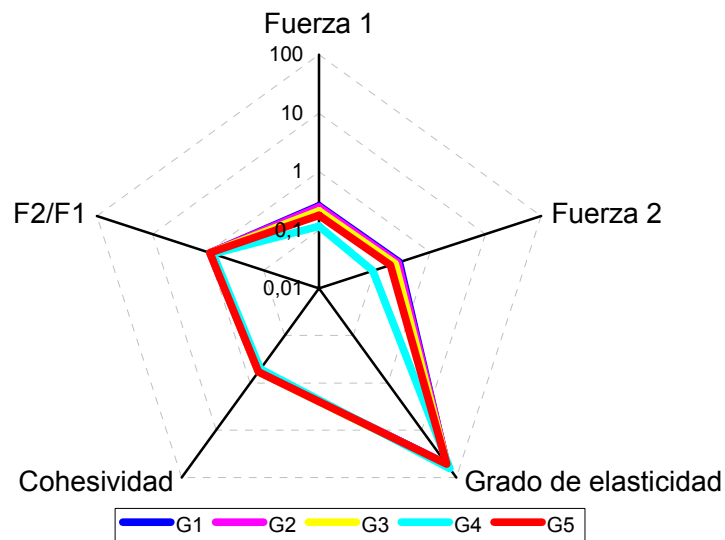


Figura 6: Perfil TPA 25%

La muestra G_4 que recibió el valor más bajo en las propiedades sensoriales de *firmeza* y *deformabilidad*, también recibió los valores más bajos en los parámetros instrumentales de *módulo de deformabilidad*, *trabajo*, *esfuerzo* y *deformación a la fractura* (compresión uniaxial), *Fuerza 1*, *Fuerza 2* y F_2/F_1 (TPA). La misma muestra recibió el valor más alto en la propiedad sensorial *elasticidad*, esta tendencia concuerda con el valor más alto obtenido del parámetro *grado de elasticidad* (TPA 20% y 25%). Estas relaciones para la textura entre propiedades sensoriales e instrumentales concuerdan con estudios realizados por otros autores (*Creamer y col, 1991; Hennequin y col, 1993; Noel y col, 1996*)

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos sobre los atributos de textura del queso Goya servirán para reconocer mejor a este producto.

Cuatro de los cinco quesos analizados (G_1 , G_2 , G_3 y G_5) poseen características similares respecto a su textura.

El método de compresión uniaxial permite diferenciar un número mayor de muestras, dicho método es el que posee mejor resolución.

La utilización de tasas de compresión de 20% y 25% no produce cambios en la resolución del método TPA.

Los métodos instrumentales para el análisis de textura presentan la ventaja de ser reproducibles, y de poder utilizarse rápidamente con independencia del panel de análisis sensorial.

BIBLIOGRAFIA

- Castañeda R. (2002).** La reología en la caracterización y tipificación de quesos. *Tecnología Láctea Latinoamericana* N°26,
- Creamer, L.K; Grappin, R; Eberhard, P; Green, M; Gupta K; De Man, J; Peleg, M; Pompei, C; Popova, T; Walstra, P; Van Vliet; Zoon, P. (1991).** Rheological and Fracture Properties of Cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation* N°268.
- Friedman, H; Whitney, J. and Szczesniak, A. (1963).** The Texturometer- A New Instrument for Objective Texture Measurement. *Journal of Food Science* 28.
- Hennequin, D. y Ardí, J. (1993).** Evaluation Instrumentale et Sensorielle de Certaines Propriétés texturales de fromages a pate molle. *Int. Dairy Journal* 3 pag. 635-647.
- Innocente, N; Pittia, P; Stefanuto, O. and Corradini C.(2000).** Texture profile of Montasio cheese. *Milchwissenschaft* 55 (9).
- IRAM (1995),** Análisis Sensorial Vocabulario. Norma IRAM 20001.
- IRAM (1995),** Análisis Sensorial Directivas generales para la metodología. Norma IRAM 20002.
- IRAM (1996),** Guía general para la selección, entrenamiento y monitoreo de evaluadores Norma IRAM 20005.
- IRAM (2001),** Análisis Sensorial Metodología Perfil de Textura. Norma IRAM 20013.
- Kaletunc, G; Normand, M.D; Johnson, E.A. and Peleg, M. (1991)** “Degree of Elasticity” Determination in solid foods. *Journal of Food Science* Vol 56, N°4
- Lavanchy, P; Bérodiér, F; Zannoni M; Noel, Y; Adamo, C; Squella, J; Herrero, L(1994).** Guide d’évaluation sensorielle de la textura des fromages a pate dure ou semidure, INRA 1994.
- Luginbuhl, W. (1996).** The Effect of Stress Correction on Fracture Point Coordinates in Uniaxial Compression Tests of Cheese. *Lebensm. Wiss u Technol*, 29, 433-437.
- Noel, Y; Zannon, M; Hunter, E. (1996).** Textura of Parmigiano Reggiano Cheese: Statistical relationships between rheological and sensory variates. *Lait* 76, 243-254.
- ISO/IDF (2003).** Cheese Determination of rheological properties by unaxial compression at constant displacement rate. Draft ISO TC 34/SC5N/ ISO /CD 17996/IDF 205.
- Raphaelides, S; Antonion, K and Petridis, D. (1995).** Texture Evaluation of Ultrafiltered Teleme Cheese. *Journal of Food Science* Vol 60, N°6.

Ciencia y Tecnología de Alimentos 2005

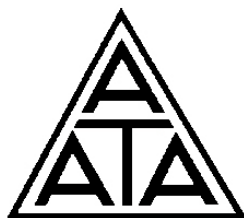
TRABAJOS DEL X CONGRESO CYTAL

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías

“Apertura a nuevos procesos, productos e ideas: camino al futuro”

Realizado en Mar del Plata, Argentina del 18 al 20 de mayo de 2005



ASOCIACION ARGENTINA de TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

Filial Mar del Plata
aatamdq@gmail.com

AATA Central
Alsina 943. 4to Piso, oficina 406 (1088) Buenos Aires
TE/FAX: 54 11 4334 0155

Asociación afiliada a:



ITF- Institute of Food Technologists



IUFoST- Institutional Union of Food Science and Technologists



ALACCTA- Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos



IAEF- International Association for Engineering and Food

ISBN: 987-22165- 1- 7.

Editado: Ciencia Actual, Buenos Aires. Argentina.
1er Edición. Volumen 1. Marzo de 2006

TOMO V

Tomo V:

Microbiología

Nutracéuticos y alimentos funcionales

Nutrición

Varios

INDICE

MICROBIOLOGÍA

- CAPACIDAD GENERADORA DE AMINAS BIÓGENAS DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN LA REGIÓN PATAGÓNICA..... 1586
- HIDROLIZADOS CASEINICOS TOTALES Y FRACCIONADOS. ACCION PROMOTORA DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS. ESTUDIO SOBRE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS.... 1593
- MEJORAMIENTO ECOFISIOLÓGICO DE *KLUYVEROMYCES* spp L16 Y SU IMPACTO EN EL CONTROL DE *ASPERGILLUS* SECCION FLAVI..... 1601
- USO POTENCIAL DE ANTIOXIDANTES PARA EL CONTROL DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINA B1 POR *Aspergillus* sección Flavi EN GRANOS DE MANÍ..... 1608
- PERTURBACION DE LAS CARACTERISTICAS TOXICOGENICAS DE *Aspergillus* Sección Flavi POR LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE ANTIOXIDANTES EN MAIZ ALMACENADO..... 1618
- CARACTERIZACION ENOLOGICA DE LEVADURAS KILLER DE LOS VALLES CALCHAQUIES, SALTA, ARGENTINA..... 1626
- PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS CON ACTIVIDAD MACERANTE DE TEJIDOS VEGETALES..... 1633
- CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS ELABORADOS, NO ELABORADOS Y CRUDOS..... 1639
- CAPACIDAD INHIBITORIA DE CULTIVOS DE *ENTEROCOCOS* FRENTE A *Listeria monocytogenes* 1645
- INFECCIONES FÁGICAS EN BACTERIAS PROBIÓTICAS (*Lactobacillus casei/paracasei*)..... 1651
- MUTANTES ESPONTANEOS FAGORRESISTENTES DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PARA APLICACIONES INDUSTRIALES..... 1660
- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE REMOCIÓN Y DESINFECCIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA INDUSTRIA JUGUERA..... 1668
- PROPUESTA DE PARAMETROS DE CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA PARA YERBA MATE ELABORADA..... 1675
- VIABILIDAD DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS ELABORADOS CON LECHE BOVINA..... 1683
- BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA LACTICA INVOLUCRADA EN LA FERMENTACIÓN DE EMBUTIDOS ARTESANALES PRODUCIDOS EN TUCUMÁN..... 1692
- PRINCIPALES COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA (*Cinnamomun zeylanicum*) CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* 1699
- CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CEPAS NATIVAS DE *LEUCONOSTOC* SPP. POTENCIALMENTE UTILIZABLES COMO BIOPRESERVADORES EN ALIMENTOS..... 1706
- EFECTO PROTECTOR DE UNA CEPA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (CIDCA 133) SOBRE LA ACCIÓN DE *E.coli* O157: H7 EN CULTIVOS CELULARES..... 1713
- MODELADO DEL DESARROLLO BACTERIANO EN UN SISTEMA MODELO DE UN PRODUCTO CÁRNEO..... 1722
- EFECTO DEL CONTENIDO DE LEVADURAS Y DE LA TEMPERATURA DE RADIACION UV EN LA REDUCCION DE CEPAS DE *E. coli* O157:H7 EN JUGO DE NARANJA NATURAL..... 1729

-UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS POR <i>Lactobacillus plantarum</i> EN CONDICIÓN DE STRESS NUTRICIONAL.....	1737
-UTILIZACIÓN DE LEUCIL-LEUCINA Y GLICIL-GLICINA POR <i>Lactobacillus hilgardii</i>	1743
-CALIDAD BACTERIOLÓGICA DEL AGUA DE POZO PARA CONSUMO HUMANO Y RIEGO DE HORTALIZAS EN EL BARRIO MONTE TERRABUSI, MAR DEL PLATA. ARGENTINA.....	1749
-CONTAMINACIÓN BACTERIOLÓGICA DE COLIFORMES FECALES EN HORTALIZAS Y EN SUELOS REGADOS CON AGUAS DE POZO. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECuento.....	1757
-CARACTERIZACIÓN BACTERIANA DE CEPAS AISLADAS DE AGUA DE POZOS OBTENIDAS DEL BARRIO GRAL. BELGRANO, MAR DEL PLATA, ARGENTINA.....	1765
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS HALOFILAS EXTREMAS DETERIORANTES EN ANCHOITA SALADA.....	1780
-MICOFLORA CONTAMINANTE EN soja COSECHADA EN LA PRINCIPAL ZONA DE PRODUCCION DE LA REPUBLICA ARGENTINA.....	1788

NUTRACÉUTICOS Y ALIMENTOS FUNCIONALES

-QUESO PATEGRÁS PROBIÓTICO CON <i>Bifidobacterium lactis</i>	1795
-PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y CONTENIDO DE COLESTEROL EN QUESOS PATEGRÁS ARGENTINO CON ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	1804
-CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS GENERADOS POR LACTOBACILOS TERMÓFILOS PARA EL DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES.....	1812
-ELABORAÇÃO DE PÃO SEM GLUTEN PARA CONSUMO POR CELÍACOS.....	1822
-ACEPTABILIDAD SENSORIAL EN POSTRES FUNCIONALES.....	1829
-CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLISACÁRIDO AISLADO DE GRÁNULOS DE KEFIR.....	1836
-GALLETAS CON AGREGADO DE FRUCTANOS, VITAMINAS Y MINERALES.....	1846
-“IOGURTE” DE SOJA ENRIQUECIDO COM VITAMINAS E MINERAIS PARA CONSUMO DE INDIVÍDUOS COM INTOLERÂNCIA À LACTOSE	1856
-BISCOITO ENRIQUECIDO COM MINERAIS OBTIDOS DE MIX DE FARINHAS (BABAÇU, COGUMELO AGARICUS BRAZILIENSES E CASCA DE OSTRAS), PROTEÍNAS E ÓLEO LÁURICO PARA O CONSUMO DE CRIANÇAS PORTADORAS DO VÍRUS HIV.....	1864
-INFLUENCIA DE LA RELACION pH-CALCIO EN LA INTERACCION PROTEINAS-LECITINA DE SOJA Y LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES ACEITE EN AGUA (O/W).	1872

NUTRICIÓN

-ESTIMACIÓN DEL CONSUMO DE ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) EN ESCOLARES.....	1879
-ACEITUNAS VERDES FERMENTADAS CON MENOR APORTE DE SODIO.....	1885
-COMPLEMENTACIÓN PROTEICA – UNA IDEA VIABLE PARA MEJORAR LA CALIDAD BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES.....	1892
-CONTENIDO DE ZINC EN HUEVO FRESCO DE CONSUMO EN ARGENTINA.....	1901

-HUEVO FRESCO COMO APORTADOR DE HIERRO EN ARGENTINA.....	1909
-EVALUACION BIOLÓGICA DEL MEJORAMIENTO NUTRICIONAL DE HARINA DE TRIGO Y SÉMOLA CON PROTEÍNAS DE SUERO.....	1916
-INFLUENCIA DE DISTINTOS COMPONENTES DE LA DIETA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD POTENCIAL DE HIERRO.....	1922
-COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE ALGUNOS NUTRIENTES MINERALES EN <i>Porphyra columbina</i> PRESERVADA TRADICIONALMENTE Y CON TRATAMIENTO DE DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA	1929
-YERBA MATE ADICIONADA CON ROSA MOSQUETA: UN APOORTE IMPORTANTE DE ACIDO ASCORBICO.	1937
VARIOS	
-SIMULACIÓN DE MONTECARLO DE UN MODELO ECONOMICO DE EMPRESA CITRICOLA.....	1945
-ANÁLISIS DE MERCADOS SELECCIONADOS DE PIMENTÓN. CEE, EEUU, JAPÓN Y BRASIL.....	1953
-COMINO: PRODUCCIÓN NACIONAL, IMPORTACIONES Y EXPORTACIONES.....	1961
-ANALISIS BIBLIOMETRICO DE LA PRODUCCION IBEROAMERICANA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.....	1969
UN DESPERTAR EN LA VIDA DE UNA EMPRESA FRIGORÍFICA.....	1975

CAPACIDAD GENERADORA DE AMINAS BIÓGENAS DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN LA REGIÓN PATAGÓNICA.

BARAGGIO Nancy G., SPONTÓN Marisa E., MORAGUES Liana G., VENICA Claudia I., SIMONETTA Arturo C.

Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. Ing. en Alimentos, Fac. de Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral. Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe. Tel/Fax:0342-4571164 (Int. 2541)/4571162 e-mail: asimonet@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la actividad decarboxilativa de histidina, tirosina y triptofano que presentan bacterias ácido lácticas aisladas de leche ovina y quesos producidos en la región patagónica.

Se ensayaron 28 cepas de *Enterococcus*, una de *Streptococcus thermophilus* y una de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, aplicando un método en placas de Petri con posterior confirmación por cromatografía en placa delgada (TLC).

Todas las cepas estudiadas demostraron capacidad de decarboxilar tirosina en los ensayos en placas de Petri, mientras que ninguna resultó capaz de hacerlo con triptofano ni con histidina. Mediante TLC se determinaron concentraciones de tiramina variables para cada cepa, comprendidas entre 200 y 2000 ppm.

Los resultados indican que existe una alta probabilidad de que las cepas de bacterias lácticas de origen patagónico sean capaces de acumular considerables cantidades de tiramina, por lo que es indispensable evaluar esta actividad para determinar la conveniencia de su incorporación a fermentos.

Palabras Claves: aminas biógenas / bacterias lácticas / región patagónica

ABSTRACT

The objective of this work has been to evaluate the decarboxilative activity of histidine, tyrosine and triptophane present in lactic acid bacteria isolated from sheep milk and cheeses produced in the Patagonia region.

28 strains of *Enterococcus*, one of *Streptococcus thermophilus* and one of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* were studied applying a Petri dishes method with later confirmation by thin layer chromatography (TLC).

All the studied strains, when assayed by Petri dishes method, demonstrated decarboxilative activity of tyrosine, while none was able to make it with tryptophane neither with histidine. Variable concentrations of tiramine (from 200 to 2000 ppm) were determined for each strains by means of TLC assays.

The results indicate that exists a high probability that the strains of lactic acid bacteria isolated from sheep milk and cheeses produced in Patagonia region be able to accumulate high concentrations of tiramine. In consequence, it is very important to evaluate this activity prior to determine the convenience from their incorporation to starters.

INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas son base orgánicas alifáticas, alicíclicas o heterocíclicas de bajo peso molecular, que se comportan como moléculas biológicamente activas sobre el sistema nervioso central y sobre el sistema vascular de los seres humanos.

Se encuentran en niveles variables en alimentos de alto contenido proteico, dependiendo esos niveles de las condiciones microbiológicas y de la actividad bioquímica de los mismos (El-Sayed, 1996; Joosten and Northolt, 1989; Vale and Glória, 1998). Ellas son consideradas indeseables por sus posibles efectos tóxicos, a veces agudos, sobre el consumidor (Shalaby, 1996). Son moléculas relativamente pequeñas, de bajo peso molecular y muy estables, que persisten en los alimentos por un tiempo prolongado. También resisten la cocción y esterilización.

En muchos países se han reportado casos de intoxicación por aminas biógenas provenientes de diversos productos alimenticios (El-Sayed, 1996; Vale and Glória, 1998). En Argentina, según la información brindada por los organismos relacionados con la salud pública, no existen registros de casos asistidos, pero sí se conocen casos aislados. Estos compuestos se inactivan fisiológicamente por amino-oxidasas, las cuales son enzimas encontradas en bacterias y células de plantas, humanos y animales, capaces de catalizar la deaminación oxidativa de las aminas con producción de aldehídos, peróxido de hidrógeno y amonio.

En función de lo expuesto, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la actividad decarboxilativa ejercida sobre los aminoácidos histidina, tirosina y triptofano, conducente a la generación de histamina, tiramina y triptamina, que presentan bacterias ácido lácticas aisladas de leche ovina y quesos elaborados con ella en la región Patagónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas seleccionadas:

Se ensayaron 28 cepas de *Enterococcus* (22 *E. faecium* y 6 *E. faecalis*), una de *Streptococcus thermophilus* y una de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Estas cepas fueron aisladas de leche de oveja y de productos lácteos elaborados con ella en la zona patagónica.

Conservación de las cepas:

Todas las cepas bacterianas se conservaron por liofilización, para disponer de un stock de referencia seguro y estable en el tiempo. Asimismo, y con el objeto de contar con cultivos fácil y rápidamente disponibles para efectuar las propagaciones, se procedió también a conservar todas las cepas por congelamiento a -20 °C en Caldo M17 (Biokar) con el agregado de un 15% de glicerol.

Activación de los cultivos:

Los cultivos para efectuar los ensayos de producción de aminos se obtuvieron activando las cepas conservadas mediante dos siembras sucesivas en tubos con 5 ml de Caldo M 17 (Biokar), que se incubaron a 37°C durante 24 h.

Determinación de la capacidad de producción de aminos biógenas

Método en Placas de Petri:

Para determinar cualitativamente la capacidad de producción de aminos se aplicó un método en placas de Petri, usando el medio de Joosten y Northolt (1989), adicionado de los aminoácidos precursores (tirosina, triptofano e histidina) en una concentración final del 2 % (p/v), a pH 5 – 5,25 y esterilizado a 121 °C durante 10 minutos.

En cajas de Petri se volcaron 10 ml del medio citado y se dejaron solidificar. Luego se efectuó la siembra en superficie de cada una de las cepas bacterianas en estudio y se incubó a 30 °C durante 7 días.

Método químico (TLC):

Cultivos:

Los cultivos finales se prepararon en caldo de Joosten y Northolt (1989) adicionado con un 0,2% (p/v) de cada uno de los aminoácidos precursores, incubándolos a 30°C durante 7 días. Para algunas cepas de *Enterococcus*, también se prepararon con idéntica metodología cultivos finales en leche descremada en polvo, reconstituida al 10 % (p/v), que se incubaron a 37°C durante 15 días.

Análisis cromatográfico:

Se aplicó la técnica de multidetección de Shalaby (1995, 1999), que consiste en extraer las aminas de los cultivos, transformarlas en sus derivados dansilados por reacción con cloruro de dansilo, y luego separar las dansilaminas por análisis cromatográfico utilizando dos sistemas de solventes, primero la mezcla cloroformo: benceno: trietilamina (6:4:1 v/v/v) y después la mezcla benceno: acetona: trietilamina (10:2:1 v/v/v). Las manchas características se observaron bajo luz UV, a una longitud de onda de 360 nm, y se procedió a su comparación visual con las correspondientes a soluciones estándar dansiladas de distintas concentraciones de las tres aminas en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas estudiadas demostraron capacidad de decarboxilar tirosina en los ensayos en placas de Petri, mientras que ninguna resultó capaz de hacerlo con triptófano ni con histidina.

Estos resultados fueron confirmados por TLC (Tabla 1), determinándose concentraciones de tiramina variables para cada una de las cepas, comprendidas para la mayoría de los casos entre 200 y 2000 ppm, cuando las mismas se cultivaron en caldo de Joosten y Northolt. Cuando algunas de estas cepas se cultivaron en leche a 37°C y durante 15 días (Tabla 2), varias no manifestaron actividad decarboxilativa, y en las restantes ésta resultó sensiblemente disminuida.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que existe una muy alta probabilidad de que las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de leche y productos lácteos patagónicos sean capaces de acumular considerables cantidades de tiramina, por lo que es indispensable evaluar esta actividad bioquímica como paso previo a determinar la conveniencia de su incorporación a nuevos fermentos específicamente diseñados para este tipo de productos regionales.

Si bien existen criterios muy dispares en lo que se refiere a los niveles máximos de aminas biógenas en distintos tipos de alimentos que pueden ser tolerados con seguridad por el consumidor, variadas referencias bibliográficas (Shalaby, 1996; Huss, 1997; Suzzi and Gardini, 2003) coinciden en indicar que con niveles de 100 mg de aminas biógenas por 100 g de alimento, ya se han observado efectos tóxicos. Las mismas referencias indican que, en individuos especialmente sensibles, consumos de tiramina comprendidos

entre 8 y 40 mg por 100 g de alimento ya pueden provocar efectos adversos suaves, mientras que niveles de 100 y 1000 mg producen, respectivamente, efectos moderados y severos.

Tabla 1: Determinación por TLC de la capacidad de producción de tiramina por cepas de *Enterococcus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* desarrolladas en caldo de Joosten y Northolt.

Cepas	Identificación de cepas	Origen de las cepas	Concentración de tiramina (ppm)				
			200 - 500	500 - 1000	1000 - 1500	1500 - 2000	> 2000
<i>Enterococcus faecium</i>	ETw4	Leche ovina			+		
	ETw5	Leche ovina			+		
	ETw6	Leche ovina			+		
	ETw7	Leche ovina				+	
	ETw8	Leche ovina		+			
	ETw9	Leche ovina					+
	ETw10	Leche ovina				+	
	ETw11	Leche ovina				+	
	ETw13	Leche ovina					+
	ETw14	Leche ovina					+
	ETw15	Leche ovina		+			
	ETWSV(3)	Leche ovina	+				
	ETWSV(12)	Leche ovina	+				
	ETWSV(16)	Leche ovina	+				
	ETWSV(17)	Leche ovina	+				
	ETw20	Queso ovino				+	
	ETw22	Queso ovino				+	
	ETw24	Queso ovino					+
	ETw25	Queso ovino			+		
	ETw28	Queso ovino				+	
ETWSV(21)	Queso ovino	+					
ETWSV(29)	Queso ovino			+			
<i>Enterococcus faecalis</i>	ETWSV(18)	Leche ovina			+		
	ETw19	Queso ovino			+		
	ETw23	Queso ovino			+		
	ETw26	Queso ovino				+	
	ETw27	Queso ovino				+	
	ETWSV(27)	Queso ovino			+		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Twsv39	Leche ovina				+	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Twsv40	Leche ovina				+	

Tabla 2: Determinación por TLC de la capacidad de producción de tiramina por cepas de *Enterococcus* desarrolladas en el caldo de Joosten y Northolt y en leche.

Cepas	Identificación de cepas	Concentración de tiramina (ppm)	
		Medio Joosten-Northolt (30 °C – 6 días)	Leche (30 °C – 15 días)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ETWSV(18)	> 1000	> 200
	ETWSV(27)	> 1000	ND
<i>Enterococcus faecium</i>	ETWSV(3)	> 200	ND
	ETWSV(12)	> 200	> 200
	ETWSV(16)	> 200	ND
	ETWSV(17)	> 200	ND
	ETWSV(21)	> 200	ND
	ETWSV(29)	> 1000	200

ND: No detectado

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con subsidios provenientes de la Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina) (Proyecto PICT Redes n° 00063 – Convocatoria 2002), y del Programa “Curso de Acción para la Investigación y el Desarrollo” (C.A.I.+D. 2000, Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Litoral, Argentina).

BIBLIOGRAFÍA

- **El-Sayed, M. M. (1996).** “Biogenic amines in processed cheese available in Egypt”. *International Dairy Journal*, **6**: 1079 – 1086.
- **Huss, H.H. (1997).** Documento FAO “Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. 3.4. Aminas biógenas” Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. 42-46
- **Joosten, H.M.L.J. and Northolt, M.D. (1989).** “Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese”. *Applied and Environmental Microbiology*, **55** (9): 2356-2359.
- **Shalaby, A.R. (1995).** “Multidetecction, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods”. *Food Chemistry*, **52**: 367-372.

- **Shalaby, A.R. (1996).** *“Significance of biogenic amines to food safety and human health”*. Food Research International, **29** (7): 675-690.
- **Shalaby, A.R. (1999).** *“Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods”*. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section. Food Chemistry, **65**: 117-121.
- **Suzzi G., Gardini F. (2003).** *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review”*. International Journal of Food Microbiology, **88**: 41-54.
- **Vale, S. & Glória, B.A. (1998).** *“Biogenic amines in brazilian cheeses”*. Food Chemistry, **63** (3): 243-248.

HIDROLIZADOS CASEINICOS TOTALES Y FRACCIONADOS. ACCION PROMOTORA DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS. ESTUDIO SOBRE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS.

REY María C.¹⁻², TONARELLI Georgina G.², SIMONETTA Arturo C.¹

¹Cátedra de Microbiología y Biotecnología, Dto. de Ingeniería en Alimentos, Fac. de Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral. Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe. e-mail: asimonet@figus.unl.edu.ar ²Dto de Qca. Orgánica, Fac. de Bioq. y Cs. Biológicas, Univ. Nac. del Litoral. Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina. e-mail: mcrey@fcb.unl.edu.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto provocado por hidrolizados caseínicos totales (HT) y fraccionados (fracción A) sobre el crecimiento de distintas cepas de bacterias ácido lácticas obtenidas a partir de alimentos fermentados comerciales y artesanales de la región. Se analizó la influencia sobre el estado fisiológico, mediante la determinación comparativa de propiedades tecnológicas como la actividad acidificante, proteolítica y lipolítica y la producción de sustancias tipo bacteriocinas.

Asimismo, se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en leche, con el fin de estudiar posteriormente su aptitud para ser utilizadas como fermentos en la industria láctea.

Los resultados demostraron que, si bien existen variaciones de cepa a cepa, en general el lactosuero adicionado de hidrolizados caseínicos fraccionado o total puede reemplazar al caldo MRS en la propagación de bacterias ácido lácticas para su posterior utilización como starters, asegurando el mantenimiento del estado fisiológico de las mismas.

Palabras Claves: bacterias lácticas / crecimiento / propiedades tecnológicas / hidrolizados caseínicos

ABSTRACT

In this work we studied the effect caused by casein hydrolysed total (HT) and fractional (fraction A) in the growth of different strains of lactic acid bacteria isolated from commercial and artisanal fermented foods produced in Santa Fe region. The influence on the physiologic state was analysed by means of the comparative determination of technological properties as the acidifying activity, proteolytic and lipolytic activities, and the production of bacteriocin-like substances.

Also, the capacity of growth of the strains in milk was evaluated, with the purpose of studying its aptitude later on to be used as starters in dairy industry.

The results demonstrated that, although there are variations to each strain, in general the cheese whey with the addition of casein hydrolysed fractional or total can replace the MRS broth in the lactic acid bacteria strains propagation for its later use as starters cultures, assuring the maintenance of the physiologic state of the same ones.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del ácido láctico exigen el suministro exógeno de aminoácidos para su crecimiento, ya que ellas son, en general, incapaces de efectuar su síntesis a partir de una fuente nitrogenada mineral simple (4, 5, 7).

Como las concentraciones de aminoácidos y péptidos cortos en la leche son bajas, las bacterias lácticas ponen en marcha enzimas proteolíticas para procurarse péptidos que las provean de nutrientes complementarios, y así asegurarse un buen desarrollo. En la leche, las caseínas son degradadas y puede imputarse a este proceso un noventa por ciento de la capacidad de crecimiento de los lactococos en ese medio (4, 5, 7, 10).

En lo que respecta a la obtención de elevadas poblaciones de estas bacterias del ácido láctico, destinadas a una posterior utilización como cultivos starters en distintas industrias alimentarias, no sólo es importante la densidad de población máxima alcanzada en un medio de cultivo dado, sino también lograr la mayor velocidad de multiplicación celular posible; es igualmente de interés el estado fisiológico en que se encuentren esas células, dado que del mismo dependerán las propiedades tecnológicas, que son de fundamental importancia para su desempeño como cultivos iniciadores en la obtención de diversos alimentos fermentados. Entre estas propiedades se pueden mencionar como relevantes a las actividades acidificante, proteolítica y lipolítica, y a la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas(1,8,9, 11-13).

Por estas razones, en el presente trabajo se investigó acerca de los potenciales efectos estimulantes sobre cepas de bacterias del ácido láctico, de la presencia en el medio de desarrollo de hidrolizados caseínicos totales y fraccionados. Esos efectos se evaluaron sobre la velocidad de crecimiento y la máxima concentración celular alcanzada y sobre algunas propiedades tecnológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hidrolizados caseínicos. Fraccionamiento: Se utilizaron hidrolizados enzimáticos comerciales de caseínas marca Sigma N-Z - CASE PLUS From Bovine Milk. (SIGMA. N-4642). Para fraccionarlos se utilizó la técnica de filtración por geles o cromatografía de exclusión molecular en columnas de Shepadex G25 Medium (Farmacia), utilizando agua Milli Q como solvente de elución. Para controlar los eluatos obtenidos se realizó cromatografía en placas de sílica-gel GF 254, utilizando n-butanol/ácido acético/agua, en relación 40/15/30, como solvente de corrida. El revelado se realizó con solución de ninhidrina-piridina disueltas en etanol. Las fracciones fueron analizadas por HPLC en fase reversa.

Cepas: Se estudiaron 7 cepas de bacterias del ácido láctico de colección propia, pertenecientes a las siguientes especies: *Enterococcus faecalis* (2 cepas: E 24 y E 30), *Enterococcus faecium* (E 23), *Lactobacillus plantarum* (Lp 31), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb 92), *Streptococcus thermophilus* (Ch 3-4), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Sf 1-1).

Las mismas han sido aisladas a partir de leche cruda, productos lácteos y productos cárnicos, producidos industrial o artesanalmente en la región.

Todas las cepas fueron conservadas por congelamiento a -20°C , en Caldos MRS o M17 (Merck) adicionados con un 15% de glicerol.

Condiciones de cultivo (8): Los cultivos se desarrollaron en cinco medios:

- Caldo MRS (Merck), medio comercial de uso muy extendido.
- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de peptona de carne (Microquin).
- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado de caseína (Sigma).
- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% y un 4% (p/v) de hidrolizado de caseína fraccionado (fracción A).

Cada uno de los cultivos finales se sembraron con los respectivos precultivos (relación de siembra: 0,1% v/v), cuya concentración celular fue previamente estandarizada en un valor de Densidades Ópticas igual a 0,80, a 560 nm, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se tomaron 5 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 3000 rpm; el agregado celular fue lavado y posteriormente resuspendido en 5 mL de solución fisiológica. Éstos fueron estandarizados en una concentración celular determinada, correspondiente a un valor de D.O. igual a 0,80 (a 560 nm), y con ellos se estudiaron las propiedades tecnológicas.

Propiedades tecnológicas:

- **Actividad acidificante** (1, 6, 9): A leche descremada en polvo reconstituida al 10% (p/v), se la inoculó con cada una de las suspensiones celulares (obtenidas según lo indicado en el párrafo anterior) en una proporción 10/1. Los cultivos en leche se incubaron a 37°C durante 12h, 24h, 48h y 5 días. La acidez expresada en grados Dornic fue determinada por titulación con solución de NaOH (N/9). La actividad acidificante se expresó como promedio de tres medidas realizadas en los distintos períodos de tiempo contra blanco de leche sin cultivar.

- **Actividad lipolítica:** Se aplicó la técnica de Deeth and Fitz Gerald (1975) (3); esta consiste en una extracción con mezcla de solventes (isopropanol/ éter de petróleo/ SO₄H₂ 4N en una proporción 40/ 10 /1) de los ácidos grasos libres y luego, a una alícuota de la fase superior se la titula con KOH 0.02 N, utilizando fenolftaleína metanólica como indicador. El contenido de ácidos grasos libres se expresó como μ equivalentes/mL.

- **Actividad proteolítica:** Se determinó mediante el test de OPA, según Church et al. (1983) (2). De cultivos de 24 horas obtenidos a partir de leche inoculada con las suspensiones celulares estandarizadas de cada una de las cepas (propagadas en los diferentes medios propuestos y obtenidas según lo indicado previamente), se tomó una alícuota, se la trató con ácido tricloroacético, y a una fracción se la hizo reaccionar con el reactivo de OPA. Luego se determinó la absorbancia a 340 nm contra blanco de reactivo.

- **Producción de bacteriocinas (11-13):** Se obtuvieron los sobrenadantes libres de células, que fueron concentrados y esterilizados por filtración. El pH final de estos sobrenadantes estuvo comprendido entre 6,0 y 6,5. La capacidad inhibitoria se determinó aplicando el ensayo de difusión en agar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

De los datos expuestos en la Figura 1 se deduce que para la mayoría de las cepas estudiadas se obtuvieron significativos incrementos en las concentraciones celulares máximas alcanzadas, cuando se utilizó lactosuero adicionado con hidrolizado de caseína. Los resultados fueron variables al adicionarse la fracción peptídica A: con el agregado al lactosuero del 2% (p/v), se observaron valores inferiores a los obtenidos con el hidrolizado total; los valores mejoraron notablemente cuando la concentración se incrementó al 4 % (p/v), excepto en el caso de las cepas de *Enterococcus faecalis*. En la mayoría de los casos se observó una variación en el tiempo de incubación necesario para alcanzar la población máxima, aunque generalmente resultó próximo a las 12 horas de incubación.

La actividad acidificante mostró resultados variables (Tabla N° 1), siendo en la mayoría de los casos, más elevada cuando la propagación de las cepas se realizó inicialmente en suero de quesería adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total o un 4% (p/v) de hidrolizado fraccionado.

La actividad proteolítica siempre fue mayor al utilizar caldo MRS como medio de propagación, frente a resultados significativamente inferiores observados con los otros medios utilizados.

La capacidad de lipólisis (Tabla N° 1) fue mayor para los cultivos de *Enterococcus* y *Streptococcus thermophilus* provenientes de lactosuero con 4 % (p/v) de hidrolizado caseínico fraccionado, mientras que en las demás cepas el incremento se observó cuando lo adicionado fue el hidrolizado total.

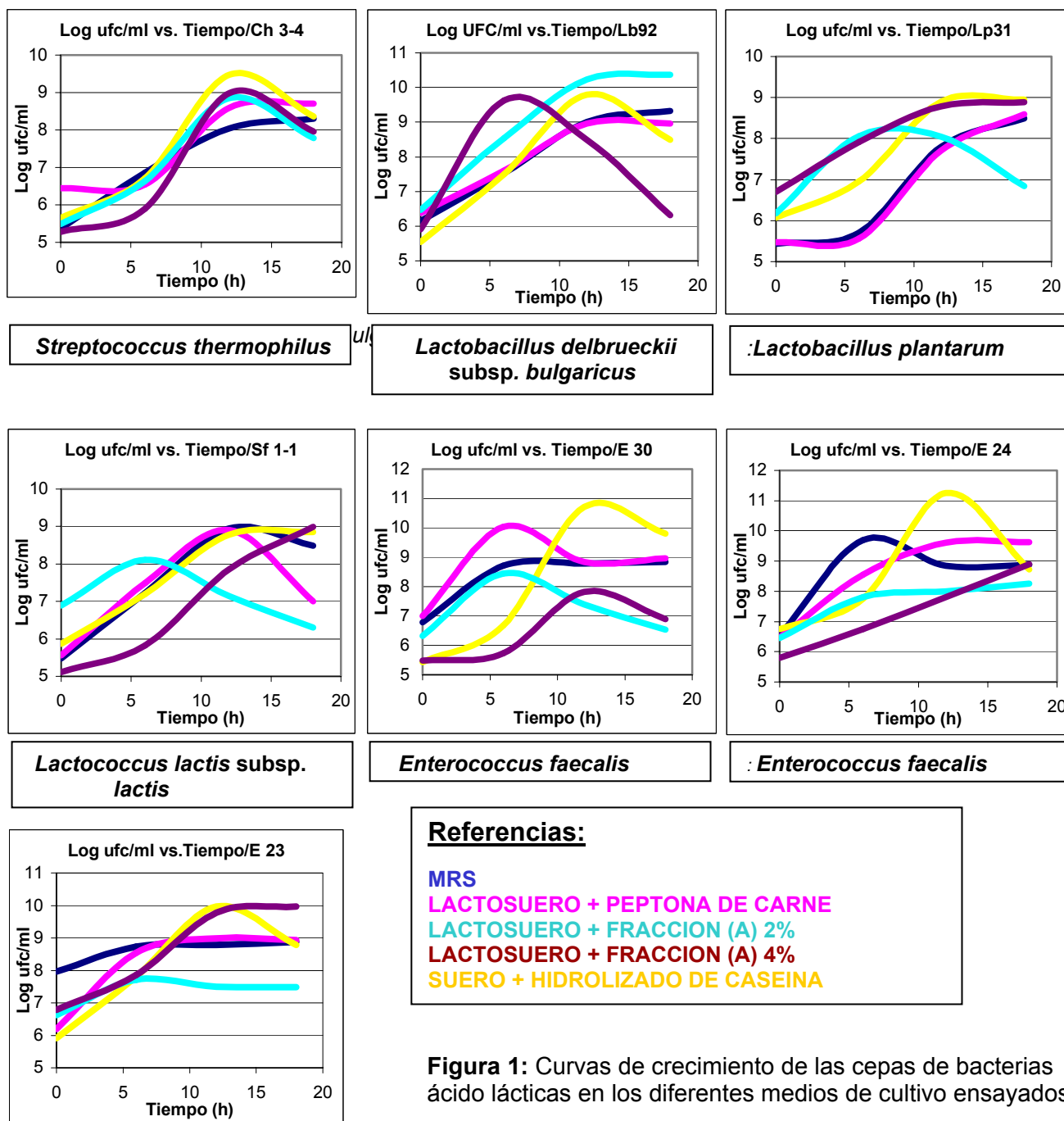


Figura 1: Curvas de crecimiento de las cepas de bacterias ácido lácticas en los diferentes medios de cultivo ensayados

Tabla 1: Propiedades tecnológicas de las cepas de bacterias ácido lácticas en los diferentes medios de cultivo ensayados

Actividad	MEDIO DE CULTIVO	12 h.	TIEM 24 h.	PO 48 h	5 días	
		<i>E. faecium</i> E 23	MRS	27.47	34.78	65.89
	SUERO+HT 2%	27.47	36.61	73.22	102.50	
	SUERO+A 4%	27.47	38.44	76.88	129.96	
<i>E. faecalis</i> E 24	MRS	25.63	31.12	71.39	126.30	
	SUERO+HT 2%	21.96	27.46	86.03	142.77	
	SUERO+A 4%	18.30	29.29	93.35	140.94	
<i>E. faecalis</i> E 30	MRS	73.22	86.69	91.52	135.45	
	SUERO+HT 2%	18.30	82.37	91.52	144.60	
	SUERO+A 4%	58.57	69.55	95.18	146.43	
acidificante	<i>L. lactis</i> Sf 1-1	MRS	23.79	23.79	73.22	91.52
		SUERO+HT 2%	23.79	23.79	76.88	93.35
		SUERO+A 4%	21.96	27.46	93.35	129.96
	<i>L. bulgaricus</i> Lb 92	MRS	27.46	38.44	67.72	104.33
		SUERO+HT 2%	25.63	47.59	67.72	115.32
		SUERO+A 4%	34.78	58.57	75.05	109.82
	<i>S. thermophilus</i> Ch 3-4	MRS	32.95	49.42	65.89	102.50
		SUERO+HT 2%	29.29	49.42	71.39	107.99
		SUERO+A 4%	23.80	45.76	65.89	115.32
	<i>L. plantarum</i> Lp 31	MRS	20.13	45.76	56.74	107.99
		SUERO+HT 2%	23.79	45.76	65.89	107.99
		SUERO+A 4%	27.46	47.59	71.39	113.48

Actividad lipolítica	MEDIO DE CULTIVO / MO	E 23	E 24	E 30	Sf 1-1	Lb 92	Ch3-4	Lp 31
	MRS	12.09	11.70	16.96	10.86	10.72	13.58	7.63
	SUERO+HT 2%	14.70	16.37	20.35	11.93	12.25	15.99	10.43
	SUERO+A 4%	15.41	19.24	22.29	11.46	10.72	18.52	9.76

Producción de sustancias inhibitoria tipo bacteriocinas		<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aureginosa</i>
	E 23-MRS	17	20	16	18
	E23-suero+HT 2%	16	15	15	16
	E23-suero+A 4 %	9	9	11	13
	E 24-MRS	16	19	15	17
	E24-suero+HT 2%	16	19	16	19
	E24-suero+A 4 %	10	15	14	16
	E 30-MRS	17	18	19	19
	E30-suero+HT 2%	9	11	13	14
	E30-suero+A 4 %	8	10	11	16
	Lp31-MRS	15	18	14	16
	Lp31-suero+HT2%	10	11	13	15
Lp31-suero+A4 %	10	6	13	12	

- Actividad acidificante: valores expresados en grados Dornic
- Actividad lipolítica: valores expresados en μ equivalentes/mL.
- Producción de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas: expresada como diámetro de los halos de inhibición medidos en mm.

La actividad antibacteriana (Tabla N° 1) resultó mayor cuando las cepas fueron propagadas en caldo MRS o en lactosuero con 2 % (p/v) de hidrolizado caseínico total. Los resultados correspondientes a las propiedades tecnológicas determinadas utilizando lactosuero con el agregado de peptona de carne como medio de propagación (datos no mostrados) fueron sensiblemente inferiores a los logrados utilizando cualquiera de los otros medios ensayados.

CONCLUSIONES:

En general los resultados han sido variables para cada una de las cepas y de las propiedades estudiadas, pero se puede observar que, para la mayoría de ellas, utilizando lactosuero con el agregado de un 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total o un 4 % (p/v) del fraccionado, se han logrado resultados similares o mejores a los observados con un medio comercial de alto costo como lo es el caldo MRS.

Se puede concluir que el agregado de fracciones caseínicas al suero de quesería puede ser una buena alternativa tecnológica para la propagación de bacterias del ácido láctico, conservando o mejorando varias de sus propiedades de interés industrial.

Si bien en esta etapa del trabajo no se ha realizado aún una evaluación exhaustiva de los costos implicados en la obtención de los hidrolizados fraccionados, se puede prever que al menos el lactosuero (desecho industrial contaminante del medio ambiente y de muy escaso valor comercial) con el agregado de hidrolizados caseínicos totales permitiría obtener un medio de propagación sensiblemente más económico que el caldo MRS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con subsidios provenientes de la ANPCyT, Argentina (Proyecto PICT Redes n° 00063 – Convocatoria 2002), y del Programa C.A.I.+D. 2000 (Sec. de Ciencia y Técnica, Univ. Nac. del Litoral)

BIBLIOGRAFÍA

Carrasco M., Scarinci H., Garat M., Simonetta A. “Technological Properties of Enterococci in Lactic Starters: Acidifying and Lipolytic Activities”. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 10: 289-293 (1992)..

Church F., Swaisgood H., Porter D. and Catignani G. “Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins”. *J. Dairy Sci.*, 66 (6) (1983).

H. Deeth and C. Fitz Gerald. “Lipolysis”. Aust. J. Dairy Tech., 30 (1975).

Flambard B., Herlich S., Richard J., Juillard V. “The Contribution of Caseins to the Amino Acid Supply for *Lactococcus lactis* depends on the Type of Cell Envelope Proteinase”. App. Environ. Microbiol., 64 (1998).

Juillard V., Guillot A., Dominique L., Gripon J. “Specificity of Milk Peptide Utilization by *Lactococcus lactis*”. App. Environ. Microbiol. 64(4) (1998).

Kanasaki M., Breheny S., Hiller A. and Jago G. “Effect of Temperature on the Growth and Acid Production of Lactic Acid Bacteria. A Rapid Method for the Estimation of Bacterial Population in Milk”. Aust. J. Dairy Technol. (1975)

Salminen S. and von Wrigght A. (eds.)” Lactic Acid Bacteria”. Food Science and Technology Series / 58; 2:65-95 (1993).

Scarinci H., Carrasco M., Simonetta A. ”Growth yield of Lactic Acid bacteria Strains for Concentrated Starter Cultures”. Microbiologie- Aliments-Nutrition 15: 253-260 (1997)

Scarinci H., Carrasco M., Simonetta A.”Technological Properties of Strains of Lactic Acid Bacteria for Chesse Starter: Acidifyng Activity and Redox Potential Control”. Microbiologie-Aliments-Nutrition 12:437-442 (1994).

Shah N.P.”Effects of milk-derived bioactives: An overview”. School of Life Science and Technology, Victoria University of Technology, Melbourne Australia, 84(1): **S3-10 (2000)**.

Simonetta A., Frison L., Moragues L. “Antibacterial Activity of Bacteriocin-Like Substances Produced by Enterococci Strains”. Microbiologie-Aliments-Nutrition 16: 281-288 (1998).

Simonetta A., Morgues L., Frisón L. “Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*”. Letters App. Microbiol. 24: 139-143 (1997).

Vignolo G., Suriani F., Ruiz Holgado A., Oliver G. “Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages”. J. App. Bacteriol. 75: 344-349 (1993).

MEJORAMIENTO ECOFISIOLÓGICO DE *KLUYVEROMYCES* spp L16 Y SU IMPACTO EN EL CONTROL DE *ASPERGILLUS* SECCION FLAVI

La Penna¹ Mariangeles y Etcheverry¹ Miriam

Orientación Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Ruta Nacional 36 Km 601. 5800. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. (e-mail: metcheverry@exa.unrc.edu.ar)

RESUMEN

Se estudió la influencia de *Kluyveromyces* spp. manipulada fisiológicamente sobre la fase de latencia (FL), velocidad de crecimiento (VC) y producción de aflatoxina B₁ (AFB₁) de *Aspergillus* sección *Flavi* en agar harina de maíz (AHM) a diferentes actividades acuosas. Cuando la a_w del medio de crecimiento fue mayor, el agente de biocontrol retardó el desarrollo fúngico en la mayoría de las interacciones estudiadas. A la a_w 0.937 *Kluyveromyces* spp. fue más efectiva para incrementar la FL que a 0.955. La velocidad de crecimiento de *Aspergillus* a diferentes a_w fue reducida cuando *Kluyveromyces* spp. fue modificada a las a_w 0.995 y 0.982. En general, este efecto fue mayor cuando el soluto utilizado para la manipulación fisiológica fue glicerol. La interacción del antagonista manipulado fisiológicamente y sin manipular con las cepas de *Aspergillus* inhibió la acumulación de aflatoxina B₁ (AFB₁) en todos los tratamientos analizados.

Palabras claves: Mejoramiento ecofisiológico, *Kluyveromyces* spp L16, *Aspergillus* sección Flavi, Biocontrol

ABSTRACT

The influence on *Aspergillus* section *Flavi* lag phase, growth rate and aflatoxin B₁ by *Kluyveromyces* spp manipulate physiologically was determined in maize meal agar at different water activity. When water activity of growth medium was high biocontrol agent delayed the fungal growth of majority interactions studied. At 0.937 a_w *Kluyveromyces* was more effective to increase the lag phase at 0.955 a_w . The *Aspergillus* growth rate at different water activities was reduced when *Kluyveromyces* spp was modified at 0.955 and 0.982 a_w . The effect was major when the solute used to physiological manipulation was glicerol. The interaction between *Aspergillus* strains and antagonist physiologically manipulate and no manipulate inhibited aflatoxin B₁ accumulation in all treatments analized.

INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Aspergillus* de la sección Flavi se caracterizan por su tolerancia al estrés acuoso y por su capacidad de producir biodeterioro de productos alimenticios y acumulación de aflatoxinas. Los agentes de control biológico podrían ser una alternativa para la prevención de la acumulación de estos metabolitos tóxicos. La manipulación fisiológica de las condiciones de crecimiento del antagonista podría incrementar su tolerancia al estrés acuoso y mejorar su actividad de competencia frente a las cepas aflatoxicogénicas. El aislado L16 de *Kluyveromyces* spp posee potencialidad para antagonizar con cepas aflatoxicogénicas (La Penna y col. 2004). Debido a ello el objetivo fue estudiar el efecto del mejoramiento fisiológico de *Kluyveromyces* spp L 16 sobre el control del crecimiento y acumulación de aflatoxina B₁ de cepas aflatoxicogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos: Aislado L₁₆ de *Kluyveromyces* spp. mantenido en agar extracto de malta a 4°C y en glicerol al 15% a -80°C

Cepas de *Aspergillus* Sección *Flavi*, *A. flavus* (H₁₁₀₅, H_{T104}) y *A. parasiticus* (H_{D106}, H_{T9}) mantenidas en agar extracto de malta a 4°C y en glicerol al 30% a -80°C

Medios de cultivo: Se utilizó agar harina de maíz (AHM) al 3% acondicionado con volúmenes definidos de glicerol, para lograr las actividades de agua (0.995, 0.982, 0.955, 0.937). Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos y fraccionados en placas de Petri.

Preparación del inóculo de *Kluyveromyces* spp A partir de un cultivo de 24 horas del aislado L₁₆ en caldo extracto de malta (CEM) se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembró una alícuota de 0.1 ml en placas de Petri conteniendo agar extracto de malta (AEM), para recuento de UFC. Las placas se incubaron durante 48 horas a 25°C. La dilución con 1×10^6 ufc ml⁻¹ fue utilizada para inocular frascos erlenmeyer en distintas condiciones de a_w.

Manipulación fisiológica de *Kluyveromyces* spp: Se utilizaron frascos erlenmeyer con 100 ml de caldo extracto de malta (CEM) en distintas condiciones de a_w (0.995, 0.982, 0.955 y 0.937) y a pH 5.5. Las diferentes a_w se lograron por el agregado de cantidades conocidas de un soluto iónico (CINa) y uno no iónico (glicerol). Cada tratamiento fue inoculado con una concentración conocida de *Kluyveromyces* spp (1×10^6 ufc ml⁻¹) y fueron cultivados en agitador termostatzado (150 rpm) a 25°C durante 24 horas.

-Inoculación, incubación, velocidad de crecimiento y fase de latencia: Utilizando la técnica de placa vertida se inocularon las placas con 1 ml de 1×10^6 ufc ml^{-1} de la levadura manipulada fisiológicamente. Se utilizó para la experiencia AHM a 45°C a diferentes a_w . Cada placa también fue inoculada con una punción central de esporas de *A. flavus* (H_{I105} , H_{T104}) y *A. parasiticus* (H_{D106} , H_{T9}) suspendidas en agar semisólido, éstas provenían de colonias de 5-7 días desarrolladas en AEM. Las placas fueron incubadas a 25°C y selladas en bolsas de polietileno para evitar los cambios de a_w . Cada tratamiento se realizó por triplicado. El crecimiento fue monitoreado diariamente hasta que la colonia del hongo control cubrió la placa, aproximadamente 12 días. El radio de las colonias fue medido diariamente. Las velocidades de crecimiento, expresadas en mm d^{-1} , fueron calculadas por regresión lineal del radio de la colonia versus el tiempo de incubación para cada cepa de cada set de condiciones analizadas (Marín y col., 1995a, 1998a,b). La fase de latencia fue obtenida por extrapolación de la fase exponencial de crecimiento (González y col., 1987)

Extracción y detección de AFB₁: La extracción de la AFB₁ se realizó, a los once días de incubación, de las placas utilizadas para averiguar la velocidad de crecimiento. Se siguió la metodología propuesta por Geisen (1996) con modificaciones en nuestro laboratorio. Un disco de agar de 5 mm de diámetro de la colonia desarrollada de cada cepa fue transferida a un tubo Eppendorf y se le adicionaron 500 μl de cloroformo. La mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos, se tomaron 200 μl de la fase clorofórmica y se evaporó el extracto a sequedad. Los extractos se conservaron a 4°C hasta el momento del análisis. El residuo fue resuspendido en 200 μl de la mezcla acetonitrilo: agua (9: 1), se adicionaron 700 μl de la solución derivatizante y se colocó en baño de agua a 65°C durante 9 minutos. Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y analizadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de acuerdo a la técnica propuesta por Trucksess y col., 1994.

Análisis estadístico: La velocidad de crecimiento y la fase de latencia fueron analizados por un análisis de varianza con SAS software (SAS Institute, versión 6.03, Cary N.C.). La significancia estadística fue ajustada a un nivel $P < 0.05$. Cuando el análisis fue estadísticamente significativo se utilizó El Test de Rangos Múltiples de Duncan para la separación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar la fase de latencia obtenida en el medio agar harina de maíz (AHM) modificado con glicerol a la a_w 0.995, se determinó que la misma fue incrementada en todas las interacciones con el aislado L_{16} que no sufrió manipulación. Dicha capacidad se mantuvo cuando el antagonista fue mejorado fisiológicamente, excepto cuando la manipulación se realizó en CEM a_w 0.955/glicerol y se determinó la interacción con H_{T9} , estos resultados también se observaron cuando la manipulación se realizó a la misma a_w pero en presencia del soluto iónico (CINa), en este caso el antagonista no pudo aumentar la fase de latencia de ninguno de los hongos en estudio. Cuando la disponibilidad de agua del medio AHM fue mayor, el agente de control biológico tuvo la habilidad de influir sobre las cepas fúngicas retardando su desarrollo en la mayoría de las interacciones estudiadas. A la a_w 0.955 y 0.937, la cepa H_{T9} fue la más afectada por la presencia del antagonista, determinándose un retraso del crecimiento superior a 10 días de incubación. A la a_w 0.937 el aislado L_{16} fue más efectivo para incrementar la fase de latencia que a la a_w 0.955. En general, se observó menor fase de latencia en aquellas interacciones en las que el antagonista fue producido en CEM modificado con CINa cuando la a_w del medio AHM fue 0.937. El proceso realizado al antagonista L_{16} en CEM a la a_w 0.982/glicerol para su mejoramiento fisiológico permitió incrementar la fase de latencia en la mayoría de las interacciones, independientemente de la a_w del medio AHM. Todos los factores simples ensayados (a_w , aislado L_{16} , cepas fúngicas) y las interacciones de dos y tres vías fueron estadísticamente significantes de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). En este caso el factor más importante fue cepas fúngicas, seguido de a_w y la interacción $a_w \times$ cepas fúngicas. (Tabla 1).

Tabla 1: Análisis de varianza del efecto de la actividad acuosa (a_w), el aislado L_{16} sin manipular y manipulado fisiológicamente (L_{16}), diferentes cepas fúngicas (H) y sus interacciones sobre las fases de latencia (d) de 4 cepas de *Aspergillus* Sección *Flavi* en agar harina de maíz

Fuente	GL	CM	F	Pr > F
a_w	3	1.40298219	16.85**	0.0001
L_{16}	8	1.07360693	12.89**	0.0001
H	3	3.10866698	37.33**	0.0001
$a_w \times L_{16}$	24	0.92104164	11.06**	0.0001
$a_w \times H$	9	0.93669178	11.25**	0.0001
$L_{16} \times H$	24	0.41241371	4.95**	0.0001
$a_w \times L_{16} \times H$	71	0.30941912	3.72**	0.0001

Nota: GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio; **significativo $P \leq 0.001$. Los datos de fase de latencia fueron transformados a coseno para el análisis

El antagonista L₁₆ producido en CEM a altas a_w (0.995 y 0.982) es capaz de reducir la velocidad de crecimiento de *Aspergillus* Sección *Flavi*, en general, este efecto fue mayor cuando el soluto utilizado para la manipulación fisiológica del aislado fue glicerol. A las a_w más bajas (0.955 y 0.937) la disminución de la velocidad de crecimiento fue observada cuando el agente de biocontrol fue modificado a altas actividades de agua. La cepa fúngica H_{T9} fue la más sensible a la presencia del antagonista. Cuando el aislado L₁₆ fue producido en CEM modificado con glicerol a la a_w 0.982 se observó que su efectividad de biocontrol fue muy prometedora en la mayoría de las interacciones analizadas (Tablas 2, 3, 4, 5).

Tabla 2: Producción de AFB₁ por *Aspergillus* Sección *Flavi*, en AHM a diferentes condiciones de actividad acuosa y 25°C.

Medio crecimiento aw/soluto	Reducción de la velocidad de crecimiento (%)			
	H _{T9}	H _{T104}	H _{D106}	H _{I105}
0.999/s/sto	100	100	0.5	30
0.995/ Glicerol	60	18	41	24
0.982/ Glicerol	54	24	50	35
0.955/ Glicerol	72	22	46	21
0.937/ Glicerol	59	20	39	19
0.995/ CIna	62	43	56	41
0.982/ CIna	29	0	14	23
0.955/ CIna	51	2	17	22

El aislado L₁₆ modificado en a_w 0.937/ CIna no fue considerado para esta experiencia por presentar poco crecimiento en estas condiciones.

Tabla 3: Reducción de la velocidad de crecimiento (%) de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* por el aislado L₁₆ sin manipular (a_w 0.999/s/sto) y manipulado fisiológicamente (a_w 0.995, 0.982, 0.955, 0.937) por el agregado de glicerol o CIna, en cultivos apareados crecidos sobre agar harina de maíz modificado con glicerol a la a_w 0.982.

Medio crecimiento aw/soluto	Reducción de la velocidad de crecimiento (%)			
	H _{T9}	H _{T104}	H _{D106}	H _{I105}
0.999/s/sto	100	73	68	0.7
0.995/ Glicerol	87	68	44	55
0.982/ Glicerol	86	100	14	100
0.955/ Glicerol	74	49	80	69
0.937/ Glicerol	20	37	14	70
0.995/ CIna	0	24	53	39
0.982/ CIna	9	16	71	0
0.955/ CIna	0	17	8	10

El aislado L₁₆ modificado en a_w 0.937/ CIna no fue considerado para esta experiencia por presentar poco crecimiento en estas condiciones.

Tabla 4: Reducción de la velocidad de crecimiento (%) de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* por el aislado L₁₆ sin manipular (a_w 0.999/s/sto) y manipulado fisiológicamente (a_w 0.995, 0.982, 0.955, 0.937) por el agregado de glicerol o CINA, en cultivos apareados crecidos sobre agar harina de maíz modificado con glicerol a la a_w 0.995.

Reducción de la velocidad de crecimiento (%)				
Medio crecimiento a_w /soluto	H _{T9}	H _{T104}	H _{D106}	H _{I105}
0.999/s/sto	100	2	0	53
0.995/ Glicerol	100	0	0	38
0.982/ Glicerol	100	6	0	48
0.955/ Glicerol	100	0	0	41
0.937/ Glicerol	100	0	0	0
0.995/ CINA	100	0	28	8
0.982/ CINA	100	0	0	0
0.955/ CINA	100	0	0	0

El aislado L₁₆ modificado en a_w 0.937/ CINA no fue considerado para esta experiencia por presentar poco crecimiento en estas condiciones.

Tabla 5 Reducción de la velocidad de crecimiento (%) de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* por el aislado L₁₆ sin manipular (a_w 0.999/s/sto) y manipulado fisiológicamente (a_w 0.995, 0.982, 0.955, 0.937) por el agregado de glicerol o CINA, en cultivos apareados crecidos sobre agar harina de maíz modificado con glicerol a la a_w 0.937.

Reducción de la velocidad de crecimiento (%)				
Medio crecimiento a_w /soluto	H _{T9}	H _{T104}	H _{D106}	H _{I105}
0.999/s/sto	100	0	100	0
0.995/ Glicerol	100	20	2	18
0.982/ Glicerol	100	27	79	67
0.955/ Glicerol	100	24	0	0
0.937/ Glicerol	100	2	0	0
0.995/ CINA	100	52	100	28
0.982/ CINA	100	0	0	0
0.955/ CINA	100	0	0	0

El aislado L₁₆ modificado en a_w 0.937/ CINA no fue considerado para esta experiencia por presentar poco crecimiento en estas condiciones.

Tabla 6: Producción de AFB₁ por *Aspergillus* Sección *Flavi*, en AHM a diferentes condiciones de actividad acuosa y a 25°C.

A_w medio cultivo (AHM)	Cepa fúngica	AFB ₁ (ng/g)
0.995	H _{T9}	2524.86
	H _{T104}	12.58
	H _{D106}	37.69
	H _{I105}	80.27
0.982	H _{T9}	305.14
	H _{T104}	8.37
	H _{D106}	120.52
	H _{I105}	36.68
0.955	H _{T9}	ND
	H _{T104}	ND
	H _{D106}	ND
	H _{I105}	ND
0.937	H _{T9}	ND
	H _{T104}	ND
	H _{D106}	ND
	H _{I105}	ND

ND: no detectado

La Tabla 6 muestra la acumulación de AFB₁ en diferentes condiciones de a_w, solamente se determinó síntesis de AFB₁ en los cultivos controles a las a_w más altas, 0.995 y 0.982, debido a que a las actividades acuosas 0.955 y 0.937, no se detectó producción de AFB₁ por ninguna de las cepas fúngicas en estudio. La tabla no considera las interacciones de las cepas fúngicas con el aislado L₁₆ ya que en ninguna de ellas se observó acumulación de AFB₁, independientemente del proceso empleado para lograr la manipulación fisiológica del agente de control biológico y de la a_w del medio AHM. La interacción del antagonista manipulado y sin manipular con las cepas de *Aspergillus* Sección *Flavi* redujeron totalmente la producción de AFB₁ en todas las condiciones de a_w ensayadas.

CONCLUSIONES

El desarrollo del aislado L₁₆ en CEM modificado con glicerol a la a_w 0.982 demostró una gran potencialidad de biocontrol en la mayoría de las interacciones analizadas, incrementando la fase de latencia y reduciendo la velocidad de crecimiento

-La acumulación de AFB₁ en todas las condiciones de a_w ensayadas fue inhibida por el aislado de *Kluyveromyces* independientemente de su condición de mejoramiento fisiológico.

BIBLIOGRAFÍA

-Geisen, R. (1996). *Applied Microbiology* 19: 388-392.

-González, H. H. L., Resnik, S. L., Vaamonde, G., 1987. *Int. J. Food Microbiol.* 4: 111-117.

-La Penna, M., Nesci, A. and Etcheverry, M. (2004) *Letters in Applied Microbiology.* 38,257-264

-Marín, S.; Sanchis, V.; Magan, N. (1995). *Canadian Journal of Microbiology* 41:1063-1070.

-Trucksess, M.W.; Stack, M.E., Neshirim, S.; Albert, R.H., Romer, T.R. (1994). *Journal of AOAC International* 6: 1512-1521.

AGRADECIMIENTOS.

La presente investigación recibió aporte financiero de la Universidad Nacional de Río Cuarto (SECYT-UNRC) y la ANPCyT PICT/03 -14551

USO POTENCIAL DE ANTIOXIDANTES PARA EL CONTROL DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINA B₁ POR *Aspergillus* sección *Flavi* EN GRANOS DE MANÍ

PASSONE, María A.¹; FUNES, Gustavo J.²; SOMOZA, Carlos F.²; RESNIK, Silvia² y ETCHEVERRY, Miriam G.¹

¹Orientación Ecología Microbiana. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. Ruta 36 km 601. C.P. 5800. FAX: 0358-4676231. metcheverry@exa.unrc.edu.ar

²Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires.

RESUMEN

Los propósitos del presente trabajo fueron: a) Determinar el efecto de tres antioxidantes de calidad alimentaria; butilhidroxianisol (BHA), parabeno de propilo (PP) y butilhidroxitolueno (BHT) (10, 20 mmol g⁻¹) y sus mezclas sobre el crecimiento (UFCs g⁻¹) y la producción de aflatoxina B₁ por *A. parasiticus* CHG24 y *A. flavus* CHG46 sobre granos de maní irradiados b) Evaluar la influencia de estos antioxidantes a las actividades de agua (a_w) (0.982, 0.955, 0.937) durante 11 y 35 días de incubación a 28°C. La a_w afectó el desarrollo fúngico, no obteniéndose recuento a la a_w 0.937. El BHA a la dosis de 10 mmol g⁻¹ y todas las mezclas con PP y/o BHT redujeron significativamente (p<0.05) las UFCs g⁻¹ y la acumulación de AFB₁ por ambas cepas de *Aspergillus* analizadas, en tanto que la aplicación de BHA a la dosis de 20 mmol g⁻¹ sólo o en combinación con PP y/o BHT inhibió totalmente el desarrollo fúngico en ambos períodos de incubación. Las mezclas de BHA-PP-BHT durante el almacenamiento del maní posee gran potencialidad para impactar sinérgicamente en el control de *Aspergillus* sección *Flavi* en maní.

Palabras claves: *Aspergillus* sección *Flavi*, control químico, antioxidantes, maní

ABSTRACT

The aims of the present work were: a) To determine the effect of three food grade antioxidants: butylated hydroxianisole (BHA); propyl paraben (PP) and butylated hydroxitoluene (BHT) (10, 20 mmol g⁻¹) and the effect of these mixture of antioxidants on the colony forming units per peanut gram (CFUs g⁻¹) and the aflatoxin B₁ accumulation by *A. parasiticus* CHG24 and *A. flavus* CHG46 grown on irradiated peanut grains. b) To

evaluate the influence of these antioxidants at three water activities (a_w) (0.982, 0.955, 0.937) at 11 and 35 days of incubation at 28°C. Water activity affected the fungal growth, not recount was obtained at 0.937 a_w . Butylated hidroxianisole at 10 mmol g⁻¹ and all the combinations with PP and/or BHT were significantly effective ($p < 0.05$) in reducing *Aspergillus* section *Flavi* populations development and the AFB₁ accumulation. The application of BHA at 20 mmol g⁻¹ alone or in combination with PP and/or BHT totally inhibited fungal growth at 11 and 35 days of incubation. The application of the different mixture of antioxidants during the storage of peanut has potentiality to impact synergically on the control of *Aspergillus* section *Flavi*.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*, chemical control, antioxidants, peanut

INTRODUCCIÓN

La provincia de Córdoba se caracteriza porque gran parte de su actividad comercial está vinculada a la producción agropecuaria. Un cultivo de gran importancia en la región centro-sur de dicha provincia es el maní (*Arachis hypogaea* L.), ya que proporciona materia prima para las agroindustrias y para la exportación de productos primarios y elaborados. El 98% de la producción argentina de maní, su acopio y comercialización, se concentra en la región semiárida central de la provincia de Córdoba. La Argentina se ubica en tercer lugar a nivel de países exportadores después de China y Estados Unidos. Debido a esto, la industria manisera nacional aporta aproximadamente un ingreso anual de divisas de 200 millones de dólares. La mayor parte de la producción nacional de aceite se destina a la exportación, siendo el destino más importante la Unión Europea, situación que se repite en la producción de pellets de maní (www.secyt.gov.ar).

Los frutos de maní, son susceptibles a la contaminación fúngica con especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi*. Dicha contaminación no sólo causa pérdidas de materia seca, disminución de la calidad y del poder germinativo, sino que además acumulan aflatoxinas, responsables del rechazo del grano en la etapa de exportación. En Argentina, en las tres regiones maniseras evaluadas por Barros y col. (2003), *A. flavus* fue la especie dominante de la sección *Flavi* aislada de suelo de maní en la etapa de crecimiento y en la etapa de cosecha del cultivo, con un porcentaje de aislamiento de 70 a 90%. La AFB₁ es el carcinógeno más potente conocido, clasificado como carcinógeno de grado 1 (IARC, 1993).

El uso de agentes conservadores para controlar la proliferación de estas especies potencialmente aflatoxicogénicas y evitar la producción de micotoxinas es una alternativa

para los productos almacenados. El butilhidroxianisol y el parabeno de propilo demostraron ser los antioxidantes más efectivos capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* toxicogénicas, tanto en medios agarizados como líquidos (Etcheverry y col., 2001; Nesci y col., 2003; Thompson, 1991, 1992; Thompson y col., 1993). Por lo tanto, el uso de agentes químicos antioxidantes podría ser una posible estrategia para el control de hongos aflatoxicogénicos en maní. Los objetivos del presente estudio fueron: a) Determinar la eficacia de los antioxidantes BHA, BHT y PP y sus mezclas a distintas dosis sobre el crecimiento y producción de aflatoxina B₁ por 2 cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en granos de maní irradiados, a las actividades acuosas de 0.982, 0.955 y 0.937 durante 11 y 35 días de incubación. b) Determinar el nivel de residuos de los antioxidantes en los granos de maní luego de los períodos de incubación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

A. parasiticus CHG24, *A. flavus* CHG46 aisladas de granos de maní (Barros y col., 2003). Las cepas fueron mantenidas en 15% de glicerol a -80°C.

Preparación de los antioxidantes

Se utilizaron los antioxidantes: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) y parabeno de propilo (PP). Se prepararon soluciones stock (10 mg ml⁻¹) en etanol 95°. Los granos se trataron con el antioxidante a las concentraciones: 10 mmol g⁻¹ y 20 mmol g⁻¹.

Los tratamientos utilizados en este ensayo fueron: BHT (10); BHT (20); PP (10); PP (20); BHA (10); BHA (20); BHT-PP (10:10); BHT-PP (10:20); BHT-PP (20:10); BHT-PP (20:20); BHT-BHA (10:10); BHT-BHA (10:20); BHT-BHA (20:10); BHT-BHA (20:20); BHA-PP (10:10); BHA-PP (10:20); BHA-PP (20:10); BHA-PP (20:20); BHT-PP-BHA (10:10:10); BHT-PP-BHA (10:10:20); BHT-PP-BHA (10:20:10); BHT-PP-BHA (10:20:20); BHT-PP-BHA (20:10:10); BHT-PP-BHA (20:10:20); BHT-PP-BHA (20:20:10); BHT-PP-BHA (20:20:20).

Preparación del sustrato

70 g de maní irradiados (7 KGy) se colocaron formando una monocapa en placas de Petri estériles y se acondicionaron a las actividades acuosas 0.982, 0.955 y 0.937. El control de la a_w de los granos se realizó utilizando un equipo de medición de la misma (Thermoconstanter Novasina TH 200, Zurich, Switzerland). Las muestras hidratadas se estacionaron una semana en cámara fría a 4° C para permitir el equilibrio de las mismas.

Determinación de la poblaciones de *Aspergillus* sección *Flavi*

A los 11 y 35 días de incubación, se tomaron 10 gramos de maní correspondientes a cada tratamiento y se agitaron por 5 minutos en un erlenmeyer que contenía 90 ml de agua peptonada. Las tres últimas diluciones seriadas de cada tratamiento se sembraron en el medio agarizado *Aspergillus flavus* y *parasiticus* (AFPA) (Pitt and Hocking, 1997). Las placas se incubaron a 28°C y se analizaron después de 48-72 h. Cada tratamiento se sembró por triplicado. La colonización de los granos de maní se expresó como unidades formadoras de colonias (UFCs) g⁻¹ de maní.

Análisis de aflatoxina B₁

La detección y cuantificación de aflatoxina B₁ se realizó siguiendo la metodología propuesta por Trucksess y col (1994). Después de 11 y 35 días de incubación, se obtuvieron triplicados de 50 g de muestra correspondiente a cada tratamiento y se realizó la extracción de las toxinas con una mezcla de acetonitrilo:agua (90:10) en agitación durante 1 hora. La muestra se filtró y 3 ml del filtrado se limpiaron por pasaje a través de una columna de limpieza. Una porción del filtrado (0.5 ml) fue almacenada a 4°C hasta el momento del análisis. Para la detección y cuantificación de las toxinas se tomaron 200 µl del filtrado, derivatizando las mismas con 700 µl de derivatizante. Las toxinas derivatizadas (100 µl de la solución), se analizaron usando un sistema de detección con fluorescencia por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C18 (150x4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelcosil LC-ABZ, Supelco) conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20x4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). El flujo de la fase móvil fue de 1 ml min⁻¹. La longitud de onda de excitación y emisión usada fue de 360 y 440 nm, respectivamente. La cuantificación de AFB₁ se basó en las medidas de los picos comparados con las soluciones testigos de referencia.

Determinación de residuos de antioxidantes

Después de 11 y 35 días de incubación, se obtuvieron 5 g de muestra correspondiente a cada tratamiento y se realizó la extracción de los antioxidantes con 10 ml de acetonitrilo en agitación magnética (Precytec Modelo A E 28) con buzo sumergido en la muestra durante 10 minutos. Dicho procedimiento se repitió tres veces. Luego de la última agitación la muestra se sonicó durante 15 minutos. De cada una de las extracciones se tomó una alícuota de 1 ml para obtener un volumen final de 3 ml por muestra. Para la detección y cuantificación de los antioxidantes 10 µl del filtrado se inyectaron usando un sistema de detección luz UV (λ 280 nm) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC),

Agilent Technologies serie 1100 con bomba cuaternaria, inyector automático y termostizador de columna seteado a una temperatura de 35°C. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C18 (250x4.6 mm x 1/4" Valco Microsorb-MV 100-5, Varian). El gradiente de solventes utilizados fue: 0 min metanol: ácido acético (solución acuosa 2%) (30:70); 6 min metanol :acetonitrilo ácido acético (solución acuosa 2%) (65:20:15); 15 min metanol 100%. Se determinó la concentración de antioxidantes presentes en la muestra utilizando un estándar externo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de antioxidantes sobre las poblaciones de *Aspergillus* sección *Flavi* y la producción de aflatoxina B₁ en granos de maní irradiados.

El impacto de los antioxidantes sintéticos sobre el crecimiento (UFC g⁻¹ de maní) de dos especies de *Aspergillus* sección *Flavi* a las a_w 0.982 y 0.955 y a los 11 y 35 días de incubación se observa en la Figura 1 (a y b) y Figura 2 (a y b). En la experiencia control se observó que la a_w del medio afectó el fúngico, disminuyendo una unidad logarítmica (10¹⁰ y 10⁹) UFC g⁻¹ cuando disminuyó la a_w a 0.955, en tanto que la a_w 0.937 fue limitante, no se observó desarrollo fúngico.

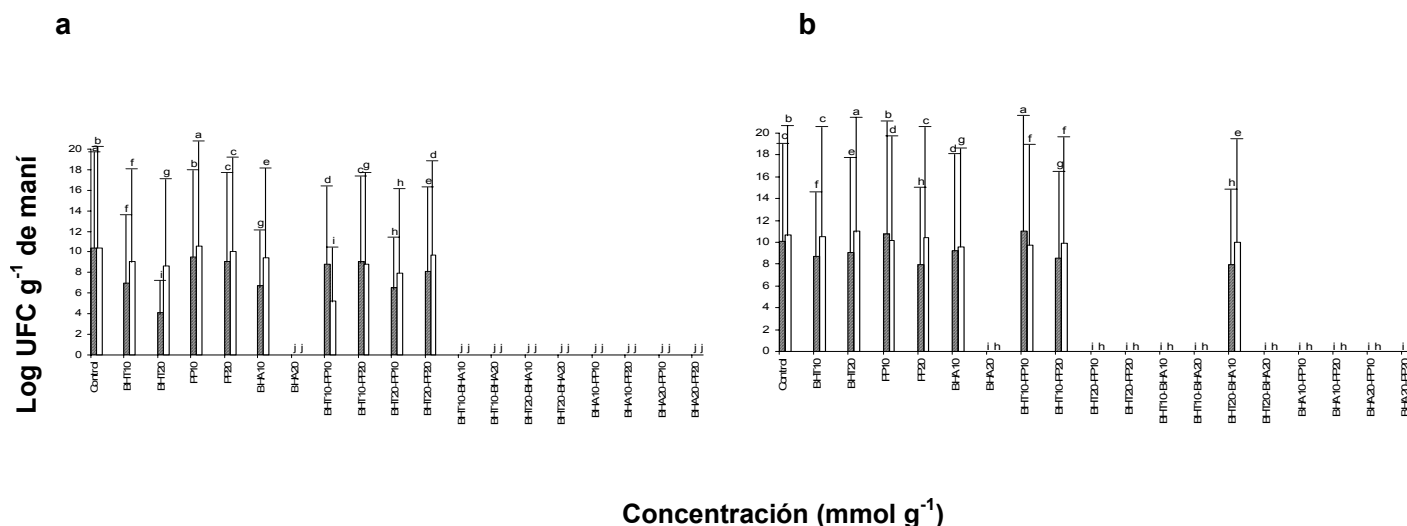


Figura 1: Efecto de antioxidantes sobre el crecimiento (UFC g⁻¹ de maní) de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* a 0.982 a_w (a) *A. parasiticus* CHG24 (b) *A. flavus* CHG46. ■ Recuento a los 11 días. □ Recuento a los 35 días. Los datos con la misma letra para cada tratamiento no son significativamente diferentes (Test de rangos múltiples de Duncan p < 0.05).

En los tratamientos a la a_w 0.982 (Figura 1 (a y b)) se observó una reducción significativa de las UFC g^{-1} de *A. parasiticus* CHG24 a los 11 días de incubación, con porcentajes de reducción entre el 8-100%. Sin embargo, la aplicación de 10 y 20 $mmol g^{-1}$ de BHT y PP a los 35 días de incubación no demostró su eficacia, observándose en algunos tratamientos un efecto estimulante. Cuando se aplicaron todas las mezclas de BHT-PP se observó una reducción en el recuento de las cepas de *Aspergillus* en ambos períodos de incubación con porcentajes entre 12.9-36.9% (11 días) y entre 6.5-49.7% (35 días) para *A. parasiticus* CHG24 y entre 15.6-100% (11 días) y entre 8.7-100% (35 días) para *A. flavus* CHG46. Mientras que todas las combinaciones de BHA-PP y BHT-PP-BHA inhibieron totalmente el desarrollo fúngico.

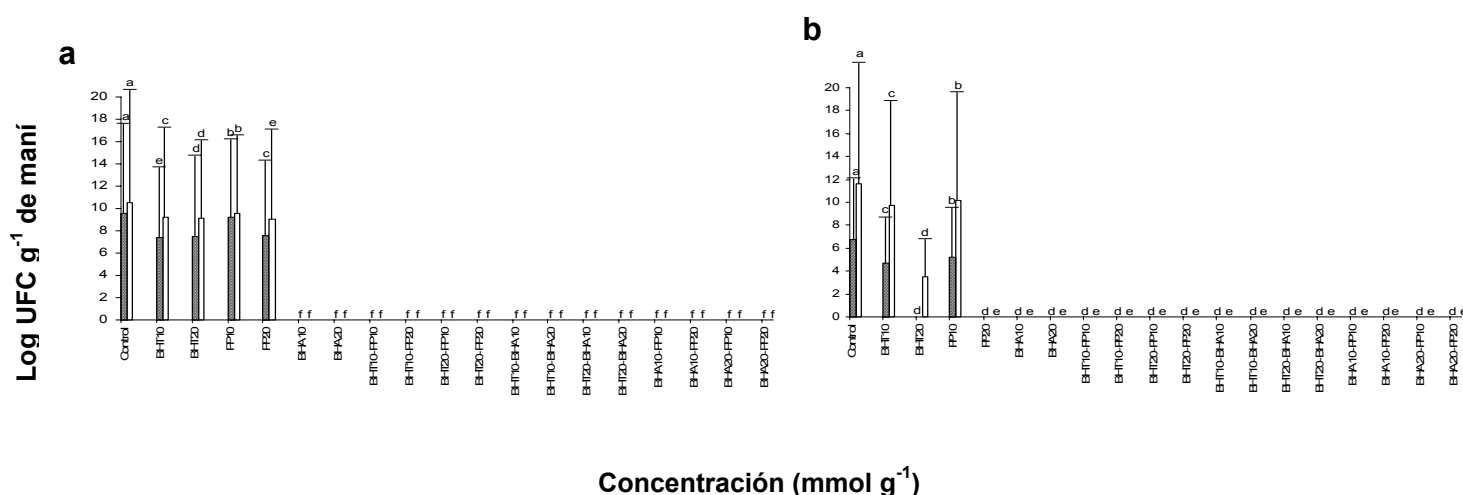


Figura 2: Efecto de antioxidantes sobre el crecimiento (UFC g^{-1} de maní) de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* a 0.982 a_w (a) *A. parasiticus* CHG24 (b) *A. flavus* CHG46. Recuento a los 11 días. Recuento a los 35 días. Los datos con la misma letra para cada tratamiento no son significativamente diferentes (Test de rangos múltiples de Duncan $p < 0.05$).

La aplicación de los distintos antioxidantes fue más efectiva sobre el crecimiento fúngico a la a_w de 0.955 (Figura 2 (a y b)) ya que todos los tratamientos disminuyeron significativamente las UFCs g^{-1} de ambas cepas a los 11 y 35 días de incubación. Para *A. parasiticus* CHG24 los porcentajes de reducción en el recuento fúngico agregando BHT y PP a las dosis de 10 y 20 $mmol g^{-1}$ oscilaron entre 3 y 23%, en tanto que para *A. flavus* CHG46 las UFCs g^{-1} se redujeron entre 13 y 100%. La presencia de BHA, aplicado sólo o

mezclado con BHT y/o PP, independientemente de la concentración utilizada, inhibió totalmente el desarrollo micelial de ambas cepas.

La influencia del tratamiento con antioxidantes fenólicos sobre la acumulación de AFB₁ (ppm) por dos especies de *Aspergillus* sección *Flavi* a dos períodos de incubación (11, 35 días) y 0.982 a_w se observa en la Tabla 1.

La condición acuosa del medio y el tiempo de incubación influyeron sobre la producción de AFB₁, ya que no se detectaron concentraciones de este metabolito a la a_w 0.955 y los niveles de AFB₁ a los 35 días, para los hongos controles, fue 3.2 y 5.3 veces mayor para *A. parasiticus* CHG24 y *A. flavus* CHG46, respectivamente. Se observó que el efecto de los antioxidantes disminuyó a medida que aumentó el tiempo de incubación de las muestras. A los 11 días de incubación todos los tratamientos disminuyeron significativamente la acumulación de AFB₁ por *A. parasiticus* CHG24 con porcentajes de 52-100 %. Si bien el agregado de PP a 10 mmol g⁻¹ y BHA a 20 mmol g⁻¹ estimularon la acumulación de este metabolito por *A. flavus* CHG46, el efecto de los tratamientos restantes fue positivo, disminuyendo significativamente la acumulación de aflatoxinas.

En el período de incubación de 35 días se observó un efecto estimulante sobre la concentración de AFB₁ por *A. parasiticus* CHG24 cuando se agregó al medio 20 mmol g⁻¹ de BHT y 10 mmol g⁻¹ de BHA, del mismo modo la aplicación de 10 y 20 mmol g⁻¹ de BHT, 10 y 20 mmol g⁻¹ de PP y 10 mmol g⁻¹ de BHA incrementaron la síntesis de AFB₁ por *A. flavus* CHG46.

De manera similar, Nesci y col. (2003) mostraron que los antioxidantes PP y BHA a la dosis de 1 mmol l⁻¹ inhibieron el crecimiento y la síntesis de AFB₁ por especies de *Aspergillus* sección *Flavi* en agar harina de maíz y que concentraciones de 10 y 20 mmol l⁻¹ de THB a 0.937 a_w estimularon la concentración de este metabolito. La estimulación en la síntesis de aflatoxinas podría explicarse por el estrés ocasionado por la acción del inhibidor en dosis subletales (Yousef y Marth, 1981; Marshall y Bullerman, 1986).

Determinación de residuos de antioxidantes

Los resultados obtenidos en el análisis de residuos de antioxidantes (datos no mostrados), mostraron que a medida que disminuyó la a_w del medio, aumentó la concentración de estos químicos. Este resultado es de esperar dado que el desarrollo fúngico estuvo profundamente influenciado por la a_w del medio, no observándose crecimiento a 0.937 a_w.

Al analizar la influencia de los períodos de incubación sobre la concentración de antioxidantes a 0.982 a_w, se observó que, la concentración de estos químicos disminuyó a

medida que transcurrió el tiempo de incubación (35 días). El nivel de residuos fue cuantitativamente menor cuando se analizaron los tratamientos (BHA-BHT (10:10; 10:20; 20:10; 20:20) y BHA-PP (10:10; 10:20; 20:10; 20:20)) que disminuyeron significativamente el crecimiento y la producción de AFB₁ por ambas cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*. En tanto que en aquellos tratamientos en los cuales no se observó desarrollo fúngico (BHA-PP-BHT), tampoco se detectaron residuos cuando se evaluaron los antioxidantes BHA y PP, y la concentración de residuos de BHT disminuyó considerablemente.

Tabla 1: Efecto de los antioxidantes BHT, PP y BHA a 10 y 20 mmol g⁻¹ sobre la producción de aflatoxina B₁ (ppm) por los aislados *A. parasiticus* CHG24 y *A. flavus* CHG46 sobre granos de maní irradiados a los 11 y 35 días y a 0.982 a_w.

Aflatoxina B ₁ (ppm)	<i>Aspergillus parasiticus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	CHG24		CHG46	
	Control/Tratamientos	11 días	35 días	11 días
Control	2.7 a	8.6 c	1.5 c	7.9 c
BHT10	0.8 c	7.7 d	1.9 c	11.9 a
BHT20	0.4 d	9.1 b	1.9 c	8.7 b
PP10	n.d. e	2.1 f	7.9 a	8.2 bc
PP20	n.d. e	n.d. g	1.7 c	8.3 bc
BHA10	0.7 c	9.4 a	3.9 b	11.9 a
BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT10-PP10	n.d. e	0.4 f	1.3 c	2.7 f
BHT10-PP20	0.7 c	7.7 d	1.8 c	6.7 d
BHT20-PP10	1.3 b	2.5 e	n.d. d	4.4 e
BHT20-PP20	n.d. e	0.3 f	n.d. d	1.9 g
BHT10-BHA10	n.d. e	n.d. g	n.d. d	0.8 h
BHT10-BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT20-BHA10	n.d. e	n.d. g	1.8 c	3.1 f
BHT20-BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHA10-PP10	n.d. e	n.d. g	3.7 b	3.8 e
BHA10-PP20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	0.4 hi
BHA20-PP10	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHA20-PP20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT10-PP10-BHA10	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT10-PP10-BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT10-PP20-BHA10	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT10-PP20-BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT20-PP10-BHA10	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT20-PP10-BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT20-PP20-BHA10	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i
BHT20-PP20-BHA20	n.d. e	n.d. g	n.d. d	n.d. i

Los datos con la misma letra para cada tratamiento no son diferentes significativamente de acuerdo al test de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher (P < 0.001).

n.d. no detectado

BHT, butil hidroxitolueno.

PP, parabeno de propilo.

BHA, butil hidroxianisol.

Cuando se analizaron los residuos de antioxidantes a 0.955 a_w , se obtuvieron menores concentraciones de los mismos en la segunda etapa de muestreo (35 días), con porcentajes de reducción de 6-100%. El antioxidante BHT fue el que dejó mayores niveles de residuos, n.d.-1182 ppm, siendo el menos efectivo sobre el control del crecimiento y acumulación de AFB₁ por ambas cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* ensayadas. Cuando se analizaron los tratamientos que resultaron mas efectivos en el ensayo de crecimiento y acumulación de AFB₁ (BHA-PP), no se obtuvieron niveles de antioxidantes detectables, los valores oscilaron entre 14 y n.d. ppm y 57 y n.d. ppm para las muestras contaminadas con *A. parasiticus* CHG24 y *A. flavus* CHG46, respectivamente. En tanto que para las muestras a las que se les agregaron mezclas de los tres antioxidantes (BHA-PP-BHT) los valores para PP y BHA variaron entre 2.7-n.d. ppm y 1.3-n.d. ppm para los granos inoculados con *A. parasiticus* CHG24, y entre 14.1-n.d. ppm y 4.2-n.d. ppm para las muestras contaminadas con *A. flavus* CHG46. En el análisis de residuos a 0.937 a_w se obtuvieron las mayores cuantificaciones de antioxidantes, este hecho puede explicarse por la inhibición total del crecimiento fúngico causado por la baja disponibilidad acuosa del medio. Si se comparan ahora los resultados obtenidos teniendo en cuenta los tiempos de incubación (11, 35 días) los resultados, en general, fueron muy variables, no existiendo reducción en la concentración de residuos a los 35 días de incubación, lo que es de esperar debido a que bajo esta condición acuosa (0.937 a_w) el crecimiento de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* fue totalmente inhibido. Si bien hasta el momento no existe ninguna reglamentación vigente en cuanto al nivel de residuos de estos químicos (BHA, PP, BHT) en granos, el artículo 523bis del Código Alimentario Argentino (CAA) establece normas para el nivel de los mismos en aceites y grasas vegetales comestibles. En el presente estudio incorporamos a los granos 2204 y 4408 ppm de BHT y 1802 y 3604 de BHA y PP y la concentración de residuos de los antioxidantes BHA y PP a los 35 días de incubación variaron entre 79-n.d. ppm; 86-n.d. ppm y 174-n.d. a 0.982, 0.955 y 0.937 a_w , respectivamente, siendo éstos niveles aceptables por el CAA. Por otro lado sí se cuantificaron valores superiores a los admitidos por el CAA (200 ppm) cuando se evaluaron los residuos de BHT en granos de maní que se habían tratado con 20 mmol g⁻¹ de este químico.

CONCLUSIONES

Todas las mezclas de 10 mmol g⁻¹ de BHA con BHT y BHA con PP disminuyeron significativamente las UFCs g⁻¹ de maní y la producción de AFB₁ por las especies de *Aspergillus* sección *Flavi*.

La aplicación de 20 mmol g⁻¹ de BHA sólo o en combinación con PP y/o BHT inhibió totalmente el desarrollo fúngico de las especies aflatoxicogénicas.

En general, no se detectaron residuos de BHA y PP, en tanto que los niveles cuantificados de BHT están dentro de los límites admitidos por el CAA.

BIBLIOGRAFÍA

Barros, G.; Torres, A.; Palacio, G. y Chulze, S. (2003) Journal of the Science of Food and Agriculture **83**: 1303-1307.

Código Alimentario Argentino (CAA) Alimentos grasos aceites alimenticios, Capítulo VII. Artículo 523bis-(Res 2012, 19.10.84)

Etcheverry, M., Torres, A., Ramírez, M., Chulze, S., Magan, N. (2002) Journal of Applied Microbiology **91**: 1-9.

International Agency for Research on Cancer (1993) IARC. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human. pp. 257-253.

Lacey, J. y Magan, N. (1991) Cereal grains micotoxins, fungi and quality in drying and storage. pp. 77-118.

Marshall, D.L. y Bullerman, L.B. (1986) Journal of Food Protection **49**: 378-382.

Nesci, A., Rodriguez, M., Etcheverry, M. (2003) Journal of Applied Microbiology, **95**: 279-287.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997) *Aspergillus* and Related Teleomorphs. pp. 339-417.

Thompson, D.P. (1991) Journal of Food Protection **54 (5)**: 375-377.

Thompson, D.P. (1992) Mycología **84**:791-793.

Thompson, D. P.; Metevia, L. and Vessel T. (1993) Journal of Food Protection **56 (2)**: 134-138.

Trucksess, M.W.; Stack, M.E. y Nesheim, S. (1994) Journal of AOAC International **77 (6)**: 1512-1520.

Yousef, A.E. y Marth, E.H. (1981) Journal of Food Protection **44**: 741-745.

www.secyt.gov.ar/publica_planplur/regional_1_p2.htm - 50k -

PERTURBACION DE LAS CARACTERISTICAS TOXICOGENICAS DE *Aspergillus* Sección *Flavi* POR LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE ANTIOXIDANTES EN MAÍZ ALMACENADO

FERRARI, Luciana; NESCI, Andrea y ETCHEVERRY, Miriam

Orientación Ecología Microbiana. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. Ruta 36 km 601. C.P. 5800. FAX: 0358-4676231. metcheverry@exa.unrc.edu.ar

RESUMEN

Se evaluó la influencia de una mezcla de antioxidantes sintéticos (BHA y PP) sobre las características toxicogénicas de *Aspergillus* Sección *Flavi* en maíz almacenado durante seis meses. Las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi* estuvieron presentes en los seis períodos de muestreo del silo control. Después del tratamiento y a partir del segundo período de muestreo se observó una supresión total de las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las cepas de *A. flavus* con mayor capacidad de producir altos niveles de aflatoxinas se encontraron en el cuarto período de muestreo del silo control. El tratamiento con antioxidantes afectó negativamente las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi* y la capacidad de producción de aflatoxinas entre el segundo y el sexto períodos de almacenamiento. Sólo se aisló un 13% de cepas con capacidad de producir aflatoxinas durante el primer muestreo (momento de la aplicación de la mezcla de antioxidantes). Este ensayo *in situ* muestra la potencialidad de la mezcla de BHA y PP, como fungitóxicos para hongos aflatoxicogénicos en condiciones de almacenamiento.

Palabras claves: *Aspergillus* Sección *Flavi*, aflatoxinas, antioxidantes, maíz almacenado

ABSTRACT

The influence of a mixture of synthetic antioxidants (BHA and PP) on sclerotial and toxigenic characteristics of *Aspergillus* section *Flavi* in stored maize during six months was evaluated. *Aspergillus* section *Flavi* populations were present at six sampling periods from stored maize without antioxidants (control). Conversely, their strains were present only during the first period in treated maize. Afterwards a total suppression of *A. flavus* and *A. parasiticus* populations were observed. The *A. flavus* strains with great ability to produce highest aflatoxin levels were found in the fourth sampling period of the control silo. The toxigenic ability of isolate strains in the first sampling period of treated maize was 13%.

Antioxidant treatment negatively affect the *Aspergillus* section *Flavi* populations and aflatoxin production between the second and sixth months of storage. This *in situ* assay raises showed the potentiality of BHA-PP mixture as fungitoxicants for aflatoxigenic fungi of maize in storage conditions.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*, aflatoxin, antioxidants, stored maize

INTRODUCCION

Un tratamiento pos-cosecha efectivo podría asegurar la inhibición de la producción de aflatoxinas. Estudios sobre la actividad fungicida y fungistática de diferentes antioxidantes, como el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), se han focalizado en el control del crecimiento y la síntesis de aflatoxinas por *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare (Chang and Branen 1975; Fung *et al.* 1977; Beuchat and Jones 1978; Ahmand 1979; Lin and Fung 1983). Antixodiantes fenólicos han mostrado controlar la germinación conidial, el crecimiento y la producción de aflatoxina por *A. flavus* y *A. parasiticus* (Thompson 1991, 1992). Estudios previos han mostrado que el butilhidroxianisol (BHA) y el n-propil p-hidroxibenzoato (PP) pueden considerarse efectivos fungitóxicos por controlar la germinación conidial, el crecimiento y la producción de aflatoxina B₁ por *A. flavus* y *A. parasiticus* en agar extracto de maíz (Nesci *et al.* 2003). Sin embargo, no se conoce el impacto ecológico que tales antioxidantes podrían tener sobre las características toxicogénicas de aislados de *Aspergillus* Sección *Flavi* en maíz almacenado. La introducción de diferentes antioxidantes sintéticos en el sistema de almacenamiento puede afectar las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi*, ocasionando alteraciones eventuales y permanentes en la composición de estas poblaciones fúngicas (Nesci 2005).

Las aflatoxinas son compuestos tóxicos, carcinogénicos producidos por varios miembros de *Aspergillus* Sección *Flavi* (IARC 1993). La contaminación por aflatoxinas ocurre durante el desarrollo del maíz y después de la cosecha. En los períodos de pos-cosecha, la temperatura, humedad y otros factores juegan un rol importante en el crecimiento de los hongos.

Se han aislado *Aspergillus* Sección *Flavi* en suelo, desechos e insectos (Lussenhop and Wicklow 1990; Wicklow 1991; Horn *et al.* 1995; Olanya *et al.* 1997). Estudios previos han mostrado que cepas toxicogénicas de *Aspergillus* Sección *Flavi* están extensivamente distribuídas en suelo, desechos e insectos de un campo de maíz en Río Cuarto, Córdoba, Argentina (Nesci and Etcheverry 2002). Sin embargo, estos resultados indican que las

cepas con una alta probabilidad de ser transferidas al ecosistema de almacenamiento son cepas con baja capacidad toxicogénica.

La perturbación generada por la adición de agentes químicos podría producir un cambio en las características aflatoxicogénicas de las cepas. Por lo tanto, es importante elucidar la influencia de una mezcla de antioxidantes sintéticos (BHA y PP) sobre las características toxicogénicas de *Aspergillus* Sección *Flavi* en maíz almacenado.

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento de los granos

Granos de maíz de la cosecha 2001-2002, fueron tratados con un formulado de antioxidantes. Las proporciones de los mismos se colocaron en partes iguales. El producto fue aplicado con un equipo dosificador sobre los granos. Los granos tratados fueron almacenados en silos australianos, con una capacidad de 100 kg de granos en cada uno (un silo control y un silo tratado) y mantenidos dentro de un galpón en las mismas condiciones en las que se encontraban los silos del productor.

Toma de muestra

Se tomaron muestras al azar de granos al tiempo cero (en el momento de llenar los silos) y cada 30 días, durante un período de 6 meses. En cada muestreo se tomaron por cada silo 5 muestras de 2 kg c/u y a su vez cada una de las muestras se subdividió en dos submuestra

Determinación de la capacidad toxicogénica

Se utilizó la metodología propuesta por Horn y col. (1996). Para la producción de micotoxinas, los aislados de *A. flavus* crecieron en viales que contenían 1 mL del medio de cultivo correspondiente. Cada vial fue inoculado con una ansada de conidios de un cultivo con 10^5 ufc/ml e incubado en oscuridad por 7 días a 30°C. La experiencia fue realizada por duplicado.

La extracción de las toxinas se realizó adicionando 1 mL de cloroformo a cada uno de los viales, rompiendo el material fúngico con una espátula y agitando durante 1 min. Con este procedimiento de extracción, aproximadamente un 85% de aflatoxina B₁, fue recuperado del medio.

La mezcla fue agitada a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se extrajo el micelio y el extracto clorofórmico fue evaporado a sequedad con nitrógeno. El residuo fue redissuelto en 10 µL de cloroformo en el momento de su cuantificación por cromatografía en capa delgada (TLC) (Geisen, 1996).

El sistema de desarrollo utilizado fue cloroformo:acetona (9:1). La observación de las placas se hizo bajo luz UV a 360 nm y las concentraciones de AFB₁ y AFG₁ se determinaron por el método de la comparación visual. De esta manera se determinó la dilución necesaria para llevar a cabo una cuantificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Trucksess *et al.* (1994). El sistema HPLC consistió de una bomba HP 1100 pump (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) conectada a un detector de fluorescencia programable HP 1046A, y la cuantificación se realizó a través de una estación de trabajo Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se realizaron a través de una columna C₁₈ de fase reversa (150 mm x 4.6 mm di, 5 µm tamaño de partícula; Luna-Phenomenex, Torrance, CA, USA). El límite de detección de esta técnica es de 1 ng/g.

RESULTADOS

Las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi* estuvieron presentes en los seis períodos de muestreo del silo tratado sin la mezcla de antioxidantes (control). Por el contrario, estas cepas estuvieron presentes solo durante el primer período de muestreo en el silo tratado con la mezcla de antioxidantes. Posteriormente se observó una supresión total de las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus* (tabla 1).

Las cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* mostraron una capacidad variable para producir aflatoxinas. La contribución de estas cepas a la toxigenicidad del silo fue mayor en el tratamiento control en el cuarto y sexto períodos de muestreo (20%).

En las muestras controles el mayor porcentaje de cepas de *A. flavus* no toxicogénicas (66%) se obtuvo del quinto período de muestreo. Por otro lado, en las muestras del silo tratado el mayor porcentaje de cepas de *A. flavus* toxicogénicas (23%) ocurrió en varios períodos de muestreo. Las cepas de *A. flavus* con mayor capacidad para producir altos niveles de aflatoxinas se encontraron en el cuarto período de muestreo, con niveles entre 10.6 y 110.32 ng.ml⁻¹ de AFB₁. Mientras que se encontraron cepas de *A. parasiticus* en el cuarto y quinto períodos de muestreo con niveles de AFB₁ entre 2.8 y 54 ng.ml⁻¹ y niveles de AFG₁ entre 5.2 and 63.9 ng.ml⁻¹. En el primer período de muestreo del maíz tratado con antioxidantes se aisló un 13% de cepas con capacidad de producción de aflatoxinas. Las cepas de *A. flavus* produjeron niveles de AFB₁ entre 1.6 y 21.08 ng.ml⁻¹; mientras que las cepas de *A. parasiticus* produjeron niveles de AFB₁, AFB₂ y AFG₁ de 57.9, 1.8 and 1.2 ng.ml⁻¹ respectivamente. Esta cepa de *A. parasiticus* produjo el mayor nivel de aflatoxina B₁ encontrado en ambas unidades experimentales. La cepa de *A. flavus* más toxicogénica

fue aislada del cuarto período de muestreo, mientras que la cepa de *A. parasiticus* más toxicogénica fue aislada del quinto período de muestreo de maíz no tratado con la mezcla de antioxidantes.

Tabla 1. Producción de aflatoxina por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* durante 6 períodos de muestreo (Julio/Noviembre)

Períodos de muestreo	Nº de aislados	Toxigenicidad de las cepas (rango ng/ml medio)	Nº de cepas toxicogénicas	Contribución a la toxigenicidad del silo
S1c	20	<i>A. flavus</i> 19 cepas 1 cepa	ND 17.7 AFB ₁	1 T 5%
S1t	22	<i>A. flavus</i> 20 cepas	ND	2T 8%
	1	2 cepas <i>A. parasiticus</i> 1 cepa	1.6-21.08 AFB ₁ 57.9 AFB ₁ , 1.8 AFB ₂ , 1.2 AFG ₁	
S2c	12	<i>A. flavus</i> 11 cepas 1 cepa	ND 5.5 AFB ₁	1 T 8%
S3c	21	<i>A. flavus</i> 21 cepas	ND	- -
S4c	16	<i>A. flavus</i> 11 cepas 5 cepas	ND 10.6-110.32 AFB ₁	5 T 31%
	4	<i>A. parasiticus</i> 3 cepas 1 cepa	ND 2.8 AFB ₁ , 5.2 AFG ₁	
S5c	31	<i>A. flavus</i> 23 cepas 8 cepas	ND 2.3-50 AFB ₁	8 T 26%
	4	<i>A. parasiticus</i> 3 cepas 1 cepa	ND 54 AFB ₁ , 18.6 AFB ₂ , 63.9 AFG ₁	
S6c	15	<i>A. flavus</i> 12 cepas 3 cepas	ND 3.2-52.6 AFB ₁	3 T 20%

S1c, S1t, S2c, S3c, S4c, S5c, S6c

S: período de muestreo, c: control, t: tratamiento

ND: ninguna detectada

NT: no toxicogénica

T: toxicogénica

Si comparamos la capacidad de producción de aflatoxinas de ambas especies, podemos observar que sólo el 10% de las cepas de *A. flavus* fueron toxicogénicas, mientras que el 33% de las cepas de *A. parasiticus* fueron productoras de aflatoxinas. Un efecto supresor significativo a largo plazo, fue observado, sobre la capacidad toxicogénica de las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi* luego de la introducción de la mezcla de antioxidantes.

DISCUSION

La aplicación de una mezcla de antioxidantes como aditivos alimentarios causó una disminución total de las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi* con capacidad de producción de aflatoxinas, durante todo el período de almacenamiento. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos donde se observó que el BHA y el PP tienen actividad antimicrobiana sobre las especies de *Aspergillus* provenientes del agroecosistema de maíz (Nesci *et al.* 2003). Por otro lado, se evaluaron los efectos de BHA, PP y sus mezclas en maíz esterilizado y maíz natural. Los resultados mostraron que la mezcla fue más efectiva para el control el crecimiento de las cepas de *Aspergillus* Sección *Flavi* (Nesci 2005). En este trabajo, las cepas de *Aspergillus* Sección *Flavi* con capacidad de producir aflatoxinas, estuvieron distribuídas en bajos niveles durante los seis períodos de muestreo del maíz almacenado sin la mezcla de antioxidantes. Sin embargo, en el silo tratado con la mezcla de antioxidantes, sólo se aislaron cepas aflatoxicogénicas en algunas muestras del primer muestreo. Las poblaciones de *Aspergillus* Sección *Flavi* observadas en ambos silos, es similar a las poblaciones de *Aspergillus* encontradas en diferentes genotipos de maíz y en polenta comercial (Etcheverry *et al.* 2000).

Es limitada la información sobre el mecanismo de acción de los antioxidantes sobre las especies de *Aspergillus*. El butilhidroxianisol y el parabeno de propilo afectan la membrana celular, perturbando la fuerza protón motriz y afectando la transducción de energía y el transporte de sustrato (Adams and Moss 1995). La acción de los parabenos puede dirigirse a varios blancos en las células microbianas, inhibiendo las funciones de varias enzimas, disolviendo los lípidos de membrana, interfiriendo con el transporte de nutrientes, con la síntesis de proteínas, RNA y DNA, y destruyendo el potencial de membrana, como otros ácidos orgánicos (Eklund 1989).

El potencial de producción de aflatoxinas, de las comunidades fúngicas de diferentes agroecosistemas, puede influenciar el riesgo de contaminación aflatoxicogénica

(Schroeder and Boller 1973; Cotty *et al.* 1994). La proporción de cepas toxicogénicas provenientes del maíz almacenado sin la mezcla de antioxidantes es similar a datos encontrados de campos de maíz en (Nesci and Etcheverry 2002) y con datos de USA en años no epidémicos (Shearer *et al.* 1992). El tratamiento químico aplicado afectó en forma negativa a la comunidad aflatoxicogénica.

Lord *et al.* (1981) expresaron que uno de los problemas potenciales en el uso de conservantes fungistáticos, especialmente con distribución irregular, es la posibilidad de emergencia de focos de crecimiento fúngico, permitiendo un incremento de la producción de micotoxinas. Afortunadamente en nuestro estudio, la distribución de la mezcla de conservantes fue adecuada, lo cual influyó positivamente los resultados obtenidos. En este trabajo, la población aflatoxicogénica fue inhibida por la adición de una mezcla de PP y BHA en maíz homogeneizado eficientemente. También se pudo apreciar que el estrés químico provocado no estimuló la síntesis de aflatoxinas de las cepas aisladas durante la etapa inicial del tratamiento.

Este estudio *in situ* muestra la potencialidad de la mezcla de BHA-PP, como efectivos fungitóxicos para *A. flavus* y *A. parasiticus* en maíz almacenado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo a través de subsidios otorgados por la SECYT-UNRC 2002-2003, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT N° 0907199) y la AGENCIA CORDOBA CIENCIA, otorgados durante 2002-2003.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.R. and Moss, M.O. (1995).** *The Royal Society of Chemistry*, pp. 88-90. Cambridge, UK.
- Ahmand, S. (1979)** *MS thesis*. Washington State University, Pulman, WA, USA.
- Beuchat, L.R. and Jones, W.K. (1978).** *Acta Alimentari* **7**, 373-384.
- Chang, H.C. and Branen, A.L. (1975)** *Journal of Food Science* **40**, 349-351.
- Cotty, O.J., Bayman, P., Egel, D.S. and Elias, K.S. (1994).** ed. Powell, K.A., Renwick, A. and Peberdy, J.F. pp. 1-27. Plenum Press: New York.
- Etcheverry, M., Nesci, A., Barros, G., Torres, A. and Chulze, S. (2000).** *Mycopathologia* **147**, 37-41.
- Fung, D.Y.C., Taylor, S. and Kahan, J. (1977)** *Journal of Food Safety* **1**, 39-53.
- Geisen, R. (1996)** *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 388-392.

- Horn, B.W., Greene, R.L. and Dorner, J.W. (1995). *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2472-2475.
- Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W., Powell, J.H. and Layton, R.C. (1996). *Mycologia* **88**(4), 574-587.
- IARC (1993) *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human* **56**, 257-263.
- Lin, C.C.S. and Fung, D.Y.C. (1983). *Journal of Food Science* **48**, 576-580.
- Lord, K.A., Lacey, J., Caley, G.R. and Manlove, R. (1981). *Transactions of the British Mycological Society* **77**, 41-45.
- Lussenhop, J. and Wicklow, D.T. (1990). *Transactions of the Japanese Mycology Society* **31**, 63-74.
- Nesci, A. (2005). *PhD thesis*, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Nesci, A. and Etcheverry, M. (2002). *Letters in Applied Microbiology* **34**, 343-348.
- Nesci, A., Rodriguez, M. and Etcheverry, M. (2003). *Journal of Applied Microbiology* **95**, 279-287.
- Olanya, O.M., Hoyos, G.M., Tiffany, L.H. and McGee, D.C. (1997). *Plant Disease* **81**, 576-581.
- Schroeder, H. and Boller, R.A. (1973). *Applied Microbiology* **25**, 885-889.
- Shearer, J.F., Sweets, L.E., Baker, N.K. and Tiffany, L.H. (1992). *Plant Disease* **76**, 19-22.
- Thompson, D.P. (1991). *Journal of Food protection* **54**, 375-377.
- Thompson, D.P. (1992). *Mycologia* **84**, 791-793.
- Trucksess, M.W., Stack, M.E., Nesheim, S., Albert, R.H. and Romer, T.R. (1994). *Journal of AOAC International* **6**, 1512-1521.
- Wicklow, D.T. (1991). *Aflatoxin in Corn: New Perspectives* ed. Shotwell, O.L. and Hurburg, C.R. Jr pp. 315-328. Research Bulletin 599. Ames, Iowa: Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station.

CARACTERIZACION ENOLOGICA DE LEVADURAS KILLER DE LOS VALLES CALCHAQUIES, SALTA, ARGENTINA

DI CARLO, Berta M.¹, GÓMEZ de DIAZ Rosario del V. ¹, NAVIA Yolanda F.², ARMADA Margarita³, FIGUEROA Lucía I.C.⁴,

Universidad Nacional de Salta-CIUNSA. (1)Fac. Cs. Exactas, (2)Fac. Cs. de la Salud, (3)Fac. Ingeniería. Buenos Aires 177. Salta. TE: 0387-4255363. (4) PROIMI- Tucumán.E-mail: berta@unsa.edu.ar

RESUMEN

El estudio de las características enológicas de levaduras autóctonas en distintas zonas vitivinícolas, se realiza para seleccionar starters, determinando las cepas con mayor rendimiento en etanol, buena velocidad fermentativa, resistencia al anhídrido sulfuroso y con carácter killer, entre otras propiedades de interés enológico.

Se ha investigado las características enológicas de las levaduras killer obtenidas durante la vinificación de uvas variedad Torrontés de los Valles Calchaquíes, Salta, Argentina.

La toma de muestras de uvas y mostos, se realizó en época de vendimia y durante el proceso fermentativo. Como medio de aislamiento se usó agar extracto de malta y se incubó a 25°C durante 5 días. De los 271 aislamientos se encontraron 40 con el carácter killer que fueron identificados como *Saccharomyces cerevisiae*, extraídos en distintas etapas del proceso de vinificación, sobre los que se realizan los siguientes estudios:

1) Resistencia a concentraciones crecientes de anhídrido sulfuroso, de 0 a 300 mg/lt. 2) Desarrollo en mosto de uva de 21° Brix a temperaturas de 5°C y 12 °C. 3) Fermentación en mosto de uva de 21°Brix con cantidades de etanol de 8, 9, 10, 11 y 12%. 4) Habilidad para fermentar en mosto de uva de 30° Brix. 5) Poder fermentativo 6)Actividad killer 7)Parámetros de crecimiento como la velocidad específica y la producción de biomasa.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron buenas características enológicas, tales como resistencia al anhídrido sulfuroso y a la concentración de alcohol, fermentando a 12°C y a 30° Brix, con actividad killer competitiva y velocidades específicas de crecimiento adecuadas, seleccionando los tres mejores aislamientos que fueron extraídos a los 0, 3 y 10 días del proceso fermentativo de uvas variedad Torrontés de la zona de Cafayate y son utilizados como starters en microvinificaciones .

Palabras Claves: levaduras, killer, Torrontés, enológicas, Valles Calchaquíes.

ABSTRACT

The study of the enological characteristics of indigenous yeasts in different wine making zones, is made to select starters, determining the strain with greater ethanol yield, good fermentation speed, resistance to the sulphurous anhydride one and with killer character among other properties of enological interest. The enological characteristics were investigated of killer yeasts obtained during the fermentation process of grapes Torrontés variety of the Calchaquíes Valleys, Salta, Argentine.

The taking of samples of grapes and musts, was made in time of harvest and during the fermentation process. The yeasts were isolated in malt extract agar and incubated to 25°C for 5 days. From 271 isolated yeasts, 40 killer yeasts were determined and they were identified as *Saccharomyces cerevisiae*. The following enological characteristics were investigated of killer yeasts extracted in different stages from the vinification process : 1) Resistance to increasing concentrations of sulphurous anhydride , 0 to 300 mg/lit. 2) Growth in grape Brix of 21° Brix to temperatures of 5°C and 12 °C. 3)Resistance to ethanol concentration of 8, 9,10, 11 and 12%. 4) Ability to ferment in juice of grape of 30° Brix. 5) Ethanol yielding power. 6) Killer activity 7)Growth kinetics like the growth specific speed and the production of cell biomass.

The strains of *Saccharomyces cerevisiae* showed good enological characteristics, such as resistance to the sulphurous anhydride one and to the alcohol concentration, fermenting to 12°C and 30° Brix, with killer activity competitive and normal growth specific speed, selecting the three better isolated yeasts extracted to the 0, 3 and 10 days of the vinification process of Torrontés variety grapes of the zone of Cafayate and they are used like starter culture in microvinification.

INTRODUCCION

En los últimos años las levaduras han sido objeto de investigación y selección, a fin de mejorar la calidad del vino y controlar las tecnologías de vinificación para obtener productos tipificados por regiones, con escasa variabilidad de un año a otro.

El carácter killer asegura el dominio fermentativo de las levaduras starters sobre las cepas sensibles o neutras presentes en el proceso fermentativo.

Se han seleccionado levaduras de la microflora natural de la uva, para ser utilizadas como starters, dado la importancia de seleccionar cepas autóctonas de las propias regiones vitivinícolas, para la denominación de origen del vino.

MATERIAL Y METODOS

La toma de muestras se realizó en época de vendimia y durante el proceso fermentativo, extrayéndose en condiciones de asepsia muestras de uvas en bolsas estériles y de mostos variedad Torrontés, de la zona de los Valles Calchaquíes, provenientes de bodegas en Cafayate, Tolombón, Animaná, Angastaco y Santa María de Catamarca; extraídos de las piletas de fermentación. Como medio de aislamiento se usó agar extracto de malta y se incubó a 25°C durante 5 días, se efectuó un aislamiento de las colonias, obteniéndose un total de 271 aislamientos.

Determinación del carácter killer de las cepas puras aisladas, según Sommers & Bevan (1969) a pH 4,5.

El estudio taxonómico de las colonias aisladas se realizó siguiendo las técnicas de Yarrow (1998), para la clasificación sistemática de las cepas aisladas, de acuerdo a sus caracteres morfológicos y fisiológicos.

De los 271 aislamientos se encontraron 48 cepas con el carácter killer, de las cuales 40 fueron identificadas como ***Saccharomyces cerevisiae*** pertenecientes a distintas etapas del proceso de vinificación, sobre las cuales se analiza las características enológicas siguientes:

- 1) Resistencia a concentraciones crecientes de anhídrido sulfuroso (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 mg/lit). El medio utilizado es Yeast Nitrogen Base (YNB) con 1% de glucosa y soluciones de metabisulfito de sodio, según Parish and Carroll (1987) .
- 2) Desarrollo en mosto de uva de 21° Brix a temperaturas de 5°C y 12 °C.
- 3) Fermentación en mosto de uva de 21°Brix con cantidades crecientes de etanol (8, 9, 10, 11 y 12%)
- 4) Habilidad para fermentar en mosto de uva de 30° Brix.
- 5) Poder fermentativo en matraces provistos con válvula de Müller, con 50 ml de mosto de uva de 21° Brix, se pesó diariamente hasta que se alcanzó peso constante, con la diferencia de pesos inicial y final se calculó el % de alcohol en volumen, según Delfini y Cioffi (1979).
- 6) Actividad killer según técnica de Philliskirk & Young (1975) con medio YEPD bufferado con fosfato-citrato a pH 4,5-4,7 usando como césped sensible la cepa NCYC 1006 sembrando 80 µl de la enzima extraída de cada aislamiento, incubándose a 22°C por 72 horas y midiendo el halo de inhibición y muerte con un vernier.

7) Parámetros de crecimiento como la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa, realizando las curvas de crecimiento por medición de la absorbancia a 600 nm durante 50 horas de fermentación a 25°C en 250 ml de medio de cultivo con mosto de uva de 15,8 ° Brix adicionado con extracto de levadura (0,2%), peptona de caseína (0,4 %) y cerelosa (4%). La producción de biomasa producida se determinó por peso seco mediante el trazado de curvas de calibración para cada aislamiento.

RESULTADOS

Las características enológicas de las 40 cepas killer identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* presentaron un comportamiento similar en cuanto a su desarrollo en las distintas pruebas enológicas efectuadas.

Todos los aislamientos mostraron resistencia a concentraciones de 0-150mg/l de anhídrido sulfuroso, con 38 que fermentaron a 200-250 mg/l y 36 a 300mg/l como podemos observar en la figura 1.

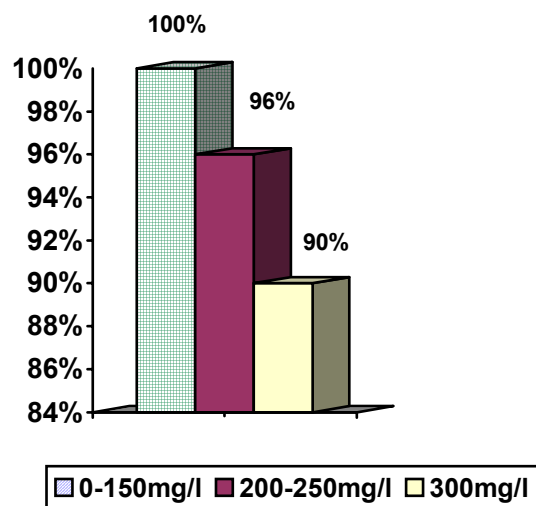


Fig. 1 Porcentaje de resistencia a concentraciones crecientes de anhídrido sulfuroso de las levaduras killer

Respecto al desarrollo fermentativo en mosto de uva de 21° Brix fue negativo a temperatura de 5°C y positivo a 12°C para todas las cepas. En cuanto a la fermentación

en mosto de uva con cantidades crecientes de etanol resultó exitosa para todas las cepas, igual ocurrió con la habilidad para fermentar en mosto de uva de 30° Brix.

En cuanto al poder fermentativo, se obtuvieron valores de 104,8 g/l a 110,2 g/l, con buena producción alcohólica, siendo los mejores resultados 13,77; 13,72; 13,40; 13,42 y 13,71 % de alcohol en volumen con velocidades fermentativas de 1,96; 1,89; 1,92; 1,93 y 1,87 g/l/día para los aislamientos de 0, 3, 6, 10 y 12 días de fermentación de mostos de la zona de Cafayate respectivamente.

Para los tres mejores rendimientos alcohólicos se graficó el poder fermentativo durante todo el proceso fermentativo, como se observa en la figura 2.

La producción de etanol es de mayor importancia en la fase de crecimiento hasta los 10 días , para luego mantenerse constante, luego de los 20 días de fermentación. Los tres mejores rendimientos alcohólicos correspondieron a muestras extraídas de mostos provenientes de Cafayate a los 0, 3 y 12 días de fermentación.

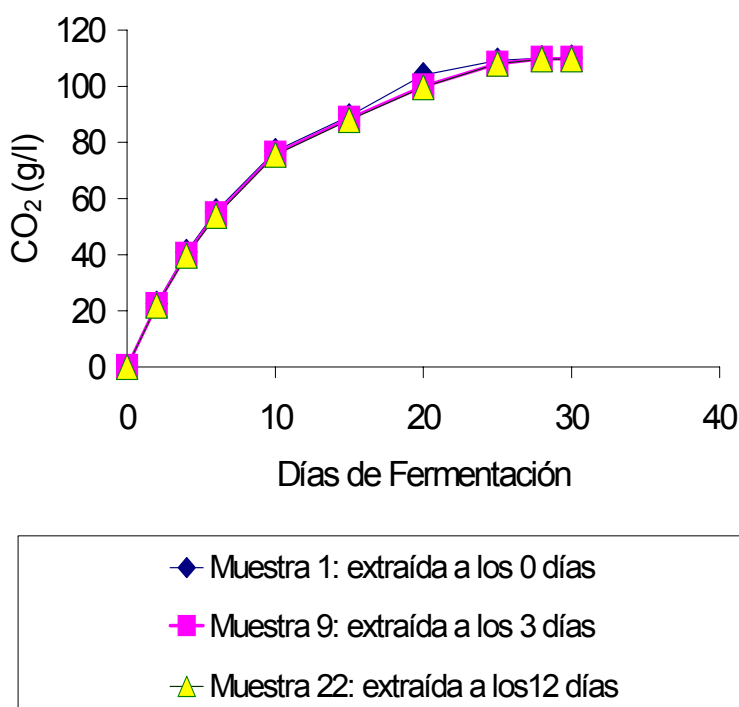


Fig. 2 Poder Fermentativo de las levaduras killer extraídas a los 0, 3 y 12 días del proceso fermentativo de mostos de la zona de Cafayate

En la tabla 1 se observan los resultados de los 15 aislamientos con mejores características killer, siendo la mayor actividad killer correspondiente a los aislamientos

extraídos a los 3 y 10 días, siguiendo los de 12 y 0 días de fermentación de mostos de la zona de Cafayate.

Los valores encontrados en los aislamientos seleccionados variaron de 1,10 a 6,13 mm para el halo de inhibición y de 2,13 a 9,62 mm para el de muerte de células, con el mejor resultado para la levadura extraída a los 3 días del proceso fermentativo que resultó superior al de la cepa starter utilizada en la bodega que registró 3,60 y 7,00 mm para los halos de inhibición y muerte respectivamente

Tabla 1. Actividad killer de las levaduras aisladas de mostos de los Valles Calchaquíes

Días de fermentación	Muestra	Inhibición (mm)	Muerte (mm)	Total (mm)
0	1	4,80	7,60	12,40
0	2	4,60	7,40	12,00
0	3	1,10	2,13	3,23
0	4	1,50	2,50	4,00
0	5	3,00	4,00	7,00
0	6	1,80	2,90	4,70
0	7	3,24	4,40	7,64
0	8	2,00	3,30	5,30
3	9	6,13	9,62	15,75
3	10	5,10	8,30	13,40
3	11	3,10	4,20	7,30
10	12	5,10	7,90	13,00
10	13	5,49	8,26	13,75
12	14	4,90	7,60	12,50
3 (Angastaco)	15	3,10	7,30	10,40

Los valores de la velocidad específica de crecimiento para las 7 muestras seleccionadas por su mayor actividad killer, muestras 1,2,9,10, 12, 13 y 13, variaron de 0,13 a 0,145 h⁻¹, para r² de 0.95 - 0,99 , si se compara con la cepa starter utilizada en la bodega con un valor de 0,13 h⁻¹., se encuentra que los aislamientos de los 3 días y 10 días de fermentación son superiores al del starter. La biomasa total producida al final de la fermentación varió entre 3,35 a 4,60 g/l, valores que indican un buen rendimiento celular. Se realizó la selección de los tres aislamientos con mejores características enológicas, determinándose que se encuentran en las muestras de Cafayate, extraídas a los 0, 3 y 10 días del proceso fermentativo, correspondientes a las muestras 2, 9 y 13 de la Tabla 2, con rendimientos alcohólicos de 13,75; 13,72 y 13,42° v/v y velocidades específicas de crecimiento de 0,14; 0,145 y 0,145 h⁻¹, respectivamente.

Se efectuaron las microvinificaciones con los tres aislamientos seleccionados en damajuanas de 5 litros con válvula de Müller, con 3 l de mosto de uva Torrontés, 13,5 °Be (grados Baumé), se pesó diariamente hasta que se alcanzó peso constante. De las cepas seleccionadas, la extraída a los 10 días del proceso fermentativo no produjo sulfuro de hidrógeno y presentó mejores características de floculación, dando un vino con pH de 4,10, acidez total de 6,2 g/l en ácido tartárico, con un residuo de 5 g/l de azúcar y grado alcohólico de 13,4 % v/v.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron buenas características enológicas, tales como resistencia al anhídrido sulfuroso y a la concentración de alcohol, fermentando a 12°C y a 30° Brix, con actividad killer competitiva y velocidades específicas de crecimiento adecuadas, seleccionando los tres mejores aislamientos en base a los estudios enológicos que fueron extraídos a los 0, 3 y 10 días del proceso fermentativo de uvas variedad Torrontés de la zona de Cafayate, resultando la cepa de los 3 días con mejores características enológicas para ser usada como starter en los procesos de vinificación.

BIBLIOGRAFIA

- Delfini C. y Ciolfi G.** Opportunita' della messa a punto di metodiche standardizzate per la determinazione dei caratteri enologici dei lieviti selezionati. Riv. Vitic. Enol. 5, 3, pp. 163-175,1979.
- Parish M. E. And Carroll D.E.** Fermentation Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolates from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. Am. J. Enol. Vitic., Vol 38, N° 1, pp. 45-48,1987.
- Philliskirk G. and Young T. W. ,1975,** "The occurrence of killer character in yeasts of various genera", *Antonie van Leeuwenhoek*, 41, p.147-151.
- Sommers,J.M. and Bevan, E.** AT he inheritance of killer character in yeast. Genetical Research 13, 71-83. 1969.
- Yarrow D.** Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Fourth edition, Kurtzman and Fell (Eds.), Elsevier Science F.V., Amsterdam, New York. **Part IV**, pp. 77.100. 1998.

PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS CON ACTIVIDAD MACERANTE DE TEJIDOS VEGETALES

MARTOS, María A.¹; ZUBRESKI, Emilce R.¹; VELAZQUEZ, Gabriela S.¹; MARTINEZ VAZQUEZ, Francisco¹; BENASSI, Fernando O.¹; HOURS, Roque A.²

¹Fac. de Cs. Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Félix de Azara 1552, (3300) Posadas, Misiones, Argentina. Fax.: +54 3752 42-5414. E-mail: biotecno@fcegyn.unam.edu.ar ²Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), UNLP-CONICET. Fac. de Cs. Exactas, UNLP. 47 y 115, (1900) La Plata, Argentina.

RESUMEN

Una cepa de levadura, aislada en nuestro laboratorio, fue seleccionada para evaluar su capacidad de producir enzimas pécticas en medio líquido. Se estudió la influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de poligalacturonasa. Se investigó la capacidad macerante de los extractos enzimáticos en diferentes tejidos vegetales.

De 154 cepas de levaduras aisladas, la levadura N° 111 mostró actividad pectinolítica. Esta levadura produjo poligalacturonasa (PGasa) cuando se utilizó glucosa y ácido poligalacturónico o pectina de citrus como fuentes de carbono, en medio líquido. La máxima producción de PGasa obtenida fue de 86,3 UE/mL en el medio con glucosa y pectina de citrus. Los tejidos vegetales estudiados fueron macerados por el extracto enzimático. El examen microscópico mostró células simples liberadas y agregados celulares de hasta 6 células. No se observó lisis por destrucción de la pared celular, lo que presenta interés para preparar alimentos de uso geriátrico y para bebés.

Palabras claves: levadura, enzimas pécticas, poligalacturonasa, maceración.

ABSTRACT

A yeast strain, isolated in our laboratory, was selected to evaluate its ability to produce pectic enzymes by submerged fermentation processes. The effect of different carbon sources on polygalacturonase (PGase) production was studied. Different vegetable tissues were used for tests of maceration with the crude enzyme extract.

Among 154 yeasts strains isolated, the yeast N° 111 was positive for pectinase activity. This yeast secreted a PGase when grown in shake flasks under the presence of either glucose and polygalacturonic acid or glucose and citrus pectin as the carbon sources. Maximum PGase production obtained was 86,3 EU/mL in the medium with glucose and

citrus pectin. All tissues studied were macerated by the enzyme extract. Microscopic examination showed a suspension of loose single cells and cell clumps of up to 6 cells. Lysis of cells was not observed, this requirement is desired in the production of baby and geriatric foods.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas pécticas microbianas son de interés comercial, algunas tienen la capacidad de liberar sustancias pécticas cementantes de la pared celular de las plantas, produciendo la maceración de los tejidos vegetales (Nakamura, T. *et al.*, 1995).

La producción de enzimas pécticas ha sido ampliamente estudiada en bacterias y hongos filamentosos. En cambio, su producción a partir de levaduras ha recibido menos atención y se han encontrado que muy pocas especies de levaduras producen estas enzimas (Blanco, P. *et al.*, 1999).

El objetivo del presente trabajo fue investigar la producción de pectinasas en medio líquido, utilizando levaduras aisladas en nuestros laboratorios y estudiar la capacidad macerante de sus extractos enzimáticos crudos en tejidos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo: Levadura N° 111, aislada en nuestro laboratorio a partir de frutas cítricas en descomposición.

Medio de mantenimiento: extracto de levadura, 5 g/L; triptona, 5 g/L; glucosa, 10 g/L; agar, 18 g/L, pH: 5.

Medio de fermentación: Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco), 0,67 %; glucosa o galactosa, 0,5 % y como inductores ácido galacturónico (G-2125, Sigma), ácido poligalacturónico (81325-Fluka) o pectina de citrus (P-9135 Sigma), 0,5 % (Blanco, P. *et al.*, 1999).

Inóculo: se preparó una suspensión de células en Tween 80 al 0,05% (DO₆₂₀ 0,96), a partir de cultivos jóvenes de la levadura desarrollada en medio de mantenimiento.

Producción de enzimas pécticas en sistema de cultivo batch: Se inocularon erlenmeyers de 125 mL que contenían 25 mL del medio de fermentación con 1 mL de inóculo. Los mismos se incubaron a 30 °C en baño termostático rotatorio a 150 rpm (Blanco, P. *et al.*, 1999).

Luego de 4 d el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 min, a 5 °C para remover las células de levadura. El sobrenadante se mantuvo a -18 °C hasta su utilización.

Procedimientos analíticos:

Determinación de la actividad pectinolítica por el método del hoyo (cup plate assay): Se realizaron hoyos en placas que contenían ácido poligalacturónico al 1 % en buffer acetato-ácido acético 0,2 M, pH: 5 y agar 1,8 %. A cada hoyo se le agregó 45 μ L del filtrado enzimático. Las cajas se incubaron a 35 °C hasta 4 d y se inundaron con HCl 5 N. Se midió el diámetro de los halos de hidrólisis formados (Souza, J.V.B. *et al.*, 2003).

Medida de la actividad poligalacturonasa (PGasa): La actividad PGasa se midió por determinación de los grupos reductores liberados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), usando ácido galacturónico como referencia (Miller, G.L., 1959). Una unidad enzimática (UE) de PGasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ácido galacturónico por min en las condiciones de ensayo.

Determinación de la capacidad macerante: Se colocaron cilindros de papa, zanahoria, pepino, manzana o frutilla en cajas Petri, a c/u de las cuales se le agregó la solución de enzima. Las placas se incubaron a 30 °C, durante 2 h. La actividad macerante se determinó por la pérdida de coherencia de los tejidos (Schwan, R.S. *et al.*, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad pectinolítica de los sobrenadantes obtenidos en cada uno de los cultivos se determinó mediante el método del hoyo (Fig. 1).

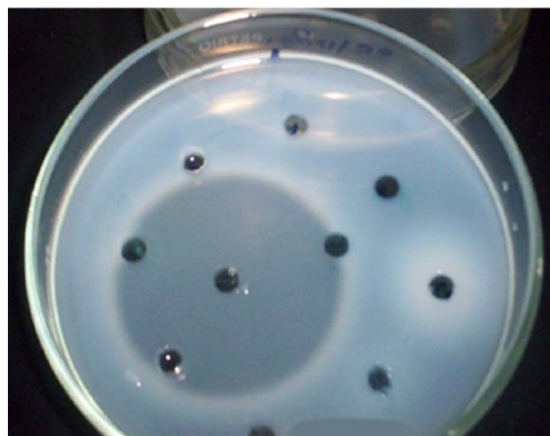


Fig. 1: (A) Halo de hidrólisis sobre placa con APG producido por el filtrado enzimático de la lev. 111. (B) Hoyos conteniendo filtrados enzimáticos sin actividad pectinolítica.

El diámetro de los halos de hidrólisis formados y el número de células producidas en cada caso se presentan en la Tabla 1. Los filtrados enzimáticos que presentaron actividad

pectinolítica (halos de hidrólisis) fueron utilizados para cuantificar la actividad PGasa (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de diferentes fuentes de carbono y energía en el crecimiento y la producción de poligalacturonasa (PGasa) por la levadura N° 111.

Fuente de carbono (% w/v)	N° de células/ml	pH _{final}	Diámetro de los halos de hidrólisis (mm)	Actividad PGasa UE/ml
GALA, 0,5 %	Sin crecimiento	5,1	Negativo	ND
GALA, 0,5 %; APG, 0,01%	Sin crecimiento	5,1	Negativo	ND
GALA, 0,5 %; APG, 0,2 %.	Sin crecimiento	5,1	Negativo	ND
GALA, 0,5 % AG, 0,01 %.	Sin crecimiento	5,1	negativo	ND
GALA, 0,5%; AG, 0,2 %.	Sin crecimiento	5,1	negativo	ND
GLUC, 0,5%	3,810 ⁶	3,0	negativo	ND
GLUC, 0,5%; AG, 0,01 %.	4,4 10 ⁷	3,1	negativo	ND
GLUC, 0,5%; AG, 0,2 %.	7,1 10 ⁷	3,1	Halo transparente 2,5 cm (3 d)	73,42
GLUC, 0,5%; AG, 0,5 %	8,0 10 ⁷	3,2	Halo transparente 2,8 cm (3 d)	74,33
GLUC, 0,5%; APG, 0,01 %.	3,9 10 ⁷	3,0	Halo opalescente 1,0 cm (2d)	ND
GLUC, 0,5%; APG, 0,2 %.	6,80 10 ⁷	2,8	Halo transparente 1,0 cm (2 d)	70,2
GLUC, 0,5%; APG, 0,5 %	6,3 10 ⁷	3,3	Halo transparente 2,5 cm (1 d) 4,0 cm (2 d)	79,6
GLUC, 0,5%; PECT (Sigma): 0,5 %.	7,3 10 ⁷	2,72	Halo transparente 2,5 cm (1 d) 4,0 cm (2 d)	86,3

GALA: galactosa; GLUC: glucosa; GA: ácido galacturónico; APG: ácido poligalacturónico; PECT: pectina de citrus. ND: ningún dato

Como se observa en la Tabla 1, la actividad enzimática y el crecimiento celular fueron despreciables en todos los cultivos realizados en medios que contenían galactosa como

fuelle de carbono fáclmente asimilable, aún en los casos en que fue adiclonada de áclido poligalacturónico o áclido galacturónico. Cuando los cultivos se realizaron en medios que contenían glucosa y otros sustratos (áclido galacturónico, áclido poligalacturónico o pectina de citrus) se observó buen crecimiento y actividad PGasa. Los mayores halos de hidrólisis de hasta 4 cm de diámetro a las 48 h se obtuvieron con los filtrados enzimáticos provenientes de los cultivos realizados en los medios que contenían glucosa, 0,5 %, adiclonados con áclido poligalacturónico o pectina de citrus, 0,5 %. En este último medio la actividad PGasa fue de 86,3 UE/mL (Tabla 1). En el medio con glucosa únicamente la actividad enzimática fue despreciable. Esto indicaría que tanto áclido galacturónico, áclido poligalacturónico o pectina de citrus actúan como inductores de la producción de PGasa, y que la glucosa no tiene efecto represor sobre la misma. Blanco, P. *et al.* (1994) informaron que la expresión de una endo-PGasa de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1389 fue mayor cuando se utilizó 0,5 % de galactosa como fuente de carbono y energía en lugar de glucosa. La producción de pectinasas es generalmente una capacidad constitutiva en las levaduras (Blanco, P. *et al.*, 1999). Sin embargo, la capacidad pectinolítica de algunas especies de levaduras, tales como *Cryptococcus albidus* (Federici, F., 1985) y *Geotrichum lactis* (Blanco, P. *et al.*, 1999) han sido consideradas como inducibles. Este último parecería ser el caso de la levadura N° 111.

La Fig. 2 muestra las microfotografías de los distintos vegetales macerados con los extractos enzimáticos que presentaron actividad pectinolítica. Los tejidos vegetales estudiados fueron macerados en todos los casos. El examen microscópico de los productos macerados mostró células simples liberadas y agregados celulares de hasta 6 células.

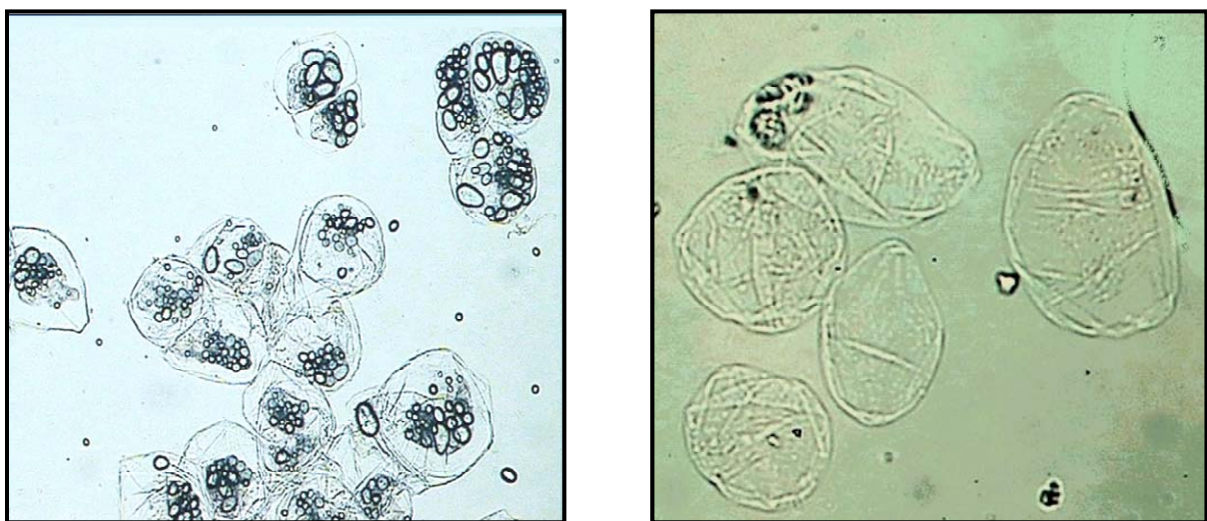


Fig. 2: Microfotografías: **(A)** Células del tejido de papa macerado. **(B)** Células del tejido de pepino macerado

CONCLUSIONES

Se estudió la producción de pectinasas por una levadura aislada a partir de frutos cítricos en descomposición. Dicha actividad pectinolítica no es reprimida por glucosa y es inducida por ácido poligalacturónico y por pectina. Los sobrenadantes de cultivos con actividad pectinolítica maceraron diferentes tejidos vegetales sin que se observe lisis por destrucción de la pared celular. Esto presenta interés desde el punto de vista industrial para la producción de néctares de frutas y alimentos infantiles y de uso geriátrico en general.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco, P.; Sieiro, C; Diaz, A. and Villa, T.G. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. 40, 974-977, 1994.

Blanco, P.; Sieiro, C. and Villa, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. MiniReview. FEMS Microbiol. Lett. 175, 1-9, 1999.

Federici, F. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Antonie van Leeuwenhoek. 51,139-150, 1985.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428, 1959.

Nakamura, T.; Hours, R.A.; Sakai, T. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. J. Food Sci. 60, 3, 468-472, 1995.

Schwan, R.F.; Cooper, R.M.; Wheals, A.E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. Enz. Microb. Technol. 21, 234-244, 1997.

Souza, J.V.B; Silva E.S.; Maia, M.L.S. and Texeira, M.F. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2 A. UMIDA.1. Proc. Biochem. 39, 455-458, 2003.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS ELABORADOS, NO ELABORADOS Y CRUDOS

PUCCIARELLI, Amada, B.; MARUCCI, Raúl, S.; PEDROZO, Williams

Laboratorio de Análisis Microbiológico de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la UNAM. Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones 3300, TE/FAX: 0054-03752-425414. mima@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

En los últimos años se ha observado un aumento del consumo de alimentos de escasa elaboración y listos para el consumo, como así también han incrementado los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de alimentos como sandwiches de jamón, queso, y/o verduras, como así también lechuga y tomate listos para ensalada. Fueron usados métodos estándares para la determinación de Coliformes, *Escherichia coli*, Recuento de Bacterias aeróbicas mesófilas totales (BAMT). También fueron investigadas la presencia de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. El recuento de Coliformes varió entre 9 y 10^5 NMP/g; recuento de BAT varió entre 10^4 y 10^7 ufc/g; la presencia de *Escherichia coli* se detectó en un 3% de las muestras. No se aislaron *Salmonella* spp. ni *Staphylococcus aureus*. Los recuentos de coliformes y bacterias aeróbicas detectados muestran que se necesita mayor control para evitar brotes potenciales de ETA.

Palabras Claves: Sandwich, verduras, bacterias, calidad microbiológica.

ABSTRACT

The consumption of low prepared food and ready-to-eat food are increased in recent years as well the foodborne illnesses. The purpose of this study was to evaluate the microbiological quality of food such as sandwiches (ham, cheese, mayonnaise, vegetables), and also lettuce and tomatoes to prepare salads. Standard methods were used to determine coliforms, *Escherichia coli*, aerobic counts. Samples also tested for the presence of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. The coliforms counts ranged from 9 y 10^5 MNP/g, aerobic counts ranged from 10^4 y 10^7 CFU/g; *Escherichia coli* were detected in three percent of samples. *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were

not isolated. Coliforms and aerobic counts detected show that better control is needed to avoid potential foodborne.

Key words: Sandwich, vegetables, bacteria, microbiology quality.

INTRODUCCIÓN

La manipulación de los alimentos durante su etapa de elaboración y expendio es una de las fuentes más frecuentes de contaminación por microorganismos patógenos que convierten a los mismos no aptos para el consumo humano, en especial cuando es de consumo masivo, no tiene un proceso de cocción y las condiciones de conservación no son las apropiadas, especialmente si no son refrigerados, lo cual permitiría la rápida multiplicación de estos microorganismos patógenos(ICMSF1991,1985).

Los sandwiches son productos alimenticios de composición variada como: pan, jamón, quesos, mayonesa, verduras (principalmente lechuga y tomate), huevos y otros que se caracterizan por estar asociados a enfermedades transmitidas por alimentos(Bryan,F.L.,1992). Debido a la gran variedad de ingredientes que se emplean en la preparación de los mismos, también es variada la flora microbiana que se pueden desarrollar en estos productos.

Las ensaladas constituyen un aporte fundamental en la dieta actual. Son alimentos que debido a su producción, almacenamiento, distribución y el consumo sin cocción son susceptibles de tener una carga microbiana importante y estar asociada a la presencia de microorganismos patógenos capaces de incrementar los brotes enfermedades de transmisión alimentaria(ETA).

El problema de las ETAs ha estado aumentado debido a las serias infecciones/intoxicaciones que causan probablemente porque los microorganismos patógenos adquirieron resistencia a agentes antimicrobianos, lo cual hace a estas infecciones difíciles de tratar(D'Aoust,J.Y.,1992; Tessi,M.A.,1997, 2002).

El objetivo de este estudio fue determinar el nivel de contaminación por microorganismos como Coliformes, *Escherichia coli*, Bacterias Aerobias Mesófilas Totales(BAMT), *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) en muestras de sandwiches y verduras para ensaladas, indicadores de falta de higiene en la elaboración e inadecuadas condiciones conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de sandwiches y verduras

Las treinta(30) muestras (diez (10) de cada una) se recolectaron del lugar de elaboración y expendio de los mismos y fueron transportadas al laboratorio en cadena de frío; las que fueron procesadas antes de las doce horas.

Para los recuentos e identificación de los microorganismos se utilizaron las técnicas y medios de cultivos recomendados por especialistas del tema (FDA-BAM y ICMSF).

Los sandwiches estaban compuestos por pan de sandwich (tipo.inglés.), jamón cocido, queso tipo barra, tomates y lechugas, envueltos en film plástico. Las verduras para la preparación de ensaladas eran: lechugas(cortada en juliana) y tomates(cortados en cubos, rodajas, cuartos, etc.).

Análisis Microbiológicos:

Se pesaron 25 gramos de muestras y se diluyeron con 225ml de agua de peptona al 0.1% (AP). Con la suspensión obtenida se realizaron diluciones seriadas 1:10 en AP al 0,1% (FDA-BAM, 1992).

Coliformes: Se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP/g) en caldo Mac Conkey (Britania) incubando 48 horas a 35°C. (a).

Escherichia coli: Los tubos positivos (a) fueron repicados a caldo EC(Britania) con una incubación de 24 horas a 44°C, los tubos que presentaron formación de gas fueron inoculados en agar Eosina Azul Metileno (EMB según Levine) (Merck), las cuales se incubaron 24 horas a 35°C, posteriormente se realizó la confirmación bioquímica con las pruebas del IMViC (APHA, 1993; Mc Faddin,J.F.,1980).

Aerobias Mesófilas totales: Se sembraron por duplicado en agar para recuento en placa(PCA) (Merck) incubando 48horas a 35°C.

Staphylococcus aureus: Las diluciones seriadas (0,1ml) fueron inoculadas sobre placas conteniendo agar Baird Parker (Britania) por extendido en superficie y se incubaron durante 24 a 48 horas a 35°C. Las colonias con características sospechosas se confirmaron con el test de la coagulasa, de la catalasa y la coloración Gram.(APHA, 1992).

Aislamiento e Identificación de Salmonella spp.

Preenriquecimiento: Las muestras fueron homogeneizadas en caldo peptonado bufferado incubando durante 24 horas a 35°C (ICMSF) .

Enriquecimiento selectivo: Se sembraron al 10% caldos de Selenito-Cistina (SC) (Britania) y Rappaport Vassiliades (RV) (Merck), que se incubaron durante 48 horas a 41,5°C.

Aislamiento: Se utilizaron placas con agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) (Merck) y agar Bismuto-Sulfito (BS) (Britania), las cuales se incubaron a 35°C por periodos variables según los requerimientos. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se tomaron cinco colonias sospechosas de *Salmonella* y se inocularon en picos de agar triple azúcar hierro (TSI) (Merck) y agar lisina hierro (LIA) (Merck) incubando a 35°C durante 24 horas, continuando luego con pruebas bioquímicas compatibles con el género *Salmonella* (ureasa, Fenilalanina desaminasa, oxidasa, indol, Voges Proskaur, citrato y otros).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 30 muestras analizadas, los Coliformes variaron entre 9 y 10^5 NMP/g, se detectaron la presencia de *Escherichia coli* en el 3% de las muestras, los recuentos de BACT oscilaron entre 10^4 y 10^7 ufc/g, los resultados de las colonias sospechosas aisladas resultaron negativos tanto para *Salmonella* spp. como para *Staphylococcus aureus*. (Tabla N°1).

Tabla N°1: Resultados de las muestras analizadas

Análisis ensayados	Muestras		
	Sandwich (jamón, queso) 10 muestras	Sandwiches (jamón, queso, verduras) 10 muestras	Lechuga y tomate para ensaladas. 10 muestras
Coliformes (NMP/g)	9- $1,1 \cdot 10^3$ /10	90 – $2,5 \cdot 10^5$ /10	500 – $9 \cdot 10^5$ /10
Escherichia coli (NMP/g)	Ausencia/10	Ausencia/9 4NMP/g / 1 muestra	Ausencia/7 $9 - 1,5 \cdot 10^2$ / 3 muestras
Bact. Aerobias Mesof. Tot (ufc/g)	$7 \cdot 10^4 - 9 \cdot 10^5$ /10	$1 \cdot 10^5 - 1,1 \cdot 10^7$ /10	$1 \cdot 10^4 - 1,5 \cdot 10^7$ /10
<i>Staphylococcus aureus</i> coag(+) (ufc/g)	Ausencia/10	Ausencia/10	Ausencia/10
Salmonella spp (Pres/aus/25g)	Ausencia/10	Ausencia/10	Ausencia/10

Rango de resultados/ N° de Muestras

En la tabla se puede observar los rangos de valores para los distintos análisis ensayados y las muestras. La presencia de *Escherichia coli* en estos productos indican evidencias de contaminación fecal, con el riesgo de presencia de patógenos entéricos. Los datos de las muestras de lechuga resultaron con valores bajos de *Escherichia coli* y en muchos casos la total eliminación de las mismas debido a la efectiva sanitización con agua, ácido acético y lavandina. Solo en un caso, el análisis de *Escherichia coli* en los sandwiches de jamón, queso y verduras resulto con 4NMP/g.

Según los resultados obtenidos, los recuentos de aerobios totales y coliformes algo elevados muestran que se debería realizar mayores controles periódicos en las materias primas, condiciones de elaboración, transporte y almacenamiento en los lugares de venta para asegurar una mejor calidad en estos productos.

CONCLUSIÓN

Los microorganismos detectados en estos alimentos que son en la actualidad de expendio en comercios, la mayoría de los cuales no autorizado, indican que hay alto riesgo de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Estos alimentos se elaboran sin una receta predeterminada, composición es muy variada, por lo que no se puede fijar valores standard que definan las causas de contaminación: (deficiente manipulación o falta de higiene de sus componentes). Cualquier valor alto en los resultados de los análisis lo convierte en alimentos de riesgo

BIBLIOGRAFÍA

American Public Health Association (APHA), 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. C.Vanderzant & D.F Splittstoesser editores, Washintong.USA.

Bacteriological Analytical Manual, 1992. 7th Ed. Food and Drug Administration. Ass. Of Analit. Chem. W.D.C.

Bryan, F.L. 1992. Evaluaciones por análisis de peligro en puntos críticos de control. Ed.OMS, Ginebra,. Pp: 84-86.

D'Aoust, J.Y; Sewell, A.M.; Daley, E.and Greco,P. 1992- Antibiotic resistance Of agricultural and foodborne *Salmonella* isolates in Canada:1986-1989. J. Food Prot. 55:428-434.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)-1991- El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza. pp:272-274.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)-1985. Ecología Microbiana de los alimentos. Tomo II. Ed. Acribia - Zaragoza.

Mc. Faddin J.F. "Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica". Ed. Panamericana S.A. 1980. Viamonte 2164. Bs.As.

Tessi, M.A.; Salsi,M.S.; Caffer, M.I and Moguilevsky, M.A. 1997. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. J. Food Prot. 60: 1001-1005.

Tessi, M.A.; Aringoli,E.; Pirovani,M.E.; Vincenzini,A.Z.; Sabbag,N.G.; Costa,S.; García,C.;Zannier,M.;Silva,E. and Moguilevsky M. 2002- Microbiological Quality and Safety of Ready-to-eat Cooked Foods From A Centralized School Kitchen in Argentina. J. Food Prot. 65(4): 636-642.

CAPACIDAD INHIBITORIA DE CULTIVOS DE ENTEROCOCOS FRENTE A *Listeria monocytogenes*.

BENASSI, Fernando O.; GARCÍA, Myriam A.; DALLAGNOL, Andrea;
VON SPECHT, Martha H.; PUCCIARELLI, Amada B.; MARTÍN, Bibiana; PEDROZO,
Williams.

Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.
UNAM. Félix de Azara 1552 (3300). Posadas, Misiones, Argentina, Tel/Fax : 0054 3752- 425414
magarcia@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Se determinó en 50 cepas de *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis* (31), *E. faecium* (14), *E. hirae* (3), *E. avium* (1), *E. gallinarum* (1)) la producción de sustancias inhibitorias sobre *L. monocytogenes*, utilizada como cepa indicadora. Los enterococos fueron aislados de canales de pollos evisceradas frescas y de aguas de arroyos interiores de Posadas. El 38 % de las cepas de enterococos ensayadas fueron productoras de sustancias inhibitorias frente a *Listeria monocytogenes* (79% *E. faecalis*, 10.5% *E. faecium*, 10.5% otros enterococos).

El porcentaje de cepas productoras de estas sustancias, fue más alto en los aislamientos de pollos (56.5%) que en los de agua (22.2%).

A la luz de estos hallazgos, se continuarán los estudios a fin de caracterizar estas sustancias con actividad anti-listeria como bacteriocinas.

Palabras clave: *Enterococcus* – *Listeria monocytogenes* – Bacteriocinas – Pollos - Aguas

ABSTRACT

Inhibitory substances production was determined for 50 *Enterococcus* isolates (*Enterococcus faecalis* (31), *E. faecium* (14), *E. hirae* (3), *E. avium* (1), *E. gallinarum* (1)) obtained from different origins (chicken samples (23) and water samples from streams of Posadas city (27)). *Listeria monocytogenes* was used as indicator for bacteriocin production. Thirty-eight percent of the analyzed enterococcal isolates were Inhibitory substances producers (79% of *E. faecalis*, 10.5% of *E. faecium* and 10.5% other enterococcal) against *L. monocytogenes*.

The percent of these substance producers was higher among chicken isolates (56.5%) than among water samples isolates (22.2%).

The results obtained require the characterization of these inhibitory substances as bacteriocins.

INTRODUCCION

Las bacterias ácido-lácticas, entre ellas los enterococos, son utilizadas para la fermentación y preservación de una gran variedad de productos lácteos, cárnicos y vegetales; mejoran además el aroma, sabor y textura de los mismos. Se ha demostrado la capacidad de estas bacterias para producir sustancias inhibitorias del desarrollo microbiano denominadas bacteriocinas (Aymerich et al,1996 ; Jack et al, 1995; Siragusa 1992).

Las bacteriocinas son proteínas o polipéptidos biológicamente activos contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora.

Estudios más recientes han demostrado la existencia de bacteriocinas que impiden la proliferación de otras bacterias Gram (+) no relacionadas estrechamente desde un punto de vista taxonómico con la cepa productora. Algunas de ellas poseen un amplio espectro de acción antibacteriana, incluyendo en el mismo a géneros y especies alterantes o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria, tales como, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* entre otros.

Por otra parte, las mencionadas sustancias generalmente son inocuas para el consumidor, pueden ser hidrolizadas en el tracto intestinal humano, son resistentes al calentamiento, activas a pH bajo, resistentes a la acción de algunas enzimas, estables en los alimentos, y se encuentran en las bacterias ácido lácticas consideradas por la Organización Mundial de la Salud como GRAS (generalmente seguras para su incorporación en alimentos para consumo humano). Presentan así un gran interés para su utilización como “biopreservadores naturales” en la industria alimentaria (Aymerich et al,1996 ; Jack et al, 1995; Siragusa. 1992).

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, asociada a enfermedades de origen alimentario. Se encuentra ampliamente distribuida en aguas, alimentos crudos y el tracto intestinal de hombres y animales. Su gran tolerancia frente a las condiciones adversas (biodisponibilidad de agua, bajas temperaturas, etc) hacen de este

microorganismo un problema para la industria alimenticia (Benkerroum et al, 2000; Jack et al, 1995).

El biocontrol de *L. monocytogenes* por bacterias ácido-lácticas productoras de bacteriocinas o por extractos de bacteriocinas ha atraído mucho la atención en los últimos años (Jack et al, 1995). Nuevas estrategias de preservación para el control de esta especie han sido desarrolladas, incluyendo la aplicación de la bacteriocina nisina aceptada por la Food and Drug Administration de Estados Unidos (García et al, 2004).

Se evaluó en este trabajo la acción inhibitoria de sustancias producidas por enterococos sobre *L. monocytogenes*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas seleccionadas:

Se estudiaron 50 cepas de *Enterococcus* spp., 27 aisladas de aguas de arroyos interiores de la Ciudad de Posadas y 23 de canales de pollo evisceradas comercializadas en la ciudad de Posadas.

Estas cepas fueron conservadas por congelamiento a -20°C, en caldo BHI con 15% de glicerina.

Se utilizó como indicadora una cepa de *L. monocytógenes* de origen clínico aislada de LCR (líquido cefalorraquídeo).

Ensayos para la determinación de bacteriocinas:

Se siguió la metodología propuesta por Del Campo y col. 2001. Se adicionaron 50 μ l de un cultivo *overnight* de *L. monocytogenes* a 5 ml de agar semisólido Infusión cerebro corazón (caldo BHI + 0,7 % de agar) fundido y mantenido a 50 °C. Esta suspensión se distribuyó sobre placas con una base de agar BHI (Britania, Argentina).

Cepas puras de enterococos con 18 hs de incubación en agar BHI, se inocularon con palillos estériles mediante punción en placas agarizadas.

La incubación se realizó a 37°C durante 48 hs. Las cepas de enterococos se consideraron productoras presuntivas de bacteriocinas cuando se constataron halos de inhibición alrededor de las colonias ensayadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies de enterococos ensayadas fueron: *E. faecalis* (31 cepas), *E. faecium* (14), *E. hirae* (3), *E. avium* (1), *E. gallinarum* (1). La distribución de las especies con actividad anti-listeria, según el origen de los aislamientos se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1: Producción de sustancias inhibitorias en *Enterococcus* de diferentes orígenes, frente a *L. monocytogenes*.

Origen \ Especie	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Totales
POLLOS	12/17	1/6	-----	-----	-----	13/23
AGUAS	3/ 14	1/8	1/3	0/1	1/1	6/27
Totales	15/31	2/14	1/3	0/1	1/1	19/50

Ref cepas +/- n° de cepas ensayadas

El 38% de las cepas ensayadas fueron productoras de sustancias inhibitorias frente a *L. monocytogenes*. La especie más frecuentemente asociada fue *E. faecalis*. Estas proporciones se ilustran en la Figura 1.

Se observó mayor porcentaje de cepas productoras presuntivas de bacteriocinas entre los aislamientos de pollos (56.5%), correspondiendo a los aislamientos de agua un 22.2%.

Diversos autores han descrito sustancias inhibitorias producidas por el género *Enterococcus* con actividad frente a *Listeria monocytogenes*, las que fueron caracterizadas como bacteriocinas (Aymerich et al,1996 ; García et al, 2004; Jack et al, 1995; Siracusa, 1992).

Se continuarán los estudios a fin de caracterizar estas sustancias inhibitorias como bacteriocinas.

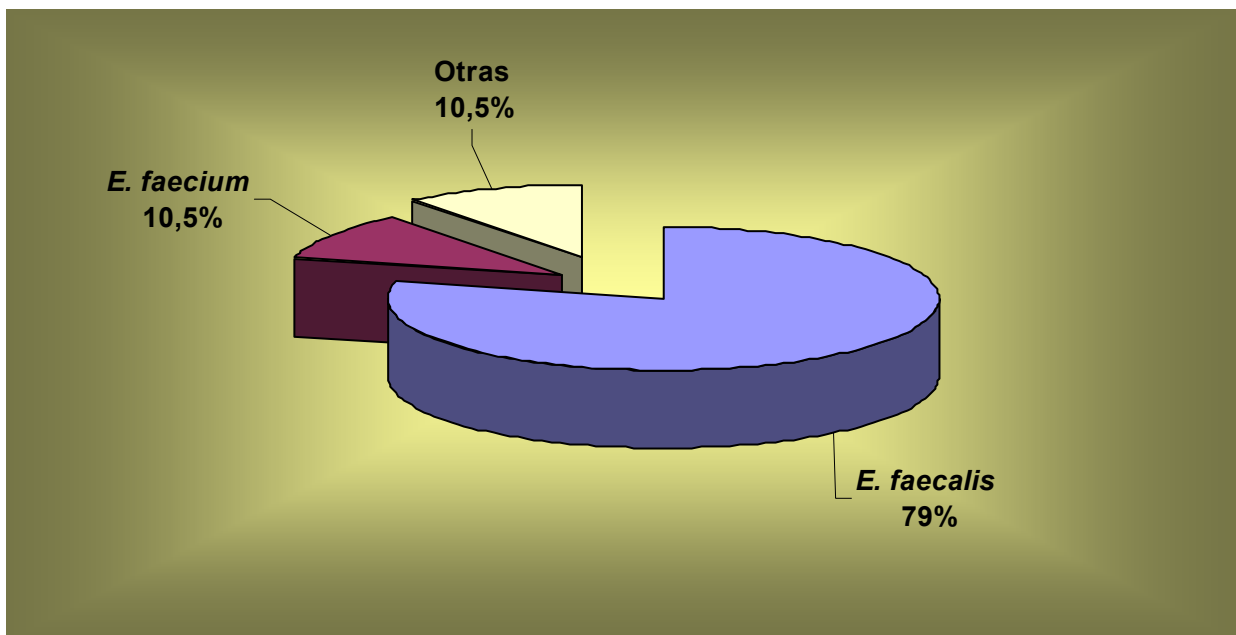


Figura 1: Distribución de especies de *Enterococcus* productoras de sustancias inhibitorias frente a *L. monocytogenes*. (N=19)

CONCLUSIONES

Los aislamientos del género *Enterococcus* en nuestra zona presentan una alta proporción de cepas productoras de sustancias inhibitorias, probablemente bacteriocinas, frente a *Listeria monocytogenes*, especie patógena reconocida por

el equipo de salud de la región, como causante de diversas infecciones, que afectan a todos los grupos etarios .

Podría considerarse su utilización como biopreservadores naturales en la elaboración de productos regionales.

BIBLIOGRAFÍA

Aymerich T., Holo H., Havarstein S. L., Hugas M., Garriga M. and Nes I. F. (1996). Biochemical and Genetic characterization of enterocin A from *enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol.62(5): 1676-1682.

Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlia S. and Filali-Maltouf A. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. J. Appl. Microbiol.89: 960-968.

Del Campo R., Tenorio C., Jiménez-Díaz R., Rubio C., Gomez-Lus R., Baquero F. and Torres C. (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. Antimicrob. Agents Chemother.45(3):905-912.

García T. M., Martínez Cañamero M., Lucas R., Omar N. B., Pérez Pulido R., Gálvez A. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. Int. J. Food Microbiol.90: 161-170.

Jack R. W., Tagg J. R., and Ray B. (1995). Bacteriocin of gram-positive bacteria. Microbiological Reviews. 59: 171-200.

Siragusa G.R. (1992). Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus*. Appl. Environ. Microbiol. 58(11):3508-3513.

INFECCIONES FÁGICAS EN BACTERIAS PROBIÓTICAS (*Lactobacillus casei/paracasei*).

CAPRA María L., QUIBERONI, Andrea del L. y REINHEIMER, Jorge A.

Instituto de Lactología Industrial, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829. 3000 Santa Fe, Argentina. T.E. (0342) 453-0302. FAX (0342) 4571162. e-mail: mcapra@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN

Recientemente han surgido infecciones fágicas hacia bacterias probióticas, causando importantes pérdidas económicas. En el presente trabajo se caracterizó espectro de huéspedes, morfología, influencia de cationes divalentes, resistencia térmica y química, cinéticas de lisis y parámetros de multiplicación fágica, de dos fagos de colección (PL-1 y J-1) y del primer fago argentino (MLC-A), específicos de *Lactobacillus casei/paracasei*.

Los tres fagos fueron clasificados como pertenecientes a la Familia *Siphoviridae*, presentando idéntico espectro de huéspedes y diferentes comportamientos frente a calcio y magnesio. Suspensiones en leche de los fagos PL1 y J1 fueron inactivadas completamente luego de 5 minutos a 72°C. El fago MLC-A se mostró notablemente más resistente. El ácido peracético y el NaClO fueron los biocidas más efectivos. Los rangos para los parámetros de multiplicación fágica obtenidos fueron: *burst size*, 69-200 UFP/centro infectivo; período de latencia, 30-100 minutos y tiempo de *burst*, 135-240 minutos.

La caracterización de fagos de bacterias probióticas permite enfrentar racionalmente sus infecciones e implementar medidas de control en la industria láctea.

Palabras claves: bacteriofago, *Lactobacillus casei/paracasei*, *burst size*, resistencia térmica, biocida.

ABSTRACT

Worldwide, some recent phage attacks on probiotic bacteria have caused important economic losses. In this work, the host spectra, morphology, divalent cation influence, thermal and chemical resistance, lysis kinetics and phage multiplication parameters of two collection phages (PL-1 and J-1) and the first Argentinean phage (MLC-A), specific of *Lactobacillus casei/paracasei*, were investigated.

Phages belonged to the *Siphoviridae* Family. They showed identical host spectra but different behaviors regarding calcium and magnesium ions. PL-1 and J-1 milk suspensions were totally inactivated after 5 minutes to 72°C, while MLC-A phage resulted to be noticeable more resistant. Peracetic acid and sodium hypochlorite were the most effective biocides tested. The ranges of phage multiplication parameters obtained were: *burst size*: 69-200 PFU per infective center; latent period: 30-100 minutes and *burst time*: 135-240 minutes.

The characterization of phages that attack probiotic bacteria allows the development and implementation of thorough rational control strategies in the dairy industry.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, existen pocos fagos conocidos capaces de atacar bacterias probióticas: los fagos J1 (Yokokura, 1971) y PL1 (Watanabe y col., 1970), aislados en Japón de fermentaciones de Yakult y depositados en la ATCC; el ϕ 393-A2 (Herrero y col., 1994) aislado del suero de un queso azul artesanal; el ϕ Lc-Nu (Forsman y col., 1993), de una planta quesera en Finlandia y el profago FSW (Shimizu-Kadota y Tsuchida, 1984), que lisogeniza la cepa de *Lact. casei* ATCC 27139. Recientemente, debido al incremento y diversificación en el empleo de cepas probióticas, en distintos países han surgido infecciones fágicas específicas hacia estas cepas, poniendo en peligro los procesos de obtención de ciertos alimentos probióticos y aparejando importantes pérdidas económicas.

En el presente trabajo se estudiaron dos fagos de colección y el primer fago argentino, específicos de *Lactobacillus casei/paracasei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, fagos y medios de cultivo

Se emplearon los bacteriofagos de colección PL-1 y J-1 y el fago autóctono MLC-A, aislado de un proceso industrial de leche fermentada, y sus cepas sensibles: *Lb. paracasei* ATCC 27092, *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* A. Se empleó caldo MRS para el desarrollo y reactivación de las cepas (over-night a 37°C), así como para la propagación de los fagos. Las partículas fágicas se enumeraron en agar MRS por el método de la doble capa agarizada (Svensson & Christiansson, 1991).

Espectro de hospedadores

Tabla 1- Sensibilidad de cepas de *Lactobacillus* frente a los fagos PL-1, J-1 y MLC-A

Organismo	Cepa	Fago		
		PL-1	J-1	MLC-A
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ATCC 27092	+	+	+
	Yk*	+	+	+
	Hn*	+	+	+
	Dn*	+	+	+
	A*	+	+	+
	A13*	+	+	+
	A14*	+	+	+
	Bio*	-	-	-
	L26*	-	-	-
	SA*	-	-	-
	PR*	-	-	-
	CNRZ 1224	-	-	-
	CNRZ 1308	-	-	-
	CNRZ 318	-	-	-
	CNRZ 1976	-	-	-
	JP1	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 27139	+	+	+
	ATCC 393	+	+	+
	CNRZ 1874	-	-	-
	8	-	-	-
	M	-	-	-
	SA*	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG*	-	-	-
	A15*	-	-	-
	A16*	-	-	-
	F22	-	-	-
	F30	-	-	-
	F49	-	-	-
	F53	-	-	-
	F56	-	-	-
	F70	-	-	-
	F74	-	-	-
	F85	-	-	-
	F95	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	F37	-	-	-
	F37"	-	-	-

* cepas comerciales.

Test de turbidez (Sensibilidad fágica en medio líquido): Cultivos over-night de las cepas de lactobacilos empleadas en este estudio (Tabla 1), se inocularon en caldo MRS-Ca y fueron infectados con los fagos. Luego de una agitación suave, se incubaron a 37°C junto con un control de cepa sin infectar. Para establecer la resistencia o la sensibilidad de una cepa frente al fago, se hicieron tres repiques de los cultivos.

Spot test: Cultivos en fase exponencial de desarrollo de cada una de las cepas, se mezclaron con agar blando MRS y fueron plaqueadas sobre agar MRS-Ca. Alícuotas de 50 µl de cada fago se depositaron sobre las placas. Después de la incubación (18h-34°C) se observó la presencia o no de zonas de inhibición (Svensson y Christiansson, 1991).

Morfología y dimensiones

Partículas fágicas de φMLC-A fueron sedimentadas en una ultracentrífuga (Beckman J2-21) y lavadas en acetato de amonio. Los fagos purificados fueron coloreados con fosfotungstato de potasio o acetato de uranilo y examinados en un microscopio electrónico Philips EM 300 (Ackermann 2004, comunicación personal).

Efecto de los cationes calcio y magnesio

La influencia en la lisis celular fue investigada por incubación (37°C) de las cepas infectadas con los fagos correspondientes, en caldo MRS con y sin CaCl₂ o MgCl₂ (10 mM). La formación de placas de lisis se investigó por el método de la doble capa agarizada, en agar MRS con o sin CaCl₂ o MgCl₂ (10 mM). Las placas se incubaron a 34°C en microaerofilia durante una noche.

Resistencia térmica

Suspensiones de alto título de los fagos se sometieron a tratamientos de 63°C, 72°C y 90°C en leche descremada reconstituida (LDR), determinando la concentración de fagos viables a intervalos de tiempo predeterminados.

Resistencia química

Suspensiones fágicas de alto título se trataron con: hipoclorito de sodio comercial (200, 400, 600, 700 y 800 ppm), etanol (10, 50, 75 y 100% v/v), isopropanol (10, 50 y 100% v/v), y ácido peracético (0.15% v/v), a temperatura ambiente, excepto para el ácido peracético, que se ensayó a 40°C. A intervalos de tiempo predeterminados se cuantificaron los fagos sobrevivientes.

Cinéticas de lisis

Cultivos de las cepas sensibles en fase exponencial de desarrollo se infectaron con sus respectivos fagos a diferentes dosis infectivas, en caldo MRS y MRS-Ca (10 mM) y se incubaron a 37°C. A intervalos de tiempo regulares, se efectuaron mediciones de DO_{560 nm}

en espectrofotómetro. Los valores se graficaron en función del tiempo, para cada condición, utilizando como control un cultivo de la cepa sin infectar.

Curvas de multiplicación fágica en un paso (*Burst size*)

Se determinó el número de partículas fágicas liberadas a partir de un centro infectivo (Chow et al., 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de huéspedes de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A resultaron idénticos y en general, específicos para cepas de *Lact. paracasei* (Tabla 1). Sobre la base de sus características morfológicas (Fig. 1, Tabla 2), los tres fagos se incluyeron en la Familia *Siphoviridae*, según la clasificación de Ackermann.

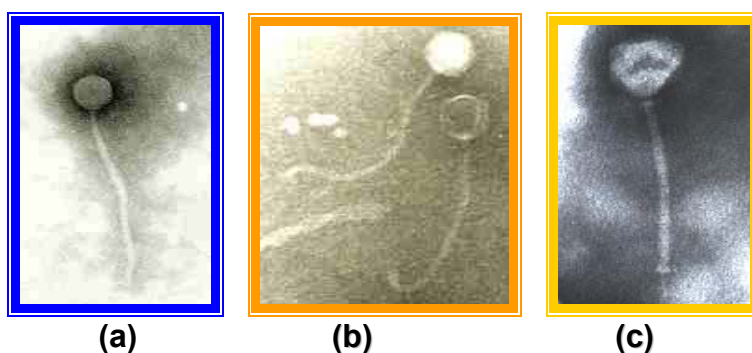


Figura 1. Micrografías electrónicas de los fagos PL-1 (a), J-1 (b) y MLC-A (c).

Tabla 2- Dimensiones y características morfológicas de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A de *Lactobacillus casei/paracasei*.

Fago	Cabeza		Cola		Particularidades
	Morfología	Diámetro (nm)	Longitud(nm)	Diámetro (nm)	
PL-1(*)	isométrica	60	270	10	cola flexible, no contráctil, estriada, placa basal con espículas y fibra caudal
J-1(**)	isométrica	62	250	7	cola flexible, no contráctil
MLC-A	isométrica	57	156	7	cuello, cola bastante rígida, no contráctil, placa basal con fibra caudal

(*) Watanabe et al., 1982

(**) Séchaud et al., 1988.

Los cationes divalentes fueron indispensables para la formación de placas de lisis de los fagos PL-1 y MLC-A (Fig. 2). El ϕ J-1 produjo placas, aunque de distinta morfología (más pequeñas y de bordes más difusos) y con un título menor (en $2 \log_{10}$), en comparación con un control en agar MRS-calcio. En presencia de magnesio, los títulos de PL-1, J-1 y MLC-A disminuyeron ($1,1 \log_{10}$, $0,5 \log_{10}$ y $1,0 \log_{10}$, respectivamente), pero sólo se observaron cambios de morfología de las placas para el ϕ MLC-A. En medio líquido, ambos cationes fueron efectivos para permitir la lisis de los cultivos infectados. En ausencia de cationes, sólo el fago MLC-A fue incapaz de producir lisis, mientras que PL-1 y J-1 lo hicieron aunque más tardíamente que en presencia de los cationes.

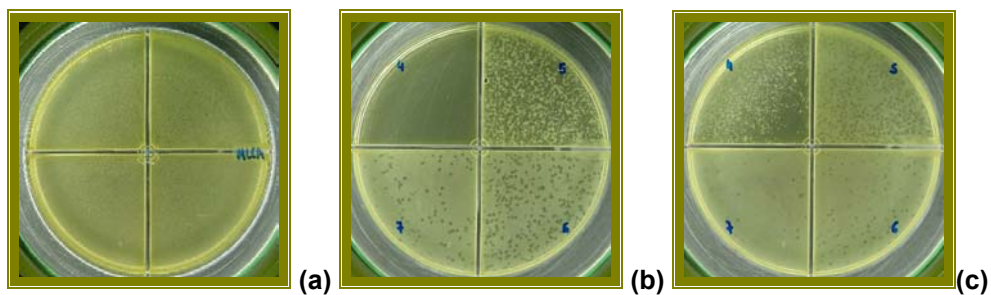


Figura 2. Placas de lisis del fago MLC-A en ausencia de cationes (a), presencia de calcio (b) y presencia de magnesio (c) sobre *Lact. paracasei* A.

Los tres fagos resultaron capaces de sobrevivir a tratamientos de pasteurización industrial. A 72°C , suspensiones de alto título de los fagos PL-1 y J-1 se inactivaron completamente en 5 minutos, mientras que el fago MLC-A se mostró notablemente más resistente (Fig. 3).

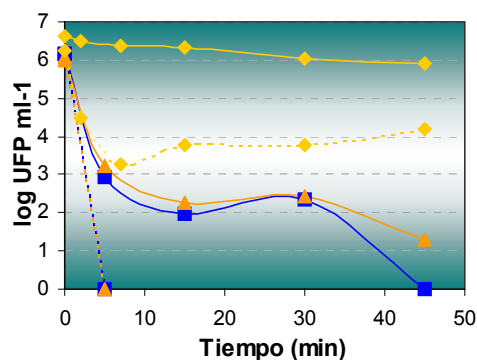


Figura 3. Cinéticas de destrucción térmica de los fagos PL-1 (■), J-1 (▲) y MLC-A (◆) en LDR, para 63°C (línea llena) y 72°C (línea punteada). Los valores son promedio de tres determinaciones.

Sólo 2 minutos a 90°C fueron suficientes para reducir los títulos de los tres fagos en 6 órdenes logarítmicos (datos no mostrados). El isopropanol y el etanol (10 y 50%), prácticamente no afectaron la viabilidad de los fagos en el tiempo ensayado. Con relación al NaClO, para ϕ MLC-A se necesitaron 600 ppm para inactivar 10^6 UFP/ml en 30 minutos, mientras que una concentración de 700 ppm fue insuficiente para lograr la total pérdida de viabilidad de PL-1 y J-1, aún luego de 45 minutos de tratamiento. Una concentración de 800 ppm se requirió para la inactivación total de ϕ PL-1 y ϕ J-1, que se mostraron más resistentes que el fago autóctono frente a este biocida (Fig. 4). El agente más efectivo fue el ácido peracético (0,15%v/v), el cual produjo una inactivación total de las suspensiones fágicas en sólo 2 minutos (dato no mostrado).

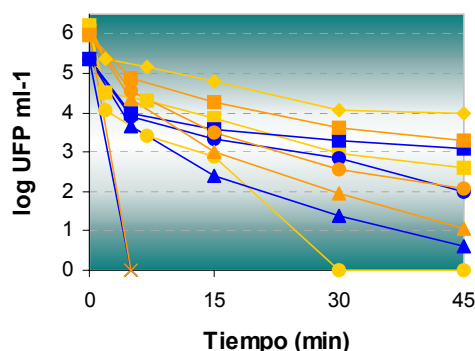


Figura 4. Cinéticas de destrucción de los fagos PL-1 (□), J-1 (△) y MLC-A (○) con 200 ppm (◆), 400 ppm (■), 600 ppm (●), 700 ppm (▲) y 800 ppm (×) de cloro libre residual. Los valores son promedio de tres determinaciones

Los parámetros de multiplicación fágica obtenidos (burst size: 69-200 UFP/centro infectivo; período de latencia: 30-100 minutos y tiempo de *burst*: 135-240 minutos) (Fig. 6, Tabla 3) se encuentran dentro de los rangos calculados para otros sistemas fago/cepa de *Lactobacillus casei/paracasei* estudiados.

Tabla 3- Parámetros de multiplicación fágica de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A de *Lactobacillus casei/paracasei*.

sistema fago / cepa	Parámetros de multiplicación fágica		
	Periodo de latencia (min)	Burst time (min)	Burst size (UFP/centro infectivo)
ϕ J-1/ ATCC 27139	45	240	160
ϕ PL-1/ ATCC 27092 (*)	100	170	200
ϕ MLC-A/ <i>Lact.paracasei</i> A30		135	69

CONCLUSIONES

Los tres fagos estudiados muestran en general, comportamientos similares. Sin embargo, el primer bacteriofago argentino de *Lactobacillus paracasei*, se muestra totalmente dependiente de la existencia de cationes divalentes en el medio para poder culminar su ciclo lítico, notablemente más resistente a tratamientos térmicos y menos resistente frente al hipoclorito de sodio.

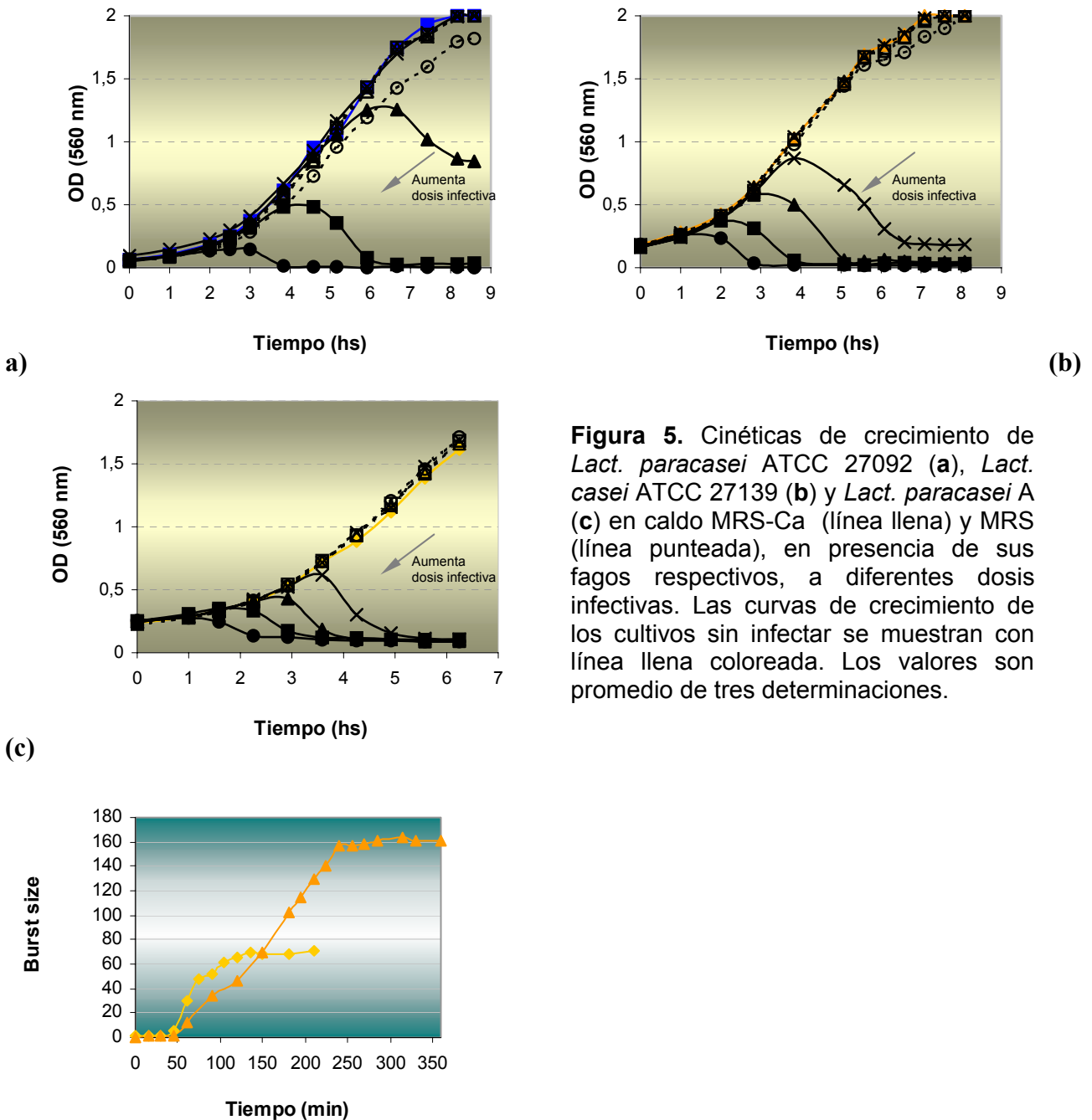


Figura 5. Cinéticas de crecimiento de *Lact. paracasei* ATCC 27092 (a), *Lact. casei* ATCC 27139 (b) y *Lact. paracasei* A (c) en caldo MRS-Ca (línea llena) y MRS (línea punteada), en presencia de sus fagos respectivos, a diferentes dosis infectivas. Las curvas de crecimiento de los cultivos sin infectar se muestran con línea llena coloreada. Los valores son promedio de tres determinaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Chow J. J., Batt C.A. and Sinskey A. J.. (1988)** Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* ch2. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1138-1142.
- Forsman P., Tanskanen J. and Alatossava T. (1993)** Structural similarity and genetic homology between *Lactobacillus casei* bacteriophages isolated in Japan and in Finland. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(12), 2043-2048.
- Herrero, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Caso, J.L., and Suárez, J.E. (1994).** Characterization of ϕ 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*. *Microbiology*, **140**, 2585-2590.
- Séchaud, L., Cluzel, P.-J., Rousseau, M., Baumgartner, A. and Accolas, J.-P. (1988)** Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie* **70**, 401-410.
- Shimizu-Kadota, M. and Tsuchida, N. (1984)** Physical mapping of the virion and the prophage DNAs of a temperate *Lactobacillus* phage ϕ FSW. *Journal of General Microbiology* **130**, 423-430.
- Svenson, U. and Christiansson, A. (1991).** Methods for phage monitoring. Cap. 4 in Bulletin FIL-IDF n° 63. 29-39.
- Watanabe K., Takesue S., Ishibashi K., Iwamoto T. and Kondo J.I. (1982).** Fine structure of phage PL-1 active against *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **28**, 1-6.
- Watanabe, K., Takesue, S, Jin-Nai, K. and Yoshikawa, T. (1970)** Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology* **20** (3), 409-415.
- Yokokura, T. (1971).** Phage receptor material in *Lactobacillus casei* cell wall. I. Effect of L-rhamnose on phage adsorption to the cell wall. *Japan. J. Microbiol.* **15** (5), 457-463

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) (Programación CAI+D'2002, Secretaría de Ciencia y Técnica, Proyectos N° 155 y 156), el Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) (Proyecto PIP 02035/2000-2002) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina) (Proyecto PICT 2001 N°09-08200).

MUTANTES ESPONTANEOS FAGORRESISTENTES DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PARA APLICACIONES INDUSTRIALES.

GUGLIELMOTTI, Daniela M.; QUIBERONI, Andrea y REINHEIMER, Jorge A.

Instituto de Lactología Industrial - Facultad de Ingeniería Química - Universidad Nacional del Litoral - Santiago del Estero 2829 - 3000, Santa Fe, Argentina. T.E. (0342) 453-0302. Fax (0342) 457-1162. e-mail: dgugliel@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN

Se aislaron y caracterizaron 44 mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de 3 cepas comerciales de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (identificadas Ab₁, YSD V e Ib₃), utilizando sus fagos líticos (ϕ YAB, ϕ BYM y ϕ Ib₃). Luego de ser confirmada y caracterizada la fagorresistencia de las variantes, se determinaron sus propiedades tecnológicas (cinéticas de acidificación, actividades proteolítica y acidificante). La actividad acidificante permitió clasificarlas en variantes “lentas” y “rápidas”. Las variantes “rápidas” mostraron mayor actividad proteolítica y velocidad de acidificación. Este trabajo reveló que es posible aislar mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas sensibles de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que mantengan las propiedades tecnológicas originales.

Palabras claves: bacteriofago, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mutantes fagorresistentes.

ABSTRACT

A total of 44 spontaneous phage-resistant mutants were isolated from 3 commercial strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (identified Ab₁, YSD V and Ib₃) by using their lytic phages (ϕ YAB, ϕ BYM and ϕ Ib₃). Once the phage-resistant phenotype was confirmed and characterized, technological properties of the variants were determined (acidifying kinetics, proteolytic and acidifying activities). Acidifying activities rates allowed classifying them in “slow” and “fast” variants. “Fast” mutants showed higher proteolytic activities and faster acidifying kinetics than the “slow” ones. This work demonstrated that it is possible to isolate phage-resistant mutants from sensitive strains of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* that could be used in the dairy industry.

INTRODUCCIÓN

La infección fágica representa un grave problema en la industria láctea fermentativa, donde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es usado como starter en las elaboraciones de yogur, junto a *Streptococcus thermophilus*. La contaminación por fagos virulentos puede resultar en la lisis de las cepas del starter durante elaboraciones de quesos o yogur, causando fermentaciones lentas o la total paralización del proceso. Debido a la importancia de esta problemática, y a la escasa información acerca de fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, la obtención de mutantes espontáneos fagorresistentes con aptitud tecnológica, se puede plantear como una de las estrategias de defensa más simples aplicables en la actualidad (Moineau, 1999) a nivel industrial. El objetivo del presente trabajo estuvo orientado al aislamiento y caracterización de mutantes espontáneos fagorresistentes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* obtenidos a partir de cepas de alta sensibilidad fágica usadas en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

★ **Cepas, fagos y condiciones de cultivo.** Las variantes se aislaron a partir de tres cepas comerciales de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Ab₁, YSD V e Ib₃) con sus fagos líticos (ϕ YAB, ϕ BYM y ϕ Ib₃, respectivamente). Se empleó caldo MRS para el desarrollo y reactivación de las cepas (over-night a 42°C), así como para la propagación de los fagos. Las partículas fágicas se enumeraron en agar MRS por el método de la doble capa agarizada (Svensson and Christiansson, 1991).

★ **Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes.** Se utilizaron dos metodologías, a) cultivos secundarios (Callegari, 1992; Carminati y col., 1993) y b) medio agarizado (Reinheimer y col., 1993).

★ **Caracterización del fenotipo fago resistencia.** Se determinó:

- Estabilidad de la fagorresistencia: mediante repiques sucesivos de las variantes con el agregado de nuevas dosis de fagos (Carminati y col., 1993).
- Nivel de fago resistencia: eficiencia de plaqueo (EOP= relación entre el título fágico logrado sobre el mutante resistente y el correspondiente a la cepa sensible) (Sechaud y col., 1989).
- Lisogenia espontánea: mediante centrifugación de un cultivo de los mutantes y posterior titulación del sobrenadante (fagos potencialmente liberados) sobre la cepa sensible (Reinheimer y col., 1995).
- Tasas de adsorción: determinación de la tasa de fagos adsorbidos luego de 30 min a

42°C (Carminati y col., 1993) sobre las variantes fagorresistentes, en comparación con la cepa sensible.

★ **Caracterización bioquímica de los mutantes fago resistentes.** Mediante el *perfil fermentativo de azúcares* (API 50 CHL, Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France).

★ **Caracterización tecnológica de los mutantes fago resistentes.**

- *Actividad acidificante*: % de ácido láctico obtenido en leche (24 hs, 42°C).

- *Actividad proteolítica*: OPA test, ($A_{\lambda, \text{máx}} = 340 \text{ nm}$) (Church y col., 1983), a partir de cultivos en leche (24 hs, 42°C).

- *Cinéticas de acidificación*: se determinó pH a distintos tiempos (entre 0 y 24 hs) para cultivos en leche (42°C).

- *Carácter "fast"/ "slow"*: por cultivo de las variantes en LDR (leche descremada reconstituida); LDR + 0,25% hidrolizado de caseína, y LDR + 1% Glucosa. Luego de 24 hs a 42°C, se determinó el pH de los cultivos (Mc Kay y Baldwin, 1974; Efstathio y Mc Kay, 1976).

-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

★ **Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes.** En general, se observó una mayor recuperación de mutantes fagorresistentes cuando se utilizó la metodología de *cultivos secundarios* en comparación con *medio agarizado*. Considerando ambas metodologías, fue posible aislar un total de 29 variantes presuntivas cuando se utilizó el ϕ YAB, de las cuales 20 (69%) fueron confirmadas como verdaderos mutantes fagorresistentes. Cuando se usó el ϕ BYM fueron aislados 20 mutantes presuntivos, de los cuales sólo 12 (60%) fueron confirmados como tales. Asimismo, fue posible aislar 12 mutantes verdaderos de un total de 40 variantes presuntamente fagorresistentes (30%) cuando se utilizó el ϕ lb₃ (Tabla 1).

★ **Caracterización del fenotipo fagorresistencia.**

- *Estabilidad de la fago resistencia*. Se observó una elevada estabilidad (> 7 repiques) del fenotipo fagorresistencia en los mutantes derivados de las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V y Ab₁. La estabilidad fue más heterogénea para las variantes obtenidas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lb₃ (Tabla 2).

Nivel de fagorresistencia (E.O.P). Ninguno de los mutantes aislados fue capaz de formar placas de lisis cuando se ensayaron con suspensiones fágicas de alto título (> 10⁷ UFP/ml) (valores de E.O.P < 3.10⁻⁷).

Lisogenia espontánea. No se observó liberación espontánea de fagos en ninguno de los

mutantes fagorresistentes aislados.

Tasas de adsorción. Las variantes fagorresistentes obtenidas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁ exhibieron tasas de adsorción muy bajas o nulas (0-37%), demostrando que el mecanismo de fagorresistencia involucrado es de tipo extracelular (bloqueo en la adsorción). Por el contrario, se observaron elevadas tasas de adsorción para los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (> 97%), y los valores fueron muy heterogéneos para las variantes aisladas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ib₃ (0 - > 99%), postulándose bloqueos en la inyección del ADN fágico y/o mecanismos de resistencia intracelulares (**Fig. 1**)

Tabla 1: Mutantes espontáneos fago resistentes obtenidos a partir de cepas fago sensibles de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mediante cultivos secundarios (CS) y en medio agarizado (MA).

Cepa (<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	Fago	Total de mutantes fago resistentes (presuntivos)		Total de mutantes fago resistentes (confirmados)		Eficiencia (%) de la recuperación de mutantes confirmados	
		CS	MA	CS	MA	CS	MA
Ab ₁	φ YA B	23	6	19	1	83%	17%
YSD V	φ BY M	20	-	12	-	60%	-
Ib ₃	φ Ib ₃	33	7	10	2	30%	29%

Tabla 2: Estabilidad de la fago resistencia en mutantes espontáneos fago resistentes de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (% de mutantes que resisten sucesivos repiques en presencia de fagos, sin perder el fenotipo).

Cepa	Fago	Número de repiques						
		1	2	3	4	5	6	7
Ab ₁ (n _R = 20)	φ YAB	100	100	100	100	100	100	95
YSD V (n _R = 12)	φ BYM	100	100	100	100	100	100	100
Ib ₃ (n _R = 12)	φ Ib ₃	100	100	100	83,3	41,7	41,7	41,7

n_R: número de mutantes espontáneos fago resistentes confirmados, aislados a partir de cada cepa sensible

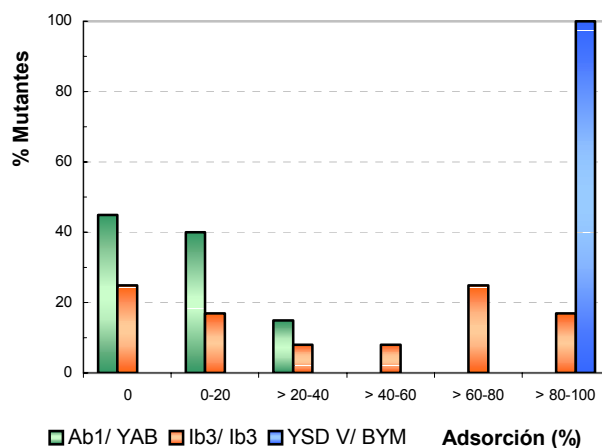


Fig. 1: Distribución porcentual de las tasas de adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas a 42°C – 30 min) exhibidas por los mutantes aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁, Ib₃ e YSD V bajo presión selectiva de los fagos YAB, Ib₃ y BYM, respectivamente.

★ **Caracterización bioquímica de los mutantes fago resistentes.** El perfil fermentativo de azúcares de los tres grupos de mutantes aislados resultó similar al de sus correspondientes cepas sensibles.

★ **Caracterización tecnológica de los mutantes fagorresistentes.**

- **Actividad acidificante:** Se observó un comportamiento heterogéneo para las variantes aisladas a partir *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁, siendo posible clasificarlas en “rápidas” (1,60 ± 0,08 % de ácido láctico) y “lentas” (0,33 ± 0,04 %). Por otro lado, en el caso de los mutantes aislados a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V e Ib₃, se obtuvieron sólo variantes fagorresistentes “rápidas” (1,22 ± 0,12 y 1,39 ± 0,09 % de ácido láctico, respectivamente) (**Fig. 2**).

- **Actividad proteolítica:** La actividad proteolítica resultó marcadamente superior para todas las variantes clasificadas como “rápidas” (entre 0,41 y 1,69) y muy baja para las “lentas” (entre 0,06 y 0,12) (**Fig. 2**).

- **Cinéticas de acidificación:** Las cinéticas de acidificación de las variantes “rápidas” fueron similares a las exhibidas por las respectivas cepas madres, en tanto que resultaron significativamente diferentes (menor pendiente) para los mutantes “lentos” (**Figs. 3, 4 y 5**).

Carácter “fast”/ “slow”: Las variantes “lentas” (pH= 5,75 ± 0,15, LDR) obtenidas a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁ desarrollaron y acidificaron la leche hasta valores de pH similares a los de las variantes “rápidas” (pH= 4,03 ± 0,14) sólo cuando ésta fue adicionada de hidrolizado de caseína (pH= 3,79 ± 0,15). El agregado de glucosa modificó ligeramente el desarrollo de los cultivos (pH= 5,16 ± 0,53). Esto demuestra que

dichas variantes poseen déficit de actividad proteolítica (Prt⁻).

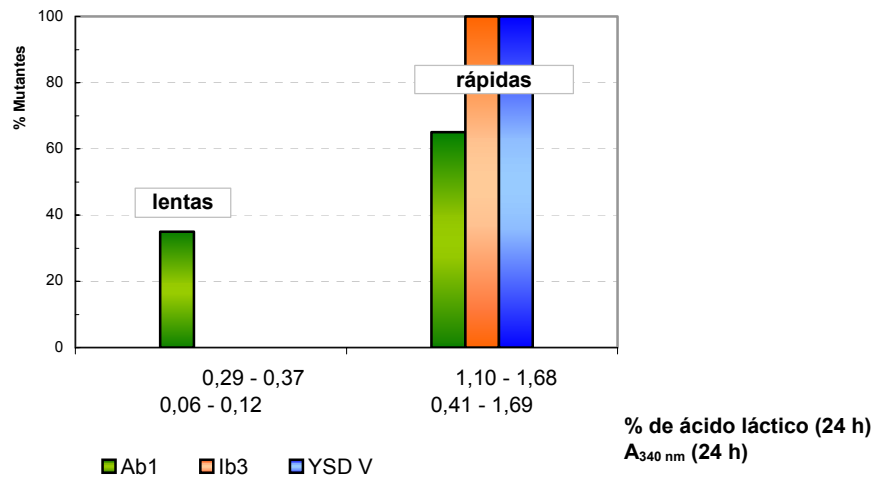


Fig. 2: Distribución porcentual de los mutantes fagorresistentes de acuerdo a su actividad acidificante y proteolítica.

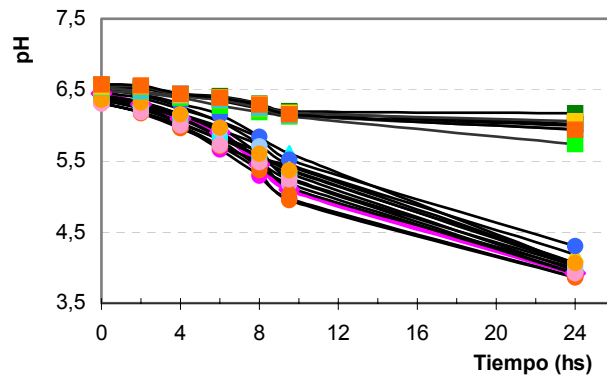


Fig. 3: Cinéticas de acidificación en leche de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab₁ (—) y sus mutantes fagorresistentes (—) (n_R = 20) a 42°C.

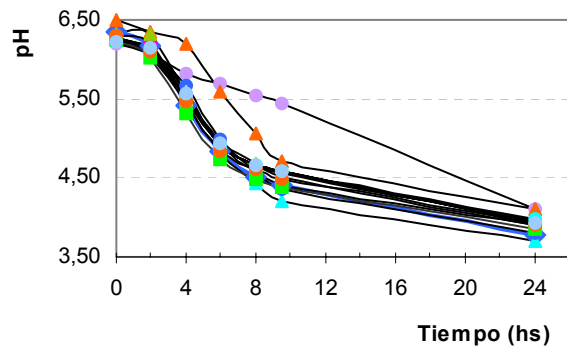


Fig. 4: Cinéticas de acidificación en leche de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ib₃ (—) y sus mutantes fagorresistentes (—) (n_R = 12) a 42°C.

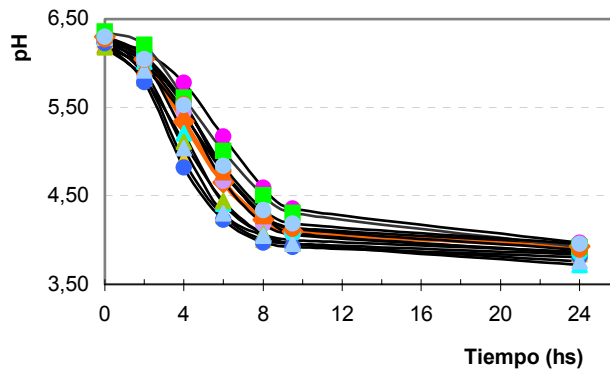


Fig. 5: Cinéticas de acidificación en leche de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (—) y sus mutantes fagorresistentes (—) ($n_R = 12$) a 42°C.

CONCLUSIONES

Este trabajo demostró que es posible aislar mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sensibles a fagos que conservan las propiedades tecnológicas de la cepa original.

BIBLIOGRAFÍA

- Callegari, M.L. Caratterizzazione dei recettori de pare specifici per l'adesione dei batteri lattici termofili. Tesis presentada para obtener el título de Dottore di Ricerca della Università Católica del Sacro Cuore. Piacenza. Italia (1992).
- Carminati, D., Zennaro, R., Neviani, E.; Giraffa, G. Selezione e caratteristiche di mutanti fago-resistenti di *L. helveticus*. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* **44**(1), 33-48 (1993).
- Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H. and Catignain, G. L. Spectrophometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* **66**, 1219-1227 (1983).
- Efstathio, J. D. and Mc Kay, L. L. Plasmids in *S. thermophilus*. Evidence that lactose metabolism and proteinase activity sre plasmid linked. *American Society for Microbiology* **32**, 38-44 (1976).
- Mc Kay, L. L. and Baldwin, K. A. Simultaneous loss of proteinase and lactose utilizing enzymes activities in *Lactococcus* and reversae of loss by transduction. *American Society for Microbiology* **20**, 342-346 (1974).
- Moineau, S. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* **76**, 377-382 (1999).

Quiberoni, A.; Reinheimer, J. A. and Tailliez, P. Characterization of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage resistant mutants by RAPD-PCR fingerprints and phenotypic parameters. *Food Res. Int.* 31, 537-542 (1998).

Reinheimer, J. A., Morelli, R., Callegari, M. L. and Bottazzi, V. Phage resistance in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 328. *Microbiologie- Aliments- Nutrition* 11, 235-240 (1993).

Reinheimer, J. A.; Suárez, V. B.; Bailo, N. B.; and Zalazar, C. A. Microbiological and Technological Characteristics of Natural Whey Cultures for Argentinian Hard-Cheese Production. *Journal of Food Protection* 58 (7), 796- 799 (1995).

Sechaud, L.; Callegari, M.L.; Rousseau, M.; Muller, M.C. and Accolas, J.P. Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus* (1989).

Svensson, U. and Christiansson, A. (1991). Methods for phage monitoring. Cap. 4 in Bulletin FIL-IDF n° 63. 29-39.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) (Programación CAI+D'2002, Secretaría de Ciencia y Técnica, Proyectos N° 155), el Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) (Proyecto PIP 02035/2000-2002) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina) (Proyecto PICT 2001 N°09-08200).

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE REMOCIÓN Y DESINFECCIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA INDUSTRIA JUGUERA

BRUGNONI Lorena I. ⁽¹⁾ , LOZANO Jorge E. ⁽²⁾

(1) Universidad Nacional del Sur. Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos. San Juan 670. Bahía Blanca. Tel: 0291-4595129. FAX: 0291-4595130. E-mail: brugnoni@uns.edu.ar

(2) PLAPIQUI (UNS-CONICET). Camino La Carrindanga Km 7. Bahía Blanca. Tel: 0291-4861700. FAX: 0291-4861600. E-mail: jlozano@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

Se investigó la actividad sanitizante del hipoclorito de sodio a concentraciones de 150 mg/L de cloro libre y pH 6.5 sobre levaduras contaminantes del jugo de manzana fresco. Las mismas se adhirieron a superficies de acero inoxidable y los efectos de remoción y desinfección se evaluaron por separado mediante la enumeración de microorganismos viables por recuento en placa y microscopía de epifluorescencia para recuento de células totales. La cuantificación por ambos métodos determinó que la pérdida de actividad celular fue mayor del 90% en todos los casos, y la remoción, sólo 40 y 25% para tiempos de adhesión de 2 y 5 horas respectivamente. Nuestros resultados confirman que los efectos de remoción y muerte no son comparables ($p < 0.05$), predominando el segundo sobre el primero a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleadas por la industria.

Palabras Clave: jugo de manzana-*Rhodotorula rubra*-hipoclorito de sodio-acero inoxidable

ABSTRACT:

The sanitizing activity of sodium hypochlorite at 150 mg/L of active chlorine and pH 6.5 was investigated against the spoilage yeast *Rhodotorula rubra* isolated from fresh apple juice. The adhesion was made on sterile stainless steel surfaces and the removal and disinfection percentages were calculated through the use of epifluorescence microscope using orange acridine to count the total cell numbers and plate count for viable enumeration respectively. The quantification for both methods determined that the loss of cellular activity was more than 90% in all cases, while the remotion, only 40 and 25% for 2 and 5 hours to attachment. Our results confirm that the effects of remotion and death are

not compared processes ($p < 0.05$), predominating the effect of disinfection on the removal at sodium hypochlorite concentrations used in this industry.

INTRODUCCIÓN

Es común observar que en una planta procesadora de jugos de manzana y pera, comienzan a aparecer problemas de contaminación del producto durante el segundo año a partir de su instalación. Esta situación es producto de la presencia de microorganismos en la materia prima con capacidad de adherirse y proliferar en las superficies que forman parte de los equipos de producción.

En la mayoría de las industrias elaboradoras de alimentos las líneas de producción son limpiadas diariamente a fin de asegurar la calidad y seguridad del producto. El lavado y la desinfección, cuando se efectúan correctamente, ayudan a mantener a lo largo del proceso de elaboración, niveles óptimos de sanidad que se reflejan en la calidad final del alimento. En el caso del control de los microorganismos involucrados en el deterioro de jugos de fruta, la información es escasa. Existen diversos procesos en línea de limpieza de equipos, denominados comúnmente CIP (clean-in-place) cuya implementación requiere conocer las características del producto elaborado: su contenido en proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales, etc., a fin de elegir el programa CIP más adecuado que permita su remoción y la eliminación de los microorganismos presentes.

Dado que la mayor parte de la línea de proceso está en contacto con jugo de manzana con una concentración de sólidos de 9 - 15 % y un pH de 3 - 3.5, no deben esperarse desarrollos bacterianos importantes, sí en cambio crecimiento de levaduras y en menor escala de mohos. Dada su modalidad facultativa, el desarrollo de levaduras puede obstruir cañerías de proceso en un tiempo limitado. El hipoclorito de sodio es el agente sanitizante más utilizado en la industria alimentaria en concentraciones de cloro activo que varían entre 50 y 200 mg/L. Entre estos valores, más del 99% de los microorganismos adheridos deberían eliminarse sin causar corrosión cuantificable sobre el acero inoxidable aún por períodos prolongados de exposición (Qin y col., 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de adhesión se llevaron a cabo sobre segmentos de 1.5 X 7.5 cm de acero inoxidable desengrasados con detergente neutro, sumergidos en alcohol al 70% durante 1 hora, enjuagados con agua destilada y esterilizados en autoclave a 121°C durante 15

minutos. La cepa levaduriforme utilizada, *Rhodotorula rubra*, fue aislada en agar glucosado al 4 % a partir de jugo de manzana fresco e identificada por sus características culturales, morfológicas y bioquímicas en nuestro laboratorio. Un cultivo puro fue inoculado en caldo glucosado al 2% e incubado a 25°C por 24 h. A partir del mismo se preparó el inóculo utilizado en los ensayos de adhesión en jugo de manzana clarificado estéril con una concentración de aproximadamente 5×10^6 células/ml, determinada por absorbancia a 550 nm y posterior enumeración en agar glucosado al 4%. La solución sanitizante (150 mg/L de cloro activo, pH 6.5) se preparó en agua destilada estéril a temperatura ambiente a partir de hipoclorito de sodio comercial (60 g/L), y la determinación de cloro activo se realizó a través del Método iodométrico de VOGEL para la valoración de cloro activo (De la Canal y Asociados, 1997). Los ensayos de adhesión se llevaron a cabo aplicando volúmenes de 2 ml sobre los segmentos de acero inoxidable que se incubaron sin agitación durante 2 horas a 23°C para permitir la adhesión de las células levaduriformes. Posteriormente, las superficies fueron lavadas con agua destilada estéril pH 6.5 (3 veces durante 1 min) a fin de remover los microorganismos ligeramente adheridos y se continuaron los ensayos de adhesión cubriendo las superficies con jugo de manzana estéril durante 5, 10, 24 y 48 h. Las superficies así obtenidas fueron sumergidas en la solución sanitizante (tratamientos) o en agua destilada estéril pH 6.5 (controles) durante 5 minutos a 23°C. A continuación, los segmentos se enjuagaron con agua destilada estéril pH 6.5 (3 veces durante 1 min) para eliminar cualquier resto del sanitizante. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El recuento convencional se realizó por agregado de agar glucosado al 4% directamente sobre las superficies tratadas y por recuento en placa (RP) previo hisopado en las muestras sin tratar. La incubación se realizó a 25°C durante 72-96 hs. Para el recuento por microscopía de epifluorescencia (ME) de células adheridas se tiñeron las superficies tratadas y control con una solución de naranja de acridina al 0.025% en buffer fosfato pH 7.5 durante 2-3 minutos a fin de obtener una coloración naranja brillante altamente estable durante el tiempo de recuento (Rossoni y col., 2000). La observación se realizó con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 51 con un aumento total de 700 X. Las imágenes se obtuvieron con cámara digital. Se contaron como mínimo 25 campos de 2.83×10^{-2} mm² de superficie en cada uno de los triplicados.

El porcentaje de remoción se calculó como la diferencia entre los recuentos por ME de células adheridas a las superficies no tratadas (controles) y células adheridas a las superficies tratadas:

$$\% \text{ de remoción (ME)} = \frac{(\text{células sin tratar} - \text{células tratadas})}{\text{células sin tratar}} \times 100 \quad (A)$$

El porcentaje de células viables se calculó como el cociente entre el recuento por RP de células tratadas y células sin tratar:

$$\% \text{ de células viables (RP)} = (\text{células tratadas} / \text{células sin tratar}) \times 100 \quad (B)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se observan los recuentos por ambos métodos expresados como el logaritmo de unidades formadoras de colonias por área de superficie \pm el desvío estándar (Log UFC/superficie \pm DS). Los datos revelan que, en ensayos de 2 y 5 h de adhesión, un número importante de células adheridas (1.04 y 1.13 log respectivamente) no fueron enumeradas por el método de recuento en placa en las superficies control, siendo las diferencias por ambos métodos significativas ($p < 0.05$). Luego de 5 minutos de sanitización con una solución de 150 mg/L de Cl activo, el número de células viables decrece en 4.770 y 4.950 log respectivamente. Los resultados indican que el tratamiento propuesto reduce el número de microorganismos viables a valores cercanos a 5 unidades logarítmicas. Es importante notar que los ensayos de recuento por microscopía de fluorescencia deben limitarse a biofilms en monocapas (en nuestro caso, tiempos de contacto entre la superficie y el inóculo de hasta 5 h aproximadamente) ya que biofilms de mayor grosor dificultan la interpretación de las imágenes (Doyle y col., 1997). Aplicando (A), el porcentaje de remoción en las condiciones de nuestro ensayo para tiempos de adhesión de 2 y 5 h fue de 40 y 25 % respectivamente. Se ha informado que concentraciones de Cl libre entre 15 y 100 mg/L inducen un desprendimiento sustancial (mayor de un 25%) de células (Chen y col., 2000) . La utilización de un colorante fluorescente que se une tanto a las células viables como no viables permite poner de manifiesto sólo el efecto de remoción del hipoclorito de sodio, no su poder germicida (Figura 1 A, B, C y D). Aplicando (B), se obtiene que el valor de células viables es menor que 0.01%, lo que permite concluir que los efectos combinados de remoción y desinfección del hipoclorito de sodio superan el 99 % en todos los tiempos de contacto. El RP permite conocer el número de células viables presentes en las superficies antes y después del tratamiento, pero no discriminar entre los efectos de remoción y desinfección del sanitizante. En el caso de las muestras donde se permitió la adhesión por 5 h, ha sido

ampliamente establecido que el tiempo de contacto superficie-microorganismo incrementa la fuerza de unión de las células al sustrato, siendo, por lo tanto, más difícil la remoción de las mismas. Lo anterior podría explicar los valores menores de remoción a las 5 h con respecto a las muestras con 2 h de adhesión.

Tabla 1: Enumeración de células de *Rhodotorula rubra* adheridas a acero inoxidable por 2, 5, 10, 24 y 48 h antes (muestras sin tratar) y después (muestras tratadas) del tratamiento con 150 mg/L de cloro activo

Tiempo de contacto (h)	Muestras no tratadas		Muestras tratadas	
	RP (Log UFC/superficie ± DS)	ME (Log células/superficie ± DS)	RP (Log UFC/superficie ± DS)	ME (Log células/superficie ± DS)
2	5.117 ± 0.150	6.156 ± 0.009	0.347 ± 0.099	5.922 ± 0.126
5	5.165 ± 0.096	6.293 ± 0.070	0.215 ± 0.060	6.173 ± 0.174
10	6.145 ± 0.031	-	0.538 ± 0.120	-
24	6.418 ± 0.050	-	1.895 ± 0.120	-
48	8.086 ± 0.040	-	2.414 ± 0.064	-

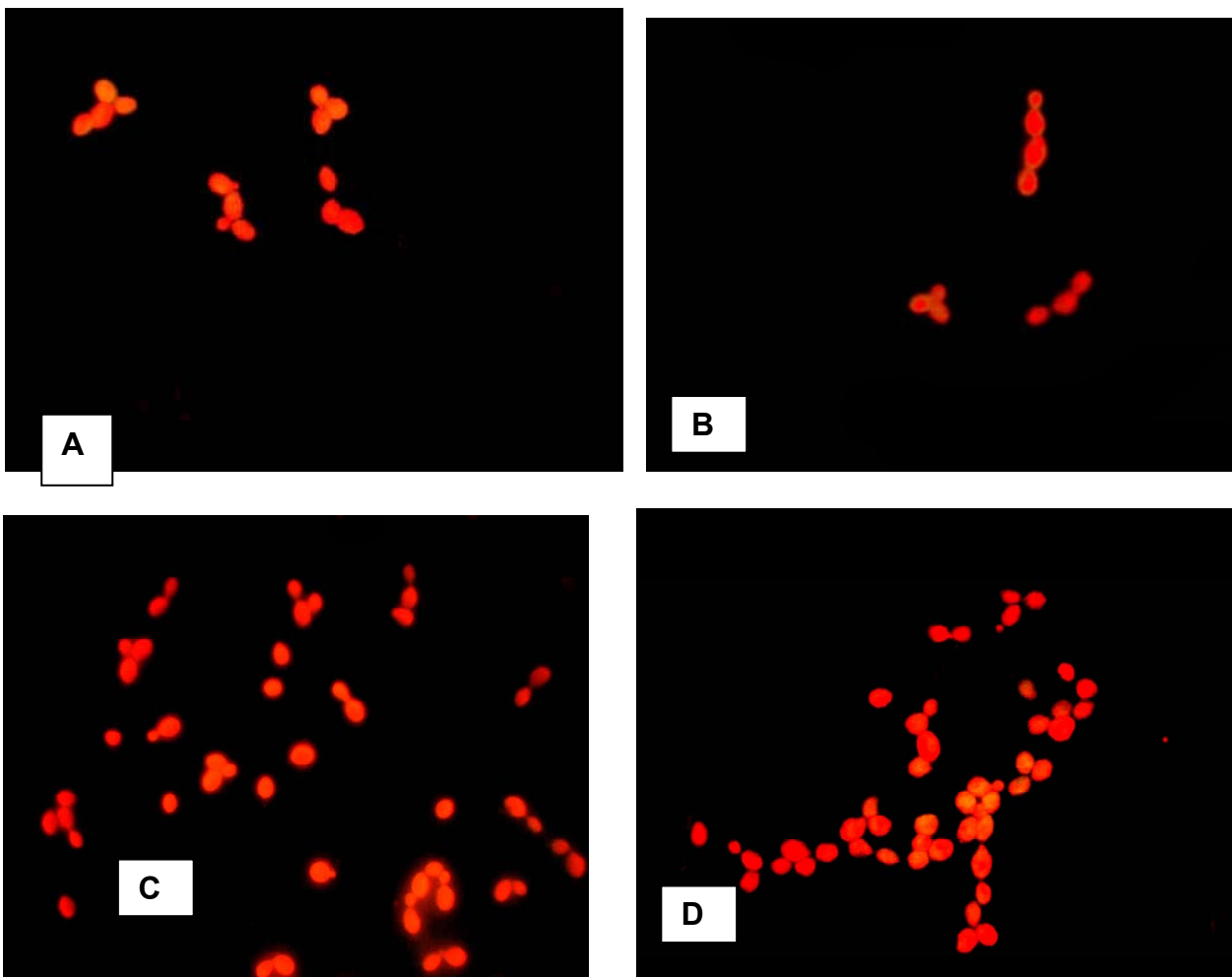


Figura 1 A, B ,C y D: Células de *Rhodotorula rubra* adheridas durante 2 h a acero inoxidable antes (Figura 1 C, D) y después del tratamiento con 150 mg/L de cloro activo durante 5 minutos (Figura 1 A y B). Aumento: 700 X, Resolución 1024 X 800.

CONCLUSIONES:

En la actualidad, el principal desafío de las industrias elaboradoras de alimentos consiste en conocer el número real de células que resisten la aplicación de un sanitizante, es decir, aquellas que conservan su actividad. Los métodos microbiológicos convencionales de enumeración de microorganismos adheridos a superficies se basan en la remoción mecánica de las células, seguido del recuento de las colonias formadas (RP). Estas técnicas requieren de tiempos de incubación prolongados, que en el caso de las levaduras se extienden entre 4 y 7 días. Los métodos de recuento de células basado en la utilización de tinciones fluorescentes permiten conocer en forma rápida, sencilla y sensible el número real de células que permanecen en una superficie (ME).

Aunque los porcentajes de remoción obtenidos son relevantes, no son suficientes para garantizar una limpieza óptima de los equipos.

El crecimiento microbiano en las superficies en contacto con materias primas y alimentos origina biofilms, los que se han definido como un consorcio de microorganismos que desarrollan dentro de un período definido, dependiendo de ciclos de sanitización y desinfección programados (Christensen y col., 1990; Costerton y col., 1987; Flemming y col., 1992). Inclusive, si las células en el biofilm mueren durante el proceso de sanitización, los depósitos remanentes proveen sitios que favorecen la recolonización cuando se introducen al sistema células viables.

Los resultados obtenidos indican que es necesario incorporar agentes químicos genéricamente denominados detergentes sin los cuales muchas veces el lavado a fondo es imposible.

Aplicando(A), el porcentaje de remoción en las condiciones de nuestro ensayo para tiempos de adhesión de 2 y 5 h fue de 40 y 25 % respectivamente. Se ha informado que concentraciones de Cl libre entre 15 y 100 mg/L inducen un desprendimiento sustancial (mayor de un 25%) de células (Chen y col., 2000) .

La utilización de un colorante fluorescente que se une tanto a las células viables como no viables permite poner de manifiesto sólo el efecto de remoción del hipoclorito de sodio, no su poder germicida (Figura 1 A, B, C y D). Aplicando (B), se obtiene que el valor de células viables es menor que 0.01%, lo que permite concluir que los efectos combinados de remoción y desinfección del hipoclorito de sodio superan el 99 % en todos los tiempos de contacto.

BIBLIOGRAFÍA:

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.C., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasguta, M. and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.

Chen, X. and Stewart P, (2000). Biofilm removal caused by chemical treatments. *Wat. Res.* 34 (17), 4229-4233.

Christensen, B.E. and Characklis, W.G. Biofilm processe. In: Characklis, W.G. and Marshall, K.C. (eds.) *Biofilms.* John Wiley & Sons, New York. 1990b, pp. 523-584.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. editors. 1997. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y fronteras.* Págs. 23-27.

Flemming H.C., Schaule G. and McDonogh R. Biofouling on membranes-a short review. In: Melo L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville B. (eds.). *Biofilms-Science and Technology.* Kluwer Academic Publications, Dordrecht. 1992, pp. 113-124

Normas de Comercio para uso Doméstico y Tocador. Res. SIC N° 364 del 28-11-91. En Anexo III. Métodos de Ensayo. De la Canal y Asociados S.R.L. eds. Nov. 1997. Bs. As

Qin, G.F., Li, Z.Y., Chen, X.D. and Russel, A.B. 2002. An experimental study of an NaClO generator for antimicrobial applications in the food industry. *Journal of Food Engineering* 54: 111-118

Rossoni E.M.M. and Gaylarde, C.C. 2000. Comparision of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 81-85

PROPUESTA DE PARAMETROS DE CALIDAD HIGIENICO-SANITARIA PARA YERBA MATE ELABORADA

DUCE, Jorge A*; BORDENAVE Sylvia A; YBARRA, Liliana R.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552. 3300-Posadas-Misiones. TEL: 03752-422186
FAX: 03752-42541 *joduce@fceqyn.unam.edu.ar ; *joduce@ciudad.com.ar

RESUMEN

El equipo de trabajo investigó la calidad higiénico-sanitaria de 60 marcas distintas de yerba mate elaborada, con el objeto de determinar parámetros medios de calidad que pudieran ser propuestos como referencia.

En las muestras se realizaron recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, coliformes totales y fecales, hongos y levaduras siguiendo técnicas propuestas por Normas IRAM.

Se encontró que, el 61% de las muestras presentan valores de aerobios mesófilos totales <3000 UFC/g.

En hongos y levaduras, el 63,33% de las marcas presentan valores < 500 UFC/g y el 60 % de las mismas presentan valores de coliformes totales < 100 NMP/g. No se encontraron coliformes fecales.

Proponemos, en función de los valores hallados que la yerba mate elaborada se ajuste inicialmente a valores máximos de aerobios mesófilos totales < 1000 UFC/g, coliformes totales < 100 NMP/g, hongos y levaduras < 1000 UFC/g, y ausencia de coliformes fecales y microorganismos patógenos.

Palabras Clave: yerba mate -microbiología-parámetros

ABSTRACT

The research team investigated the hygienic-sanitary quality of 60 different trademarks of elaborated yerba mate to determine standard parameters that could be proposed as reference.

The counting of microorganisms: total aerobic mesophilic, total and faecal coliforms, fungi and yeasts was carried out in the samples following the techniques proposed by IRAM Norms.

In 61% of the samples, it was found values of total aerobic mesophilic are < 3000 UFC/g. In fungi and yeasts, 63, 33 % of the trademarks presents values < 500 UFC/g and in a 60% of these trademarks the value of total coliforms is < 100 NMP/g. Faecal coliforms were not found.

In view of the values found, we suggest elaborated yerba mate to be initially adjusted to the < 1000 UFC/g limits, for aerobic total mesophilic intervals < 100 NMP/g, and that faecal coliforms and pathogenic microorganisms should not be present.

Key Words: yerba mate- microbiology- parameters.

INTRODUCCION

El cultivo y la producción de la yerba mate es una de las actividades económicas más importantes de nuestra provincia, consecuentemente se ha estudiado y legislado sobre su calidad desde el punto de vista físico-químico. Pero en cuanto a su calidad higiénico-sanitaria, existen pocos estudios y ninguna legislación.

El grupo de investigación trabajó los últimos años en la variación del contenido microbiano de la yerba mate durante su procesamiento (recepción-sapecado-secado-canchado-estacionamiento y molienda). Para ello se tomaron un total de 80 muestras. Y los puntos de muestreo fueron: planchada-salida de sapecadora, cinta de secado superior (100°C), cinta de secado inferior (120°C) y a la salida de la canchadora.

En cada unidad analítica se determinó aerobios mesófilos totales, coliformes totales y fecales y hongos y levaduras.

Se detectaron valores de recuento alto en planchada, que luego decrecían durante el sapecado (proceso de calentamiento térmico a alta temperatura y corto tiempo) y secado, para incrementarse luego del proceso de canchado (molienda gruesa que produce la yerba mate canchada).

Los valores de recuento de aerobios mesófilos totales, coliformes totales, coliformes fecales y hongos y levaduras encontrados en el proceso de canchado, coincidían con los valores máximos propuestos por la Legislación paraguaya, lo cual nos pareció un antecedente valido para futuras investigaciones. En trabajos realizados en yerba mate canchada (4) y yerba mate elaborada (5), se encontró que todos los recuentos se incrementan en gran forma, lo que se considera se debe a deficiencias higiénico-sanitarias en el establecimiento y posterior molienda y envasado.

Los resultados fueron presentados al II Congreso Sudamericano de la yerba mate realizado en Chapecó- Brasil en noviembre de 2003.

Como una continuación de ese trabajo, en el año 2004 se decidió investigar la calidad higiénico-sanitaria de yerba mate elaborada en 60 marcas comerciales diferentes, con el objeto de determinar parámetros medios de calidad que pudieran ser propuestos como valores de referencia.

Para ello, se tuvo en cuenta la Legislación paraguaya que establece intervalos de valores para hongos y levaduras y coliformes totales, como así también los inconvenientes generados en la implementación de la misma en el vecino país al establecerse valores muy bajos para recuentos de hongos y levaduras.

Por otra parte, se consideraron los valores promedios de recuentos de aerobios mesófilos totales, hongos y levaduras, coliformes totales a la salida de la etapa de canchado en el proceso de elaboración de la yerba mate hallados en anteriores trabajos (4,5,7).

MATERIALES Y METODOS

Se realizó el control higiénico-sanitario de la yerba mate a través de la determinación de microorganismos aerobios mesófilos totales, coliformes totales y fecales y de hongos y levaduras.

Se extrajeron muestras siguiendo el muestreo tipo Survey (tal como lo hace el consumidor final) las cuales fueron procesadas en el laboratorio siguiendo la Norma IRAM 20517 para análisis microbiológico, con algunas modificaciones, pues se empleó agua de peptona al 0,1% en vez de solución fisiológica peptonada como lo recomienda la Norma IRAM 20517.

Primeramente, se tomó una unidad analítica de 25 gramos de muestra y se homogeneizó en 225 ml de agua de peptona al 0,1%, luego se realizaron diluciones seriadas, (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) y se sembraron por duplicado en los medios correspondientes para la determinación de cada uno de los microorganismos.

Para determinación de aerobios mesófilos totales se utilizó el medio Plate Count Agar, sembrándose en profundidad e incubándose a 37°C durante 24 horas.

Para determinación de coliformes totales, se sembró primeramente en caldo Lauril Sulfato a 37°C, durante 24-48 horas, los tubos positivos con formación de gas fueron pasados a caldo Brilla e incubados en baño termostático a 45°C durante 24 -48 horas.

Para la determinación de hongos y levaduras se utilizó el medio H y L de laboratorios Britania; se realizó por duplicado la siembra en superficie, y se incubaron las placas en estufa a 30°C durante 3 a 5 días.

RESULTADOS

Se extrajeron muestras de distintas marcas de yerba mate elaborada con palo en paquetes de 250 gramos, 500 gramos y 1000 gramos. Los resultados están expresados en la **TABLA 1**.

TABLA 1: Recuento de aerobios mesófilos totales, coliformes totales, coliformes fecales y hongos y levaduras en yerba mate elaborada.

MUESTRAS DE YERBA MATE ELABORADA	AEROBIOS MESOFILOS TOTALES UFC/g	COLIFORMES TOTALES NMP/g	COLIFORMES FECALES NMP/g	HONGOS Y LEVADURAS UFC/g
Muestra 1.	5,4x10 ²	0	0	3,5x10
Muestra 2.	2x10 ³	0	0	4,5x10 ²
Muestra 3.	2x10 ²	0	0	2x10
Muestra 4.	9x10 ²	0	0	5x10 ²
Muestra 5.	3,5x10 ⁴	2,9x10 ²	0	2x10
Muestra 6.	2,3x10 ³	2,8x10	0	5x10 ²
Muestra 7.	1,3x10 ²	0	0	1,1x10 ²
Muestra 8.	7x10	0	0	4x10
Muestra 9.	2x10 ³	0	0	1x10 ³
Muestra 10.	1,5x10 ²	0	0	10
Muestra 11.	4,4x10 ²	0	0	2x10 ²
Muestra 12.	6x10 ³	0	0	1,3x10 ³
Muestra 13.	3x10 ³	0	0	2,1x10 ³
Muestra 14.	1,4x10 ³	0	0	1,2x10 ²
Muestra 15.	5,5x10 ²	0	0	1,4x10 ²
Muestra 16.	1,3x10 ²	0	0	6x10
Muestra 17.	6,6x10 ³	2,9x10 ²	0	8,5x10 ²
Muestra 18.	8,5x10 ³	3,2x10 ³	0	1,1x10 ³
Muestra 19.	1,3x10 ²	2,8x10	0	7x10
Muestra 20.	2x10 ³	0	0	4x10 ²
Muestra 21.	1,3x10 ²	0	0	10
Muestra 22.	1,5x10 ²	5x10	0	2x10
Muestra 23.	1,5x10 ³	0	0	6x10
Muestra 24.	2,3x10 ²	5x10	0	10
Muestra 25.	2,5x10 ³	0	0	1,2x10 ⁰
Muestra 26.	3,3x10 ⁴	3,2x10 ³	0	3,2x10 ³
Muestra 27.	1,4x10 ²	0	0	0
Muestra 28.	1,6x10 ³	6,5x10	0	4,3x10 ²
Muestra 29.	3,7x10 ³	5,2x10 ²	0	3x10 ³
Muestra 30.	1,3x10 ⁴	0	0	5x10 ²
Muestra 31.	2,8x10 ³	5,2x10 ²	0	5x10 ²
Muestra 32.	3x10 ³	0	0	6x10 ²
Muestra 33.	2,1x10 ⁴	6,4x10 ³	0	2,5x10 ³
Muestra 34.	5,2x10 ⁴	1,77x10 ²	0	2x10 ³
Muestra 35.	1,5x10 ²	2,8x10	0	7x10
Muestra 36.	8,3x10 ³	1,77x10 ²	0	1,1x10 ²
Muestra 37.	2x10 ³	0	0	2,6x10 ²
Muestra 38.	8x10	0	0	6x10
Muestra 39.	1,6x10 ⁴	5,2x10 ²	0	2x10 ²
Muestra 40.	2,8x10 ³	1,77x10 ²	0	3,2x10 ²

Muestra 41.	5x10 ²	2,8x10	0	8,5x10
Muestra 42.	4x10 ⁴	2,9x10 ²	0	4x10 ²
Muestra 43.	4,8x10 ⁴	3,2x10 ³	0	4,5x10 ³
Muestra 44.	1,5x10 ⁴	6,4x10 ³	0	2,9x10 ²
Muestra 45.	4,3x10 ³	3,4x10 ³	0	8x10 ²
Muestra 46.	2,5x10 ⁴	2,8x10	0	0
Muestra 47.	2,3x10 ²	1,77x10 ²	0	3x10 ²
Muestra 48.	6x10 ³	5x10	0	1,3x10 ³
Muestra 49.	2,6x10 ⁴	5,2x10 ²	0	1,1x10 ³
Muestra 50.	2x10 ⁵	1,77x10 ²	0	3x10 ⁴
Muestra 51.	1,8x10 ⁴	2,9x10 ²	0	1,6x10 ³
Muestra 52.	2,5x10 ³	0	0	5x10 ²
Muestra 53.	4,3x10 ³	3,2x10 ³	0	1,4x10 ³
Muestra 54.	2,7x10 ³	2,2x10 ³	0	1x10 ³
Muestra 55.	7x10	0	0	0
Muestra 56.	2,8x10 ⁴	1,77x10 ²	0	4x10 ²
Muestra 57.	2,2x10 ⁴	3,2x10 ³	0	3,3x10 ³
Muestra 58.	1,8x10 ⁴	3,2x10 ³	0	3,8x10 ³
Muestra 59.	3,2x10 ²	1,77x10 ²	0	4x10
Muestra 60.	7x10 ²	2,8x10	0	1x10 ²
Muestra 61.	3,2x10 ²	2,8x10	0	6x10

TABLA 2: Porcentajes de yerba mate elaborada que se ajustan a valores máximos propuestos.

VARIABLES	% de las muestras
Aerobios mesófilos totales < 100 UFC/g	5 % de las muestras
Aerobios mesófilos totales < 550 UFC/g	31,66% de las muestras
Aerobios mesófilos totales < 1000 UFC/g	36,66% de las muestras
Aerobios mesófilos totales < 5000 UFC/g	68,33% de las muestras
Aerobios mesófilos totales < 10000 UFC/g	73,30% de las muestras
Hongos y levaduras < 100 UFC/g	30% de las muestras
Hongos y levaduras < 500 UFC/g	63,33% de las muestras
Hongos y levaduras < 1000 UFC/g	73,33% de las muestras
Hongos y levaduras < 5000 UFC/g	98,33% de las muestras
Coliformes totales < 10 NMPC/g	41,66% de las muestras
Coliformes totales < 100 NMP/g	58,33% de las muestras
Coliformes totales < 500 NMPC/g	75% de las muestras

TABLA 3: Muestras que se ajustan a la Legislación paraguaya.

VARIABLES	% de las muestras
Hongos y levaduras < 1500 UFC/g (1)	83,33 %
Hongos y levaduras < 100 UFC/g (2)	33,33 %
Coliformes totales < 200 NMP/g (1)	73,33 %
Coliformes totales < 90 NMP/g (2)	60 %
Valor máximo (1)*	63,33 %
Valor mínimo (2)*	31,16 %

La Legislación paraguaya establece que de cinco muestras analizadas, dos deben estar por debajo del valor mínimo y tres pueden estar debajo del valor máximo.

TABLA 4: Muestras que se ajustan a los valores máximos hallados a la salida del proceso de canchado .

VARIABLE	% de las muestras
Hongos y levaduras < 1000 UFC/g	73,33%
Aerobios mesófilos totales < 3000 UFC/g	65%
Coliformes totales < 3000 NMP/g	58,33%
Muestras que se ajustan a los valores máximos anteriores.	50%

DISCUSION

De los resultados se observa que, proponer valores bajos iniciales en los recuentos de aerobios mesófilos totales y hongos y levaduras conduce a restringir la circulación de casi el 70% de las marcas analizadas. En tanto se puede observar que el 25 % de las marcas tienen recuentos de aerobios mesófilos totales y coliformes totales muy altos, y que implicarían un riesgo para la salud.

Del análisis del contenido microbiano durante el proceso, hemos observado que los recuentos a la salida del canchado, si las condiciones de higiene del establecimiento son adecuadas, se los puede mantener durante el resto del proceso. A nuestro entender, los valores máximos propuestos especificados en TABLA 4, pueden ser parámetros iniciales aceptables.

CONCLUSIONES

Como resultado de nuestro trabajo de investigación, proponemos valores máximos de microorganismos aerobios mesófilos totales de < 3000 UFC/g; coliformes totales < 100 NMP/g y de hongos y levaduras < 1000 UFC/g. Estos valores propuestos se toman en función de los resultados hallados, los valores de recuentos microbianos encontrados a la salida del proceso de canchado (1)

y los valores recomendados por la Legislación paraguaya .

Además, se sugiere que los mismos se revean cada tres años, de forma de conducir a la elaboración de un producto de calidad higiénico-sanitaria adecuada sin perjudicar a la industria yerbatera.

Por último, cabe señalar que el valor del 50% de muestras analizadas que se adaptan a los parámetros propuestos, se eleva a un 80% si se limita el análisis a las muestras de mayor circulación en nuestra provincia (25 muestras).

BIBLIOGRAFIA

- AOAC (Association of Analytical Chemist)."Official Methods of Analysis". 1995. Gaiterburg Maryland 16th Edition
- APHA. 1984. American Public Health Association.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. 1992. FDA. Food and Drugs Administrations. 7^{ma} Edición.
- Bordenave, S.A; Duce, J.A; Ybarra, L.R; Cañete, L.A. 2003.
"Correlación entre cenizas y humedad de hojas de Yerba Mate y la calidad microbiológica de Yerba Mate canchada estacionada".
- Cañete, L. A; Duce, J.A; Ybarra, L.R; Bordenave, S.A. 2003
"Correlación del contenido de humedad y cenizas con la calidad microbiológica de a Yerba Mate durante su proceso de elaboración".
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO ACTUALIZADO. 1994 .De la Canal y Asociados. Buenos Aires. Argentina.
- Duce, J.A; Ybarra, L.R; Cañete, L.,A; Bordenave, S.A. 2000
"Correlación de las cenizas y humedad de hojas de Yerba Mate y la calidad microbiológica de Yerba Mate Elaborada".
- INSTITUTO ARGENTINO DE RACIONALIZACION DE MATERIALES:
Norma IRAM 20517. 2004. (Análisis microbiológico de yerba mate canchada y yerba mate elaborada).
- MULLER, Gunther 1981. Microbiología de los Alimentos Vegetales.
Editorial ACRIBIA. Zaragoza. España.
- Presidencia de la República del Paraguay. Ministerio de Industria y Comercio. Decreto N° 17.595: Medidas para la comercialización de la yerba mate dentro del territorio nacional.

GLOSARIO DE TERMINOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO:

Planchada: Lugar de recepción del material recién cosechado, previo al sapecado

Sapecado: Tratamiento térmico inicial en el proceso de secanza de la yerba mate que consiste en la exposición de las hojas y ramas a la acción directa del fuego, con el objeto de detener los procesos biológicos, acompañado de la formación de ampollas bajo la epidermis de las hojas con un ligero y típico crepitar.

Canchada: Yerba mate canchada, secada y groseramente triturada obtenida a partir de las hojas, los tallos, pecíolos y pedúnculos florales de la especie *Ilex paraguariensis* St. Hil., reconocida como apta para la preparación de bebidas.

Secado: Operación de deshidratación por tratamiento térmico de la yerba mate sapecada hasta reducir su contenido de humedad a menos del 5%.

Secado de cinta: sistema continuo de secado constituido por transportadora de tejido metálico, que se deslizan lentamente sobre un canal calefaccionado, removiéndose la yerba en forma mecánica al caer o al ser elevada a la siguiente transportadora

Estacionamiento acelerado: Proceso por el cual se mantiene almacenada la yerba canchada por un período de tiempo adecuado (de 30 a 60 días) en un depósito con regulación de temperatura, humedad y circulación de aire para que adquiera las características de sabor y color similares al estacionamiento natural.

Estacionamiento natural: Operación de almacenamiento por la cual se mantiene la yerba canchada por un período de tiempo de (6 a 24 meses) en depósito a la espera de que por procesos de transformación espontánea adquiera las características de sabor y color requeridas por los consumidores.

Yerba mate elaborada: Yerba mate canchada que ha sido sometida a los procesos de zarandeo, trituración y molienda.

VIABILIDAD DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS ELABORADOS CON LECHE BOVINA.

CIRONE, Karina M.¹, MORSELLA, Claudia G.¹, COLOMBO, Daniel², PAOLICCHI, Fernando A.¹

¹Laboratorio de Bacteriología, Área Producción Animal, Unidad Integrada INTA UNMdP, CC 276, (7620) Balcarce, Argentina; fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar. ²Med Vet Actividad Privada, Mar del Plata.

RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) es el microorganismo causante de la Paratuberculosis o Enfermedad de Johne, enteritis crónica que afecta a rumiantes, domésticos y especies silvestres. Hembras bovinas infectadas con *Map* pueden excretar micobacterias en su leche, que consumida cruda o usada para la elaboración de quesos sin pasteurizar podría constituir una fuente potencial para la infección humana. El objetivo del trabajo fue determinar la viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche bovina infectada experimentalmente y sometida a diferentes tratamientos térmicos. Durante la maduración *Map* fue aislada sólo en los quesos elaborados con leche sin tratamiento térmico, manteniendo su viabilidad hasta los 45 días. No se observó relación entre la evolución del pH y la viabilidad de *Map*. La maduración de los quesos podría disminuir la viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche sin tratamiento térmico y el calentamiento de la leche a 65° seguido por la maduración de los quesos sería beneficioso para la elaboración de este producto ya que destruiría las micobacterias presentes.

Palabras Claves: *Map*, quesos, viabilidad, pH, maduración.

SUMMARY

Viability of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* during elaborated bovine milk cheese maturity.

Mycobacterium avium subsp *paratuberculosis* (*Map*) is the etiologic agent of Paratuberculosis or Johne's disease. This is a chronic enteritis affecting to ruminants, domestic and wild species. Cows infected with *Map* can excret mycobacteria in their milk. This fact represents a potential risk when people consumes crude milk or not pasteurized cheese. The objective of this work was to determine the viability of *Map* in cheese

elaborated with experimentally infected bovine milk with different termic treatments (65°C or 37°C). During maturity, *Map* was isolated in cheeses with only treatment of milk with 37°C, keeping its viability until the 45th day. No relationship was observed between the pH and the *Map* viability. The maturity decrease the *Map* viability in elaborated cheeses without thermal treatment, and the treatment with 65°C of temperature plus cheese maturity process would be beneficial for the mycobacteria elimination in these products.

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) es el microorganismo causante de la Paratuberculosis (PTBC) o Enfermedad de Johne, enteritis crónica que afecta a rumiantes domésticos y especies silvestres. Está caracterizada clínicamente por diarrea, pérdida de peso, debilitamiento y finalmente la muerte; sin embargo, una gran proporción de los animales infectados presentan la condición de portadores asintomáticos (Collins *et al.*, 1996).

Map ha sido vinculado a la enfermedad de Crohn en humanos, patología asociada a una inflamación crónica del intestino que puede derivar en una inmunodepresión generalizada (Hermon-Taylor, 2002). En los últimos 10 años se ha investigado sobre la relación entre *Map* y esta enfermedad, poniendo énfasis en los productos alimenticios como fuente de contaminación.

Algunas evidencias sugieren que los humanos se pueden infectar por el consumo de leche contaminada, aunque relativamente poco se conoce sobre la supervivencia de *Map* durante los procesos de elaboración de lácteos. Ciertos autores afirman que la pasteurización es capaz de destruir las micobacterias (Stabel *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2002). Otros, por el contrario, sostienen que *Map* es capaz de resistir las condiciones de pasteurización cuando está presente en la leche (Grant 1998, Grant *et al.*, 1996, 1997, 1999, 2000, 2002, 2003; Millar *et al.*, 1996).

En Inglaterra esta micobacteria fue detectada en un 2% de muestras de leche pasteurizada comercial y en un 6,7% en muestras de leche cruda sometida a pasteurización experimental a 72°C por 15 o 25 s (Grant *et al.*, 2002). También en Estados Unidos fueron encontrados organismos viables en un 2,8% de envases de leche comercial pasteurizada (Ellingson, 2005). Estos resultados indican que este patógeno es capaz de sobrevivir en ocasiones la pasteurización comercial.

Esta micobacteria además podría estar presente en quesos y otros productos lácteos, especialmente aquellos que se elaboran con leche sin pasteurizar. En quesos, el bajo pH

y la concentración de sal son los dos factores más importantes que contribuyen a la inactivación de patógenos durante el proceso de maduración. Collins et al. (2000) estudiaron el efecto de tres factores (pH, concentración de sal y tratamiento térmico) en la producción de quesos sobre la viabilidad de *Map*, determinando que el calentamiento y el bajo pH afectan la viabilidad de este patógeno; sin embargo, la concentración de sal no fue correlacionada con su muerte. Otras investigaciones realizadas en quesos duros y semiduros elaborados con leche cruda artificialmente contaminada con *Map* encontraron que los recuentos decrecieron lentamente durante la maduración y relacionaron la muerte del bacilo con la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración de los quesos (Spahr et al., 2001).

El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche bovina infectada artificialmente con *Map* y sometida a distintos tratamientos térmicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración: Se recolectaron 5 litros de leche bovina en un envase estéril de plástico, desde el tanque de enfriado del tambo de la Estación Experimental INTA Balcarce. La leche provenía de animales libres de Brucelosis, Tuberculosis y al momento de la toma de muestras no presentaban sintomatología ni evidencias serológicas positivas por ELISA a PTBC. La leche se dividió en dos partes: leche con tratamiento térmico (**LT**) y leche sin tratamiento térmico (**LnT**). Cada parte fue infectada, previo al tratamiento térmico, con 2,5 ml de un inóculo de *Map* cuya concentración fue de $1,6 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹. La cepa perteneciente a la colección de INTA Balcarce fue tipificada por técnicas moleculares como PCR y RFLP para la identificación del segmento de inserción característico IS900. Para comprobar la viabilidad de la cepa luego de agregada a la leche se tomó una muestra de cada una de las dos partes y se cultivó luego de someterlas al tratamiento que se describe más adelante. La leche **LT** fue sometida a un calentamiento de 65°C por 20 min, para luego ser enfriada a 37°C. La leche **LnT** solo fue calentada hasta 37°C. Se agregó a ambas el cultivo iniciador comercial mesófilo homofermentativo (CHH-22 CRISTIAN HANSEN). Se lo dejó actuar durante 20 minutos y luego fueron agregados 4 ml de cuajo comercial a cada una de las partes (**LT** y **LnT**). Cuando la leche coaguló, el cuajo fue cortado para llevar a cabo el desuerado, lavando las masas con agua a 40°C. Las mismas fueron coladas y colocadas en moldes apropiados, para ser prensadas.

Cada queso fue sometido a salado en seco por una hora y se maduraron por 60 días en una sala con aproximadamente 20°C de temperatura y 70% de humedad relativa.

Obtención y tratamiento de las muestras: Una vez elaborados los quesos, a los 10, 20, 30, 45 y 60 días del inicio de la maduración, se tomaron 5 g de muestra del centro de cada queso (Little *et al.*, 1994; Olarte *et al.*, 2000). La misma fue colocada y macerada en una bolsa de polietileno sometiéndola a decontaminación con 20 ml de hexadecilpiridinium (HPC) al 0,75% durante 5 h. Se trasvasó el contenido de cada bolsa a tubos de plástico estériles y se centrifugaron a 550 g durante 15 min, resuspendiendo el pellet con 2 ml de buffer fosfato salino pH 7 (PBS). Se sembraron 6 gotas (120 µl) de cada muestra en medios específicos usando Herrold con agregado de micobactina, piruvato y antibióticos (Paolicchi *et al.*, 2003). Los cultivos fueron observados cada 15 días durante cuatro meses, identificando el desarrollo de las colonias sospechosas de *Map*. Las colonias fueron analizadas microscópicamente mediante la coloración de Ziehl Neelsen. Los recuentos se expresaron en UFC.g⁻¹ de queso teniendo en cuenta que el pellet restante de los 5 g utilizados se resuspendió en 2 ml de PBS, sembrándose 6 gotas de la suspensión.

En cada momento de la toma de muestras de quesos fue medido el pH utilizando una cinta de pH (rango 0-14) sobre un macerado de la muestra debido a la imposibilidad del uso de un peachímetro, asumiendo el error que acarrea el uso de la cinta.

RESULTADOS

Recuento y viabilidad de *Map*: La evolución de los recuentos de *Map* durante el período de maduración de los quesos puede observarse en la Tabla 1. Se aisló *Map* sólo en los quesos elaborados con LnT, registrándose su viabilidad hasta los 45 días de maduración. A los 30 días de dicho proceso se registró un recuento más alto, llegando a valores de 26 UFC.g⁻¹ de queso. A los 45 días se detectaron micobacterias viables (20 UFC.g⁻¹), mientras que a los 60 días no fueron aisladas micobacterias.

Tabla 1: Recuento de células viables de *Map* en UFC.g⁻¹ de muestras de quesos elaborados con LnT y LT durante 60 días de maduración

Tipo de queso	Días de maduración				
	10	20	30	45	60
QLnT	13.3 x 10 ¹	mp*	2.6 x 10 ¹	2 x 10 ¹	-
QLT	-	-	-	-	-

QLnT B: queso elaborado con LnT; QLT B: queso elaborado con LT; *mp: muestra perdida

pH durante la maduración: La evolución del pH durante el periodo de maduración de los quesos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Evolución del pH de los quesos elaborados con LT y LnT durante 60 días de maduración

Tipo de queso	Días de maduración				
	10	20	30	45	60
QLnT	6.0	7.0	7.0	7.5	6.0
QLT	6.0	6.5	6.5	8.0	6.0

QLnT: queso elaborado con LnT
 QLT: queso elaborado con LT

Relación entre el pH de los quesos y el recuento de células viables de *Map*: No se observó relación entre la viabilidad de *Map* y la variable pH (Figura 1).

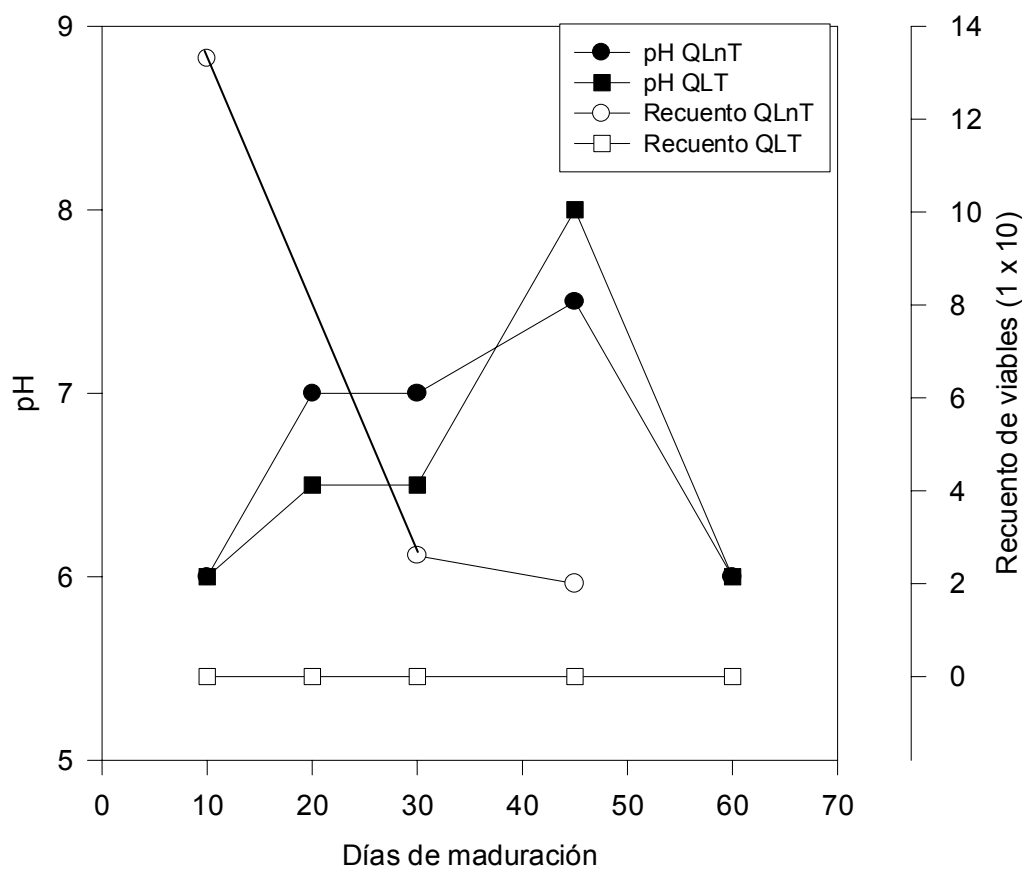


Gráfico 2: Evolución del pH de los quesos elaborados con leche LT y LnT bovina comparado con el recuento de células viables de *Map* en UFC/g de queso elaborado con LT y LnT durante 60 días de maduración.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Map es un microorganismo que puede hallarse en distintos sistemas productivos y puede estar presente en la cadena agroalimentaria, lo que significaría un riesgo para la Salud Pública. En los últimos 10 años se ha avanzado en la investigación sobre la relación de este microorganismo y la enfermedad de Crohn en humanos, poniendo énfasis en los productos alimenticios, especialmente lácteos, como vía de transmisión.

Estudios realizados sobre la supervivencia de *Map* en productos lácteos derivados reafirman la resistencia de este microorganismo a altas temperaturas y condiciones medioambientales adversas. Algunas investigaciones indican que este patógeno es capaz de sobrevivir la pasteurización comercial. Debido a estos resultados ciertos gobiernos europeos han decidido erradicar a *Map* de la cadena alimentaria (Greenstein, 2005).

Diversas investigaciones han sido realizadas en otros productos lácteos con el objetivo de determinar la resistencia de *Map* durante su elaboración. Collins *et al.* (2000) estudió el efecto de tres factores (pH, concentración de sal y tratamiento térmico) en la producción de quesos, sobre la viabilidad de *Map* y encontró que el calentamiento de la leche cruda para la elaboración de quesos que se maduraron por 60 días, inactivó aproximadamente 10^3 células de *Map* por ml. Además, comprobó que la concentración de sal tiene poco efecto sobre la viabilidad de este patógeno; sin embargo, el bajo pH fue correlacionado positivamente con su muerte. Spahr y Schafroth (2001) inocularon artificialmente leche cruda con 10^4 UFC.ml⁻¹ de *Map* y elaboraron quesos duros y semiduros, observando que en ambos los recuentos de *Map* decrecieron. Los factores identificados como más importantes para la muerte del bacilo fueron la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración de los quesos. Otros trabajos que investigaron la viabilidad de *Map* en quesos revelaron que los medios ideales para el aislamiento y cultivo de *Map* fueron el Middlebrook 7H10 suplementado con antibióticos, ya que suprimen la microbiota asociada con la maduración de los quesos Cheddar elaborados con leche pasteurizada (Donaghy *et al.*, 2003).

Los resultados preliminares de este trabajo indican que el proceso de maduración de los quesos contribuiría a la disminución de la viabilidad de *Map* en los quesos elaborados con **LnT**. Una de las causas principales de la disminución en el número de bacterias por g en los primeros días de maduración pudo ser la disminución de la actividad de agua (a_w). Por otro lado, a partir de los quesos elaborados con **LT** no se logró aislar micobacterias, lo

cual indica que *Map* podría ser sensible al tratamiento térmico usado (60°C durante 20 min) seguido del proceso de maduración.

Este proceso en los quesos contribuiría con los cambios de pH observados, sugiriendo un efecto aditivo deletéreo sobre *Map*. En estudios similares realizados en quesos elaborados con leche caprina pudo estudiarse que el efecto del descenso del pH podría eliminar muchas de las células viables de *Map* por gramo ya que cuando el pH llegó a valores más altos se registraron los aislamientos más numerosos. Sin embargo, en los quesos elaborados con leche bovina no se observó dependencia de la viabilidad de *Map* con la variación del pH.

El tratamiento térmico aplicado a la leche para la elaboración de quesos, sería recomendable para eliminar su posible contaminación con *Map*. Debería controlarse el descenso del pH durante la maduración, ya que la combinación de ambos factores resulta determinante para disminuir la viabilidad de *Map*.

La viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche bovina disminuiría durante la maduración pero los cambios bioquímicos que ocurren en este proceso no serían suficientes para eliminar la presencia de *Map*. La aplicación de un tratamiento térmico a la leche cruda previo a la elaboración de este producto sería deseable con el fin de obtener un alimento inocuo.

Por otro lado el énfasis en los controles en los sistemas sanitarios tanto en los rodeos lecheros como en industrias lácteas con el objetivo de protegería a los consumidores contra el posible riesgo de infección con *Map* u otras bacterias potencialmente patógenas. Se considera que son necesarias nuevas investigaciones cuali-cuantitativas para determinar claramente la resistencia de *Map* a los tratamientos térmicos realizados en industrias lácteas, como así también evaluar su supervencia a los distintos procesos de elaboración de los productos derivados. Sería importante desarrollar y ajustar métodos de identificación rápidos y confiables para detectar la presencia de *Map* en productos alimenticios antes de ser liberados al mercado para consumo humano.

BIBLIOGRAFIA

Collins M.T., Goodger W.J., Nordlund K.V., Pelletier J. 1996. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. J Am Vet Med Assoc. 208(11):1872-1876.

Collins, M.T., Sung N. 2000. Effect of three factors in cheese production (pH, salt and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. Appl Environ Microbiol. 66(4):1334-1339.

Donaghy J.A., Totton N.L., Rowe M.T. 2003. Evaluation of culture media for recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. Appl Environ Microbiol. 37: 285-291.

Ellingson J., Anderson J., Koziczowski J., Radcliff., R., Sloan S., Allen S., Sullivan N. 2005. Detection of Viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Retail Pasteurized Whole Milk by Two Culture Methods and PCR; J of Food Prot. 68 (5): 966-972;

Grant I.R. 1998. Letter to the editor: Does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survive current pasteurization conditions?. Appl Environ Microbiol. (7): 2760-2761.

Grant I.R., Ball H.J., Neill S.D., Rowe M.T. 1996. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. Appl Environ Microbiol. 62 (2): 631-636.

Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. 1997. A novel staining technique for assessing clumping and viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells during pasteurization; Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association of Paratuberculosis Inc, Rehoboth, MA, USA. p. 456-458.

Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. 1999. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Lett Appl Microbiol. 28(6):461-465.

Grant I.R., Pope C.M., O'Riordan L.M., Ball H.J., Rowe M.T. 2000. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. J Vet Microbiol. 77(3-4):369-378.

Grant I.R., Hitchings E.I, Ball H.J., Rowe M.T. 2002. Impact of commercial HTST pasteurization on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl Environ Microbiol. 68(2): 602-607.

Grant I.R., Kirk E., Hitchings E.I., Rowe M.T. 2003. Comparative evaluation of MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. J Appl Microbiol. 95: 169-201.

- Greenstein R. 2003.** Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparasions with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet infectious disease*. 3: 507-513.
- Hermon-Taylor J. 2002.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and its relation to Crohn's disease. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Portugal. p. 96.
- Little C., Knochel S. 1994.** Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* un Brie stored at 4, 8, and 20°C. *J of Food Microbiol*. 24: 137-145.
- Millar D., Ford J., Withey S., Tizard M., Doran T., Hermon-Taylor J. 1996.** IS900 PCR to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England en Wales. *Appl Environ Microbiol*. 5(11): 3446-2452.
- Olarte C., Sanz S., Gonzalez-Fandos E., Torre P. 2000.** The effect of comercial starter culture addition on the ripening of artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *J Appl Microbiol*. 88: 421-429.
- Paolicchi F.A., Zumarraga M.J., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., Cataldi A., Alito A., Romano M. 2003.** Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle herds in Argentina. *J Vet Med*. 50: 20-26.
- Pearce L.E., Crawford R.A., Troung H.T., Yates G.F., Lisle G.W. 2002.** The recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following heat treatment of inoculated milk in a turbulent-flow pasteuriser is not adversely affected by decontamination and antibiotic selection. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Portugal; p. 102.
- Spahr U., Schafroth K. 2001.** Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss Hard and Semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl Environ Microbiol*. 67(9): 4199-4205.
- Stabel J.R. 2001;** On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci*. 84 (2):524-527.

BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA LACTICA INVOLUCRADA EN LA FERMENTACIÓN DE EMBUTIDOS ARTESANALES PRODUCIDOS EN TUCUMÁN

FONTANA Cecilia A., VIGNOLO Graciela M.

Centro de Referencia para Lactobacilos, Chacabuco 145, 4000, Tucumán-Argentina.
Tel: 381 4310465; F: 381 4005600 C. electrónico: cfontana@cerela.org.ar

RESUMEN

Se estudió la biodiversidad de bacterias lácticas (BL) mediante RAPD y ARNr 16S además de propiedades de interés tecnológico. RAPD mostró una gran variedad de cepas con predominio de *Lb. sakei*, *Lb. plantarum* y *E. faecium*. *Lactobacillus* mostró una gran diversidad en su capacidad acidificante, producción de peróxido de hidrógeno y perfil plasmidico. No se detectaron cepas de enterococos vancomicina resistente (ausencia de genes *van*) y la producción de bacteriocinas fue característica de este grupo. La identificación y caracterización de cepas a partir de embutidos artesanales para ser usadas como cultivos iniciadores en la industria contribuye a la preservación tanto de la biodiversidad como de las características propias de los productos artesanales.

Palabras Claves: embutidos fermentados; RAPD, 16S ADNr; propiedades tecnológicas.

BIODIVERSITY OF LACTIC ACID BACTERIA INVOLVED IN THE FERMENTATION OF SAUSAGES PRODUCED IN TUCUMÁN

The combined use of RAPD analysis and 16S rDNA sequencing were applied to genotypic characterization of lactic acid bacteria (LAB) and different technological properties were also evaluated. *Lb. sakei*, *Lb. plantarum* and *E. faecium* were the dominant strains during fermentation. *Lactobacillus* strains showed an important diversity regarding to acid and hydrogen peroxide production and plasmid profile.

On the other hand vancomycin resistant enterococci were not found (absence of *van* genes); bacteriocin production being a characteristic of this group. Identification of dominant communities present in this artisanal fermented sausage can help in the selection of starter cultures and contribute to preserve the biodiversity as well as the typical sensorial properties of artisanal products.

Keywords: fermented sausages, RAPD, 16S rDNA, technological characterization.

INTRODUCTION

Dry fermented sausages manufacture is a very important part of the meat industry in many countries; in particular, manufacturing of fermented sausage has a long history in Argentina, this being in relationship with Italian and Spanish traditions as well as the well known quality of meat. Large-scale industrial processes that relied on the use of selected starter cultures led to a low variability in the present microbiota as well as the final quality of the product. In artisanal production of traditional fermented sausages it is important to use starter cultures consisting in strains isolated from local products and thus well adapted to the particular production technology (Papa and Grazia, 1990). Lactic acid bacteria (LAB) and *Staphylococcaceae* are the two main groups involved in sausages fermentation (Cocolin et al., 2001, Fontana et al., 2005), particularly lactobacilli, play an important role in meat preservation and fermentation processes due to their ability to lower the pH and produce bacteriocins that prevent the growth of pathogenic and spoilage microorganisms. Lactobacilli from meat products are not easy to differentiate (Kandler 1984) and their identification by traditional methods resulted ambiguous. LAB identification at intra-species level is also an important issue since it may help to distinguish groups of strains or single strains with peculiar technological properties. Recently, several molecular methods have been applied to the identification of bacteria isolated from meat products. The RAPD technique is a PCR-based method where fragments amplified may be species or strain specific and has been used for inter-specific and intra-specific differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus sakei*, and *Lactobacillus plantarum* strains (Bjorkroth et al., 1996; Andrighetto et al., 2001; Berthier and Ehrlich 1999). The physiological properties of bacteria isolated from meat fermentations, such as bacteriocin production (Aymerich et al., 1998), proteolysis (Fadda et al., 1999; Sanz et al., 1999), lipolysis (Kenneally et al., 1998), biogenic amines production (Bover-Cid and Holzapfel, 1999) and antibiotic susceptibility (Franz et al., 2001) have been studied in detail. The evaluation of these technological and safety features will allow to select the appropriate strains to be used in fermentation process. The aim of this study was to use molecular approaches to describe LAB diversity during natural fermentation (with no addition of starter cultures) of dry fermented sausage produced in Tucumán and to characterize its population by their technological properties.

MATERIALS AND METHODS

2.1 Sausages production

Fermented sausages were prepared by traditional techniques according to the following formulation: pork meat 85.5%, pork fat 10%, sodium chloride 1.6%, sugar (sucrose) 0.4%, starch 1.5%, binding and flavoring additives 1.0%, nitrite and nitrate 0.017%. The raw sausage material was mixed, stuffed into artificial casings and fermented for 7 days at 23°C and relative humidity (RH) of 95% followed by a gradual reduction of temperature (from 22 to 15°C) and RH (from 92 to 89%) during the next 7 days.

2.2 LAB strains

LAB isolates, from MRS and Slanetz and Bartley (*Enterococcus*) media, representing the dominant population that develops during fermentation were analyzed by means by RAPD in order to establish the diversity among these groups (Fontana et al., 2005).

2.3 RAPD-PCR analysis

Two RAPD-PCR reactions were performed for each strain, employing different primer: M13 and RAPD2 (Fontana et al., 2005). PCR products were separated by electrophoresis on 2.5 % agarose gel using 1x TAE buffer (Sambrook et al. 1989). The gels were stained in ethidium bromide and photographed on an u.v. transilluminator.

2.4 16S rDNA sequencing

The 16S rDNA gene was amplified according to Klijn et.al. (1991). The PCR product was cleaned using Quantum-prep spin columns (BIO-RAD, Italy), and subsequently sequenced, (CRIBI, Università degli Studi, Padova, Italy). Searches in the GenBank with the BLAST program (Altschul et al., 1997) were performed to determine the closest known relatives of the partial 16S rDNA sequences obtained.

2.5 Technological properties

Acid production. Lactic acid production was evaluated at different times according to Vignolo et al., (1988).

Bacteriocin activity. *Listeria innocua* 7 (Unite de Recherches Laitieres et Genetique Appliquee, INRA France) and *L. monocytogenes* Scott A (IHT, Karlsruhe, Germany) were used as indicator strains. Cell-free supernatants (CFS) from LAB were assayed for antimicrobial activity using a modified well diffusion assay (Vignolo et al., 1993).

Hydrogen peroxide production. TMB agar medium modified by Rabe and Hillier (2003) was used.

Biogenic amine production. It was determined on a media designed by Bover-Cid and Holzapfel (1999) containing the precursor amino acids tyrosine (free base) or histidine (monohydrochloride).

Plasmid profiles. A protocol described by Anderson and McKey, (1983) and a method modified by Muriana and Klaenhammer, (1991) for enterococcal and *Lactobacillus* isolates respectively, were used.

Antibiotic susceptibility All presumptive enterococcal isolates were analyzed by multiplex PCR for the occurrence of *vanA*, *vanB* and *vanC* according to Patel et al., (1997).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 60 LAB isolates were genotypically characterized by molecular methods. RAPD analysis with primer M13 allowed a preliminary differentiation obtaining specie-specific profiles. To confirm species identification the partial 16S rDNA nucleotide sequence was determined for each representative pattern. Another RAPD experiment was performed using primers RAPD2 to differentiate LAB population at strain level (Fig. 1). *Lb. sakei* (12%), *Lb. plantarum* (15%) and *E. faecium* (17%) different strains were identified, representing the dominant LAB population during sausages fermentation. The data obtained by RAPD fingerprinting techniques showed the strong selection effect of the stringent conditions present in fermented sausages on the indigenous microbiota. The use of M13 primer was previously reported by Torriani et al., (1999) and Andrighetto et al., (2001) for differentiation of *Lactobacillus* species while RAPD2 primer was also used by Cocconcelli et al., (1997), Morea et al., (1999) and Baruzzi et al., (2000) to evaluate the growth dynamics of *Lactobacillus* strains in Ricotta forte cheese, Mozzarella cheese and whey fermentation.

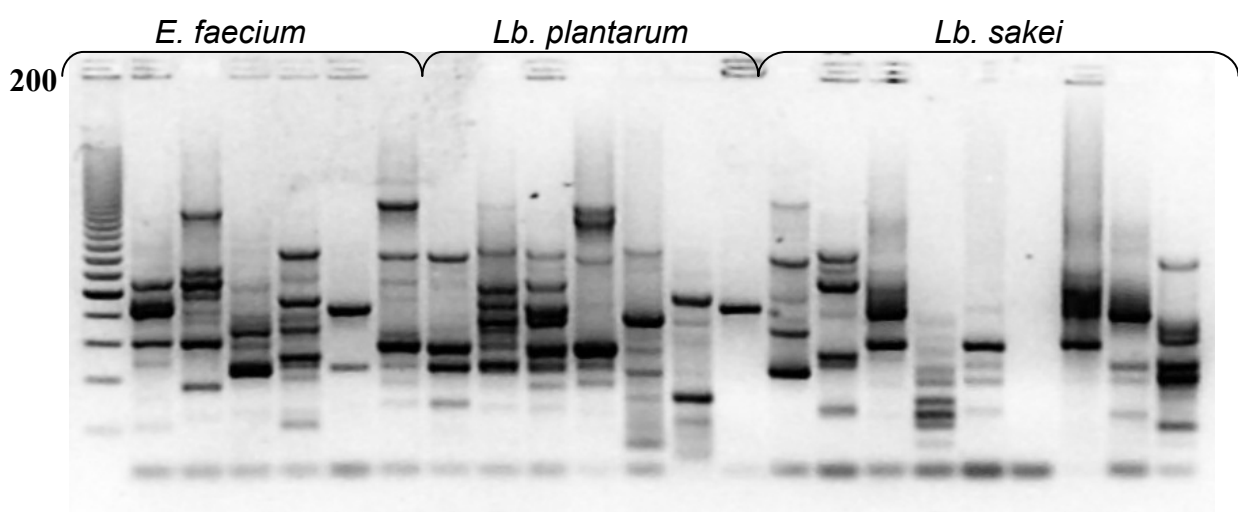


Figure 1. RAPD fingerprints obtained with primer RAPD2 of LAB isolated from MRS during sausage fermentation.

From a technological point of view *Lb. plantarum* showed to be the most acidifying strains with 0.20 to 0.60% lactic acid produced at 30 °C after 24 hs (Table 1). Six from 7 strains of *Lb. sakei* and only 3 from 9 *Lb. plantarum* strains were able to produce hydrogen peroxide (Table 1) In spite of the lack of bacteriocin production found in *Lactobacillus* population, all *E. faecium* strains identified were observed to produce some kind of antimicrobial substance. The production of these antagonistic metabolites will contribute to microbiological safety in fermented sausages.

Table 1: Technological properties

Strains	Lactic Acid production (%)	H ₂ O ₂ production	Bacteriocin production
<i>Lb. plantarum</i> (7)*	0.20-0.60	6/7	–
<i>Lb. sakei</i> (9)	0.20-0.40	3/9	–
<i>E. faecium</i> (10)	ND	–	+

* total analyzed strains; ND: not determined

A plasmid profile diversity was observed among lactobacilli (Fig. 2) while enterococci strains resulted free of them. The presence of plasmid DNA in LAB species is of great industrial interest due to significant technological trait including lactose assimilation, citrate utilization, proteinase activity; bacteriocin production, bacteriophage resistance and antibiotic resistance that are often encoded on plasmid (von Wright and Sibakov, 1998; Wang and Lee, 1997).

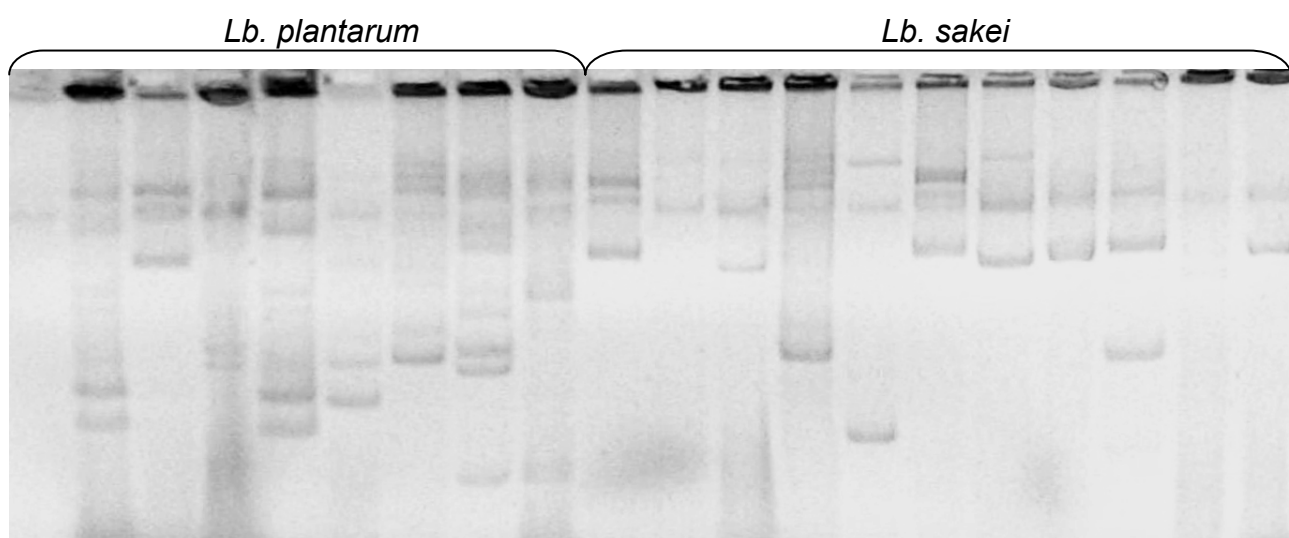


Figure 2. Plasmid profiles for *Lactobacillus* strains.

Safety investigations within LAB strains indicated that only one *Lb. plantarum* strain showed decarboxylase activity. When the presence of vancomycin resistant enterococci was investigated by PCR none of the strains showed to possess *van* genes. Enterococci are well-known to be intrinsically resistant towards antibiotic, although Franz et al., 2001; Aarestrup et al., 2002; reported that the majority of *E. faecium* food isolates were sensitive to clinically relevant antibiotics.

CONCLUSIONS

Lactobacillus sakei, *Lb. plantarum* and *E. faecium* represented the dominant LAB populations during fermentation of a traditional sausage produced in Tucumán. An important diversity was observed in *Lactobacillus* strains regarding to acid and hydrogen peroxide production and plasmid profile. All enterococci were not resistant to vancomycin and showed all to be bacteriocin producer strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from CONICET and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Argentina.

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen, L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Domínguez, L., Finn, M., and Franklin A., 2002.. Appl. Environ. Microbiol. 68:4127–4129.
- Anderon D.G. and McKay L.L., 1983.. Appl Environ Microbiol. 46(3):549-52.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402.
- Andrighetto C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., 2001. J. of Dairy Res. 68(2), 303-16.
- Aymerich, M.T., Hugas, M., Monfort, J.M., 1998. Review: Food Science and Technology International 4, 141-158.
- Baruzzi, F., Morea, M., Matarante, A., Cocconcelli, P.S., 2000. J. Appl. Microbiol. .89, 807-814.
- Berthier, F., Ehrlich, S.D., 1999. Int. J. Systematic Bacteriol. 49, 997-1007.
- Bjorkroth, J., Korkeala, H., 1996. Int. J. Food Microbiol. 30, 293-302.
- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. Int. J. Food Microbiol. 53, 33–41.
- Cocconcelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L., Bottazzi, V., 1997. Lett. Appl. Microbiol. 25,

376-379.

Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni, Comi G., 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5113 – 5121.

Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G., Toldrá, F., 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65, 578-584.

Fontana C., Cocconcelli P.S., Vignolo, G. 2005. Int. J. Food Microbiol. In press
Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Holzapfel W.H., 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4385– 4389.

Kenneally, P.M., Leuschner, R.G., Arendt, E.K., 1998. J. Appl. Microbiol. 84, 839-846.

Kandler, O., 1984. Current taxonomy of lactobacilli. In: Nash, C.H. and Underkofler, L.A. (Ed.), Development in Industrial Microbiology, Vol 25. Baltimore, Victor Graphics, pp. 109 123.

Klijn, N., Weerkamp, A.H., de Vos, W.M., 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57, 390–3393.

Morea, M., Baruzzi, F., Cappa, F., Cocconcelli, P.S., 1999. J. Appl. Microbiol. 87, 574 582.

Muriana P. M. and Klaenhammert. R., 1991. J. of Bacteriol., 173, 1779-1788.

Papa, F., Grazia, L., 1990. Industrie Alimentari XXIX, 537-540.

Patel, R., Uhl, J.R., Kohner P., Hopkins M.K. and Cockerill F. 1993. J Clinical Microbiol. 35, 703-707.

Rabe L. K. and Hillier S. L., 2003. J. of Clinical Microbiol. 41, 3260–3264

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, O., Toldrá, F., 1999. Int. J. Food Microbiol. 53, 115-125.

Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F., 1999. App. Environ. Microbiol. 56, 4351-4356.

Vignolo G., Ruiz Holgado A., Oliver G., 1988. J. Food Protection 51, 481-484.

Vignolo G., Suriani F, Pesce de Ruiz Holgado A, G. Oliver., 1993. J. Appl. Bacteriol. 75,:344-349.

von Wright, A. and Sibakov, M. 1998. Genetic modification of lactic acid bacteria . En: Lactic Acid Bacteria . Microbiology and Funtional Aspect. Marcel Dekker Inc., USA. Pp. 161-210.

Wang, T. and Lee, B., 1997. Plasmid in *Lactobacillus* Critical Rev. Biotechnol. 17, 227-172.

PRINCIPALES COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*) CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*

GENDE Liesel B. ^(1, 2, 3), FRITZ Rosalía ⁽²⁾ y EGUARAS Martin J. ^(1,3)

⁽¹⁾Departamento de Biología y ⁽²⁾Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. ⁽³⁾ CONICET. Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350 (7600). T.E: (0223) 475-6167. FAX: (0223) 475-3150. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina. lgende@mdp.edu.ar

RESUMEN

Se analizaron características fisicoquímicas, composición del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y actividad antimicrobiana de los componentes por el método de bioautografía frente a *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Se observaron zonas amarillas de inhibición correspondientes a la fracción cromatográfica con actividad antimicrobiana sobre las secciones correspondientes al aldehído cinámico y al eugenol. El aceite esencial y en especial dos de sus principales componentes presentaron capacidad inhibitoria frente a las cepas de *P. larvae* subsp. *larvae*.

SUMMARY

Physicochemical properties, essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) composition and antimicrobial activity of the components were analyzed by bioautography method against *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Yellow areas of inhibition corresponding to chromatography fraction with antimicrobial activity on the sections corresponding to the cinnamic aldehyde and eugenol were observed. The essential oil and especially two of their main components presented inhibitory capacity against the strains of *P. larvae* subsp. *larvae*.

Palabras clave: Aceites esenciales, *Cinnamomum zeylanicum*, bioautografía, actividad antimicrobiana, *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

INTRODUCCIÓN

La loque americana es la enfermedad bacteriana más grave y peligrosa que afecta a las larvas de las abejas (*Apis mellifera* L.) (Shimanuki, 1990, Bailey & Ball, 1991). El agente causal es *Paenibacillus larvae* (*P.larvae* White), una bacteria móvil de 2,5 a 5 µm de largo

y 0,4 a 0,8 μm de ancho. Su característica principal es la de formar endosporas muy resistentes. Usualmente el control de esta enfermedad se suele realizar mediante el manejo higiénico de las colmenas y la administración de antibióticos (Alippi, 1999). El uso irracional de estos últimos, además de generar la aparición de cepas resistentes, contamina a la miel con residuos de estas drogas lo cual impide su comercialización de acuerdo con la reglamentación internacional vigente. A raíz de ello se ha investigado la acción de antimicrobianos de origen natural, principalmente aceites esenciales (Alippi, 1996; Albo 2003). El aceite esencial de canela se destila de las hojas y ramas de *Cinnamomum zeylanicum*, árbol perenne perteneciente a la familia de las Lauraceas, originario de Sri Lanka, Malasia, Java e India meridional. Este aceite presenta actividad frente a *Pseudomona auruginosa*, *Salmonella typhi* y *paratyphi*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* y *Aspergillus* spp. (Jansen y col., 1986; Raharivelomanana y col, 1989). También es activo contra *Penicillium* spp. (Azzouz y Bullerman, 1982) y *Clostridium botulinum* (Ismail y Pierson, 1990). Este trabajo tiene como objetivos determinar los principales componentes del aceite esencial de canela e identificar a aquellos con actividad antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de aceite: El aceite esencial de canela (*C. zeylanicum*) fue extraído mediante el método de destilación por arrastre con vapor según Aldicara (1976). El destilado de los aceites fue conservado a 5 °C.

2. Cromatografía en capa fina: Se utilizaron placas de vidrio de 13 x 5cm cubiertas con Sílica Gel 60H. Los solventes de corrida utilizados fueron tolueno: acetato de etilo (93:7). Posteriormente se realizó el revelado rociando cada una de las placas con solución A: 5% ácido sulfúrico en etanol y posteriormente con solución B: 1% vanilín en etanol. Se secaron y observaron las bandas. El método se validó mediante la realización de replicados de los análisis y el ensayo de muestras de aceites esenciales tipo de composición conocida.

3. Propiedades fisicoquímicas: Se determinaron: *Densidad a 20 °C*, se pesó por triplicado 1 ml de aceite esencial y posteriormente se efectuó el promedio de los valores obtenidos (Montes, 1966), el *índice de refracción* mediante refractómetro Abbe de reflexión total, el *índice ácido* realizando una titulación con solución acuosa de NaOH 0.1 N de 1 g de aceite esencial disuelto en alcohol 96° previamente neutralizado con azul de timol, determinando el punto final también con el mismo indicador.

Actividad óptica [α]₂₀: Se trabajó sobre 20 ml de solución de concentración 0.02 g/ml de aceite en alcohol, con polarímetro de círculo VEB Carl Zeiss Jena.

Espectroscopía infrarroja, se empleó un equipo FTIR Mattson, modelo Génesis II, espectros sobre ventanas de NaCl, 8 scans con resolución 2 cm⁻¹.

4. Actividad antimicrobiana

Procedencia de las cepas bacterianas

Se aislaron cepas bacterianas de *P. larvae* subsp. *larvae* de cuadros con síntomas clínicos de Loque Americana correspondientes a tres localidades de la provincia de Buenos Aires, Mechongué, Cobo y Chapadmalal. Se aislaron e identificaron mediante pruebas bioquímicas según Gordon y col. (1973) y Alippi (1991,1992). Se conservaron en agar MYPGP y se almacenaron hasta su utilización.

Preparación del inóculo del microorganismo

Células vegetativas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* previamente cultivadas en agar MYPGP (Mueller-Hinton-extracto de levadura-glucosa-piruvato de sodio) durante 48 horas a 35 °C ± 0.5, se suspendieron en agua bidestilada estéril y la suspensión fue estandarizada (FDA, 1998) ajustando la concentración hasta escala 1 de Mac Farland.

Bioautografía

Cromatogramas como los obtenidos por cromatografía en capa fina, sin revelado, se secaron previamente en desecador por una hora, se introdujeron en cápsula de petri de 15 cm de diámetro y se cubrieron con 100ml de agar MYPGP, con el agregado de cloruro de trifenil tetrazolio al 5% p/v en agua, inoculado con el microorganismo. Luego se incubaron a 36 ± 1°C durante 24-48 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aceite esencial de canela tiene en su composición mayoritariamente aldehído cinámico (67-75%), eugenol (4-10%) y algunos compuestos terpénicos como alfa pineno, cariofileno, etc. (Wagner y Bladt, 1996).

Las propiedades fisicoquímicas de los aceites están relacionadas con la composición química de los mismos por lo que pueden emplearse como criterio de pureza, identificación y verificación de genuidad. Los valores de densidad e índices de refracción son altos para aceites con composición mayoritaria en compuestos con núcleo bencénico en cambio son poco activos ópticamente (Montes, 1966). Para este aceite en particular se obtuvieron los siguiente valores: densidad a 20°C de 1,061 g/ml, índice de refracción de

1.6073 y actividad óptica $[\alpha]_{20}$ de 12.5° ($c=0.02$ g/ml). Por otra parte para este aceite el índice ácido fue de 15.7. Esta valoración es una determinación cuantitativa de la acidez total de un aceite esencial, valor que esta relacionado con su estado de conservación y envejecimiento que se detecta generalmente por un aumento de la acidez (Retamar, 1982).

Los espectros de IR presentaron bandas características correspondientes: entre 3000-3100 a enlaces CH aromáticos, 3020-3080 a CH alquenos, 1640-1680 a C=C y 1690-1760 al grupo C=O de aldehídos.

Las Fig 1a y 1b muestran los espectros del aceite esencial de canela y el del aldehído cinámico individual (base de datos de SDBS). Si bien el aceite esencial es una mezcla de diferentes compuestos, debido al alto contenido de aldehído cinámico ambos espectros presentan una gran similitud.

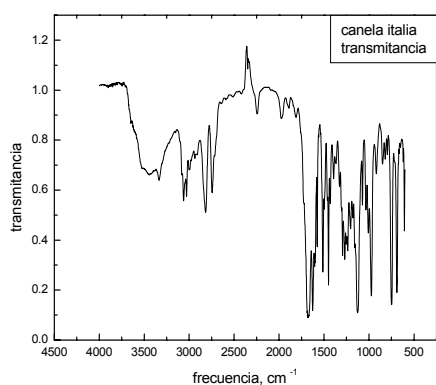


Fig.1a. Espectro infrarrojo de aceite esencial de canela

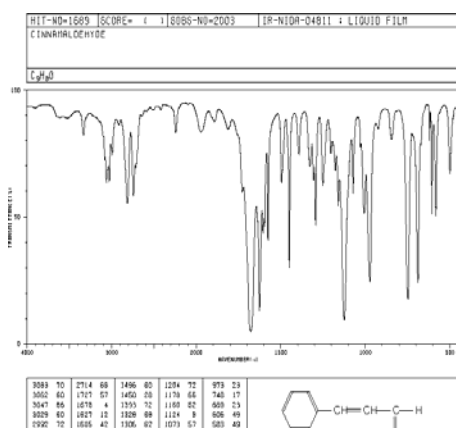


Fig. 1b. Espectro del aldehído cinámico, base de datos (SDBS)

La técnica de bioautografía, permite evaluar concentraciones mínimas del compuesto responsable de la actividad biológica observándose a simple vista la zona de inhibición (Marquez y otros, 2003). Se midieron los frentes de las bandas observadas de cada cromatograma y se determinaron los r_f siendo 0.67 para el aldehído cinámico presentando una zona de color violeta marronada, 0.35 para el eugenol banda de color naranja y una zona de r_f entre 0.05 y 0.21 correspondiente a la región de alcoholes terpénicos. La figura 2 muestra los frentes de las bandas de un cromatograma y una placa de bioautografía.

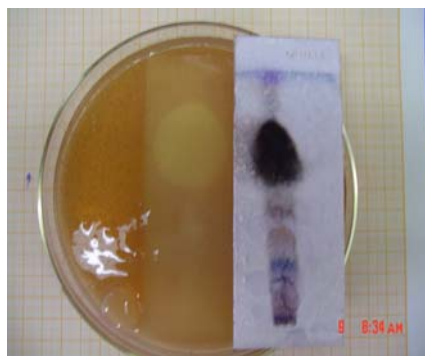


Fig. 2. Bioautografía de cepa Chapadmalal y cromatografía en placa de canela

El método de bioautografía mostró zonas amarillas de inhibición, es decir zonas con actividad antimicrobiana, en las fracciones cromatográficas correspondiente al aldehído cinámico y al eugenol.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos para estos dos componentes en las pruebas de actividad antimicrobiana frente a cepas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* de tres orígenes geográficos diferentes. Se observa que las cepas presentaron distinto grado de inhibición siendo el aldehído cinámico muy activo para la cepa proveniente de colmenas de Chapadmalal. Esto coincide con otras investigaciones que muestran que el aceite esencial de canela es muy activo frente a *P. larvae* subsp. *larvae* (Carta y Floris, 1989)

Tabla 1. Extensión de los halos de inhibición expresados en cm

Halo de inhibición	Cepa Chapadmalal	Cepa Mechongué	Cepa Cobo
Aldehído cinámico	Alto: 3.2 Ancho: 3.5	Alto: 2.0 Ancho: 2.0	Alto: 1.5 Ancho: 2.0
Eugenol	Alto: 0.5 Ancho: 1.0	Alto: 0.5 Ancho: 1.0	Alto: 0.5 Ancho: 1.0

CONCLUSIONES

Los dos principales componentes del aceite esencial de canela (*C. zeylanicum*), el aldehído cinámico y el eugenol presentaron actividad inhibitoria frente a cepas de *P.*

larvae subsp. *larvae* de diferentes orígenes. La mayor actividad se registró con el aldehído cinámico frente a la cepa de Chapadmalal.

BIBLIOGRAFÍA.

- Albo G., Henning C., Ringuelet J., Reynaldi F., Giust M y Alippi A. (2003)** Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 34, p.417-427
- Aldicara JR (1976)** Essential oil. In: *Encyclopedic of Chemical Processing and Desing.* (Eds), J. J. Macketta and W. A. Cunningham, Marcel Dekker, New York
- Alippi AM (1991)** A comparision of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera* in Argentina. *J. Apic. Res.* 30:75-80.
- Alippi AM (1992)** Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM* 8: 115-118.
- Alippi, A.M.; Ringuelet, J.A.; Cerimele, E.L.; Re, M.S. & Henning, C.P. (1996).** Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 4: 9-16.
- Alippi, A.M.; Albo, G.N.; Leniz, D.; Rivera, I.; Zanelli, M. and Roca, A.E. (1999).** Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American Foulbrood of honey bees. *Journal of Apicultural Research* 38: 149-158.
- Azzouz M.A and L.R.Bullerman. 1982.** Compartive antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J.Food Prot.*45, 1248-1301.
- Bailey, L. and Ball, B.V. (eds.) (1991).** *Honey Bee Pathology.* Second ed. Academic Press, London.
- **Carta y Floris (1989).** Prospective di controllo della peste americana api con oli essenziale. Prove preliminari. *S.I.T.E. Atti*, 8: 183-187.
- FDA (1998)** Food and Drug administration. App.3.73. In:*Bacteriological Analytical Manual.* (Ed) 8th. AOAC International, Gaithersburg, USA
- Gordon RE, Haynes WC, Pang H-N (1973)** The genus *Bacillus*. In: *Agricultural Handbook No. 427.* USDA. Washington, p.283.
- Ismail A. and M.D. Pierson.(1990).** Inhibition of germination, outgrowth and vegetative growth of *Clostridium Botulinum* 67B by spice oil. *J. Food Prot.*, 53, 755-758.

-Janssen A.; Chin N.; Scheffer J. (1996) Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharmac. Weekblnd. Scientific Edition*. Vol.8, nº6, pp.289-292

-Marquez B.; Cardenas A.; Morales C. y Verde Star M. (2003). Identificación de compuestos de *Melia Azedarach*, *Syzygium Aromaticum* y *Cinnamomum Zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia UANL*, vol VI, n 3, p.333-338.

-Montes (1966) Bromatología, tomo I I y III. Ed Universitaria de Buenos Aires.

-Raharivelomanana P.; Terrom G; Bianchini J. (1989). Contribution a l'etude de l'action antimicrobienne de quelques huiles essentiels extraites de plantes malgaches. *Archiv. Inst. Pasteur of Madagascar*. Vol. 56, nº 1, pp. 261-271.

-Retamar, J.A. (1982) Aceites esenciales de especies vegetales diversas sus posibilidades químicas. IPNAYS. CONICET-UNL-FIQ. Vol I.

-Shimanuki, H. (1990). Bacteria. In: *Honey bee pests, predators and diseases*. Second Ed., Morse R.A and Nowogrodzki R. (eds.). Cornell University Press, USA, pp. 27-47

-Wagner, H.; Blatt, S. 1996. Plant drug analysis. A thin layer chromatography. Atlas 2ª Ed.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Gabriel Gutkind (UBA) por la orientación brindada respecto de pautas a tener en cuenta en la realización de la técnica de bioautografía.

Este trabajo fue financiado por la UNMDP (Exa 233/02) y la ANPCyT (PICT 2002 N° 08-704).

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CEPAS NATIVAS DE *LEUCONOSTOC* SPP. POTENCIALMENTE UTILIZABLES COMO BIOPRESERVADORES EN ALIMENTOS.

ORTIZ, Silvia; RAFFELLINI, Silvia; MANS, María C.

Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología. C.C 221. (6700) Luján. 02323-423171 . marion@navigo.com.ar

RESUMEN

En la industria alimentaria existe interés en el empleo de bacterias lácticas como cultivos bioprotectores en alimentos. Se ha demostrado que cepas nativas de *Leuconostoc* spp. (bacteria láctica heterofermentativa) poseen capacidad inhibitoria sobre bacterias deteriorantes de alimentos. El objetivo del trabajo es estudiar las características de crecimiento de estas cepas ante diferentes condiciones de cultivo. Los resultados obtenidos indican que las cepas nativas de *Leuconostoc* spp. presentan distintos patrones de comportamiento según las condiciones de cultivo: hay cepas que presentan mayor velocidad de crecimiento en cultivo estático y otras bajo agitación. Sin embargo, la mayoría posee comportamiento similar en ambas situaciones. La mayor tasa de duplicación de las cepas va en general acompañada por una mayor velocidad en el descenso del pH del medio de cultivo en el que se desarrollan. Se corrobora la necesidad del conocimiento detallado de cada cepa para optimizar la multiplicación y el empleo de las mismas.

Palabras clave: leuconostoc - curvas de crecimiento – cultivo estático y con agitación

ABSTRACT

Food industry is interested in the use of acid lactic bacteria as bioprotective cultures in foods. Native strains of *Leuconostoc* spp. (heterofermentative lactic bacteria) have shown inhibitory capacity on food spoilage bacteria. The objective of this work is to study the growth characteristics of inhibitory native strains of leuconostocs under different culture conditions. These strains present different behavior models under different culture conditions: some strains grow rapidly in static culture while others grow faster under agitation, but most of the strains have similar behavior in both situations. Greater duplication rate is related with a rapid pH decrease in culture medium. These results corroborate the importance of a detailed knowledge of each strain to improve its growth and use.

INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria es habitual la utilización de aditivos químicos para mejorar la conservación de los alimentos. En los últimos años se está tratando de remplazarlos por conservadores naturales de origen biológico lo que ha dado lugar a la llamada “bioconservación” o “biopreservación”, que consiste en la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante el aprovechamiento de la microflora natural, propia o adicionada, o sus metabolitos (Aymerich y col., 1998). El empleo de las bacterias lácticas en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad ya que son utilizadas desde tiempos inmemoriales en la elaboración de alimentos fermentados. En la actualidad, se propone ampliar aún más su espectro de aplicación empleándolas como cultivos biopreservadores en alimentos no fermentados (Aymerich y col., 1998). Las actividades metabólicas de las bacterias lácticas contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables en los alimentos y además prolongan su vida útil (por inhibición de microorganismos alterantes) y aumentan su valor nutritivo y su salubridad (por inhibición de patógenos) (Vanderberg, 1993).

Uno de los géneros comprendidos dentro del grupo de las bacterias lácticas, utilizado habitualmente como starter en la industria alimentaria, es *Leuconostoc* spp. Son bacterias heterofermentativas que a partir de la fermentación de hexosas producen ácido láctico, etanol, anhídrido carbónico y una molécula de ATP (Cogan y Jordan, 1994). En presencia de oxígeno como aceptor de electrones, algunas cepas de *Leuconostoc* spp. generan ácido acético en lugar de etanol con producción de una molécula adicional de ATP por molécula de hexosa fermentada, por lo cual presentan mayor velocidad de crecimiento en cultivos aireados (Nuraida y col., 1992). En consecuencia, podrían resultar más inhibitorias que aquellas que solo producen ácido láctico por provocar mayor acidificación y por el tipo de ácido generado (Lortie y col., 1993).

Cepas nativas argentinas de *Leuconostoc* spp. poseen capacidad inhibitoria sobre bacterias psicrótrofas deteriorantes de alimentos (Fantuzzi y col., 1999; González y col., 1995; Mans de Marión y col., 1995). Se considera de interés conocer las características de crecimiento y metabólicas de estas cepas para optimizar su utilización como biopreservadores.

El objetivo del trabajo es estudiar la cinética de crecimiento, ante diferentes condiciones de cultivo, de cepas nativas de leuconostocs que poseen capacidad inhibitoria sobre bacterias deteriorantes de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron cepas de la colección de cultivos del laboratorio de Bacterias Lácticas de la Universidad Nacional de Luján:

- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* NCFB 529 (cepa tipo)
- *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LL223, LL44, LL101 y LL 28: cepas nativas aisladas de leche cruda (González y col., 1990), con alta capacidad inhibitoria de bacterias psicrótrofas Gram negativas (González y col., 1995; Mans de Marión y col., 1995)
- *Leuconostoc argentinum* LL76: cepa nativa aislada de leche cruda, que constituye una nueva especie de *Leuconostoc* originaria de Argentina (Dicks y col., 1993). Es la cepa tipo de la especie (ATCC 51354). Posee capacidad inhibitoria de bacterias psicrótrofas aisladas de leche cruda (Fantuzzi y col., 1996)

Los cultivos stock se almacenaron a -20°C en leche descremada reconstituida (10% p/v) estéril, suplementada con 0.3% (p/p) de extracto de levadura. Antes de ser utilizadas en los ensayos, las cepas desarrollaron en caldo MRS a 30°C durante 24 h.

Determinación de la curva de crecimiento de Leuconostoc spp. en cultivo estático y bajo agitación

a) Preparación del inóculo de cada cepa de *Leuconostoc* spp.:

Cada cepa se sembró (1%) en caldo MRS y se incubó ON a 30°C . El cultivo obtenido se centrifugó (5000 rpm – 10 minutos) y el pellet se resuspendió en caldo MRS.

b) Determinación de las curvas de crecimiento

El inóculo se sembró (1%) en erlenmeyers con 200 ml de caldo MRS, que se incubaron 24 h a 30°C en cultivo estático y en condiciones de agitación (100 rpm). Periódicamente (cada hora) se tomaron muestras de los cultivos y se determinaron por triplicado: densidad óptica (λ : 600 nm), pH, acidez titulable (titulación con NaOH 0.1N) y recuento de células viables (en placas de agar MRS, incubadas a 30°C durante 48 h).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura N° 1 (a y b) representa las curvas de crecimiento de las cepas de *Leuconostoc* spp. bajo dos condiciones de cultivo: estático y en agitación. *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* NCFB 529 (cepa tipo) presenta menor velocidad de crecimiento comparada con las cepas nativas, en ambas condiciones de cultivo.

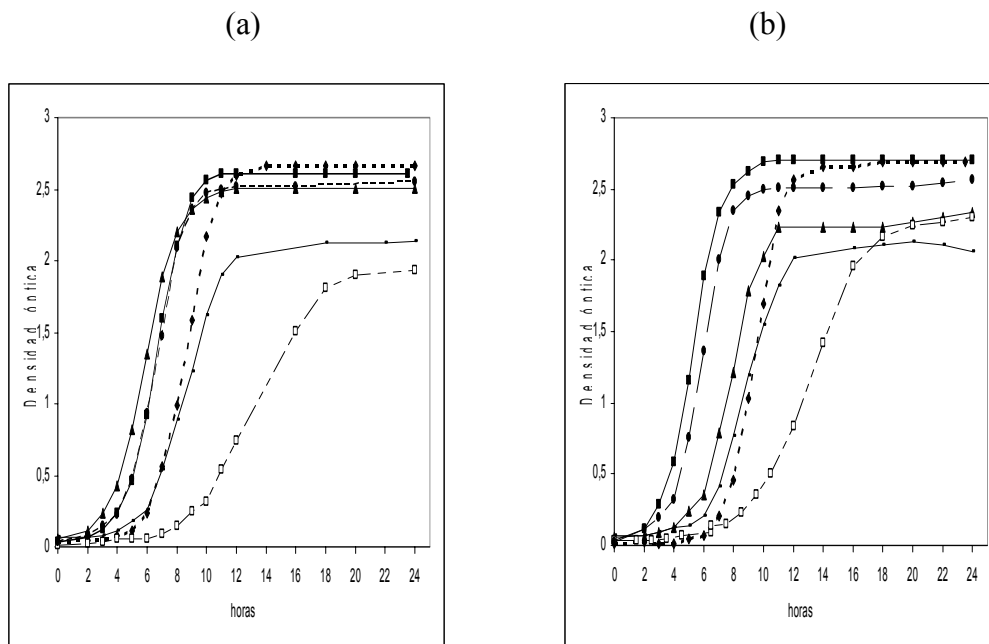


Figura N° 1: Curvas de crecimiento de cepas de *Leuconostoc* spp. ante diferentes condiciones de cultivo: (a) cultivo estático; (b) cultivo en agitación (- - ◆ - -) LL223; (— ■ —) LL28; (—▲—) LL76; (- □ - -) NCFB 529; (—■—) LL44; (- ● - -) LL101.

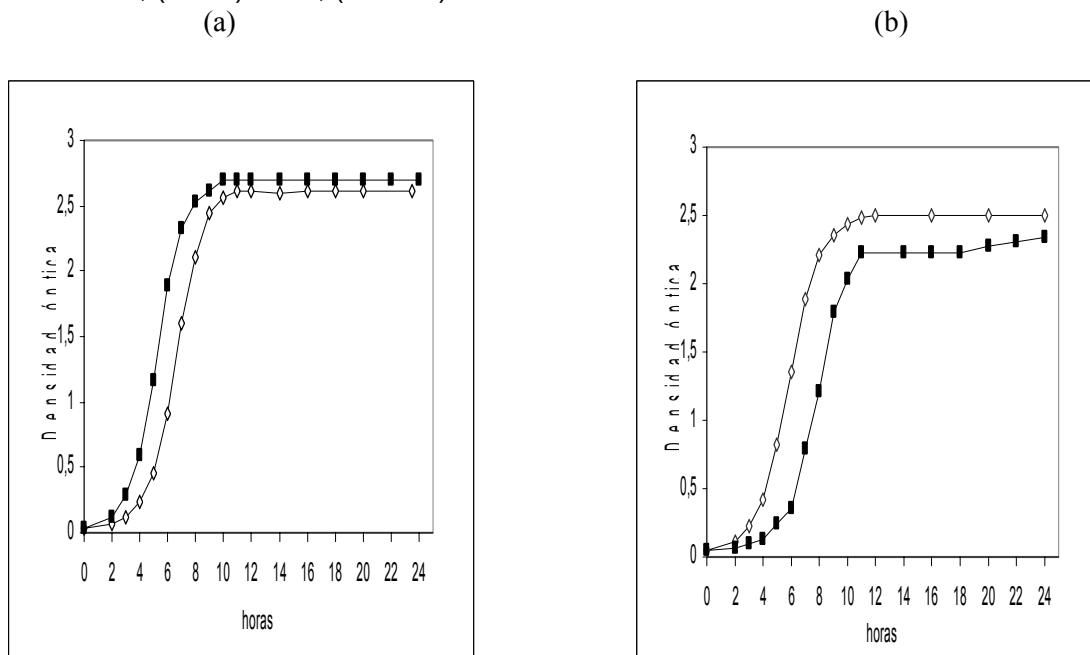


Figura N° 2: Curvas de crecimiento de las cepas LL 28 (a) y LL 76 (b) bajo diferentes condiciones de cultivo: cultivo estático (—◇—) y cultivo en agitación (—■—).

La carga celular inicial fue de 10^6 ufc/ml, y la población máxima alcanzada fue de 10^9 ufc/ml. La duración de la fase lag varió entre 1 y 5 horas, según la cepa y la condición de cultivo en la que se la hace crecer. Los cultivos llegaron a la fase estacionaria entre las 8 y las 16 horas de incubación según la cepa ensayada.

Si bien la mayoría de las cepas poseen un comportamiento similar en cultivo estático y bajo agitación, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LL 28 presenta menor fase lag en cultivo bajo agitación mientras que la cepa nativa *L. argentinum* LL 76 presenta menor fase lag y mayor velocidad de crecimiento en cultivo estático (Figura N°2).

Debería corroborarse si el comportamiento observado en la cepa LL76 es característico de la especie *L. argentinum* o si es una propiedad particular de la cepa en estudio, y si la menor velocidad de crecimiento bajo agitación podría ser debida a metabolitos generados ante el exceso oxígeno que pueden resultar bacteriostáticos para la propia cepa (Piard y Desmazeaud, 1991).

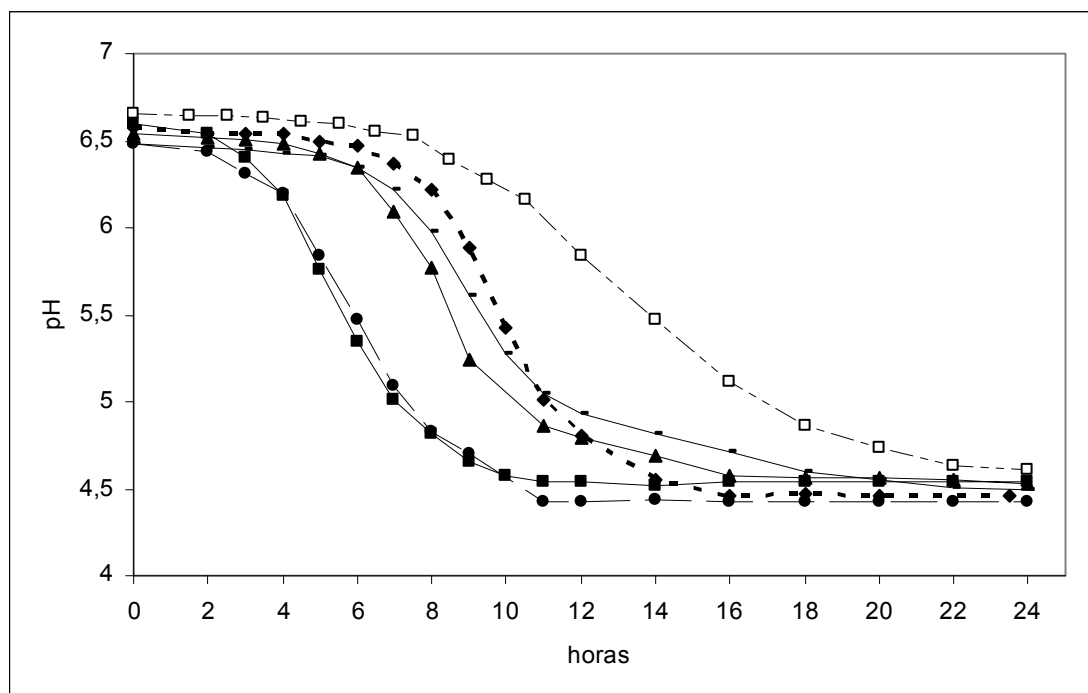


Figura N° 3. Descenso de pH producido por cepas de *Leuconostoc* spp. en caldo MRS a 30°C, en cultivo bajo agitación (- - ◆ - -) LL223; (— ■ —) LL28; (—▲—) LL76; (- - □ - -) NCFB 529; (—●—) LL44; (- -●- -) LL101.

Con respecto a la capacidad de acidificación, en general se observa un descenso de pH más rápido en aquellas cepas que poseen mayor velocidad de crecimiento (Figura N°3). No obstante, todas las cepas ensayadas alcanzan el mismo valor de pH en la fase estacionaria de crecimiento (pH mínimo = 4,5). Los valores de acidez producida (expresada en porcentaje de ácido láctico) fluctúan entre 0,65 (cepa NCFB 529) y 1,4% (cepa LL 223). En general se observan producciones similares en cultivos estáticos y bajo agitación, si bien algunas cepas como por ejemplo la LL28 presentan mayor producción de acidez bajo condiciones de agitación (1,1%) que en cultivo estático (0,8%). Si bien el

método de titulación empleado no permite diferenciar el tipo de ácido producido, la mayor producción de acidez observada en condiciones de agitación alienta la hipótesis de que en esta cepa tenga lugar la producción de ácido acético.

CONCLUSIONES

El diferente comportamiento observado en las cepas ensayadas justifica la necesidad de estudiar minuciosamente los patrones de crecimiento y las características metabólicas de cada una para poder optimizar las condiciones de multiplicación y de aplicación de las mismas como sistemas biopreservadores en alimentos.

AGRADECIMIENTOS

La Ing. Silvia Ortiz es Becaria de Iniciación de la Universidad Nacional de Luján

BIBLIOGRAFÍA

- **Aymerich, M.; Hugas, M. (1998).** Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. Eurocarne, 72: 39-49.
- **Cogan, T. M.; Jordan, K. N. (1994).** Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. J. Dairy Sci. 77: 2704-2717.
- **Dicks, L.; Fantuzzi, L.; González, F.; DuToit, M.; Dellaglio, F. (1993)** *Leuconostoc argentinum* sp.nov., isolated from Argentine raw milk. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 43 pag. 347-351.
- **Fantuzzi, L.; Mans, M.; Raffellini, S.; González, F. (1996).** Efecto inhibitorio de *Leuconostoc argentinum* sp. nov. sobre la flora psicrótrofa de leche cruda. Comunicación presentada al IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos y Primer Simposio Peruano de Conservación de Alimentos. Perú.
- **Fantuzzi, L.; Raffellini, S.; González, F. (1999).** Inhibition of psychrotrophic bacteria growth in raw milk stored at low temperature by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* LL152. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 17: 101-106.
- **González, F. C.; Mans de Marión, M. C.; Raffellini, S.; Sanahuja, M. C.; Fantuzzi, L. (1990).** Leuconostocs en leche cruda: aislamiento e identificación de especies de utilización rápida de lactosa. Rev. Arg. Microbiol. 22 (2) 86-89.
- **González, F. C.; Mans de Marión, M. C.; Raffellini, S.; Fantuzzi, L. (1995).** Preliminary tests on the inhibitory effect of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* isolated

from raw milk on Gram negative psychrotrophic bacteria. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*. 13: 55 - 59.

- **Lortie, L.; Simard, R. E.; Lavoie, M. C. (1993)**. Synergistic interaction between lactic and acetic acids partly responsible for the inhibitory effect of four *Lactobacillus casei* strains. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*. 11: 277- 228.

- **Mans de Marión, M. C.; Raffellini, S.; Fantuzzi, L.; González, F. C. (1995)**. Inhibitory effect of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* on *Pseudomonas fluorescens* in milk stored at low temperatura. *Aust. J. of Dairy Technol.* 50: 1-5.

- **Nuraida, L.; Grigolava, I.; Owens, J. D.; CampbellPlatt, G. (1992)**. Oxigen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc* spp. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 517 – 522.

- **Piard, J. C.; Desmazeaud, M. (1991)**. Inhibiting factors produced by lactica acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71:525-541.

- **Vanderberg, P.A. (1993)**. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221-223.

EFFECTO PROTECTOR DE UNA CEPA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (CIDCA 133) SOBRE LA ACCIÓN DE *E.coli* O157: H7 EN CULTIVOS CELULARES.

HUGO, Ayelen A^{1,3}.; PÉREZ, Pablo F^{1,2,3}.; DE ANTONI Gaciela L.^{1,2,4}

¹CIDCA. ²Cátedra de Microbiología General. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. UNLP. Calle 47 y 116. La Plata. (1900). Argentina. Tel/fax: 54-221 4249287.

³CONICET. ⁴CICPBA. e-mail: ahugo@cidca.org.ar

RESUMEN

E. coli productor de toxina Shiga (STEC) está asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Las cepas de STEC pertenecen a la categoría de *E.coli* enterohemorrágico (EHEC) que poseen varios factores de virulencia, entre ellos la toxina Shiga (*stx1* y *stx2*), la proteína intimina (*eae*) y la enterohemolisina (*hly*).

Se conoce el rol de ciertas cepas de bacterias lácticas en la protección de epitelios contra la adhesión e invasión de patógenos. El objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* la posible acción protectora de una cepa potencialmente probiótica, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133.

Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad y proliferación con células Vero y una cepa caracterizada de EHEC.

Mediante los ensayos de citotoxicidad revelados por cristal violeta se determinó que la cepa CIDCA 133 protege frente a la acción de EHEC *in vitro*. Los ensayos de viabilidad celular cuantificados por MTT indican que dicha cepa antagoniza la acción tóxica de EHEC.

Palabras Claves: EHEC, toxina Shiga, lactobacilos, citotoxicidad.

SUMMARY

E. coli Shiga toxin producer (STEC) is associated to diarrhea, hemorrhagic colitis and uremic hemolytic syndrome. *E.coli* enterohaemorrhagic (EHEC) are STEC strains with several virulent factors, among them Shiga toxin (*stx1* y *stx2*), intimin protein (*eae*) and enterohaemolysin (*hly*).

The role of certain lactic acid strains on the epithelium protection against adhesion and invasion of pathogens is documented. The aim of this paper is the determination of the

protective action of strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 against toxic action of one strain of EHEC.

Citotoxicity assays detected with violet crystal and viability assays detected with MTT were performed with Vero cells.

Whit both assays it was confirmed that strain CIDCA 133 has a protective action against the toxic action of EHEC.

INTRODUCCIÓN.

E. coli productor de toxina Shiga (STEC), es considerado desde hace más de dos décadas un patógeno emergente transmitido por alimentos asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Las cepas de STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E.coli* enterohemorrágico (EHEC). (Levine,1987). Numerosos factores de virulencia han sido caracterizados en las cepas de EHEC. En primer lugar se encuentra la toxina Shiga (Stx1 y Stx2) codificada por un fago lisogénico presente en el cromosoma bacteriano, cuyo efecto es la interrupción de la síntesis proteica en aquellas células eucarióticas que contienen el glicolípido de membrana receptor Gb3 (Vero, Hela, células renales endoteliales y células epiteliales intestinales) y su correspondencia clínica sería el SUH. Otro factor de virulencia importante corresponde a la proteína intimina codificada por el gen cromosomal *eae*; responsable de la adhesión a la mucosa intestinal y causante de la lesión *attachment /effacement*. El rol de la enterohemolisina (*hly*) presente en el plásmido de 60 Mda, no se ha establecido aún claramente (Nataro y Kaper, 1998). *E.coli* O157: H7 es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico y es el más aislado de los casos de SUH (Blanco y col, 2001). *E.coli* STEC se transmite al hombre a través de alimentos contaminados con materia fecal, especialmente por carne mal cocida y productos de consumo no pasteurizados. La transmisión persona a persona y mediante el agua de bebida o recreacional también ha sido reportada (Amstrong et al,1996). Los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular son los principales reservorios de STEC. Los animales excretan las bacterias en sus heces, es por ello que la contaminación fecal del agua y la diseminación de las mismas durante la faena son las fuentes más importantes en la dispersión. El ganado vacuno no es un huésped específico de STEC, en ellos existe portación de serotipos O157 y no O157. La prevalencia del serotipo O157 : H7 varía desde el 0.5% al más del 2% en campo y a nivel de playa de faena (Rivas y col. 2004).

En la Argentina el SUH es endémico y el país posee la mayor incidencia mundial con 8,6 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años. Más de 7000 casos se ha reportado desde 1965 (Comité de Nefrología, 1995).

Las bacterias probióticas ejercen distintos efectos benéficos para el hospedador, entre ellos impedir la adherencia a la mucosa intestinal de microorganismos patógenos o antagonizar sus factores de virulencia. (para una revisión ver Nadiu, 1999). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 constituye una cepa con alto potencial probiótico; ya que como fuera previamente descrito es resistente a concentraciones elevadas de ácido y bilis, además de inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes de alimentos (Kociubinski y col, 1996; Kociubinski y col, 1999). El objetivo del presente trabajo es estudiar si la cepa CIDCA 133 ejerce un efecto protector frente a la acción de la toxina Shiga producida por una cepa de *E.coli* O157:H7, sobre células Vero. La alta sensibilidad de las células Vero a la toxina Shiga fue observada por primera vez por Konowalchuk (Konowalchuk y col, 1977). Dado la alta concentración del receptor Gb3 presente en la membrana plasmática de esta línea celular, sigue siendo la técnica *gold standar* para la confirmación de aislamientos productores de Stx (Karmali y col., 1985).

A nuestro entender no existen trabajos que documenten la protección frente a la acción citotóxica utilizando cepas probióticas en ensayos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas empleadas y condiciones de cultivo.

Lactobacillus delbrueckii subsp *lactis* cepa CIDCA 133 pertenece a la colección de cultivos del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.).

Escherichia coli O157:H7 cepa EHEC 69160 constituye un aislamiento clínico efectuado en el Hospital de Niños Sor María Ludovica de la ciudad de La Plata. La cual fue caracterizada molecularmente en el A.N.L.I.S Dr. Carlos Malbrán como *stx2* (+); *eae* (+) y *hly* (+).

Los cultivos stock de ambos microorganismos se conservaron a -80°C utilizando glicerol al 10% como crioprotector. Las cepas en estudio se reactivaron dos veces en medio líquido antes de cada experimento.

Lactobacillus delbrueckii subsp *lactis* fue crecida anaeróticamente en medio MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 37°C durante 16hs. Las bacterias se colectaron por

centrifugación a 10000g por 10 minutos y se resuspendieron a la concentración deseada en medio DMEM sin suplementos.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) cepa 69160 fue crecida aeróbicamente sin agitación en caldo TSB durante 16hs a 37°C. Las bacterias se colectaron por centrifugación en las condiciones mencionadas. Los sobrenadantes de cultivo se filtraron asépticamente por membrana de 0,45 µm.

Cultivos Celulares.

La línea celular Vero originaria de riñón de mono verde africano fue gentilmente facilitada por el Instituto A.N.L.I.S. Dr Carlos Malbrán de Buenos Aires. Argentina. Las mismas se crecieron a 37°C en atmósfera enriquecida al 5% con CO₂. El medio de cultivo empleado fue el DMEM (Dulbecco's modified essential médium, Gibco. USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, aminoácidos esenciales y antibióticos (penicilina, estreptomycin y fungizona).

Las monocapas empleadas pertenecían a cultivos confluentes de 72 hs o a cultivos no confluentes de 24 hs para los experimentos de proliferación.

Cuantificación de citotoxicidad.

Los cultivos de células Vero de 72 hs totalmente confluentes se incubaron con distintas diluciones de *E.coli* EHEC, resuspendida en su propio sobrenadante filtrado durante 3 hs a 37°C a una concentración máxima final de 1x10⁸ ufc/ml. Se experimentó a su vez, la protección ejercida por la cepa CIDCA 133, preincubando las monocapas con una concentración final de 1x10⁸ ufc/ml.

El desprendimiento celular, se evaluó mediante tinción con cristal violeta. Brevemente se lavaron las monocapas dos veces con PBS, fijándolas luego con una solución de formol al 2% durante 1 min. Se procedió a lavar nuevamente las células con PBS y se añadió el colorante (cristal violeta 0.13%, 5% de etanol y 2% de formol) incubándolo durante 20 min a temperatura ambiente. Se extrajo el exceso de colorante mediante lavados sucesivos. La cuantificación colorimétrica se realizó disolviendo el colorante en etanol 50% y midiendo la absorbancia a 650 nm.

Ensayo de viabilidad celular cuantificado por MTT. (Carmichael y col, 1987).

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-bromuro de 2,5-difeniltetrazolium) (Sigma, USA) es reducido por las células vivas a azul de formazán producto de la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa.

Las células Vero fueron sembradas en placas de 96 fosas a una concentración de 2x 10⁴ cel/ml y se incubaron durante 24 hs, en medio DMEM suplementado; observándose un

50% de confluencia en las monocapas al momento del ensayo. Las células luego de ser lavadas con PBS se incubaron con diluciones crecientes de sobrenadante de cultivo filtrado de EHEC en medio DMEM base con gentamicina (100µg/ml) o se coincubaron con dichos sobrenadantes y una concentración constante de lactobacilo cepa CIDCA 133 de 1×10^7 ufc/ml durante 48 hs. El agregado de gentamicina al medio impidió el crecimiento del lactobacilo cuyo metabolismo acidificante podría dañar las monocapas. En otra condición, el sobrenadante de *E.coli* se preincubó con pellet concentrado de lactobacilo durante 60 min. a 37°C con agitación. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante libre de bacterias se agregó a las células e incubó también durante 48 hs a 37°C.

Para revelar el ensayo, se añadió una solución de MTT (0.5mg/ml en DMEM) y se incubaron las células durante 3 hs a 37°C. El color del precipitado de formazán se extrajo con HCl 0.1M preparado en isopropanol. Se efectuó la lectura del sobrenadante a 650 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La citotoxicidad de la cepa EHEC 160 se evaluó en ensayos cortos de 3hs a través del desprendimiento celular provocado a las monocapas de células Vero confluentes de 3 días. Experimentos anteriores indicaron que la producción de ácidos por el lactobacilo durante la incubación dañaban las monocapas más jóvenes, por ello se emplearon células de 72 hs.

En la Figura 1 se observa una neta protección cuando las monocapas fueron preincubadas durante una hora con el lactobacilo frente al desprendimiento causado por la acción combinada del sobrenadante de EHEC junto con la presencia de la cepa bacteriana. El daño provocado por el sobrenadante de EHEC libre de células no fue significativo en estos ensayos de corta duración (datos no mostrados).

A los efectos de cuantificar el grado de desprendimiento se midió la absorbancia del colorante eluído con etanol (Figura 2). En las condiciones ensayadas se revela una diferencia significativa para todas las concentraciones de sobrenadante EHEC más bacteria y la preincubación con el lactobacilo. El control de células Vero y células con la cepa CIDCA 133 (punto cero) no posee diferencias significativas, demostrando que el lactobacilo no afecta la integridad de la monocapa

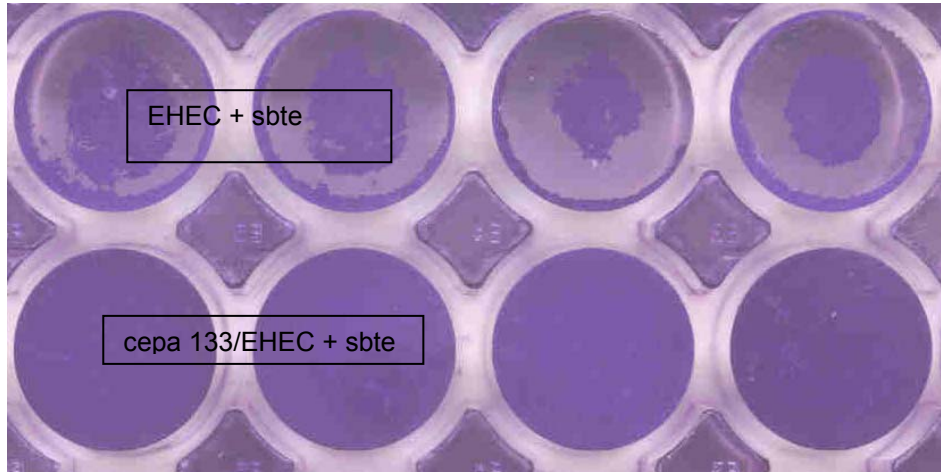


Figura 1: Fotografía del desprendimiento celular causado por *E.coli* EHEC sobre monocapas de células Vero. Primera fila cepa EHEC más su sobrenadante (sbte). Segunda fila monocapas preincubadas con lactobacilo cepa CIDCA 133 y luego sometidas a la acción de EHEC más su sobrenadante.

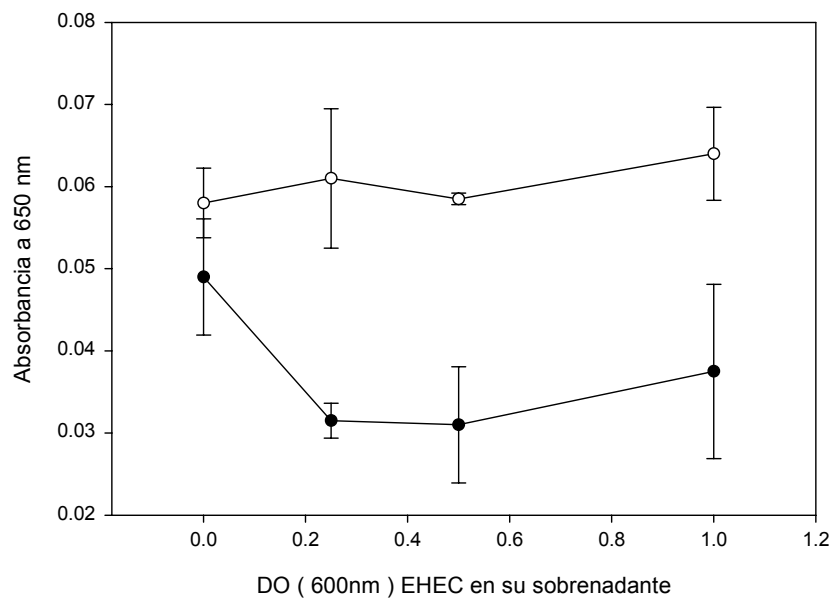


Figura 2: Cuantificación del desprendimiento celular mediante cristal violeta provocado *E.coli* EHEC. (●) Monocapas de células Vero incubadas con *E.coli* EHEC en su sobrenadante de cultivo durante 3 hs. (○) Monocapas de células Vero que fueron preincubadas durante una hora con lactobacilo cepa CIDCA 133 antes de añadirse *E.coli* EHEC.

En la Figura 3 se muestran los ensayos de viabilidad, cuantificada a través de la actividad succinato deshidrogenasa mitocondrial.

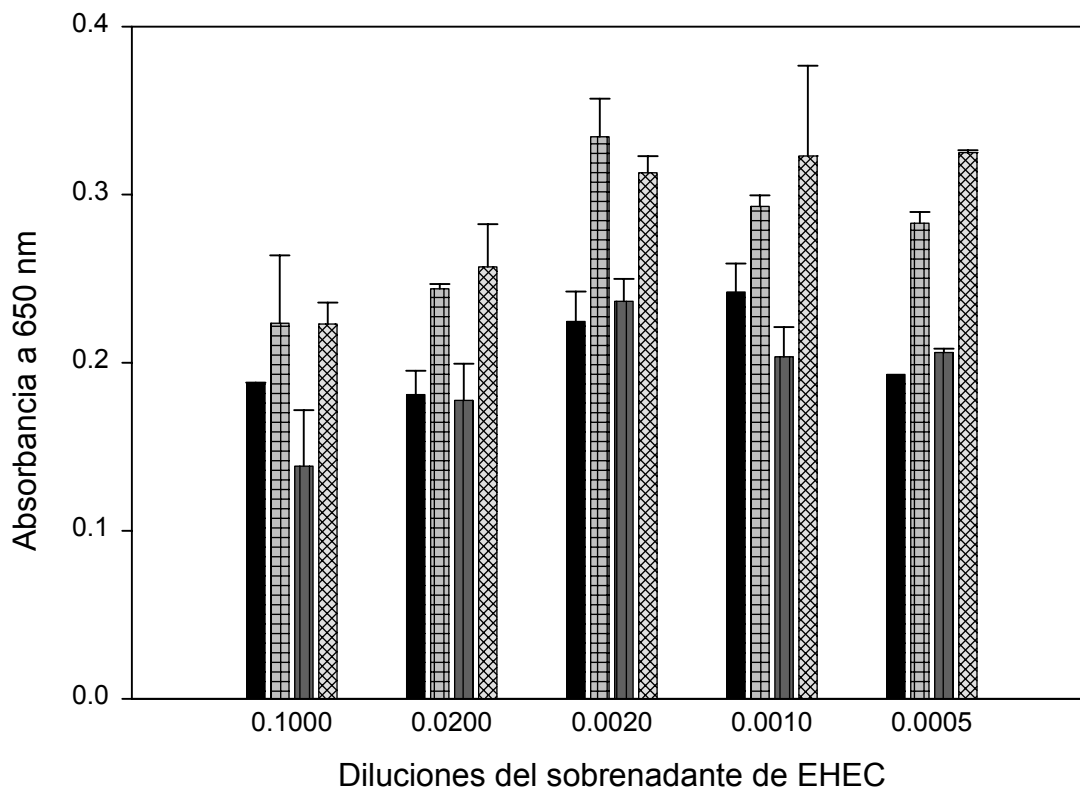


Figura 3: Viabilidad celular evaluada mediante MTT en un ensayo de proliferación sobre células Vero.
 Sobrenadante de cultivo filtrado de *E.coli* EHEC. Sobrenadante EHEC coincubado con 1×10^7 ufc/ml de lactobacilo cepa CIDCA
 EHEC preabsorbido con pellet bacteriano cepa CIDCA 133.
 Células control. Las barras indican la desviación estándar.

Se observó una disminución significativa de la proliferación en las células incubadas con los sobrenadantes de EHEC con respecto a las células control, indicando la presencia de toxina en los sobrenadantes. La adición del lactobacilo al sobrenadante produjo una inhibición de la acción tóxica permitiendo una proliferación equivalente a la de las células control. Cabe destacar que el lactobacilo no experimenta crecimiento durante la incubación, dado la concentración de gentamicina presente en el medio. El pretratamiento de los sobrenadantes con pellet de lactobacilo concentrado no revela tener un efecto

protector sobre la actividad de los mismos; lo que indicaría que no es significativa la adsorción de toxina Shiga en la superficie bacteriana. Sin embargo de la comparación de las figuras 2 y 3, no se puede descartar que exista adsorción de la toxina en las condiciones utilizadas en los ensayos cortos de citotoxicidad.

Los ensayos de ejecución rápida (citotoxicidad revelada por cristal violeta) permitirían realizar en forma ágil un relevamiento de bacterias probióticas con efecto protector frente a la combinación de factores de virulencia de EHEC. Los ensayos de proliferación y viabilidad celular se pueden utilizar para determinar cepas probióticas con capacidad de proteger contra la acción de toxina Shiga *in vitro*.

CONCLUSIONES

Los ensayos de citotoxicidad sobre células Vero revelados por cristal violeta permiten detectar bacterias lácticas protectoras frente a la acción de EHEC *in vitro*

Los ensayos de viabilidad celular sobre células Vero cuantificados por MTT permiten detectar bacterias lácticas que protegen de la acción de la toxina Shiga *in vitro*

Lactobacillus delbruekii subsp *lactis* cepa CIDCA 133 es una cepa potencialmente probiótica que antagoniza la acción tóxica de EHEC.

BIBLIOGRAFÍA.

Amstrong, G.L; J Hollingsworth; J.G. Morris. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O:157 H:7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiology Reviews*. 1996.18: 29-51.

Blanco, J; M. Blanco; J. E. Blanco; A. Mora; M. P. Alonso; E. A González; M. I. Bernárdez. 2001. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In Duffy, G; Garvey, P; McDowell, D.A. (Eds.), *Verocytotoxigenic E. coli*. Food and Nutrition Press Inc. Trumbull, C.T. pp. 113-148.

Carmichael, J; W.G, DeGraaf; A. F Gazdar; J.D. Minna; J.B. Mitchell. Evaluation of tetrazolium - based semiautomatic colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer. Res*. 1987. 47: 936-942.

Comité de Nefrología. Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 1995. 93: 409 – 411.

Karmali, M.A; M. Petric; C. Lim; R. Cheung; G.S. Arbus. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *E.coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J.Clin.Microbiol*. 1985.22: 614-619.

Finter, N.B. Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. 1969J.Gen.Virol. 5, 419 - 427.

Kociubinski, G., P. F Pérez and G. L. De Antoni, Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Food Protection. 1999. 62, 905-912.

Kociubinski, G; P. F Pérez; M. C. Añón; and G. L. De Antoni. A method of screening of highly inhibitory lactic acid bacteria. Journal of Food Protection. 1996. 59, 739-745.

Konowalchuk, J; J. I. Speirs; S. Stavric. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1977. 18: 775-779.

Levine, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J.Infect.Dis.1989; 160:469-75.

Nadiu, A.S; W. R. Bidlack ; R.A. Clemens. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1999. 38 (1): 13 – 126.

Nataro, J. and J.B.Kaper. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11: 142-201.

Rivas,M. I.Chinen; E.Miliwebsky; E.manfredi; N. Deza E. Martínez; G. Leotta; A. Baschkier Manual de Procedimientos para la Detección de *Escherichia coli*, productor de toxina Shiga O:157 y no-O:157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR. 2004. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán.

MODELADO DEL DESARROLLO BACTERIANO EN UN SISTEMA MODELO DE UN PRODUCTO CÁRNEO.

COLL CARDENAS, FERNANDA¹; GIANNUZZI, LEDA¹ Y ZARITZKY, NOEMI^{1,2}.

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET. Fac. Cs. Exactas. ² Fac Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, calle 47 y 116, La Plata (1900), Argentina. E-mail: zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se modeló matemáticamente el crecimiento de *Klebsiella sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp* y *Listeria innocua* inoculadas en un sistema modelo de un producto cárneo, almacenadas a 0, 4 y 10°C y con el agregado de ácido láctico en distintas concentraciones (pH 6.10, 5.80 y 5.60). Se aplicó la ecuación de Gompertz, calculándose los parámetros derivados: fase de latencia (LPD); velocidad específica de crecimiento (μ) y máxima densidad poblacional (MPD). Cuando el ácido tuvo acción bacteriostática, se utilizaron regresiones lineales. A 10°C, los mayores valores de μ correspondieron a *Klebsiella sp*. y los menores para *Pseudomonas sp*. *Klebsiella sp*. y *E.coli* presentaron velocidades específicas de crecimiento más sensibles a la concentración de ácido que *Pseudomonas sp* y *Listeria innocua*. *E. coli* mostró los mayores valores de LPD a 0°C (30-50 días). El efecto de la temperatura sobre μ fue modelado mediante una ecuación tipo Arrhenius, determinándose las energías de activación correspondientes.

Palabras claves: modelado matemático, carnes, microbiología de carnes, refrigeración

ABSTRACT

Microbial growth of *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp* and *Listeria innocua* inoculated on a meat model system was analyzed at 0, 4 and 10°C; lactic acid at different concentrations was added to reach pH values of 6.10, 5.80 and 5.6.

Experimental results were mathematically modelled using Gompertz equation and derived parameters (lag phase duration (LPD), specific growth rate (μ) and maximum population densities (MPD) were calculated in each case.

When the acid showed bacteriostatic effect linear regressions were applied. At 10°C the highest μ values corresponded to *Klebsiella sp* and the lowest to *Pseudomonas sp*. Specific growth rates of *Klebsiella* and *E. coli* were more sensitive to the acid

concentration than *Pseudomonas* and *Listeria innocua*. *E. coli* showed the highest values of LPD at 0°C (30-50 days). The effect of temperature on μ was modeled using an Arrhenius equation, and activation energies were calculated.

INTRODUCCION:

El crecimiento de los microorganismos de la carne tiene lugar a expensas de sus componentes solubles, principalmente carbohidratos, aminoácidos y ácido láctico. Este último también puede tener efecto bacteriostático al producir el descenso del pH. La carne presenta en su superficie numerosos microorganismos alteradores, tales como *Pseudomonas*, *Enterobacterias*, *Brochothrix*, vehiculizando también a agentes patógenos. Su pH oscila desde 6.0, óptimo para la mayoría de las bacterias patógenas y alteradoras, hasta valores próximos a 5.5 y al ser combinados con temperaturas bajas, pueden prevenir el crecimiento casi por completo.

La microbiología predictiva permite predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo las condiciones ambientales con el objeto de asegurar la calidad del alimento. Uno de los modelos matemáticos frecuentemente empleado es el de Gompertz (Zwietering y col. 1990) que permite estimar el tiempo de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y la máxima concentración poblacional (MPD) en distintas condiciones.

El objetivo de este trabajo fue modelar matemáticamente el desarrollo de *Klebsiella sp*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.* y *Listeria innocua*, inoculadas en sistemas modelo de un producto carneo con diferentes niveles de ácido láctico e incubadas a distintas temperaturas de almacenamiento.

MATERIALES Y METODOS:

Aislamiento e identificación de las cepas:

A partir de distintas muestras de carne, se aislaron en medios de cultivo adecuados *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp* y *Escherichia coli*. *Listeria innocua* fue obtenida a partir de una cepa de referencia, cedida por el Instituto Malbrán.

Medios de cultivo utilizados como sistema modelo de carne e inoculación:

El sistema modelo cárnico se preparó a partir de extracto de carne al 2% con el agregado de ácido láctico en concentraciones de 0.28, 0.39 y 0.58 M (pH 6.10, 5.80 y 5.60 respectivamente). El medio sin ácido agregado (pH 7) fue tomado como control. El inóculo fue preparado a partir de un cultivo de bacterias en fase exponencial en caldo nutritivo (18

hs, 37°C) y se inoculó al sistema modelo cárnico de tal forma que permita alcanzar un nivel de 10^7 - 10^8 UFC/ml. Las cepas de *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *E. coli* y *Listeria* se inocularon separadamente y se incubaron en forma estática a tres temperaturas (0, 4 y 10°C). Periódicamente, cada 2 días, se determinaron los recuentos microbianos en Agar Plate Count (37°C, 48hs) durante un tiempo máximo de 50 días.

Modelado matemático:

Se utilizó la ecuación de Gompertz cuya expresión es

$$\log N = a + c \cdot \exp(-\exp(-b(t-m))) \quad (1)$$

donde: $\log N$ es el logaritmo de los recuentos microbianos [\log (UFC/ml)] al tiempo t , en días; a es el log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente [\log (UFC/ml)]; c es el log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente [\log (UFC/ml)]; m es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [días]; b es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo m [días] $^{-1}$. De éstos derivan la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b \cdot c / e$) [\log (UFC/ml)/días], la duración de la fase de latencia (LPD = $m - 1/b$) [días] y la máxima densidad poblacional (MPD = $a + c$) [\log UFC/ml]. Cuando el número de microorganismos se mantiene estable o decrece durante el almacenamiento se utilizaron regresiones lineales:

$$\log N_t = \log N_0 + a t \quad (2)$$

donde: $\log N_t$ es el logaritmo de los recuentos microbianos finales [\log (UFC/ml)] al cabo del tiempo; t [días]; $\log N_0$ es el logaritmo de los recuentos microbianos iniciales [\log (UFC/ml)] y a es la pendiente de la regresión [(UFC/ml) $^{-1}$ días $^{-1}$] que es negativa cuando hay efecto bactericida (Whiting, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSION:

Modelado del desarrollo de *Klebsiella sp.*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp* en sistemas modelo de un producto cárneo:

La Fig. 1 presenta los recuentos microbianos de *Listeria innocua*, *Klebsiella sp.*, *E. coli* y *Pseudomonas sp* a 0, 4 y 10°C y a diferentes valores de pH. También se muestran los ajustes realizados mediante el modelo de Gompertz y el lineal. La Tabla 1 presenta los valores de los parámetros de Gompertz y los derivados μ , LPD y MPD para cada una de las cepas. En todos los casos estudiados al disminuir el pH y la temperatura aumentaron los valores de LPD y disminuyeron los valores de μ y MPD. *Listeria innocua* no desarrolló a 0°C y pH 5.6 observándose los mayores valores de fase de latencia. Se observó mejor crecimiento a 4°C que a 10°C.

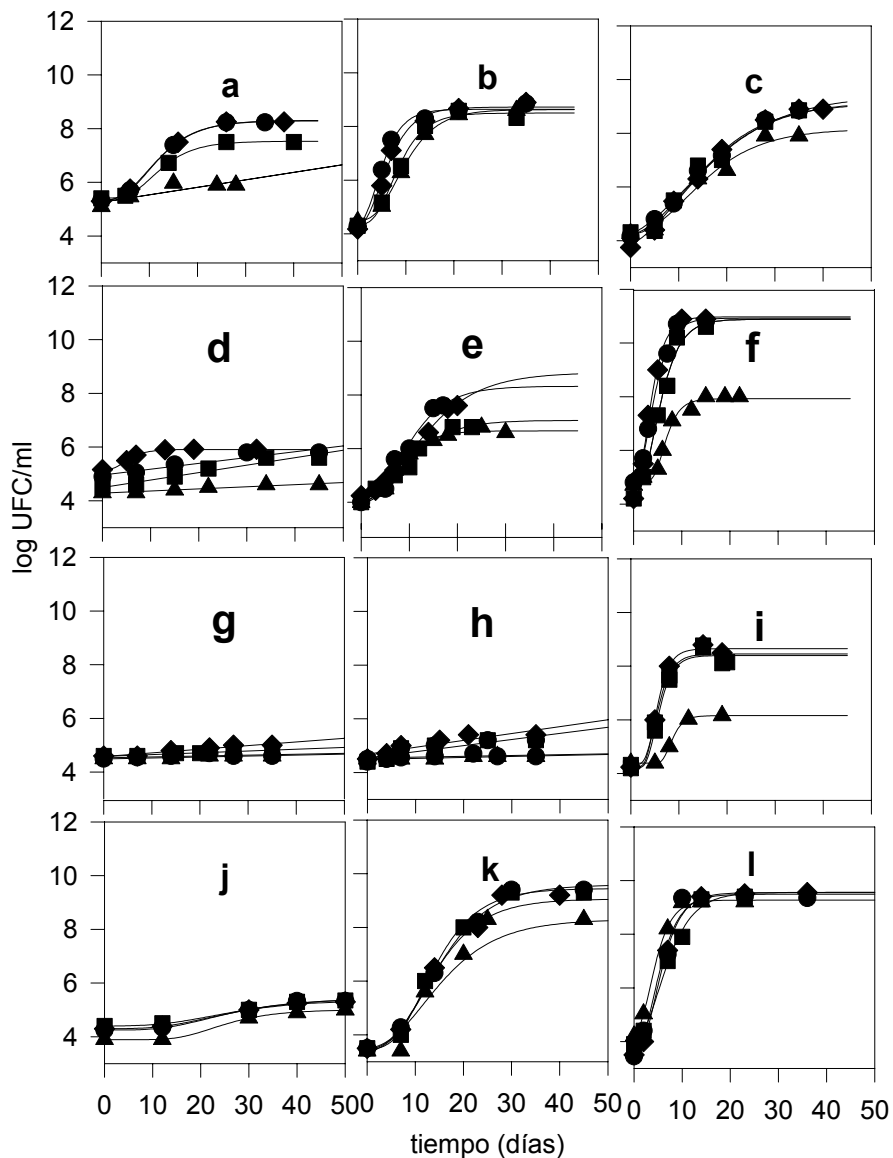


Fig. 1: Efecto de la temperatura y el pH alcanzado por la adición de ácido láctico en el desarrollo microbiano en un sistema modelo carne. Las líneas llenas corresponden al modelo de Gompertz o lineal. *Listeria innocua*: a, b, c (0, 4 y 10°C); *Klebsiella sp.*: d, e, f (0, 4 y 10°C), *E. coli*: g, h, i (0, 4 y 10°C) y *Pseudomonas sp.* j, k, l (0, 4 y 10°C) y diferentes pH: ◆ 7.0, ■ 6.10, ● 5.80, ▲ 5.6.

Para *Klebsiella sp.*, los valores de μ disminuyeron notablemente con la disminución de la temperatura; así a pH 5.6 y a 10°C el valor de μ fue de 0.60 log (UFC/ml) días⁻¹; a 4°C disminuyó 3 veces y a 0°C se observó la máxima reducción en los valores de μ (cerca de 10 veces). La fase de latencia LPD fue de 33.3 días a 0°C; a 4°C LPD varió entre 2.51 y 2.62 días y a 10°C varió entre 0.62 a 4.14 días para los diferentes valores de pH ensayados.

Tabla 1: Aplicación de la ecuación de Gompertz y el modelo lineal al desarrollo microbiano de *Listeria innocua*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp.*.

T°C	pH	Parámetros de Gompertz				Parámetros derivados		
		a	c	b	m	μ	LPD	MPD
<i>Listeria innocua</i>								
0	7.0	5.29± 0.10	3.02 ±0.14	0.18 ±0.02	9.53 ±0.69	0.20	3.98	8.31
	6.1	5.32± 0.07	2.97± 0.10	0.19± 0.01	9.73 ±0.47	0.20	4.47	8.29
	5.8	5.41± 0.05	2.12 ±0.07	0.21± 0.03	10.51 ±0.06	0.16	5.81	7.53
	5.6	-----	-----	-----	-----	0.02	18.51	-----
4	7.0	4.05± 0.47	4.67± 0.58	0.28±0.11	4.63 ±0.99	0.50	1.10	8.72
	6.1	4.27± 0.41	4.43 ±0.48	0.35± 0.13	3.92± 1.01	0.50	1.10	8.70
	5.8	4.32± 0.22	4.18± 0.29	0.27±0.05	7.00±0.61	0.40	3.30	8.50
	5.6	4.46± 0.03	4.17± 0.05	0.22± 0.01	8.10± 0.11	0.34	3.56	8.63
10	7.0	3.46 ±0.28	5.74± 0.39	0.10±0.01	10.13±0.90	0.20	0.10	9.20
	6.1	3.87 ±0.38	5.56± 0.68	0.09± 0.01	11.29±1.25	0.20	0.18	9.43
	5.8	4.04± 0.60	5.08 ±1.00	0.11± 0.04	11.50±2.20	0.20	2.41	9.12
	5.6	4.14± 0.50	4.03± 0.90	0.12± 0.06	11.76±2.80	0.18	3.43	8.17
<i>Klebsiella sp</i>								
0	7.0	5.15±0.01	0.76±0.01	0.42±0.01	4.46±0.01	0.12	2.1	6.77
	6.1	-----	-----	-----	-----	0.03	16.6	--
	5.8	-----	-----	-----	-----	0.02	25.0	--
	5.6	-----	-----	-----	-----	0.015	33.3	--
4	7.0	4.12±0.15	4.71±0.63	0.13±0.02	10.21±0.82	0.22	2.51	8.82
	6.1	3.93±0.41	4.39±1.40	0.19±0.11	7.85±1.64	0.20	2.54	8.32
	5.8	3.97±0.22	3.08±0.43	0.18±0.05	8.05±0.94	0.19	2.55	7.05
	5.6	3.96±0.13	2.70±0.16	0.26±0.04	6.46±0.48	0.19	2.62	6.66
10	7.0	4.08±0.43	6.88±0.53	0.49±0.08	2.65±0.33	1.24	0.62	10.97
	6.1	4.69±0.34	6.23±0.48	0.43±0.08	3.28±0.34	0.98	0.96	10.92
	5.8	4.18±0.55	6.70±0.87	0.35±0.10	4.28±0.69	0.86	1.43	10.88
	5.6	4.83±0.13	3.09±0.17	0.53±0.18	6.03±0.27	0.60	4.14	7.92
<i>Escherichia coli</i>								
0	7.0	-----	-----	-----	-----	0.013	38	-----
	6.1	-----	-----	-----	-----	0.006	50	-----
	5.8	-----	-----	-----	-----	0.003	50	-----
	5.6	-----	-----	-----	-----	0.003	50	-----
4	7.0	-----	-----	-----	-----	0.05	10.0	-----
	6.1	-----	-----	-----	-----	0.04	12.5	-----
	5.8	-----	-----	-----	-----	0.03	16.6	-----
	5.6	-----	-----	-----	-----	0.02	25.0	-----
10	7.0	4.24±0.21	4.41±0.27	0.58±0.14	4.85±0.28	0.95	3.00	8.65
	6.1	4.32±0.45	4.14±0.57	0.51±0.23	4.94±0.70	0.80	3.00	8.46
	5.8	4.20±0.43	4.20±0.54	0.51±0.27	5.20±0.64	0.80	3.27	8.40
	5.6	4.39±0.001	1.77±0.001	0.6±0.001	8.09±0.001	0.43	6.57	6.16
<i>Pseudomonas sp</i>								
0	7.0	4.33±0.03	1.06±0.06	0.10±0.01	21.21±1.30	0.08	11.2	5.40
	6.1	4.25±0.08	1.16±0.16	0.10±0.03	21.50±3.12	0.04	11.5	5.41
	5.8	4.40±0.06	1.00±0.15	0.08±0.02	22.86±2.80	0.03	11.7	5.40
	5.6	3.89±0.02	1.11±0.05	0.14±0.03	22.19±1.60	0.05	15.0	5.01
4	7.0	3.40±0.40	6.05±0.62	0.16±0.03	11.65±1.44	0.36	4.99	9.45
	6.1	3.48±0.28	6.11±0.43	0.14±0.02	12.23±1.03	0.32	5.04	9.59
	5.8	3.44±0.22	5.62±0.31	0.15±0.02	11.43±0.69	0.30	5.53	9.06
	5.6	3.25±0.48	5.05±0.71	0.12±0.07	11.53±1.64	0.22	6.45	8.30
10	7.0	3.51±0.85	5.89±1.02	0.26±0.07	3.89±1.240	0.56	0.04	9.40
	6.1	3.26±0.80	6.12±0.90	0.25±0.07	3.90±1.120	0.56	0.06	9.38
	5.8	2.73±0.39	6.13±0.49	0.24±0.03	4.54±0.590	0.55	0.45	8.86
	5.6	2.74±0.65	5.69±1.19	0.25±0.12	8.09±1.470	0.54	4.15	8.43

a: log(UFC/ml), c: log (UFC/ml), b: días⁻¹, m: días, μ: log (UFC/ml)días⁻¹, MPD: (log(UFC/ml), LPD: (días). ----- regresión lineal

E. coli no creció a 0 y 4°C; a 10°C los valores de LPD fueron 3.00 y 6.57 días a pH 7.0 y 5.6 respectivamente. Esta bacteria fue la que mas variacion presento en sus parametros cineticos con la temperatura. *Pseudomonas* también mostró bajos valores de μ a 0°C variando entre 0.08 y 0.03 log (UFC/ml) días⁻¹. Ninguna de las condiciones ensayadas mostró efecto bactericida.

Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento:

El efecto de la temperatura sobre los parámetros derivados fue interpretado mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\mu = A \cdot \exp(-E_{\mu}/RT) \quad (3)$$

siendo T, temperatura [°K]; E_{μ} , energía de activación [KJoule/mol]; A, factor preexponencial y R, 8.31[KJoule/°K mol]. E_{μ} puede ser considerada como la sensibilidad de los microorganismos frente a la temperatura. Los valores obtenidos y los coeficientes de regresión se presentan en la Tabla 2. Se observaron los menores valores de E_{μ} a pH 7.0 para *E. coli* y *Klebsiella sp.* *Pseudomonas sp.* no mostró variaciones significativas con los diferentes valores de pH. En el caso de *Listeria innocua* creció mas a 4 que a 10°C lo que no permitió realizar el calculo de energía de activación. Se puede observar que los valores de energía de activación (E_{μ}) para cada microorganismo fue afectado por los diferentes pH, así se obtuvo el menor valor de E_{μ} a pH 7 para *E. coli* y *Klebsiella sp.* E_{μ} para *Pseudomonas sp.* no mostró variaciones significativas a los diferentes valores de pH variando entre 257.8 y 279.3 KJoule/mol. El efecto del pH sobre la disminución de E_{μ} fue más marcada para *Enterobacteriaceae* que para *Pseudomonas sp.*

Tabla 2: Aplicación de la ecuación de Arrhenius sobre el crecimiento de *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp* y *E. coli*. en medios de cultivo a diferentes niveles de pH.

pH	LnA[ln(UFC/ml)día ⁻¹	E_{μ} [Kjoule/mol]	R ² (coef.de determinación)
<i>Klebsiella sp</i>			
7.0	90.55	210.8±8.8	0.89
6.1	137.9	320.2±1.5	0.99
5.8	149.1	347.4±4.2	0.99
5.6	178.1	416.5±1.1	0.96
<i>Escherichia coli</i>			
7.0	105.1	244.4±6.1	0.96
6.1	104.3	242.4±7.3	0.95
5.8	140.1	332.4±9.0	0.99
5.6	194.2	451.4±5.9	0.99
<i>Pseudomonas sp</i>			
7.0	120.54	279.3±8.2	0.99
6.1	106.11	257.8±10.5	0.94
5.8	117.23	273.4±8.8	0.93
5.6	94.07	277.2±12.1	0.99

A: ln(UFC/ml)días⁻¹, E_{μ} : KJoule/mol (UFC/ml)días⁻¹

CONCLUSIONES

El mayor valor de μ y LPD se observó para *Klebsiella sp* y *Pseudomonas sp*. Los valores de Máxima densidad poblacional para *Klebsiella sp*. no fueron afectados por la acidez láctica. El efecto de la temperatura sobre los valores de μ fueron modelados con una ecuación tipo Arrhenius determinándose las correspondientes energías de activación. El mayor valor fue obtenido para *E. coli* a pH 5.6.

BIBLIOGRAFIA

- Whiting, R. (1995).** Microbial modeling in foods. Food Science and Nutrition, 35(6), 467-494.
- Zwietering, M. H., Jongenburger F. M., Roumbouts . and Van't Riet K. (1990).** Modelling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1875-1881.

EFFECTO DEL CONTENIDO DE LEVADURAS Y DE LA TEMPERATURA DE RADIACION UV EN LA REDUCCION DE CEPAS DE *E. coli* O157:H7 EN JUGO DE NARANJA NATURAL

OTEIZA JUAN M.¹, GIANNUZZI LEDA¹ y ZARITZKY NOEMI N.^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET - Fac. Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Tel/Fax: (54-221) 425-4853/ 424-9287. ²Fac. de Ingeniería. Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 116 (1900). La Plata. Argentina. E-mail: zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se analizó el efecto del contenido de levaduras y de la temperatura a la que se realiza el tratamiento con radiación UV en la inactivación de 5 cepas de *E.coli* O157:H7 inoculadas en jugo de naranja natural. Se utilizó el jugo de naranjas variedad Valencia, el cual fue almacenado a 20°C hasta alcanzar diferentes rangos de concentraciones de levaduras.

Se determinaron espectrofotométricamente los coeficientes de absorptividad de dichos jugos. Los ensayos con UV se realizaron a 4 y 20°C con dosis entre 0 y 2 J/cm², determinándose los valores de *D* (Dosis para reducir un ciclo log la población microbiana) para cada una de las cepas. En todos los casos, se obtuvieron mayores valores de *D* empleando temperaturas de radiación de 4°C los cuales aumentaron con la concentración de levaduras presentes en los jugos. El contenido de levaduras así como la temperatura de radiación son factores que deben ser tenidos en cuenta para determinar las dosis UV necesarias para reducir la contaminación con cepas de *E.coli* O157:H7 en jugos.

Palabras clave: *E.coli* O157:H7, radiación UV, jugo de naranja, levaduras, temperatura.

ABSTRACT

The effects of a) yeast concentration and b) temperature of the UV radiation treatment on the inactivation of five strains of *E.coli* O157:H7 inoculated in fresh orange juice were analyzed. Oranges of the variety Valencia were used. The juice was stored at 20°C to attain different yeast concentration ranges.

The absorptivity coefficients of the juices were measured by spectrophotometry. UV radiation assays were carried out at 4 and 20°C using doses between 0 and 2 J/cm²; *D* values (doses to reduce one log of the microbial population) for each strain were determined. In all cases higher *D* values were obtained with UV radiation at 4°C; besides

D values increased with the concentration of yeasts in the juices. Yeast content and UV radiation temperature are important factors to be considered in order to determine the UV doses necessary to reduce contamination by *E.coli* O157:H7 in juices.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli O157:H7 ha sido responsable de varios brotes asociados con el consumo de carne picada, leche cruda, agua, vegetales, embutidos fermentados, frutas y jugos de fruta, lo que demuestra la capacidad de este microorganismo de sobrevivir en alimentos antiguamente considerados seguros por su acidez (Wright y col, 2000).

Para reducir el riesgo potencial en la salud pública asociado al consumo de jugos de fruta y vegetales contaminados, en el 2002, la FDA propuso la implementación de un plan de HACCP aplicable en la etapa de producción de jugos y derivados. Dentro de dicho plan, la aplicación de tratamientos alternativos a la pasteurización capaces de lograr reducciones de 5 ciclos logarítmicos en los microorganismos patógenos asociados con cada producto.

Ante la creciente demanda de los consumidores por contar con alimentos mínimamente procesados y seguros, uno de los métodos no térmicos para extender la vida útil de jugos de fruta es el empleo de radiación UV, dado que no deja residuo y minimiza la pérdida de calidad que se obtiene al aplicar tratamientos térmicos. Dicho tratamiento ha sido empleado con éxito en carne, pescado, sidra de manzana y desinfección de aguas (Wright y col, 2000) entre otros. El tratamiento con radiación UV de jugos de frutas ha sido menos estudiado.

Dentro de las características del alimento a irradiar que deben ser tenidas en cuenta, se encuentra la absorptividad, definida como la constante de proporcionalidad entre la absorbancia del alimento (medida a 254 nm) y su concentración. La presencia de levaduras en el jugo de naranja, que constituyen gran parte de la flora natural del mismo, es uno de los factores que podrían afectar a la absorptividad.

Estudios previos demostraron que existe una relación lineal entre la absorptividad del alimento y los valores de *D* (Dosis de energía UV en J/cm² necesaria para reducir un log la población bacteriana) en cepas de *E.coli* O157:H7 (Oteiza y col, 2005).

Una mayor absorptividad del medio disminuye la eficiencia de la radiación UV sobre la flora microbiana.

Sin embargo el efecto de la temperatura a la que se realiza la radiación con UV en la resistencia de *E.coli* O157:H7 no ha sido aun estudiada.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron analizar el efecto del contenido de levaduras en jugo de naranja natural y de la temperatura a la que se realiza la radiación UV a 254 nm en la inactivación de cepas de *E. coli* O157:H7.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del jugo

Se utilizaron naranjas frescas variedad Valencia adquiridas en el mercado local. Las mismas se decontaminaron externamente mediante lavados con agua clorada y se obtuvo el jugo con un exprimidor apropiado en un ambiente estéril. El pH del jugo fue determinado con un electrodo (modelo 50215, Hach) y un medidor de pH (modelo EC30, Hach). El índice de refracción y el contenido de azúcares (°Brix) fue determinado con un refractómetro (Bellingham). Posteriormente el jugo se almacenó fraccionado a 20°C de manera de alcanzar diferentes rangos de concentraciones de levaduras comprendidos entre $1.0 \times 10^1 - 5.0 \times 10^2$; $5.1 \times 10^2 - 5.0 \times 10^3$; $5.1 \times 10^3 - 8.0 \times 10^4$ y $8.1 \times 10^4 - 2.0 \times 10^6$ UFC/ml, los cuales fueron determinados por recuento en placa en Glucosa, Extracto de levadura, Cloranfenicol agar (YGC, Merck) incubando las placas durante 5 días a 30°C. Asimismo se determinaron los coeficientes de absorptividad de cada jugo conteniendo las levaduras, con un espectrofotómetro (DU 650, Beckman). La pendiente de la regresión obtenida correlacionando la absorbancia del alimento medida a 254 nm y su concentración (% V/V) fue considerada como el coeficiente de absorptividad.

Preparación del inóculo

Se emplearon 5 cepas de *E. coli* O157:H7 de diferente origen: 33 (origen animal), 303 (origen embutido fresco), 749 (origen hamburguesa), 547 (origen humano) y EDL 933 (ATCC, origen hamburguesa). Los cultivos fueron mantenidos en agar triptona soja (TSA, Difco) a 4°C y crecidos en caldo triptona soja (TSB, Difco) a 37°C 18 hs. Cada inóculo inicial se preparó transfiriendo una ansada del cultivo a un tubo conteniendo 10 ml de TSB e incubando a 37°C hs por 18-24 h. Una alícuota de cada dilución se inoculó en cada uno de los jugos de naranja de manera de alcanzar niveles de 10^7 células/ml de jugo.

Aplicación de radiación UV

Para el tratamiento con UV, se utilizó un equipo construido para tal fin, el cual cuenta con 4 lámparas de UV germicida (254 nm, UV Lux 30W/G30 T8, Philips) de baja presión de vapor de mercurio.

Para cada ensayo, 5 ml de las muestras inoculadas previamente, se colocaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro, de manera de lograr un espesor de película a irradiar de 0.7mm. Se ensayaron diferentes dosis de radiación UV entre 0 y 2 J/cm² (obtenidas como el producto de la intensidad (mW/cm²) y el tiempo de exposición (seg)). Las muestras se mantuvieron en agitación permanente (220 rpm) empleando un agitador orbital. En todos los casos, la distancia entre las muestras y las lámparas UV fue de 15cm. La intensidad de la radiación UV incidente fue medida con un radiómetro digital (Modelo VLX-3W CE). Se empleo TSA (48 hs a 37°C) como medio de cultivo para el recuento de las bacterias sobrevivientes. Los ensayos de radiación con UV se realizaron a 4 y 20°C, calculándose los valores de *D* para cada cepa de *E.coli* y para todas las condiciones estudiadas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, empleando un software Systat para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El jugo de naranja exprimido presentó en promedio las siguientes características: pH: 3.64, índice de refracción: 1.38 y contenido de azúcares: 13.10 °Brix. Ninguno de estos valores se vio modificado durante el tratamiento con radiación UV. Los jugos de naranja conteniendo diferentes niveles de levaduras presentaron los coeficientes de absorptividad que se indican en la Tabla 1. Puede observarse que dichos coeficientes aumentaban con el incremento de la concentración de levaduras presentes en el jugo de naranja. En todos los casos la diferencia observada fue significativa.

Tabla 1: Efecto de la concentración de levaduras presentes en el jugo de naranja en los coeficientes de absorptividad obtenidos regresionando la absorbancia del alimento medida a 254 nm y su concentración (% V/V).

Rango de levaduras en el jugo de naranja (UFC/ml)	Coefficiente de Absortividad
$1.0 \times 10^1 - 5.0 \times 10^2$	0.6371 ± 0.0155
$5.1 \times 10^2 - 5.0 \times 10^3$	0.6716 ± 0.0215
$5.1 \times 10^3 - 8.0 \times 10^4$	0.7315 ± 0.0104
$8.1 \times 10^4 - 2.0 \times 10^6$	0.8206 ± 0.0182

Cabe señalar que el recuento de levaduras en el jugo obtenido de naranjas sin lavar con agua clorada fue entre 3.36×10^3 y 2.24×10^4 UFC/ml; estos niveles disminuyeron entre 10 y 200 UFC/ml cuando el jugo se obtuvo a partir de naranjas lavadas previamente con agua clorada. Resultados similares fueron obtenidos por Andrés y col (1999) estudiando el

efecto del lavado superficial de naranjas con agua clorada en la disminución de hongos y levaduras presentes.

En todos los casos estudiados, los recuentos de sobrevivientes de las diferentes de cepas de *E.coli* O157:H7 en función de la dosis de UV incidente fueron ajustados mediante la ecuación: **log N/No = - k E**

donde k es la constante de inactivación, y E la dosis de energía UV aplicada. Los coeficientes de determinación (r^2), variaron entre 0.9774 y 0.9930 en todas las condiciones ensayadas.

Asimismo se calcularon los valores de D ($D=1/k$) para cada una de las cepas estudiadas. Las Tablas 2 y 3 muestran los valores de D para las 5 cepas de *E.coli* O157:H7 inoculadas en jugo de naranja conteniendo diferentes niveles de levaduras el cual fue irradiado a 20 y 4°C respectivamente.

Tabla 2: Valores de D obtenidos para cada una de las 5 cepas de *E. coli* O157:H7 inoculadas en jugo de naranja con diferentes niveles de levaduras irradiados con UV a 254nm a 20°C.

Cepa inoculada de <i>E.coli</i> O157:H7	Concentración de levaduras presentes en el jugo de naranja (UFC/ml)							
	1.0x10 ¹ -5.0x10 ²		5.1x10 ² -5.0x10 ³		5.1x10 ³ - 8.0x10 ⁴		8.1x10 ⁴ - 2.0x10 ⁶	
	D (J/cm ²)	r ²	D (J/cm ²)	r ²	D (J/cm ²)	r ²	D (J/cm ²)	r ²
303	0.2960 (0.0081)	0.9657	0.3232 (0.0001)	0.9640	0.3588 (0.0010)	0.9562	0.4182 (0.0006)	0.9877
749	0.1699 (0.0032)	0.9841	0.2064 (0.0004)	0.9859	0.2436 (0.0003)	0.9880	0.2782 (0.0006)	0.9797
547	0.2101 (0.0003)	0.9923	0.2421 (0.0004)	0.9897	0.2804 (0.0007)	0.9831	0.3277 (0.0004)	0.9914
33	0.1686 (0.0038)	0.9783	0.1970 (0.0070)	0.9736	0.2346 (0.0004)	0.9856	0.2754 (0.0007)	0.9707
933	0.2124 (0.0003)	0.9930	0.2441 (0.0002)	0.9949	0.2981 (0.0005)	0.9846	0.3465 (0.0010)	0.9618

Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de D

Puede observarse que para todas las cepas estudiadas, los valores de D aumentaron con el incremento de la concentración de levaduras presentes en el jugo, independientemente de la temperatura a la que se realiza el tratamiento con UV. Asimismo la resistencia observada a la radiación fue variable según la cepa ensayada. De todas ellas, la que presentó la mayor resistencia al UV fue la cepa 303 (aislada de embutido fresco), siendo las cepas 749 (origen hamburguesa) y 33 (origen animal) las de menor resistencia a la radiación a las dos temperaturas de ensayadas.

Tabla 3: Valores de *D* obtenidos para cada una de las 5 cepas de *E. coli* O157:H7 inoculadas en jugo de naranja con diferentes niveles de levaduras irradiados con UV a 254nm a 4°C.

Cepa inoculada de <i>E.coli</i> O157:H7	Concentración de levaduras presentes en el jugo de naranja (UFC/ml)							
	1.0x10 ¹ –5.0x10 ²		5.1x10 ² -5.0x10 ³		5.1x10 ³ – 8.0x10 ⁴		8.1x10 ⁴ – 2.0x10 ⁶	
	<i>D</i> (J/cm ²)	r ²	<i>D</i> (J/cm ²)	r ²	<i>D</i> (J/cm ²)	r ²	<i>D</i> (J/cm ²)	r ²
303	0.3112 (0.0008)	0.9695	0.3388 (0.0008)	0.9723	0.3748 (0.0008)	0.9789	0.4390 (0.0005)	0.9930
749	0.1897 (0.0044)	0.9766	0.2146 (0.0003)	0.9871	0.2705 (0.0007)	0.9711	0.3243 (0.0008)	0.9714
547	0.2333 (0.0003)	0.9924	0.2617 (0.0004)	0.9898	0.2994 (0.0005)	0.9873	0.3567 (0.0009)	0.9914
33	0.1906 (0.0050)	0.9769	0.2171 (0.0054)	0.9738	0.2605 (0.0005)	0.9811	0.3060 (0.0008)	0.9652
933	0.2328 (0.0003)	0.9918	0.2716 (0.0006)	0.9762	0.3167 (0.0005)	0.9870	0.3633 (0.0006)	0.9857

Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de *D*

Block (1977), propuso que la sensibilidad al UV de las bacterias varía con la especie, y dentro de la misma especie la resistencia es un fenómeno cepa dependiente. Si comparamos la resistencia al UV de la cepa 303 con respecto a la 33 (la más sensible al tratamiento) inoculadas en jugo de naranja con niveles de 1.0x10¹–5.0x10² UFC/ml de levaduras, podemos observar que la cepa 303 es entre un 67.0 a 84.5% más resistente que la cepa 33 cuando el jugo es irradiado a 20°C mientras que entre un 58.7 a 67.3% más resistente cuando el tratamiento es a 4°C.

Comparando los valores de *D* obtenidos en jugos conteniendo niveles de levadura de 1.0x10¹–5.0x10² y 8.1x10⁴– 2.0x10⁶ UFC/ml, se observa que dichos valores aumentan entre 1.4 y 1.7 veces para ambas temperaturas de radiación, para todas las cepas de *E.coli* O157: H7 ensayadas.

Según la reglamentación sugerida por la FDA, la utilización de tratamientos alternativos a la pasteurización deben ser capaces de lograr reducciones de 5 ciclos logarítmicos en los microorganismos patógenos asociados con cada producto. En este caso si se calcula la dosis de energía UV necesaria para lograr reducciones de 5 log (5*D*, en J/cm²) en la cepa más resistente de *E.coli* O157:H7 (303) inoculada en jugo de naranja conteniendo niveles de levaduras entre 1.0x10¹ a 5.0x10² y empleando temperaturas de radiación de 20°C, la dosis es de 1.480 J/cm² mientras que empleando 4°C, de 1.556 J/cm². Sin embargo si los niveles de levaduras se encuentran entre 8.1x10⁴ a 2.0x10⁶ y se emplea la misma

radiación UV solo se lograrían reducciones de 3.54 log de la misma cepa para ambas temperaturas; esto sería de gran riesgo para la salud teniendo en cuenta que la dosis infectiva de este microorganismo es muy baja (100 células). Estudios realizados por Wright y col (2000) demostraron que a medida que el nivel de levaduras presentes en sidra de manzana aumenta, la reducción de *E.coli* O157:H7 inoculado en dicho alimento y tratado con radiación UV disminuye, no haciendo referencia a la relación con la absorbividad del sistema.

En cuanto al efecto de la temperatura a la cual se realizó el tratamiento, puede observarse que para todas las cepas ensayadas los valores de D resultaron significativamente mayores ($p \leq 0.05$) cuando los ensayos de radiación UV se realizaron a 4°C respecto al tratamiento a 20°C. Thayer y col (2001) trabajando con radiaciones ionizantes observaron que las bajas temperaturas aumentarían la resistencia bacteriana a dichas radiaciones debido a que la formación y movilidad de los radicales libres producidos en el producto y que son los principales agentes de la destrucción celular, se ven disminuidos. Un efecto similar podría ocurrir con la aplicación de radiaciones UV. Se observó una relación lineal ($r^2=0.982$) entre las absorbividades de los jugos y los niveles de levaduras presentes en el mismo. Asimismo se determinó que existe una relación lineal entre los valores de absorbividad y los D para cada una de las cepas ensayadas tanto a 4 como a 20°C. En todos los casos se lograron coeficientes de correlación entre 0.9566 y 0.9983. A modo de ejemplo se presenta la Figura 1 en donde se observa la relación entre los valores de absorbividad de los jugos conteniendo diferentes concentraciones de levaduras y los correspondientes valores de D para la cepa 303 para ambas temperaturas de radiación.

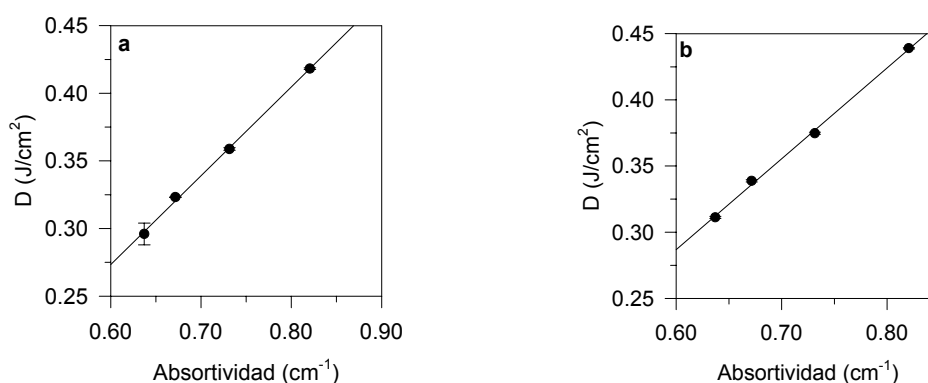


Figura 1: Relación entre los valores de D y los valores de absorbividad de los jugos conteniendo diferentes concentraciones de levaduras obtenidos para la cepa 303 empleando temperaturas de tratamiento: a) 20°C b) 4°C. Las barras indican la desviación estándar media.

CONCLUSIONES

Se pudo determinar que los coeficientes de absorptividad de jugo de naranja aumentaban con el incremento de la concentración de levaduras presentes en el mismo. Asimismo se determinó que los valores de D (Dosis de UV necesaria para reducir un log la población de *E.coli* O157:H7) aumentaban con el nivel de levaduras presentes en el jugo, independientemente de la temperatura a la que se realizó el tratamiento. En todos los casos estudiados pudo observarse que las cepas de *E.coli* O157:H7 presentaban mayor resistencia a la radiación UV cuando dicho tratamiento se realizaba a más baja temperatura (4°C). Por otra parte, se determinó la existencia de una relación lineal entre los valores de absorptividad y los D para cada una de las cepas ensayadas tanto a 4 como a 20°C. Estos resultados deberían ser tenidos en cuenta para determinar la dosis de UV necesaria para lograr reducciones de 5D de cepas de *E.coli* O157:H7 en jugo de naranja natural.

BIBLIOGRAFÍA

Wright, J.R., Sumner, S.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D. y B.W. Zoecklein. 2000. Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider. *J. Food Protect.* 63:563-567.

Oteiza J.M., Peltzer M., Gannuzzi L., Zaritzky N. 2005. Antimicrobial efficacy of UV radiation on *Escherichia coli* O157:H7 (EDL 933) in fruit juices of different absorptivities. *J. Food Protect.* 68:49-58.

Andrés S.C., Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. 1999. Microbial flora during storage of packaged fresh orange juice. *J of Scan Microscop.* 21:149-149.

Block, S.S. (ed).1977. Desinfection,sterilization, and preservation. 2nded. Lea & Febiger. Philadelphia. Pa.

Thayer, D.W., y Boyd, G. 2001. Effect of irradiation temperature in inactivation of *E.coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Protect.* 64:1624-1626.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución a este trabajo brindada por la Universidad Nacional de La Plata, CONICET, y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS POR *Lactobacillus plantarum* EN CONDICIÓN DE STRESS NUTRICIONAL

SAGUIR Fabiana M.¹, LOTO CAMPOS Iris¹ y MANCA DE NADRA María C.^{1,2}

¹Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT y ²CERELA. Ayacucho 491, 4000, Tucumán, Argentina. E-mail: mcanca@fbqf.unt.edu.ar

RESUMEN

Lactobacillus plantarum N4, requiere valina, leucina, treonina, isoleucina, lisina, ácido glutámico, cisteína y triptófano para crecer. En condiciones limitantes de crecimiento, la adición de Gly-Gly o especialmente Leu-Leu como fuente de los respectivos aminoácidos incrementó su desarrollo. Investigamos la utilización de Leu-Leu y/o Gly-Gly en medio nutricionalmente deficiente. El crecimiento se determinó cuantitativamente durante 7 días a 30° C en medio MRS privado de peptona y extracto de levadura y suplementado con 0,1 g/l de extracto de carne y mezcla de aminoácidos esenciales, estimulatorios y el aminoácido no esencial glicina. En ausencia de leucina o glicina, 0,89 y 0,86 mmol/l de Leu-Leu o Gly-Gly, respectivamente fueron consumidos al final de fase exponencial de crecimiento. 1,0 mmol/l de leucina y 1,05 mmol/l de glicina fueron asimilados internamente resultando 31,6 y 14,9% mayor que el consumo de los correspondientes aminoácidos libres. En presencia de la mezcla de dipéptidos se observaron resultados similares.

Palabras claves: *Lactobacillus plantarum*, aminoácidos, dipéptidos, nutrición, naranja.

ABSTRACT

Lactobacillus plantarum N4, isolated from orange required valine, leucine, threonine, isoleucine, lysine, glutamic acid, cysteine and tryptophane for growth. In stress nutritional condition, Gly-Gly or Leu-Leu addition as source of respective amino acids increased microorganism growth. We investigated the utilization of Leu-Leu and/or Gly-Gly in deficient nutritional medium. The growth was determined during 7 days at 30° C in MRS medium private of peptone and yeast extract and supplemented with 0,1 g/l of meat extract and an essential, stimulatory and non-essential amino acids mixture. In absence of leucine or glycine, 0,89 and 0,86 mmol/l of Leu-Leu or Gly-Gly were utilized at the end of growth, respectively. 1,0 mmol/l of leucine and 1,05 mmol/l of glycine were internally

assimilated resulting 31,6 and 14,9% higher than the utilization of corresponding free amino acids. Similar results were observed for dipeptides mixture.

INTRODUCCIÓN

En jugo de frutas el crecimiento y metabolismo de las bacterias lácticas puede producir turbidez, formación de gas y variación en el aroma, sabor y acidez afectando la elaboración y conservación del producto. La disponibilidad de nutrientes en el medio afecta su desarrollo, exigentes desde el punto de vista nutricional, especialmente en compuestos nitrogenados (Saguir y Manca de Nadra 2002, Aredes y col. 2004). Saguir y col. 2004 demostraron en las cepas de *Lactobacillus plantarum*, N4 y N8, aisladas de naranjas que 6 aminoácidos comunes, valina, leucina, treonina, isoleucina, ácido glutámico y cisteína fueron esenciales para crecer y que la cepa N4 requirió además lisina y triptófano. Considerando los requerimientos en factores de crecimiento, la conversión de péptidos en aminoácidos libres y su utilización por *Lb. plantarum* podría tener importante valor nutricional. Aredes y col (2004) demostraron en una cepa de *Oenococcus oeni* aislada de vino argentino, que dipéptidos suplieron eficientemente sus requerimientos en aminoácidos esenciales.

El objetivo de este estudio fue investigar en condiciones de stress nutricional, la utilización de los dipéptidos Leu-Leu y/o Gly-Gly como fuente de los aminoácidos leucina y glicina, respectivamente en *Lb. plantarum* N4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo: *Lb. plantarum* N4 aislado de la superficie de naranja de la provincia de Tucumán (Arena y col. 1996).

Medios de cultivos y condiciones de cultivo: Medio basal (MB): medio MRS, privado simultáneamente de peptona y extracto de levadura y suplementado con 0,1 g/l de extracto de carne y una mezcla constituida por los aminoácidos esenciales (0,2 g/l excepto para leucina, valina y lisina que se adicionaron 0,3 g/l), estimulatorios, arginina (0,3 g/l) y fenilalalnina (0,2 g/l) y el aminoácido no esencial glicina (0,2 g/l), pH 6,5. Los péptidos Leu-Leu y/o Gly-Gly (1,10 mmol/l), previamente esterilizados por filtración se adicionaron al MB, esterilizado en autoclave 20 min a 121°C, en lugar del correspondiente aminoácido en la mezcla original. Los medios se inocularon con una suspensión celular en el orden de 10^6 ufc/ml e incubaron a 30°C durante 7 días.

Medidas de crecimiento: El crecimiento se determinó espectrofotométricamente a 560 nm y cuantitativamente determinando las ufc/ml.

Métodos analíticos: Los dipéptidos y aminoácidos libres se dosaron por HPLC fase reversa (RP-HPLC), usando un cromatógrafo líquido ISCO (ISCO, Lincoln, NE). Las muestras fueron sometidas a pre-columna de derivatización con O-phthaldialdehído. La detección fue realizada por fluorescencia usando un fluorímetro modelo 121. Standards fueron usados para determinar la concentración de aminoácidos libres y dipéptidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de dipéptidos sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* N4. En MB *Lb. plantarum* N4 desarrolló con una velocidad de crecimiento de $0,11 \text{ h}^{-1}$ y alcanzó una concentración celular de $1,0 \times 10^8$ ufc/ml al final de fase exponencial de crecimiento. En medio MRS, sin modificar, la velocidad de crecimiento fue 0.63 h^{-1} y la concentración celular final 1.12×10^9 cfu/ml, confirmando que el MB fue limitante para su desarrollo. La adición de Gly-Gly y/o Leu-Leu en reemplazo de los respectivos aminoácidos al MB, no modificó la velocidad de crecimiento pero sí incrementó la población celular final (Fig. 1). El efecto estimulador fue mayor para Leu-Leu con respecto a Gly-Gly. Cuando los dipéptidos se adicionaron en forma combinada la máxima producción celular fue alcanzada (7×10^8 ufc/ml). Los resultados demostraron que los dipéptidos, especialmente el dipéptido constituido por el aminoácido esencial y la mezcla, fueron más favorables que los aminoácidos libres en sostener el crecimiento del microorganismo en medio nutricionalmente desfavorable.

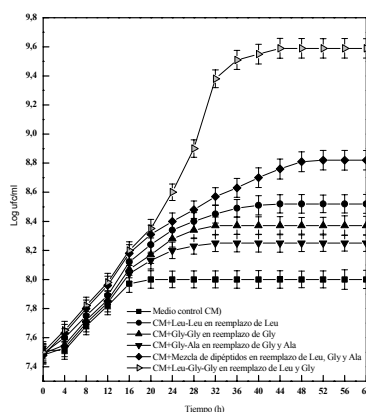


Fig. 1. Crecimiento de *Lactobacillus plantarum* N4 en MB suplementado con Leu-Leu y/o Gly-Gly como fuentes de los respectivos aminoácidos

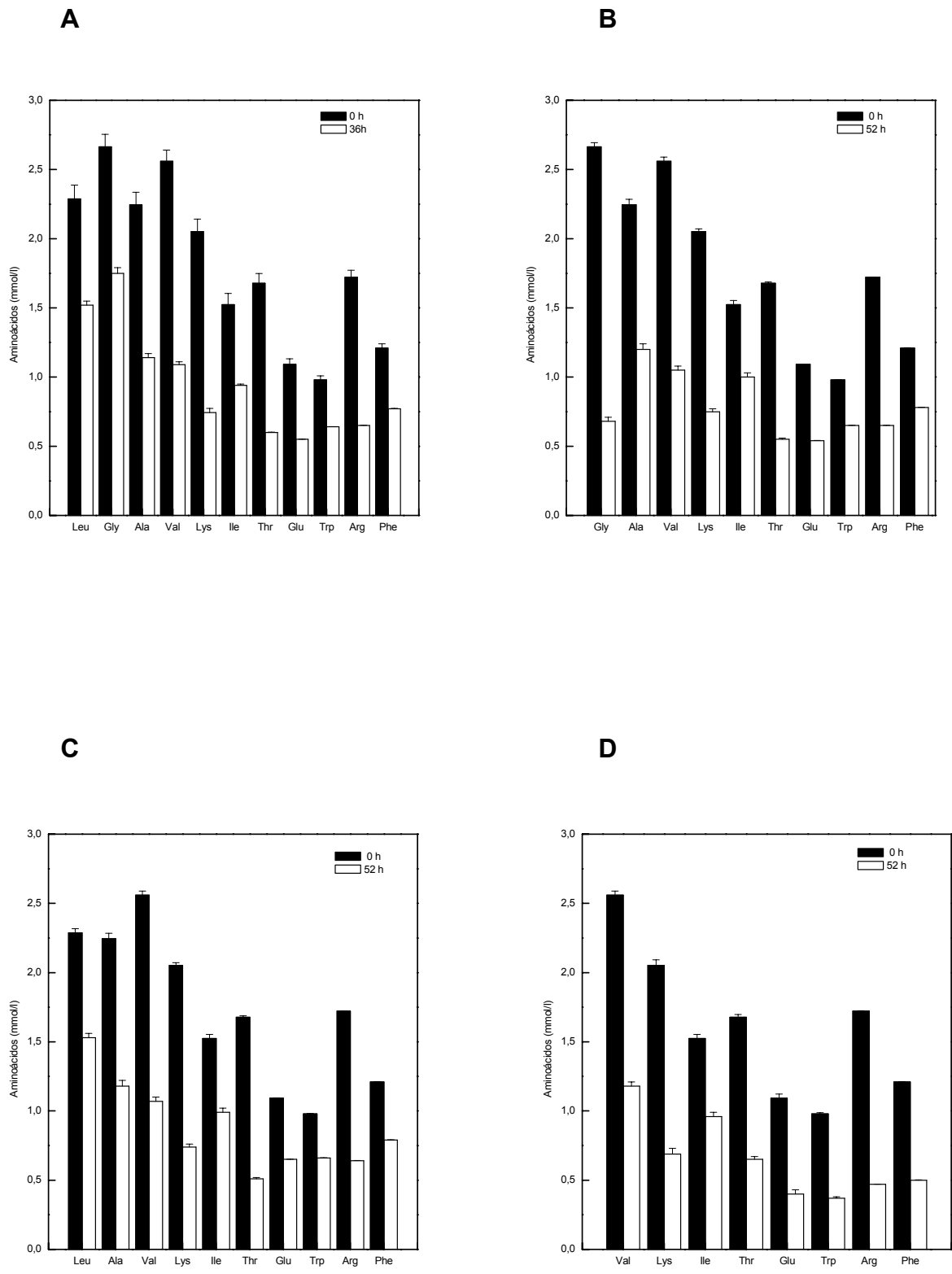


Fig. 2. Cambios en la concentración de aminoácidos libres (indicados en la parte inferior) en MB suplementado con: Leu-Leu (A), Gly-Gly (B) y la mezcla de dipéptidos (C) en reemplazo de los respectivos aminoácidos libres.

Utilización de dipéptidos en MB. La utilización de Leu-Leu y/o Gly-Gly en MB deficiente en leucina y/o glicina, respectivamente por *Lb. plantarum* N4 comenzó simultáneamente con el inicio del crecimiento microbiano. Los resultados demostraron que mientras la concentración de los dipéptidos en sobrenadantes de cultivos disminuyó, al mismo tiempo, la concentración de los productos de hidrólisis leucina y/o glicina incrementó (Fig. 3), confirmando la presencia de peptidasas intracelulares en esta cepa. En presencia de Leu-Leu o Gly-Gly como fuente de los respectivos aminoácidos, las concentraciones iniciales decrecieron significativamente al final de fase exponencial de crecimiento alcanzando un valor residual de 0,21 y 0,24 mmol/l, respectivamente. El microorganismo consumió 0,89 mmol/l de Leu-Leu y 0,86 mmol/l de Gly-Gly mientras la concentración de los productos de hidrólisis incrementó a 0,78 y 0,67 mmol/l para leucina y glicina, respectivamente (Fig. 3 A,B). 1,0 mmol/l de leucina y 1,05 mmol/l de glicina fueron acumulados internamente a partir de los respectivos dipéptidos, resultando 31,6 y 14,9 % mayor que el consumo final de los correspondientes aminoácidos libres (Fig. 2 A). En presencia de la mezcla de dipéptidos, se observaron resultados similares.

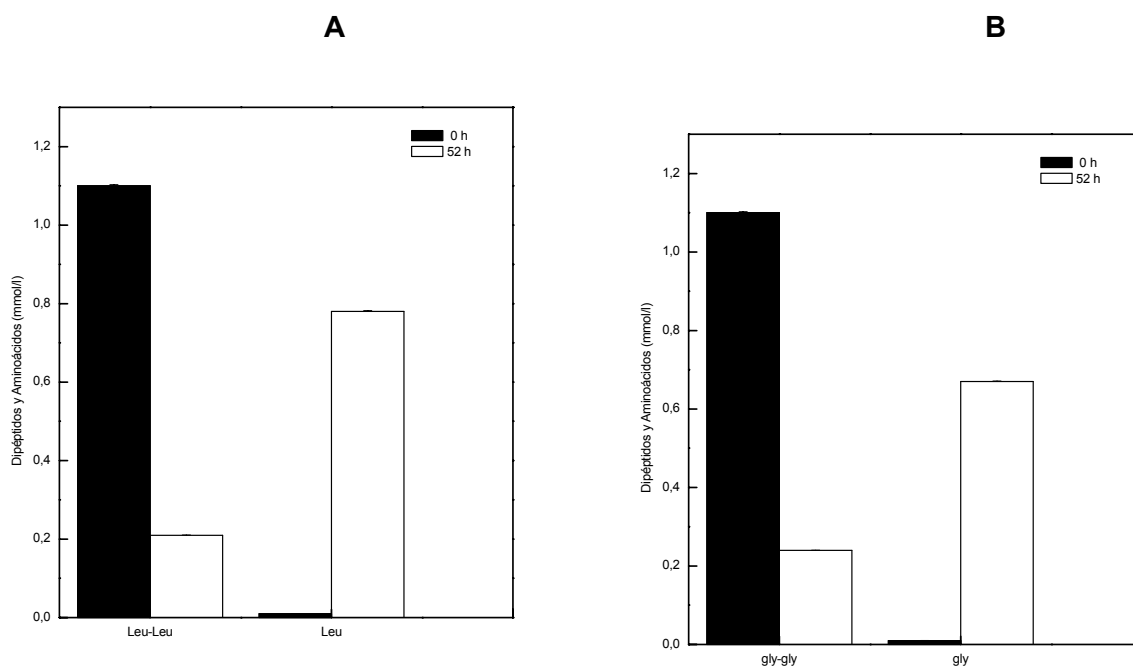


Fig. 3. Cambios en la concentración de dipéptidos y liberación parcial de aminoácidos en MB suplementado con: Leu-Leu (A) o Gly-Gly (B) en reemplazo de los respectivos aminoácidos libres

En conclusión, *Lb. plantarum* N4 consumió más eficientemente los dipéptidos que aminoácidos libres para suplir sus requerimientos en aminoácidos. Posiblemente,

isoleucina y valina, constituyentes del medio de cultivo, ejercieron inhibición parcial sobre la utilización de leucina. El mayor efecto para el dipéptido supliendo el aminoácido esencial leucina que para Gly-Gly, se relaciona con el mayor efecto estimulador de Leu-Leu sobre el crecimiento microbiano. En presencia de Leu-Leu como fuente de leucina, incrementó significativamente la utilización de glicina libre. Posiblemente el eflujo de leucina a partir de la hidrólisis del dipéptido favorecería el intercambio con glicina extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

- Aredes Fernandez, Saguir, F.M., Manca de Nadra, M.C. (2004).** Effect of dipeptides on the growth of *Oenococcus oeni* in synthetic medium deprived of amino acids. *Current Microbiol.*, 48, 1-5.
- Arena, M.E., Saguir, F.M., Manca de Nadra M.C. (1996).** Inhibition of growth of *Lb. plantarum* from citrus fruits in the presence of organic acids. *MAN 14*, 219-226.
- Arena, M.E., Saguir, F.M., Manca de Nadra, M.C. (1999).** Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 203-209.
- Saguir, F.M., Manca de Nadra, M.C. (2002).** Effect of L-malic and citric acids metabolism on essential amino acid requirements for *O. oeni* growth. *J. Appl. Microbiol.*, 93, 295-301.
- Saguir F.M., Lara M., Manca de Nadra M.C (2004).** Nutritional requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from oranges. *Biocell*, 28, 83.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con subsidios de CONICET y Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), Argentina

UTILIZACIÓN DE LEUCIL-LEUCINA Y GLICIL-GLICINA POR *Lactobacillus hilgardii*.

¹AREDES FERNÁNDEZ, Pedro A. y ²MANCA DE NADRA, María C

¹Centro de Referencia para *Lactobacillus* (CERELA), Tucumán Argentina.

²Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491, Tucumán (4000), Argentina. E-mail: mcmanca@fbqf.unt.edu.ar

RESUMEN.

En este trabajo se determina el efecto de Leucil-Leucina y Glicil-glicina como fuente de los aminoácidos leucina (estimulador) y glicina (esencial) sobre la velocidad máxima de crecimiento y concentración celular final de *Lactobacillus hilgardii* 5w, microorganismo que deteriora los vinos, en medio sintético. En el medio control, que contiene todos los aminoácidos libres, el microorganismo crece con μ de $0,39 \text{ h}^{-1}$, incrementando las ufc/ml al final del crecimiento exponencial en 2,05 ciclos log. El reemplazo de glicina, por Gly-Gly, no modifica los parámetros de crecimiento. La fracción de glicina incorporada intracelularmente a partir del dipéptido es similar a la incorporada como aminoácido libre. En presencia de Leu-Leu como única fuente de leucina, μ incrementa 21 %, lo que estaría relacionado a la mayor incorporación de leucina que glicina a la célula. La acumulación interna de leucina a partir del dipéptido Leu-Leu es 27% mayor que el consumo de leucina libre en el medio control.

Palabras clave: *Lactobacillus hilgardii*, vino, dipéptidos, nutrición.

ABSTRACT.

The aim of this study is determine the effect of Leu-Leu and Gly-Gly as only source of the amino acids leucine (stimulatory) and glycine (essential) on the growth rate and final cellular concentration in the synthetic medium of *Lactobacillus hilgardii* 5w. In the control medium, the microorganism grows with μ of 0.39 h^{-1} , increasing ufc ml^{-1} at the end of the exponential growth in 2,05 cycles log. The replacement of glycine by Gly-Gly, not modify the growth parameters. The fraction of glycine accumulated in the intracellular medium from the dipeptide was similar to the incorporated as free amino acid. In the presence of Leu-Leu as only source of leucine, μ increases 21 %, what it would be related to the greater incorporation of leucine than glycine to the cell. The internal accumulation of

leucine from the dipeptide Leu-Leu is 27% greater than the consumption of free leucine in the control medium.

INTRODUCCIÓN.

En medios pobres en fuente de nitrógeno, la fracción peptídica es más favorable que los aminoácidos para el crecimiento de bacterias lácticas.

En trabajos previos se estableció que *Lactobacillus hilgardii* 5w, con potencialidades para deteriorar vinos, requiere 9 aminoácidos para su crecimiento: histidina, cisteína, tirosina, treonina, triptofano, valina, glicina, ácido aspártico y arginina, y excepto lisina, que es no esencial, los demás son aminoácidos estimuladores.

En éste trabajo, se determina el efecto de Leucil-Leucina y Glicil-glicina sobre la μ y concentración celular final de *L.hilgardii* 5w en medio sintético Tucumán, en el cual se reemplaza el aminoácido libre por el dipéptido que lo contiene y se investiga el consumo de los aminoácidos leucina y glicina en forma libre o como dipéptidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. *Lactobacillus hilgardii* 5w, aislado de vino tinto argentino (Manca de Nadra y Strasser de Saad, Strasser de Saad y Manca de Nadra, 1987). La cepa fue almacenada a - 20 °C en medio MRS (De Man y col., 1960), adicionado con jugo de tomate (15%) y glicerol (30%, v/v).

Medio de cultivo y condiciones de crecimiento. El medio sintético Tucumán (Ledesma y col., 1977) se utiliza como medio basal (MB).

Las modificaciones de MB están definidas en cada experiencia. Los dipéptidos se adicionan al MB en las siguientes concentraciones (mmol l⁻¹): 2,2, Gly-Gly; 0,2 Leu-Leu; en reemplazo de los correspondientes aminoácidos.

Parámetros de crecimiento. Se determinó la velocidad de crecimiento (μ) y el crecimiento final (A), que corresponde a la diferencia entre el crecimiento alcanzado al inicio de fase estacionaria y la concentración celular inicial.

Determinación cromatográfica de dipéptidos y aminoácidos. Los aminoácidos libres y dipéptidos fueron cuantificados en los sobrenadantes de cultivo usando la técnica de HPLC en fase reversa descrita por Alberto y col. (2002). Previo al análisis, las muestras se filtraron por membrana 0,22 μ m. Se utilizó un patrón de aminoácidos, Gly-Gly y Leu-Leu para determinar la concentración de aminoácidos y dipéptidos.

Análisis estadístico. Los datos experimentales fueron analizados utilizando el análisis de la varianza (ANOVA). Las medias de las variables que mostraron significancia estadística fueron comparadas con el test de Tukey. (Minitab student R12).

RESULTADOS

Efecto de dipéptidos sobre el crecimiento. La figura 1 muestra el crecimiento de *L. hilgardii* 5w en medio sintético. El microorganismo comienza su desarrollo después de una fase lag de 12 h.

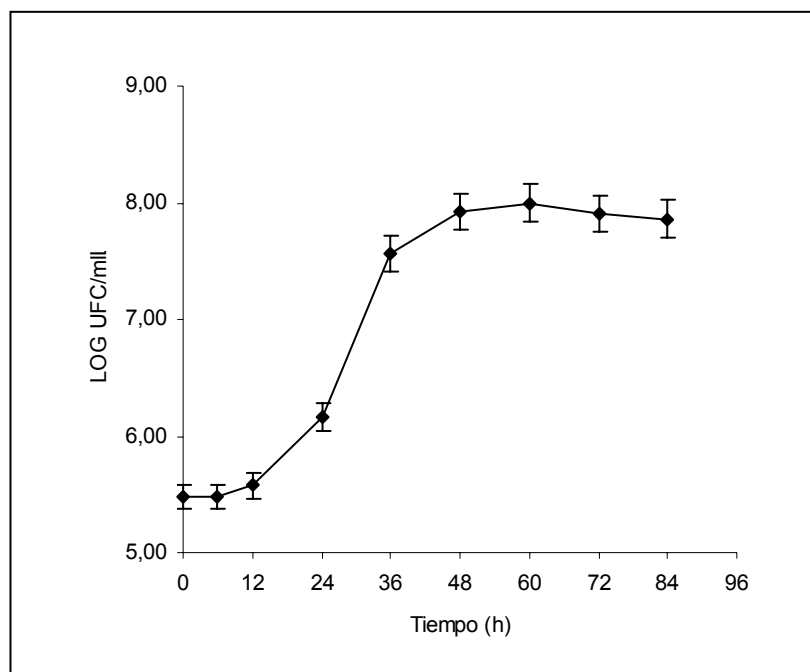


Fig. 1. Crecimiento de *Lactobacillus hilgardii* 5w en medio sintético.

La tabla 1 muestra la modificación de los parámetros de crecimiento de *L. hilgardii* 5w en el medio sintético en ausencia de leucina o glicina y en presencia de Leu-Leu y Gly-Gly como única fuente de leucina o glicina respectivamente. En el medio completo, control, el microorganismo crece con μ_{\max} de $0,39 \text{ h}^{-1}$, alcanzando una densidad celular de $8,5 \times 10^7$ ufc/ml a 48 h de incubación. Al final del crecimiento exponencial se observa incremento celular de 2,05 unidades log. En ausencia de glicina, no se observa crecimiento del microorganismo, relacionado con su carácter de aminoácido esencial. En ausencia de leucina, aminoácido estimulador, el crecimiento de *L. hilgardii* disminuye 60% μ y 57% A. El reemplazo de glicina por el dipéptido Gly-Gly, no modifica los parámetros de crecimiento con respecto al medio control. En presencia de Leu-Leu como única fuente de leucina, μ incrementa 21 % y no se observa modificación de A.

Utilización de dipéptidos. La figura 2 muestra el consumo de los dipéptidos, Leu-Leu y Gly-Gly y el incremento de los aminoácidos leucina y glicina durante el crecimiento de *L. hilgardii* a 24, 36 y 48 h de incubación. La utilización de los dipéptidos comienza cuando se inicia el crecimiento. Las concentraciones residuales de Leu-Leu o Gly-Gly disminuyen 0,18 y 0,62 mmol/l, respectivamente a 24 h de incubación. Al final de la fase exponencial de crecimiento, 36 h de incubación, las concentraciones de Leu-Leu y Gly-Gly disminuyen 0,21 y 1,16 mmol/l, respectivamente. A éste tiempo, la concentración de los productos de hidrólisis de los péptidos incrementa 0,21 mmol/l para leucina y 0,80 mmol/l para glicina. Teniendo en cuenta que por hidrólisis de cada mol de dipéptido se producen dos moles del aminoácido, la fracción de leucina y glicina acumulada internamente en la célula correspondería a 0,21 y 1,53 mmol/l respectivamente. A 36 h de incubación, la disminución de la concentración de glicina en MB es similar al valor del aminoácido que se incorpora a la célula a partir de Glicil-Glicina (1,50 mmol l⁻¹). La disminución de leucina en MB es 27% menor que la correspondiente acumulación interna del aminoácido a partir del dipéptido Leu-Leu.

Tabla 1. Efecto de dipéptidos como fuente de aminoácidos sobre el crecimiento de *Lactobacillus hilgardii* 5w.

Aminoácido omitido	Dipéptido incorporado	Parámetros de crecimiento	
		μ [h ⁻¹]	A [Log ufc/ml] ^A
-	-	0,39 a *	2,05 a
Leucina	-	0,15 b	0,88 b
Leucina	Leu-Leu	0,47 c	2,13 a
Glicina	-	0,00 d	0,02 d
Glicina	Gly-Gly	0,33 a	1,77 a

A: diferencia en la concentración celular entre el inóculo y la fase estacionaria

*: valores con diferente letra en la misma columna, son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

Los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus hilgardii* 5w no se modifican cuando el aminoácido esencial glicina es reemplazado por el dipéptido Gly-Gly.

La adición de Leu-Leu como fuente de leucina en al MB incrementa la velocidad de crecimiento, lo que estaría relacionado a la mayor incorporación de leucina que glicina a la célula.

El incremento de la respuesta del crecimiento microbiano en presencia de péptidos está generalmente relacionado al menor gasto energético necesario para la acumulación intracelular de aminoácidos a partir de péptidos que de aminoácidos libres (Van Boven y Konings, 1988). Aredes Fernández y col. (2004), demostraron que en *Oenococcus oeni* X₂L, dipéptidos constituidos por dos aminoácidos esenciales son más favorables para el crecimiento que el correspondiente aminoácido libre y establecieron que el dipéptido Leu-Leu no es más favorable que el aminoácido esencial leucina. Julliard y col (1996) enfatizan la poca diferencia entre péptidos y aminoácidos durante el crecimiento de *L. lactis subsp. lactis*

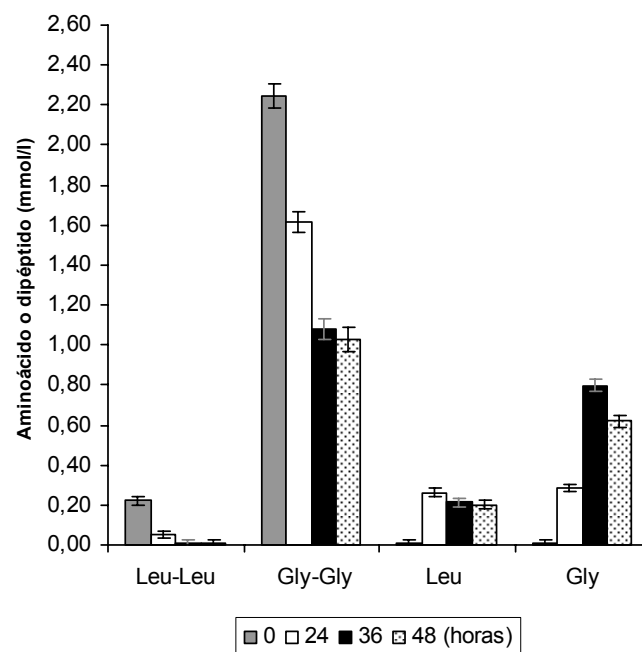


Fig 2. Modificación en la concentración residual de dipéptidos y correspondiente liberación de aminoácidos en el cultivo de *L. hilgardii* 5w conteniendo Gly-Gly o Leu-Leu como fuente de glicina o leucina respectivamente a diferentes tiempos de incubación.

Es conocido que los aminoácidos leucina, valina e isoleucina comparten el mismo sistema de transporte (Kunji y col. 1996). Por lo tanto el incremento de la velocidad de crecimiento de *Lactobacillus hilgardii* 5w en presencia de Leu-leu podría estar relacionado a un aumento en la incorporación de valina (aminoácido esencial) e isoleucina (aminoácido estimulador). Rice y col. (1978) indicaron que en *Lactococcus lactis*, glicina que comparte el mismo sistema de transporte con alanina y treonina, puede intercambiar con éstos últimos gracias a un rápido flujo del pool de glicina intracelular fuera de la célula. Recientemente Aredes Fernández y col. (2004) demostraron que la captación de Gly-Gly

por *O. oeni* X₂L, incrementa la liberación de glicina fuera de la célula, empleando el microorganismo este mecanismo de intercambio para la incorporación de alanina dentro de la célula.

AGRADECIMIENTOS

Éste trabajo fue subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

Alberto MR, Arena ME, Manca de Nadra MC (2002) A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control*, 13:125-129.

Aredes Fernández PA, Saguir FM, Manca de Nadra MC (2004) Effect of Dipeptides on the Growth of *Oenococcus oeni* in Synthetic Medium Deprived of Amino Acids. *Curr Microbiol* 49:361-365.

De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130-135

Kunji ERS, Mireau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221

Ledesma OV, Ruiz Holgado A, Oliver G (1977) A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 42:123-133

Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM (1987) Evolution of lactic acid bacteria during the different stages of vinification of Cafayate (Argentina) wines. *Microbiol Alim Nutr* 5:235-240

Rice GH, Stewart FHC, Hillier AJ, Jago JR (1978) The uptake of amino acids and peptides by *Streptococcus lactis*. *J Dairy Res* 45:93-107

Strasser de Saad AM, Manca de Nadra MC (1987) Isolation and identification of the lactic acid bacteria from Cafayate (Argentina) wines. *Microbiol Alim Nutr* 5:45-49

Van Boven A, Konings WN (1988) Utilization of dipeptides by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Biochimie* 70:535-542

Juillard V, Le Bars D, Kunji ER, Konings WN, Gripon JC, Richard J (1995) Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl Environ Microbiol* 61:3024–3030.

CALIDAD BACTERIOLÓGICA DEL AGUA DE POZO PARA CONSUMO HUMANO Y RIEGO DE HORTALIZAS EN EL BARRIO MONTE TERRABUSI, MAR DEL PLATA. ARGENTINA

YEDAIDE Marcos, DE LUCA Laura C, FOLABELLA Alicia M y ZAMORA Angela S.

Universidad Nacional de Mar del Plata. FCEyN. Depto de Biología. Laboratorio de Microbiología. Funes 3250, 3° Piso, (7600) Mar del Plata. Argentina
E-mail: azamora@mdp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la calidad bacteriológica del agua de los pozos domiciliarios del Barrio Monte Terrabusi y evaluar su aptitud para consumo humano y riego de hortalizas. Para lo cual se analizaron 30 muestras de agua y se registraron las condiciones de las perforaciones, utilización del agua, posibles fuentes de contaminación y demás antecedentes como saneamientos, enfermedades, etc.

Solo el 20% fueron aptas para consumo humano. El 83,3% de las muestras resultaron aptas para el riego de hortalizas de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud. Con respecto a los pozos se encontró que: el 46,6% utilizaban motobombardadores, 40% bombas manuales, el 13,4% restante molino, aljibe; la profundidad promedio fue de 12,3 m; el 53,3% presentaron encamisado; el 53,3% presentaron tapas en buen estado; el 83,3% presentaron base de cemento.

Palabras claves: Agua de pozos, consumo humano, irrigación, contaminación bacteriana.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the bacteriological quality of well waters from Monte Terrabusi neighbourhood and evaluate their aptitude for human consumption and vegetable irrigation. Thirty water samples were analyzed and perforation conditions, water uses, potential pollution sources, sanitation and diseases were estimated. Only the 20% of the water samples were fit for human consumption. The 83.3% of them resulted apt for vegetable irrigation, according to World Health Organization. Related to the wells, the 46,6% of them employed pumping engines and 40% manual pumps, the remaining 13,4% mill and cistern. Their mean depth was 12.3 m. The 53.3% of the wells were covered; 53.3% had a cap in good conditions and 83.3% showed cement base.

Key words: well waters, human consumption, irrigation, bacterial pollution.

INTRODUCCIÓN

El agua contaminada puede constituir un evidente peligro para el medio ambiente y un alto riesgo sanitario para el hombre, por ser un importante vehículo para la transmisión de muchos microorganismos patógenos (Mc Junkin, 1988).

Cada año tres a cuatro millones de personas de todo el mundo, principalmente niños, mueren a causa de enfermedades de transmisión hídrica. De estas muertes 2,2 millones son causadas por enfermedades diarreicas, siendo uno de los problemas de salud más graves en la actualidad. El 90% de las enfermedades diarreicas ocurren mayormente en niños de países en vías de desarrollo (Mc Junkin, 1988).

En nuestro país, dentro de las enfermedades de notificación obligatoria, la diarrea es la de mayor incidencia después de las infecciones respiratorias. Es una enfermedad de alta morbilidad y su mayor impacto se produce en los bolsones de pobreza. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), notificó para el año 2001, 452.108 casos de diarreas en menores de cinco años, y 331.283 casos en mayores de 5 años (Zamora y col., 2002). En el mismo año se notificaron en la Provincia de Buenos Aires 97.003 casos en menores de 5 años y 81.957 en mayores de 5 años de edad y en el Partido de Gral Pueyrredón 3.751 casos en menores de 5 años y 3.380 en mayores de 5 años (Boletín Epidemiológico Regional. Bs As, 2001-2002)

En el examen bacteriológico de las aguas para consumo, no se incluye la presencia de cada germen patógeno en particular, sino su grado de posible contaminación. Durante los últimos 80 años se vienen utilizando a los organismos coliformes como indicadores del estado sanitario de una muestra de agua. Este grupo de bacterias, que incluye a *Escherichia coli* y a otras bacterias presentes en las descargas fecales o en fuentes no fecales, se considera "indicador" debido a que puede ser detectado fácilmente con técnicas estandarizadas (Garavelli 1981, Packer *et al.* 1995, en Mc Junkin, 1988).

En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA) establece como límite en agua para consumo humano un valor de coliformes totales (CT) igual o inferior a 3 NMP/100ml, de bacterias aerobias mesófilas un máximo de 500 UFC/ml y ausencia de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml de agua (Código Alimentario Argentino, 1992). Este código no tiene en cuenta la cuantificación de los coliformes termotolerantes.

Aunque los coliformes son un grupo de organismos que se suponían de baja supervivencia en el suelo (ya que su hábitat natural es el intestino de animales de sangre caliente), poseen una alta tasa de adaptación y capacidad para sobrevivir en ambientes

“negativos”. Esta habilidad de supervivencia, aumenta la probabilidad de contaminación de napas luego de una lluvia o de un riego intenso (Entry *et al.*, 2000 b). Aunque Gerba *et al.*, 1975 (en Entry *et al.*, 2000 b) reportaron que el 95 % de *E. coli* se filtra en los primeros 4 cm al descender a través del suelo, estudios a campo y en laboratorio mostraron que los microorganismos patógenos pueden ser transportados por el agua a través de los macroporos, grietas y fisuras del suelo por largas distancias (Entry *et al.*, 2000 b).

Ante la falta de criterios nacionales sobre la calidad bacteriológica del agua utilizada para el riego de hortalizas, se consideraron los criterios mundiales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece como agua apta para riego aquella que contiene menos de 1000 coliformes totales por 100 ml.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad bacteriológica del agua para el consumo humano y para el riego de hortalizas de un sector del Barrio Santa Rosa del Mar de Peralta Ramos (“Monte Terrabusi”), y relacionar la calidad bacteriológica de la misma con las características de los perforaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio del presente trabajo es un sector conocido como Monte Terrabusi, ubicado dentro de la Jurisdicción de la Sociedad de fomento Santa Rosa del Mar de Peralta Ramos, en la zona sur de la ciudad de Mar del Plata. Comprende aproximadamente 70 hectáreas, con 32 viviendas que carecen de suministro de agua potable y redes cloacales, cuya población se caracteriza como de recursos económicos bajos. En la carta ambiental del Partido de Gral. Pueyrredón de 1995 (Massone *et al.*, 1998), citan que la densidad poblacional del barrio es menor a 1 hab/Ha, y que la tasa de crecimiento poblacional durante 1980-1990 fue levemente mayor al 10 %.

Muestreo

Se tomaron 30 muestras de aguas de pozo, en frascos estériles de 250 ml para la determinación de la calidad microbiológica. Se refrigeraron y se procesaron en el laboratorio dentro de las 4 horas de extraídas.

Los datos personales del propietario, como así también los datos de la construcción del pozo, utilización del agua, posibles fuentes de contaminación y antecedentes (análisis anteriores, instrucción, enfermedades de origen hídrico) se registraron en planillas.

Procedimiento bacteriológico.

Para el recuento de bacterias aerobias se utilizó el medio de agar para recuento en placa, sembrando por el método de placa vertida y la lectura se realizó a las 24 h según el CAA. Para la determinación de coliformes presuntivos se utilizó el caldo lauril sulfato sembrándose 10 ml de la muestra en 3 tubos con un caldo de doble concentración, 3 tubos con 1 ml y 3 con 0,1 ml de muestra en un caldo de simple +concentración. Después de 48 h de incubación, aquellos tubos que presentaron turbidez y gas en la campana de Durham se repicaron a caldo BRILA para evaluar coliformes totales y a caldo E-C para coliformes termotolerantes. La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml de muestra se determinó sembrando 100 ml de muestra en 100 ml de caldo nutritivo doble concentración y posteriormente se repicó a Agar Cetrimida y las colonias sospechosas fueron confirmadas con los medios King A y King B y para la presencia de *Escherichia coli* como presuntivo se determinó Indol a 44,5° C y se confirmó mediante el IMViC (Ewing, 1986) (Holt et al 1994) (APHA, 1998) (FDA, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al CAA resultaron aptas para consumo humano, desde el aspecto bacteriológico, el 20 % de las muestras de aguas de pozo analizadas (tabla 1).

Estos resultados coinciden con lo observado en el barrio Gral. Belgrano (16,1 %), siendo más baja la contaminación para el barrio J. Newbery (28,6 %) y más elevada en el Barrio Estación Chapadmalal (6,7%) caracterizándose estos barrios por ser de un nivel socioeconómico bajo dentro del Partido de Gral. Pueyrredón, (Zamora y col., 2002). En otros trabajos se detectaron menor cantidad de muestras de agua no aptas para consumo humano, como en la ciudad de Berisso (30%) y en la ciudad de La Plata (65%) ambas de la Provincia de Buenos Aires ((Barrionuevo *et al.*, 1997) y en la ciudad de Pilar, Provincia de Buenos Aires (65%) (Otamendi & Friedman, 1997).

El 80 % de las aguas analizadas resultaron con 3 o mayor de 3NMP/100 ml de CT. Aunque el CAA no incluye la determinación de CTt, en este trabajo se incluyó su determinación, hallándose un 46,66 % de las muestras analizadas con más de 3 NMP CTt/100 ml. Además, el 43,33 % de las muestras presentaron *E. coli* cada 100ml. El 16,66 % de las muestras analizadas presentaron más de 500 UFC/ml de bacterias aerobias mesófilas y una sola muestra presentó *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml.

Si consideramos los parámetros analizados, se observó que la contaminación de los pozos estaría dada principalmente por los CT, CTt y *E. coli*, indicando contaminación de

origen fecal. Mientras que, en un reducido número de muestras el recuento de aerobias mesófilas fue mayor de 500 UFC/ml (16,66%)

y la presencia de *P. aeruginosa* en 100 ml se detectó en una sola muestra, lo cual indicaría que la contaminación no se debería a deficiencias en la construcción o en la higiene de los pozos.

Tabla N° 1: Contaminación bacteriológica de las aguas de los pozos

Muestra (N°)	Potable humano	Aerobias mesófilas UFC/ml	CT NMP/100ml	CTt NMP/100ml	<i>E. coli</i> presencia en 100ml	<i>P. aeruginosa</i> presencia en 100ml
1	no	162	93	23	presencia	no
2	si	5	<3	<3	no	no
3	no	56	240	43	presencia	no
4	si	3	<3	<3	no	no
5	no	319	>1100	240	presencia	no
6	no	51	7	4	presencia	no
7	no	19	4	<3	no	no
8	no	>500	>1100	>1100	presencia	no
9	no	7	9	<3	no	no
10	no	346	>1100	<3	no	no
11	no	309	>1100	4	no	no
12	no	109	23	<3	no	no
13	no	4	7	<3	no	no
14	si	8	<3	<3	no	no
15	no	580	150	4	presencia	no
16	si	5	<3	<3	no	no
17	no	64	93	23	presencia	no
18	no	>500	1100	1100	presencia	presencia
19	no	14	9	<3	no	no
20	no	>500	4	<3	no	no
21	no	>500	150	9	presencia	no
22	no	78	43	4	presencia	no
23	no	28	240	4	presencia	no
24	si	85	<3	<3	no	no
25	no	39	43	9	presencia	no
26	si	50	<3	<3	no	no
27	no	330	240	<3	no	no
28	no	66	93	93	presencia	no
29	no	20	23	<3	no	no
30	no	275	4	<3	no	no

El 83,33% de las aguas analizadas fueron aptas para el riego de hortalizas (para consumir crudas) ya que presentan menos de 1000 NMP CT/100ml.

El análisis de las encuestas domiciliarias (tabla N° 2 acerca de las características de los pozos determinó que: 1) la profundidad de las perforaciones osciló entre 6 y 22 metros,

siendo la media geométrica de 12,33 m .No se observó relación entre la profundidad de la perforación y el número de CT y CTt, obteniéndose un R² de 0,0536 y 0,0024 respectivamente. El 53,33% presentaron encamisado cuya longitud osciló entre 1 y 12 m con un promedio de 7,12 m , no resultando significativas las diferencias entre los valores de bacterias aerobias mesófilas, CT y CTt, provenientes de aguas de pozos con y sin encamisado (X² =2,1; gl =3; P>0,5). 2) el 53,33% tenían tapas en buen estado; 3) el 83,33% presentaron base de cemento; 4) los equipos de bombeo más frecuentes: los motobombardadores (46,66%) y las bombas manuales (40%); 5) cinco propietarios tienen tanques de agua, y cuatro de ellos realizaron saneamiento de los mismos. 6) ninguna vivienda posee sistemas de clorinación, ni cámara séptica; 7) el 23,33% de los propietarios ha desinfectado los pozos de agua y sólo 4 de éstos realizaron análisis de agua; 8) dado que el 56,66% de los residentes del Monte beben el agua de sus pozos, sólo tres de

Tabla N° 2: Datos de los pozos de agua

Pozo (N°)	antigüedad (años)	profundidad (mts)	encamisado (presencia)	base de cemento	tapa (estado)	Equipo de bombeo*
1	40	19	no	apoyo	regular	MB
2	10	desconoce	desconoce	si	bueno	M
3	11	22	si	si	malo	MB
4	10	12	no	si	bueno	M
5	10	10	desconoce	si	regular	MB
6	15	8	si	si	malo	MB
7	10	16	si	si	regular	M
8	3	6	no	no	malo	MB
9	25	10	si (6 m)	si	regular	molino
10	5	desconoce	si	no	malo	MB
11	1	8	no	si	bueno	M
12	1,5	16	si	si	bueno	BS
13	7	14	si (5 m)	si	bueno	M
14	4	18	si	si	bueno	M
15	1	11	si (10 m)	si	malo	M
16	20	8	no	si	bueno	M
17	desconoce	10	no	----	malo	aljibe
18	desconoce	desconoce	si	si	bueno	MB
19	1	18	si (10 m)	si	bueno	M
20	1	12,3	si (7 m)	si	bueno	M
21	7	11	no	si	bueno	MB
22	7	12	no	si	malo	MB
23	7	12	si (12 m)	si	bueno	BS
24	16	12	si (1 m)	si	bueno	MB
25	3	desconoce	no	si(deficiente)	malo	MB
26	15	desconoce	no	si	bueno	M
27	15	15	no	si	malo	MB
28	10	15	no	no	malo	M
29	6	13	si	si	bueno	MB
30	3	14	si (7 m)	si	bueno	MB

Equipo de bombeo: M (manual); MB (motobombardador); BS (bomba sumergida)

los encuestados declaró casos de diarrea en sus familias. Estos datos se contradicen con el número de casos reportados en las dos Salitas de Atención Primaria de la Salud a las que asisten los habitantes del Monte Terrabusi (Agubordes, 2002).

CONCLUSIONES

El agua domiciliaria del Monte Terrabusi debería considerarse altamente riesgosa para sus habitantes, en función de los resultados obtenidos en este trabajo.

Los datos obtenidos indicarían que en este barrio, aunque el pozo de agua se encuentre debidamente construído, a una adecuada profundidad, con encamisado y con una tapa en buen estado, no se puede garantizar la potabilidad del agua. Entre las variables que afectarían la calidad bacteriológica del recurso se pueden citar la proximidad de los pozos ciegos, la gran cantidad de animales, la escasa vegetación, la inundación y la escorrentía superficial en el terreno, el esparcido de abono animal en tierras de labranza, y el ascenso del nivel superior del acuífero, entre otras. Estas condiciones presuponen la existencia de un acuífero vulnerable, que considerando la profundidad promedio de los pozos, constituiría la fuente de abastecimiento para la mayoría de los habitantes del Monte Terrabusi.

BIBLIOGRAFÍA

- **Agubordes E (2002)**. Programa de Vigilancia Epidemiológica de la Municipalidad del Partido de Gral Pueyrredón (Comunicación personal).
- **A.P.H.A.- A.W.W.A. – W.P.C.F. (1998)**. Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Ed. Washington, D.C. USA. Parte 9000. 1268 p.
- **Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration (FDA), (1998)** 8th Edition. Revision A.
- **Barrionuevo J, Bernava G, Brignoles P, Caballero L, Caro A, Deysi C, Gamarra M, losqin C, Mastrantonio G, Morcelle S, Giannuzzi L, Magariños M. (1997)**. Calidad de aguas subterráneas de La Plata y Berisso. Congreso Internacional de Aguas. III.29.-
- Boletín Epidemiológico Regional. Región Sanitaria VIII. Provincia de Buenos Aires. Ministerio de Salud. Seguimiento Epidemiológico por Municipio (2001 y 2002). 9 p.
- Código Alimentario Argentino (CAA) (1992), art. N° 982 (R 494 ,1/ 7/94).
- **Entry J, Hubbard K, Thies J, Fuhrmann J, (2000)**. “La influencia de la vegetación sobre las bacterias coliformes: a) Movimiento y supervivencia en agua. Reprinted from the Journal of Environmental Quality”. Volume 29, no 4, July-Aug

- **Entry J, Hubbard K, Thies J, Fuhrmann J, (2000).** “La influencia de la vegetación en sobre las bacterias coliformes: b) Supervivencia en suelos. Reprinted from the Journal of Environmental Quality”. Volume 29, no 4, July-Aug.
- **Ewing W (1986).** “Edwards and Ewing`s. Identification of Enterobacteriaceae”. Four Edition, 535 p.
- **Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T, Williams S T (1994).** Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. 787 p.
- ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1982). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Volumen 1. 2ª edición. Editorial Acribia. 430 pag..
- **Massone H, Martinez D, Martinez G (1998).** “Hidrogeología aplicada a la gestión de sitios de disposición final de residuos en el Partido de General Pueyrredón. I: Caracterización hidrogeológica del área”. 5^{tas} Jornadas Geológicas y Geofísicas bonaerenses. Volumen 2, 277 p.
- **Otamendi G, Friedman R. 1997.** Relevamiento de la calidad físico-química microbiológica de las aguas del Partido del Pilar, Prov. de Bs. As. Congreso Internacional de Aguas, III.49.-
- **Zamora A S, Folabella A, Perez Guzzi J, Domínguez S, De Luca L (2002).** “Contaminación microbiológica en aguas de pozos, Partido de Gral Pueyrredón, Prov. de Bs As., Argentina”. Congreso Aguas Subterráneas y Desarrollo Humano. XXXII IAH & VI ALHSUD CONGRESS 2002. Mar del Plata-Argentina.

CONTAMINACIÓN BACTERIOLÓGICA DE COLIFORMES FECALES EN HORTALIZAS Y EN SUELOS REGADOS CON AGUAS DE POZO. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECuento.

YEDAIDE Marcos, DE LUCA Laura C., FOLABELLA Alicia M. y ZAMORA Angela S.

Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología. FCEyN. UNMDP azamora@mdp.edu.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la contaminación bacteriológica presente en 2 tipos de hortalizas: rabanito (parte comestible subterránea) y lechuga (de desarrollo aéreo) regadas con agua de pozo contaminada, de una pequeña huerta familiar. Se cuantificaron coliformes totales (CT) (por 2 métodos de recuento: en placa vertida y fermentación en tubos múltiples), y también coliformes termotolerantes (CTt) y presencia de *Escherichia coli*, en suelo (dos muestras), agua de riego y lavado (dos muestras), y en rabanito y lechuga (toma de muestra de los vegetales en cosecha). Los mayores valores de CT se encontraron en el suelo, los intermedios en las hortalizas y los menores en el agua usada para riego y lavado. Respecto a los CTt sólo se presentaron en el suelo de cultivo y en el agua de riego. Esto indicaría que el suelo estaría actuando como reservorio. Con respecto a la evaluación de los dos métodos para el recuento de coliformes totales, a la prueba no paramétrica de Wilcoxon resultó el recuento en placa vertida con diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) con respecto a la técnica de fermentación en tubos múltiples.

Palabras claves: hortalizas – agua de riego – bacterias coliformes

ABSTRACT:

This paper displays the determination of bacteriological pollution in two different kind of vegetables: radish (its comestible part grows into the soil) and lettuce (with aerial growth). To achieve the objective of this paper, the vegetables from a small family garden were irrigated with polluted ground water. Total coliforms (TC) were counted using two different methods: pour plate and multiple tube fermentation. Termotolerant coliforms and *Escherichia coli* were also counted in the soil, water and in the harvest of vegetables studied. The highest values of TC were found in soil, lower values in the vegetables and the lowest ones in irrigated and wiped water. These results show that the soil could work

as a storage reservoir. When the statistical non-parametric Wilcoxon test was performed, significant differences ($P < 0.001$) in TC counts were only found for pour plate method.

Keywords: vegetables – irrigated water – coliforms bacteria

INTRODUCCIÓN

Desde siempre, el hombre se ha preocupado primordialmente por encontrar fuentes de agua dulce para el consumo y también para el riego. Con los asentamientos poblacionales cercanos a estas fuentes, ellas han sido factibles de contaminación debido a los desechos originados directamente por el hombre y por la industrialización.

Una gran variedad de microorganismos patógenos (bacterias, virus y parásitos) son transmitidos por el agua y suelen estar presentes en bajas, pero significativas, concentraciones en aguas contaminadas (McJunkin, 1988).

Los coliformes, como todo organismo estrechamente relacionado con la vida del hombre, poseen una alta tasa de adaptación y mutación, lo que les ha dado en el tiempo, una mayor capacidad para sobrevivir en ambientes considerados “negativos” como es el caso del suelo y las hortalizas (Entry *et al.*, 2000 b).

Normalmente, las hortalizas no deben ser causa de problemas de salud si bien la transmisión de bacterias patógenas, es posible por contaminación directa con heces de aves y de otros animales, por el uso como abono de estiércol o por el uso de aguas contaminadas para regar o lavar (Adams, 1997)

Diversos estudios, relacionan la contaminación bacteriológica encontrada en hortalizas, con la utilización del agua contaminada para regar o lavar esos alimentos. Los cultivos más asociados a dicha contaminación son los que crecen al ras del suelo y se comen crudos, como coles, lechugas, etc.(www.vm.cfsan.fda.gov/)

Existen trabajos que demuestran que el uso de agua de riego contaminada puede incrementar la frecuencia de microorganismos patógenos detectados en el producto cosechado. Por ejemplo, en una ciudad de Estados Unidos en 1995 tuvo lugar un brote de infección de *E. coli* O157:H7 causado por hojas de lechuga, que afectó por lo menos a 29 personas. (www.vm.cfsan.fda.gov)

El agua para consumo puede ser una fuente directa del patógeno en infecciones humanas. Otra ruta de infección puede ser el riego y lavado de hortalizas, debido a la supervivencia del patógeno en la superficie de éstos alimentos. Se ha observado que el crecimiento hidropónico de ciertas hortalizas, con utilización de aguas contaminadas

pueden contaminar éstos alimentos con altos valores de *E. coli* O157 (Hara-Kudo *et al.*, 1997, citado en Maule, 2000)

Las bacterias presentes en el agua utilizada para el riego (por surco o goteo) de hortalizas no pueden ingresar a la planta por la raíz y llegar a la parte comestible, debido a que los huecos entre las microfibrillas de celulosa de la pared celular primaria de las células de la raíz tienen un tamaño mucho menor (5 nm de diámetro) (Carpita *et al.*, 1979; Carpita, 1982, en Salisbury B. F. y Ross C. W., 1994) que las bacterias. La familia *Enterobacteriaceae* incluye organismos bacilos cortos de 0,3 a 1,8 μ m (Holt J. G. *et al.*, 1994), por lo que la contaminación se produciría a través de las partes aéreas (tallo, hojas) por el agua de riego, heces, salpicaduras, etc.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli* en hortalizas y suelo, y evaluar la sensibilidad de dos métodos de recuento de CT: recuento en placa vertida y fermentación en tubos múltiples.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio.

Se seleccionó una propiedad del Barrio Monte Terrabusi de la ciudad de Mar del Plata, para la realización de una huerta de uso familiar, con la característica de que el agua proveniente de su pozo, presentó una de las mayores cargas bacterianas (coliformes, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), sobre un total de 30 pozos de dicho barrio examinados previamente al ensayo.

Tareas de campo.

Cultivo y cultivo control

Para el presente estudio se realizó una pequeña huerta de aproximadamente 3 m² y se rodeó con alambre gallinero cubriéndose con un nylon de 100 micras. El agua de riego utilizada fue el agua del pozo domiciliario, identificándose como **huerta cultivo**.

Se implementó a 2 m de distancia una réplica: **huerta cultivo control**, usándose en este sector, agua potable.

Se seleccionaron dos hortalizas de consumo crudo como rabanito (*Raphanus sativus*): y lechuga (*Lactuca sativa*). Se sembraron siguiendo las recomendaciones del programa PRO-HUERTA¹ del INTA tanto para huerta cultivo como para huerta cultivo control.

¹Ver en www.inta.gov.ar/extensión/prohuerta

Cosechándose para el ensayo “Rabanito” en el mes de diciembre y el ensayo “Lechuga” en el mes de enero.

De la huerta cultivo las muestras obtenidas fueron: **suelo**, **rabanito** y **lechuga** (sin lavar), **rabanito lavado** y **lechuga lavada** utilizándose para ello agua de pozo de la propiedad.

Las muestras de la huerta control se identificaron como **suelo control**, **rabanito control** y **lechuga control** (lavados con agua potable).

En cada ensayo “Rabanito” y “Lechuga”, se obtuvieron muestras de agua domiciliaria.

Tareas de laboratorio :

En todas las muestras analizadas de suelo, agua y hortalizas, se realizaron diluciones seriadas, para las muestras de tierra la dilución inicial fue de 20 g en 180 ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril, para lechuga y rabanito se cosecharon varias plantas de ambas hortalizas, posteriormente un lote de plantas fue lavado con agua de la propiedad donde se cosechó y se extrajeron alícuotas de distintas plantas hasta completar 20 g, que se diluyeron en 180 ml de PBS para cada hortaliza. Cada dilución se sembró para la cuantificación de coliformes totales mediante el empleo de dos técnicas distintas: el recuento en placa vertida (UFC/ml) utilizando el medio agar cristal violeta rojo neutro bilis y el método de fermentación en tubos múltiples en caldo Brila. Se sembraron para cada dilución 10 ml en 3 tubos de caldo Brila de doble concentración, 1 ml y 0,1 ml en otros 3 tubos de caldo Brila de simple concentración para obtener el NMP/g de muestra. Además, utilizando sólo este último método se determinaron los coliformes termotolerantes (CTt), para lo cual todos los tubos de Brila positivos se repicaron a caldo EC y se incubaron durante 24h a 44,5° C.

A partir de los tubos con EC que presentaron resultado positivo, se investigó la presencia de *E. coli*, realizando aislamientos en placas de medio MacConkey. Las colonias aisladas se caracterizaron macro y microscópicamente, y se realizaron las pruebas de oxidasa y del IMViC (Ewing, 1989; APHA, 1998; FDA, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo “Rabanito”

En el recuento en placa se registraron valores de CT superiores a los obtenidos por fermentación en tubos múltiples para todas las muestras del ensayo “Rabanito” (rabanitos, suelo y agua) (Tabla N° 1).

Con respecto a los CTt, y presencia de *E. coli* no se detectaron en rabanitos determinándose estos microorganismos indicadores de contaminación fecal sólo en el suelo, suelo control y el agua usada para regar. Este resultado sugiere que el suelo estaría actuando como “reservorio” de estos microorganismos

Tabla N° 1. Recuento de coliformes y presencia de *E. Coli* en rabanito, suelo y agua para riego

Muestra	UFC/ml-g	NMP/ml-g		Presencia
	CT	CT	CTt	<i>E. coli</i>
Agua para riego	2,00E+00	0,23E+00*	0,23E+00*	Si
Rabanito	3,00E+03	4,30E+01	0,00E+00	No
Rabanito control	6,50E+03	4,60E+03	0,00E+00	No
Rabanito lavado	2,88E+04	4,30E+01	0,00E+00	No
Suelo	5,13E+04	1,10E+04	7,50E+02	Si
Suelo control	1,90E+04	4,30E+02	4,30E+02	Si

*los valores de coliformes/100ml se expresan convertidos en coliformes/ml

Ensayo “Lechuga”

El método de recuento en placa también registró para este ensayo los valores de CT superiores a los determinados por fermentación en tubos múltiples en todas las muestras. (tabla N° 2).

Tabla N° 2. Recuento de coliformes y presencia de *E. Coli* en lechuga, suelo y agua para riego

Muestra	UFC/m-g	NMP/ml-g		Presencia
	CT	CT	CTt	<i>E. coli</i>
Agua para riego	7,00E+00	0,21E+00*	0,04E+00*	Si
Lechuga	7,00E+04	4,30E+03	0,00E+00	No
Lechuga control	6,55E+05	4,30E+03	7,00E+00	Si
Lechuga lavada	2,71E+04	4,60E+02	0,00E+00	No
Suelo	6,70E+04	7,00E+01	7,00E+01	Si
Suelo control	2,57E+04	9,30E+03	4,30E+01	Si

*los valores de coliformes/100ml se expresan convertidos en coliformes/ml.

En este ensayo, se observó un aumento de la contaminación sobre lechuga control, lo que podría deberse tanto a la disposición foliar de la lechuga como al aporte de bacterias

que provoca el impacto de la gota de lluvia al transportar partículas de suelo o heces de animales. El agua utilizada para regar mostró valores muy bajos de CT (Gráfico N° 1).

Se detectaron CTt y *E. coli* en el agua para riego, en el suelo y suelo control y también en la lechuga control.

Comparación de los valores de contaminación bacteriológica de las distintas muestras en los dos ensayos por los dos métodos.

Recuento en placa: Como ya fue mencionado los valores de CT obtenidos por recuento en placa, resultaron similares en ambos ensayos tanto para el agua para riego, como para el suelo cultivo y suelo control, mientras que en la lechuga se registraron valores superiores respecto a los CT cuantificados en rabanito. Además, resultó mayor la contaminación presente en ambas hortalizas lavadas *in situ* respecto a las hortalizas sin lavar (Gráfico N° 1)

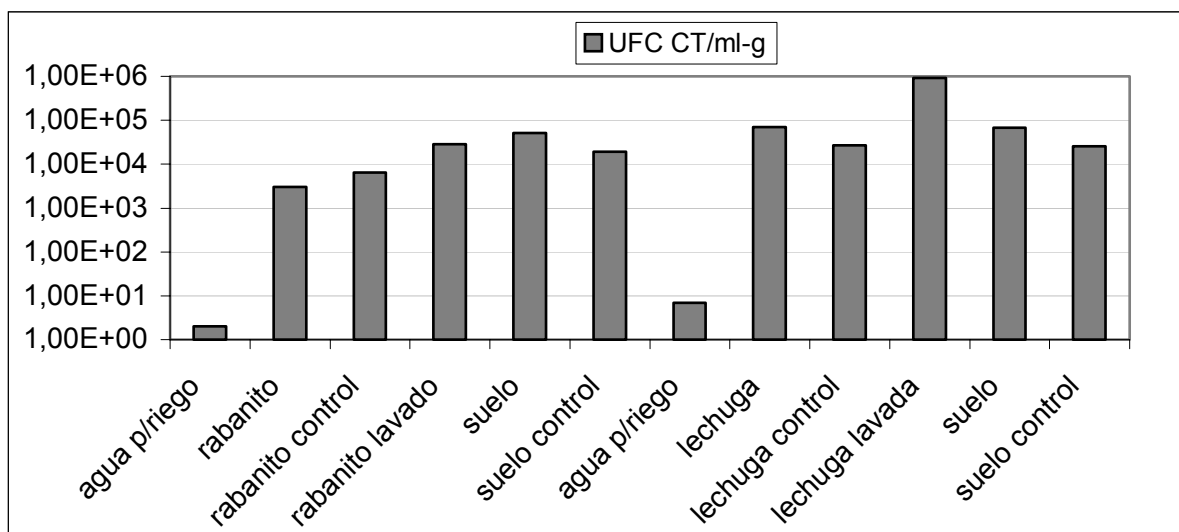


Gráfico N°1: Recuento de CT (en placa) obtenidos en los ensayos de Diciembre y Enero

Fermentación en tubos múltiples: Los valores de CT en las muestras de agua en los dos ensayos, resultaron similares y muy bajos con respecto al resto de las muestras. Las hortalizas registraron valores similares al suelo cultivo y suelo control que presentó los valores más altos de CT. La lechuga presentó valores de CT superiores al rabanito. (Gráfico N° 2).

El recuento en placa registra valores de CT superiores a los obtenidos por fermentación en tubos múltiples para todas las muestras del ensayo “Rabanito” y también para el ensayo “Lechuga”. Esto indicaría que el método en placa tendría una mayor “sensibilidad”. Para confirmarlo se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras apareadas mediante la cual se determinó que el método de recuento en placa obtuvo conteos bacterianos superiores, con diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) con respecto a la técnica de fermentación en tubos múltiples.

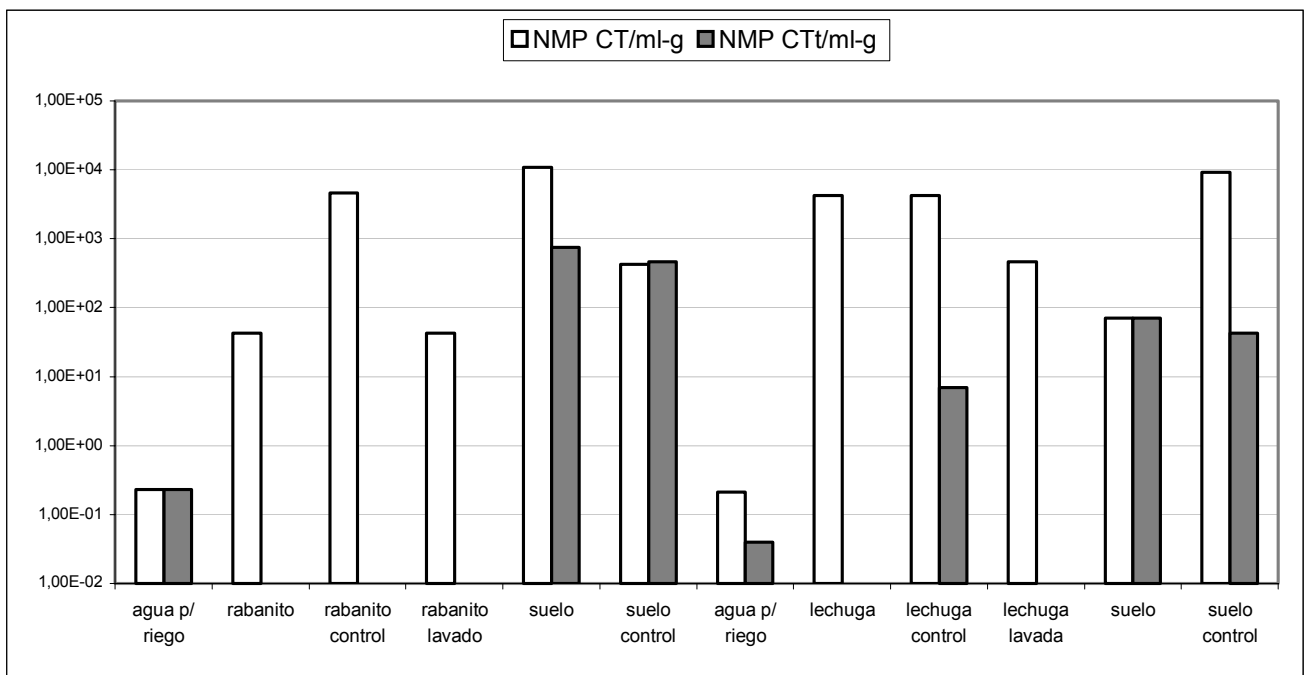


Gráfico N° 2: Comparación de los valores de CT y de CTt de las muestras en los dos ensayos

CONCLUSIONES

Escherichia coli se recuperó en el suelo y suelo control lo cual lo sugiere a estos como “reservorios”.

El método de recuento en placa podría tener una mayor “sensibilidad” en la cuantificación de los CT, con respecto a la técnica de fermentación en tubos múltiples.

En sistemas de producción de hortalizas donde se registran en el suelo altos valores de CT, CTt y presencia de *E. coli*, indicativo de contaminación fecal, representaría un riesgo sanitario para la población que las consuma.

BIBLIOGRAFÍA

Adams M. R. y Moss M. O. (1997). Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. S. A. 464 p.

A.P.H.A.- A.W.W.A. – W.P.C.F. (1998). Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Ed. Washington, D.C. USA. Parte 9000. 1268 p.

Entry J., Hubbard K., Thies J. y Fuhrmann J., (2000). “La influencia de la vegetación en sobre las bacterias coliformes: **b**) Supervivencia en suelos. Reprinted from the Journal of Environmental Quality”. Volume 29, no 4, juli-Aug. (2000).

Ewunig (1986) Edwards and Ewing`s Identification of Enterobacteriaceae. Four Edition 535 pag.

(FDA) Bacteriológical Analytical Manual. Food and Drug Administration. (1998). 8th Edition. Revision A.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (1994). Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. 787 p.

Mc. Junkin F. E. (1988). Agua y Salud Humana. Organización Panamericana de la Salud. 2º Edición. Ed. Limusa S. A. 231 p.

Maule A. (2000). “Supervivencia de *E. coli* O157 verocitotoxigénica en suelo , agua y en superficies”. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement (2000), 88, 71S-78S.

Salisbury F. B. y Ross C. W. (1994). Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamérica, S. A. 759 p.

www.vm.cfsan.fda.gov/

CARACTERIZACIÓN BACTERIANA DE CEPAS AISLADAS DE AGUA DE POZOS OBTENIDAS DEL BARRIO GRAL. BELGRANO, MAR DEL PLATA, ARGENTINA

POLVERINO Daniela, ZAMORA Angela S, FOLABELLA Alicia M y PÉREZ GUZZI Julieta I

Universidad Nacional de Mar del Plata, FCEyN, Lab. Microbiología, Funes 3250 3° piso. TE: 0223-4753554; FAX: 223-4753150; e-mail: dpolveri@uol.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue caracterizar mediante pruebas de identificación primaria la flora bacteriana presente en agua contaminada de pozos, con altos valores de bacterias coliformes y con ausencia de *Escherichia coli*. Se caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente (coloración de Gram) 50 cepas, realizándose la identificación primaria mediante el TSI ("triple azúcar hierro") y pruebas bioquímicas complementarias: (IMViC, oxidasa, catalasa, utilización de azúcares: glucosa, sorbitol y arabinosa, descarboxilación de aminoácidos: fenilalanina desaminasa y lisina descarboxilasa). De las 50 cepas, 49 resultaron bacilos Gram negativos y un bacilo Gram positivo fue clasificado como *Bacillus* spp. Mediante el TSI se clasificaron 37 de las 49 cepas, en tres grupos de reacción característicos. Otras 4 cepas se clasificaron de acuerdo al Manual de Cowan & Steel's y las 8 cepas restantes no fueron identificadas. Se desconoce la incidencia de enfermedades causadas por especies de *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. productoras de enterotoxinas (Joklik et al 1994). Sin embargo, al detectar estos microorganismos, no se puede descartar su participación en las diarreas ocasionadas por el consumo de agua contaminada.

Palabras claves: identificación bioquímica, agua de pozo, contaminación, TSI

BACTERIAL CHARACTERIZATION OF STRAINS ISOLATED FROM GENERAL BELGRANO DISTRICT WELL WATERS, MAR DEL PLATA, ARGENTINA.

ABSTRACT

The objective of the present study was to characterize, by means of primary identification tests, the bacterial flora present in polluted water of wells, with high coliform values, but without *Escherichia coli*. Fifty strains were macroscopically and microscopically characterized (Gram stain). Primary identification was carried out by means of the TSI

("Triple Sugar Iron") and complementary biochemical tests: (indole, MR, VP, citrate, oxidase, catalase, carbohydrate acid from: glucose, sorbitol y arabinose, lysine descarboxylase, phenylalanine). Forty nine of the fifty strains were negative Gram rods and only one, classified as *Bacillus* spp., was positive Gram. Thirty seven of the 49 strains were classified in three characteristic reaction groups by means of the TSI. Another 4 strains were classified according to the Cowan & Steel's Manual and the remaining 8 strains were unidentified. Although the incidence of illnesses caused by *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Enterobacter* species producing enterotoxins is unknown (Joklik et al 1994), when detecting these microorganisms, their participation in diarrheas caused by polluted water consumption can not be put aside.

Key words: biochemical identification, well waters, contamination, TSI

INTRODUCCIÓN

La materia fecal humana puede contener numerosos agentes infecciosos. Cuando estos últimos contaminan el agua de consumo o entran en contacto con el cuerpo humano o con los alimentos que el hombre consume, constituyen un grave riesgo sanitario, produciendo una gran variedad de enfermedades entéricas. Para garantizar la aptitud del agua de consumo, desde el punto de vista bacteriológico, en el examen no se incluye la identificación de cada bacteria patógena en particular, sino que se determina su posible contaminación fecal, ya que el intento de evaluar la seguridad del agua de esta forma presenta ciertas limitaciones (Garavelli 1981, Packer *et al.* 1995). Actualmente se utilizan microorganismos indicadores, siendo los más utilizados los coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTt), *Escherichia coli*, bacterias aerobias y estreptococos fecales. El Código Alimentario Argentino establece como aguas de consumo microbiológicamente aptas, las que contienen un número más probable (NMP) menor o igual a 3 CT/ 100 ml, bacterias aerobias mesófilas hasta 500 UFC/ml, ausencia de *E. coli* y de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml de agua. Estos indicadores no siempre pueden suministrar una medición confiable de los riesgos reales, debido a la presencia de falsos resultados negativos, en aquellos casos donde el indicador está ausente pero los patógenos se encuentran presentes.

Otros microorganismos propuestos como indicadores de contaminación son *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp.; pero no todos han sido aceptados como

indicadores de contaminación, ya sea por su difícil detección o su baja persistencia en el medio ambiente.

En el barrio General Belgrano de la ciudad de Mar del Plata, se realizó un estudio microbiológico del agua proveniente de pozos domiciliarios para verificar la calidad del agua de consumo. Los resultados obtenidos demostraron que en aquellas muestras de agua donde los niveles de CT y CTt eran los más elevados (> 1100 NMP/100 ml), se lograban pocos aislamientos de *E. coli* (Zamora y col., 1998). En dichas muestras se seleccionó la flora acompañante para su posterior identificación. Entre los manuales de referencia que se utilizaron para la identificación de tales microorganismos podemos citar el Bergey's (1994), el Cowan and Steel's (Barrow y Feltham, 1993) y el manual de Carter (1979), que se basan en coloraciones y pruebas bioquímicas.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar bioquímicamente, mediante pruebas de identificación primaria, la flora bacteriana presente en agua contaminada de pozos con alto contenido de bacterias coliformes y en las que no se detectó presencia de *E. coli*.

Se utilizó la prueba del triple azúcar hierro (TSI) y la coloración de Gram (Jang y Biberstein 1972), para diferenciar los múltiples grupos bacterianos, y para completar la identificación de familia o de especie, se efectuaron las pruebas bioquímicas correspondientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas bacterianas utilizadas para este estudio se obtuvieron de muestras de agua de pozos domiciliarios del barrio Gral. Belgrano de la ciudad de Mar del Plata. A partir de los tubos de caldo lactosado verde brillante bilis (BRILA) con resultado positivo, provenientes de la prueba de fermentación en tubos múltiples para CT, en los que no se detectó presencia de *E. coli*, se realizó el aislamiento en agar Mac Conkey (MAC), incubando 24h a 35°C.

Las cepas aisladas fueron conservadas a una temperatura de 4-8 °C, en el medio semisólido agar tripticasa soja (ATS) (Leardini *et al.* 1993). Previo a la tipificación de las cepas conservadas, se repicaron a placas con agar nutritivo (35 °C - 24 h), describiéndose la morfología de cada colonia. Luego de la tinción diferencial de Gram, se utilizó como coloración complementaria la de Schaeffer y Fulton. Posteriormente, se completó la identificación primaria mediante el Agar hierro tres azúcares (TSI). Este medio de cultivo permite determinar al mismo tiempo si el organismo es capaz de metabolizar la glucosa, en el culot, y la lactosa y la sacarosa, en la estría de superficie. La lectura se

realizó a través del viraje del indicador de pH. También se visualizó la producción de gas y la reducción del tiosulfato a ácido sulfhídrico (Koneman y col., 1983). Los tubos se inocularon con el total de cepas en estudio con un ansa de puntura, sembrando por punción en el culot y luego por estría en la superficie. Se incubó 24h a 35°C. De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas se identificaron utilizándose las tablas propuestas por Jang y Biberstein (1972). La prueba de TSI, junto a la utilización de pruebas bioquímicas complementarias, brinda resultados que pueden ser comparados con los provenientes de cualquier otra clave de identificación.

Se realizaron las siguientes pruebas complementarias: crecimiento y utilización de lactosa en MAC; reacción de la catalasa; pruebas de la citocromo c oxidasa, de indol, rojo de metilo, Voges – Proskauer y utilización de citrato; utilización de azúcares: glucosa, sorbitol y arabinosa; descarboxilación de aminoácidos: pruebas de fenilalanina desaminasa y lisina descarboxilasa (temperaturas y tiempos de incubación según Mac Faddin, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 52 cepas provistas para esta investigación, 50 (96.15 %) se recuperaron a partir de ATS. Se identificaron 49 cepas Gram negativas y una cepa Gram positiva (tablas 1, 2, 3 y 4). Esta cepa presentó espora, determinada por la coloración de Schaeffer y Fulton, lo cual permitió junto al crecimiento macroscópico, clasificarla bajo el género *Bacillus* spp. De las 49 cepas Gram negativas, se identificaron 37 cepas mediante el TSI (74%), 4 cepas se identificaron por pruebas complementarias (coloración de Gram, movilidad, catalasa, oxidasa, utilización de la glucosa y prueba de O/F) presentes en el Manual de Cowan & Steel's (Barrow y Feltham, 1993), y 8 cepas no pudieron ser identificadas por los métodos propuestos. Las 37 cepas identificadas fueron clasificadas de acuerdo al TSI (tabla 1), en tres grupos de reacción característicos:

Reacción 1 (fondo ácido, ácido estría, gas y H₂S negativo): *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp. (tabla 5).

Reacción 2 (fondo ácido – estría alcalina, gas- H₂S positivo). No se obtuvieron bacterias con características para este grupo (tabla 6).

Reacción 3 (fondo ácido – estría ácida, gas variable y H₂S negativo): *Klebsiella* spp. (tabla 7).

Reacción 4 (fondo ácido, estría alcalina, gas variable, H₂S): *Citrobacter* spp. (tabla 8)

El resto de las reacciones características del TSI, no se utilizaron por no tener bacterias con características para estos grupos.

Las 4 cepas que no pudieron ser agrupadas según las reacciones del TSI, fueron clasificadas como pertenecientes a los géneros *Citrobacter* spp. (2 cepas) con características atípicas en cuanto a la utilización de azúcares, y *Pseudomonas* spp. (2 cepas), identificadas por su crecimiento en agar cetrimida (tabla 4).

En este estudio se lograron identificar entre la flora acompañante aislada de agua de pozo domiciliaria, cepas pertenecientes a cinco géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. y *Escherichia* spp. Entre ellas se encuentra *E. coli* que no había sido identificada con la metodología estándar establecida por el CAA, para determinar la potabilidad del agua. La diversidad bacteriana hallada en este trabajo, supera la observada por Basualdo y colaboradores (2001) en agua de bebida.

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentran algunos de los agentes causales más importantes de enfermedad gastrointestinal. No obstante, la mayor parte de las especies no son patógenas intestinales, sino microorganismos oportunistas que pueden infectar cualquier sitio del organismo cuando encuentran un huésped susceptible (Joklik *et al.*, 1994). Estas cepas y otras especies productoras de enterotoxinas como *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., tienen la capacidad de producir una toxina similar a la del cólera (Joklik *et al.*, 1994). Cabe destacar que la mayoría de dichas cepas fueron aisladas e identificadas durante este estudio y podrían estar involucradas en las diarreas ocasionadas por el agua de consumo, aún en aquellas muestras donde no se encuentre *E. coli*.

Por otra parte, desde el punto de vista metodológico la utilización de la tinción de Gram y del TSI resultó menos costoso y laborioso frente a lo propuesto por Cowan & Steel, Bergey o la clave de King del Manual de Carter, donde son necesarias una mayor cantidad de pruebas bioquímicas. Los resultados finales de la clasificación bacteriana con las pruebas complementarias, fueron comparables a la metodología propuesta por Ewing (1986).

Tabla 1. Porcentaje de cepas bacterianas caracterizadas.

Caracterización	Total de cepas	Identificación secundaria		
	(%)	Género	Especie	N° de cepas clasificadas (%)
Gram	1 (2)	<i>Bacillus</i> spp.	No determinada	1 (2)
TSI reacción 1	18 (36)	<i>Escherichia</i> spp.	<i>E. coli</i>	2 (4)
		<i>Enterobacter</i> spp.	<i>E. cloacae</i>	4 (8)
			<i>E. agglomerans</i>	1 (2)
			<i>E. aerogenes</i>	1 (2)
		<i>Klebsiella</i> spp.	<i>K. pneumoniae</i>	3 (6)
		<i>Serratia</i> spp.	<i>S. liquefaciens</i>	7 (14)
reacción 3	1 (2)	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>K. ozaenae</i>	1 (2)
reacción 4	18 (36)	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>C. freundii</i>	18 (36)
Cowan & Steel's	4 (8)	<i>Citrobacter</i> spp. (atípico)	No determinada	2 (4)
		<i>Pseudomonas</i> spp.	No determinada	2 (4)
No identificables	8 (16)	atípicos para cualquier categoría no enterobacterias		4 (8)
				4 (8)
TOTAL	50 (100)			50 (100)

Tabla 2. Morfología macroscópica y microscópica.

Cepa	Placa (AN) ¹						Gram	Microscopía	
	Tamaño	Forma	Borde	Perfil	Superficie	Color		Forma	Agrupación
1	características no determinadas						-	bacilo corto bipolar	solitaria
2	mp	c	i	c	p	i	-	bacilo largo bipolar	solitaria
3	características no determinadas						-	bacilo bipolar	solitaria
4	mp	c	i	c	p	i	-	bacilo corto	filamentoso
5	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo largo bipolar	solitaria
6	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto	solitaria
7	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto bipolar	solitaria
8	características no determinadas						-	bacilo corto bipolar	solitaria
9	p	c	e	c	p	i	-	bacilo corto bipolar	solitaria
10	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto	solitaria
11	mp	c	i	c	p	i	-	bacilo corto	solitaria
12	mp	c	i	c	p	i	-	bacilo corto	solitaria
13	p	c	i	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
14	m	i	i	c	p	i	-	bacilo largo fino	solitaria
15	m	c	i	c	p	i	+	bacilo esporulado	en cadena
16	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo gordo curvo	solitaria
17	características no determinadas						-	bacilo corto bipolar	solitaria
18	mp	c	e	c	p	b	-	bacilo bipolar	solitaria
19	mp	c	i	c	p	i	-	bacilo corto	solitaria
20	p/m	c	e	c	p	i	-	bacilo corto fino	solitaria
21	m	c	e	mc	p	i	-	bacilo corto	solitaria
22	p	c	o	c	p	ab	-	bacilo bipolar	solitaria
23	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
24	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
25	características no determinadas						-	bacilo bipolar	solitaria
26	p	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
27	p	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
28	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
29	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
30	características no determinadas						-	bacilo bipolar	solitaria
31	características no determinadas						-	bacilo bipolar	solitaria
32	características no determinadas						-	bacilo bipolar	solitaria
33	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
34	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto	solitaria
35	m	c	e	mc	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
36	m	c	e	mc	p	i	-	bacilo corto	de a pares
37	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
38	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
39	p	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	en racimo
40	mp	c	e	c	p	b	-	bacilo bipolar	solitaria
41	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo largo fino	solitaria
42	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
43	g	c	i	c	p	i	-	bacilo largo bipolar	solitaria
44	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
45	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
46	mp	c	e	c	p	b	-	bacilo corto fino	filamentoso
47	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo bipolar	solitaria
48	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto recto	solitaria
49	características no determinadas						-	bacilo corto bipolar	solitaria
50	características no determinadas						-	bacilo corto bipolar	solitaria
51	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto bipolar	solitaria
52	mp	c	e	c	p	i	-	bacilo corto bipolar	solitaria

Referencias

mp muy pequeñas; **p** pequeñas; **m** medianas; **g** grandes; **c** circular; **ig** irregular; **e** entero; **cx** convexo; **mc** muy convexo; **pl** pulida; **i** incoloro; **b** blanco; **am** amarillo; **ab** ámbar.
 Temperatura y tiempo de incubación **1** 35 °C, 24 h.

Tabla 3. Identificación primaria y secundaria.

Cepa	TSI ¹				Oxidasa	Catalasa	Mac Conkey ¹
	Fondo	Estria	H ₂ S	Gas			
1	+	+	+	+	-	+	+
2	+	+	+	+	-	+	+
3	+	+	+	+	-	+	+
4	+	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	-	+	+
6	+	+	+	+	-	+	+
7	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	-	+	+
9	+	+	-	+	-	+	+
10	+	+	-	+	-	+	+
11	+	+	+	+	-	+	+
12	+	+	+	+	-	+	+
13	+	+	+	+	-	+	+
14	+	-	-	-	-	+	+
15	+	-	-	-	+	+	sin dato
16	+	+	-	-	-	+	+
17	+	+	-	+	-	+	+
18	+	+	-	+	-	+	+
19	+	+	-	+	-	+	+
20	-	-	-	-	+	+	-
21	+	+	-	+	-	+	+
22	+	+	+	+	-	+	+
23	+	-	-	+	-	+	-
24	+	-	-	+	-	+	-
25	+	+	-	+	-	+	sin dato
26	+	+	-	+	-	+	+
27	+	+	-	+	-	+	+
28	+	+	-	+	-	+	+
29	+	+	-	+	-	+	+
30	+	+	-	+	-	+	+
31	+	+	-	+	-	+	+
32	+	+	-	+	-	+	+
33	+	+	-	+	-	+	+
34	+	+	-	+	-	+	+
35	+	+	-	-	-	+	sin dato
36	+	+	-	-	-	+	sin dato
37	+	-	-	+	-	+	-
38	+	-	-	+	+	+	-
39	+	+	-	+	-	+	-
40	+	+	-	+	-	+	+
41	+	+	+	+	-	+	sin dato
42	+	+	+	+	-	+	+
43	+	+	+	+	-	+	+
44	+	+	+	+	-	+	+
45	+	+	+	+	-	+	+
46	+	+	-	+	-	+	sin dato
47	+	+	+	+	-	+	+
48	+	+	+	+	-	+	sin dato
49	+	+	-	+	-	+	+
50	+	+	-	+	-	+	+
51	+	+	-	+	-	+	+
52	+	+	+	+	-	+	+

Referencias

+ positivo; - negativo (acidez o producción)
 Agar MAC: + lactosa positivas; - lactosa negativas.
 Temperatura y tiempo de incubación 1 35 °C, 24 h

Tabla 4. Identificación secundaria (Continuación).

Cepa	SIM ¹			RM ¹	VP ¹	Citrato ¹	Sorbita ¹	ARA ¹	PD ¹	LD ¹	Cepa identificada como
	Movilidad	H ₂ S	Indol								
1	+	+	-	+	-	+			-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
2	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
3	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
4	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
5	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
6	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
7	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
8	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
9	+	-	-	+	-	+	+		-	+	<i>Serratia liquefaciens</i>
10	+	-	-	-	+	+	+	+			<i>Enterobacter cloacae</i>
11	+	+	-	+	-	-			-		no identificable
12	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
13	+	+	-	+	-	+	+				<i>Citrobacter freundii</i>
14	+	-	-	-	-	-	-				no identificable
15	-	-	-	-	+	-					<i>Bacillus</i> sp.
16	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>Klebsiella ozaenae</i>
17	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
18	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>Enterobacter aerogenes</i>
19	+	-	-	+	-	+	+				<i>Serratia liquefaciens</i>
20	+	-	-	-	-	+	-				<i>Pseudomona</i> sp.
21	+	-	-	+	-	+	+				<i>Serratia liquefaciens</i>
22	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
23	+	-	-	-	+	+	-	-		-	no enterobacteria
24	+	-	-	-	+	+	-	-		-	no enterobacteria
25	+	-	+	-	+	+					no recuperable
26	+	-	+	+	-	-	+				<i>Escherichia coli</i>
27	+	-	+	+	-	-	+				<i>Escherichia coli</i>
28	+	-	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citobacter freundii</i>
29	+	-	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citobacter freundii</i>
30	+	-	-	+	-	+	+				<i>Serratia liquefaciens</i>
31	+	-	-	+	-	+	+				<i>Serratia liquefaciens</i>
32	+	-	-	+	-	+	+				<i>Serratia liquefaciens</i>
33	+	-	-	-	+	+	+	+		-	<i>Enterobacter cloacae</i>
34	+	-	-	+	-	+	+				<i>Serratia liquefaciens</i>
35	+	-	-	+	-	+	+				<i>Citrobacter</i> sp. (atípico)
36	+	-	-	+	-	+	+				<i>Citrobacter</i> sp. (atípico)
37	+	-	-	-	+	-	-		-	-	no enterobacteria
38	+	-	-	-	+	-	-		-	-	<i>Pseudomona</i> sp.
39	D	-	+	-	+	+	+				no enterobacteria
40	+	-	+	-	+	+					<i>Enterobacter agglomerans</i>
41	+	+	+	+	-	+	+				no recuperable
42	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
43	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
44	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
45	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
46	+	+	-	-	-	+	+				no identificable
47	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>
48	+	+	-	-	-	+	+				no identificable
49	-	-	-	-	+	+	+	+		-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
50	-	-	-	-	+	+	+		-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
51	+	-	-	-	+	+	+	+		-	<i>Enterobacter cloacae</i>
52	+	+	-	+	-	+	+		-	-	<i>Citrobacter freundii</i>

Referencias

ARA Arabinosa

PD Fenilalanina desaminasa

LD Lisina descarboxilasa

+ positivo; - negativo (producción o utilización); **D** Dudoso

Temperatura y tiempo de incubación 1 35 °C, 24 h.

CONCLUSIONES

La identificación primaria de las cepas aisladas durante este estudio indican que la flora bacteriana acompañante presente en agua contaminada proveniente de pozos domiciliarios del Barrio Gral. Belgrano está compuesta por una variedad de cepas potencialmente patógenas.

Se evidencia la necesidad de rever las metodologías estándares previstas por el CAA, para la búsqueda de bacterias indicadoras de contaminación fecal, ya que en aguas altamente contaminadas la competencia entre los distintos grupos bacterianos podría ser uno de los factores que dificulte la detección e identificación de tales indicadores.

BIBLIOGRAFÍA

Barrow G y R Feltham (1993) Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria, 3th ed., Cambridge University Press.

Basualdo JA, Córdoba MA, De Luca MM, Rocía IL, Pezzani BC, Vay C, Grimont PAD (2001) Aislamiento y caracterización de coliformes injuriados provenientes de la red de distribución de agua de bebida de La Plata, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 33: 9-14.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. 9th ed. Williams & Wilkins. Preston Street, Baltimore, Maryland, USA.

Carter GB (1979) Procesamientos de diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinaria, ed. Acribia.

Ewing WH (1986) Identification of *Enterobacteriaceae* Edwards and Ewing's 4th ed., Elsevier Science Publishers BV, New York, USA, 536 pp.

Garavelli HJ (1981) Compendio de Microbiología. López Libreros editores SRL, Arg. 504 pp.

Jang SS, Biberstein EL (1972) A Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Micology. Veterinary Medical Teaching Hospital, University of California, Davis. Revised edition 1972.

Joklik WR, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM (1994) Zinsser Microbiología, 20 ed., Panamericana, Argentina.

Leardini N, Callejo R, Di Martino A, Fiorito S, Folcari M, Greco G, Kariyama E, Vay C (1993) Conservación de microorganismos. Métodos aplicados en microbiología médica (comunicación interna grupo de trabajo).

Mac Faddin JF (1980) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana, Argentina, 301 pp.

Packer PJ, Mackerness CW, Riches M, Keevil CW (1995) Comparison of selective agars for the isolation and identification of *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli* from environmental drinking water samples. Letters in Applied Microbiology 20: 303-307.

Zamora y col. (1998) Control de la calidad de aguas de consumo y prevención de enfermedades diarreicas en zonas suburbanas y rurales del Partido de Gral. Pueyrredón. Proyecto de extensión Universitaria, UNMdP. Ref.: BON-A-E 2013.

Tabla 5. Reacción 1 del TSI y pruebas complementarias.

TSI - Reacción 1

Gram (-), cocobacilos, bastones, Fondo ácido - Estría ácida - Gas - Sin H₂S

	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>		<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Enterobacter</i>			<i>Serratia</i>	<i>Enteric</i> spp.	<i>Aeromonas liquefaciens</i>
		<i>pneumoniae</i>	<i>oxytoca</i>			<i>aerogenes</i>	<i>cloacae</i>	<i>liquefaciens</i>			
Indol	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Movilidad	+	-	-	+	+	+	+	+	+	d	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Citrato		+	+	+	+	+	+	+	+	-	d
RM		-	d	+	+	-	-	d	d	d	d
VP		+	+	-	-	+	+	d	+	-	+
PD		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
					Arabinosa	+	+	+	-	s / d	s / d
					LD	+	-	+	+	d	-
						Crecimiento en Mac Conkey				+	+

Referencias: **RM** Rojo de Metilo, **VP** Voges Proskauer, **PD** Fenilalanina desaminasa, **LD** Lisina descarboxilasa, **d** Diferentes tipos **s / d** Sin dato, **+** Positivo, **-** Negativo

Tabla 6. Reacción 2 del TSI y pruebas complementarias.

TSI - Reacción 2

Gram (-), cocobacilos, bastones, Fondo ácido - Estría alcalina - Gas -H₂S

	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Arizona</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
Indol	-	-	-	+	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+
Citrato		+	+	-	+	+
RM		+	+	+	d	+
VP		-	-	-	+	-
LD		+	+	+	+	-

Referencias: **RM** Rojo de Metilo, **VP** Voges Proskauer, **LD** Lisina descarboxilasa, **d** Diferentes tipos, **+** Positivo, **-** Negativo

Tabla 7. Reacción 3 del TSI y pruebas complementarias.

TSI - Reacción 3

Gram (-), cocobacilos, bastones, Fondo ácido - Estría alcalina – Gas variable – Sin H₂S

	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Proteus</i>		<i>Providencia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Enterobacter</i>			<i>Aeromonas formicans</i>
				<i>morgani</i>	<i>rettgeri</i>				<i>aerogenes</i>	<i>cloacae</i>	<i>liquefaciens</i>	
Indol	+	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+
Movilidad	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+
	RM	-	-	-	-	-	+	+	-	d	d	+
	VP	+	+	+	+	+	-	-	+	+	d	-
						LD	+	-	+	-	+	-

Referencias: **RM** Rojo de Metilo, **VP** Voges Proskauer, **PD** Fenilalanina desaminasa , **LD** Lisina descarboxilasa, **d** Diferntes tipos, **+** Positivo, **-** Negativo

Tabla 8. Reacción 4 del TSI y pruebas complementarias.

TSI - Reacción 4

Gram (-), cocobacilos, bastones, Fondo ácido - Estría ácida - Gas variable - H₂S

	<i>E. Coli</i> ³	<i>Actinobacillus liqueresii</i> ⁴	<i>Proteus</i>		<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Arizona</i>
			<i>mirabilis</i>	<i>vulgaris</i>		
Indol	+	-	-	+	-	-
Movilidad	+	-	+ 2	+ 2	+	+
		Citrato	d	d	+	+
		PD	+	+	-	-
		RM			+	+
		VP			-	-
		LD			-	+

Referencias: **PD** Fenilalanina desaminasa, **RM** Rojo de Metilo, **VP** Voges Proskauer, **LD** Lisina descarboxilasa, **+** Positivo, **-** Negativo, **d** Diferntes tipos, **1** Sin movimiento, **2** Crecimiento invasor, **3** Extremadamente raros en esta categoría (ver TSI - reación 1), **4** Extremadamente raros en esta categoría (ver TSI - reación 6) No se produce gas.

	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Arizona</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
Indol	-	-	-	+	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	+	+	-	+	+
RM	-	+	+	+	d	+
VP	-	-	-	-	+	-
LD	-	+	+	+	+	-

Referencias
RM Rojo de Metilo
VP Voges Proskauer
LD Lisina descarboxilasa
d Diferentes tipos
+ Positivo
~ Negativo

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS HALOFILAS EXTREMAS DETERIORANTES EN ANCHOITA SALADA

YEANNES^(1,2), María; RAMIREZ⁽³⁾, Elida; FÉLIX⁽²⁾, Mónica

(1)CONICET, (2) UNMDP, (3) UNCPBA

Preservación y Calidad de Alimentos. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNMDP. Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Argentina. E-mail: myeannes@mdp.edu.ar

RESUMEN

En los productos salado-madurados de *Engraulis anchoita*, que poseen una actividad de agua (aw) de 0,75 a 0,80 se han encontrado bacterias halófilas. El objetivo de este trabajo fue determinar la potencial capacidad deteriorante de los grupos bacterianos encontrados. Se realizaron estudios microbiológicos en 78 muestras de anchoíta salada-madurada y 22 muestras de filetes en aceite. El 69% de las colonias halladas fueron halófilas extremas y el 31 % estrictas. De acuerdo a sus características bioquímicas se ha reconocido un 31% de *Halococcus* sp.; 15% de *Haloferax* sp 5% de *Halobacterium* sp y 7% de *Haloarcula* sp., el resto está sin identificar. De las bacterias halladas un 30% tienen actividad proteolítica, 30% lipolítica y 15% proteolítica y lipolítica. La presencia de estas bacterias podría llevar a modificaciones irreversibles y no deseables en distintas características sensoriales como olor, color y textura, que limitarían la vida útil de estos productos. La importancia de esta limitación estará dada por el número, las características de las mismas y las condiciones de almacenamiento del producto.

ABSTRACT

In salting-ripening products of *Engraulis anchoita*, with water activity (aw) from 0.75 to 0.80, halophilic bacteria were founded. The aim for this work was to determine the potential spoilage capacity of bacteria found. Microbiology studies were carried out on 78 samples of matured-salted anchovy and 22 salted of fillets. 69% of strains found were extremely halophilic bacteria and 31% was strict halophilic bacteria. In accordance with microbiological characteristic were identifying 31% of *Halococcus* sp.; 15% of *Haloferax* sp 5% of *Halobacterium* sp y 7% of *Haloarcula* sp.. The 42% remain since was not identified. On total bacteria found, 30% have lipolitic activity, 30 % proteolitic activity and 15% possess both, lipolitic and proteolitic activity. The presence of these microorganisms can cause irreversible and undesirable changes on sensory characteristics that color,

smell and texture. This activity will be limit shelf life of these products. The importance of this limitation will be give for number, characteristic of these bacteria and storage condition of product.

PALABRAS CLAVE: anchoíta- productos salados- aislamiento e identificación- bacteria halófilas- deterioro- vida útil.

INTRODUCCION

Engraulis anchoita es la especie de pescado menos explotada del Atlántico Sudoccidental (SAGPyA, 2005). Alrededor del 90% de su captura se destina a la elaboración del producto salado y madurado. El 99 % de ésta producción se exporta debiendo cumplimentar pautas de calidad impuestas por el mercado. El medio en el cual se produce la maduración posee valores de actividad de agua (a_w) de 0,75 a 0,80 (Filsinger y Yeannes, 1994; Yeannes, 1996). Estos valores sólo permiten una actividad microbiana reducida a grupos de bacterias y hongos halófilos ya que el desarrollo de la flora que inicialmente se encuentra en éste producto marino no es posible (Huss,y Valdimarson, 1990). En estos productos se han encontrado bacterias halófilas moderadas, estrictas y extremas (Ramirez y col., 1997; Ramirez y col, 2000).

Las bacterias, mohos y las levaduras halófilos son contaminantes naturales de la sal (Connell, 1990; Huss y Valdimarson, 1990). De acuerdo a la procedencia de la sal los recuentos y especies en estos microorganismos podrán variar y su presencia tiene importancia desde el punto de vista del proceso ya que pueden provocar deterioro y en algunos casos toxicidad del producto final por formación de histamina (Paredi y Yeannes, 1987; Ramirez y col., 1994).

El proceso de salado y madurado de anchoíta (*Engraulis anchoita*) consta de una serie de etapas que se muestran en la Figura 1 (Yeannes, 1991; Yeannes, 1996). En la misma se puede observar que existe una etapa de salado, que se realiza con salmuera sobresaturada con el ejemplar entero, llegando a un equilibrio salino y una A_w (actividad de agua) de 0,82- 0,87 (Yeannes, 1991). Posteriormente con el ejemplar descabezado y eviscerado hay un nuevo agregado de sal que se realiza en los tambores, intercalando capas de anchoíta en forma de "corona" y sal, donde el producto madura y llega a otro equilibrio salino y la a_w alcanza valores de 0,75 (Zugarramurdi y Lupìn, 1977; Yeannes, 1991). El producto es prensado para acelerar el proceso e impedir el acceso de aire en el interior evitando la rancidez. En estas dos etapas y desde que el pescado llega a la planta, donde ingresa a través de una máquina lavadora a la que le continúa una cinta

transportadora donde mediante una tolva se le adiciona sal, el pescado permanece en un ambiente salino.

Es importante determinar las características de las bacterias presentes y el efecto sobre los productos salados de anchoíta (*Engraulis anchoita*), por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la potencial capacidad deteriorante de los grupos bacterianos encontrados.

MATERIALES Y METODOS

Se efectuaron tomas de muestras en distintos saladeros de la ciudad de Mar del Plata, Argentina. Las muestras tomadas responden a anchoíta salada y madurada, obtenida de los barriles hacia el final de la maduración y filetes de anchoíta envasados en aceite (Figura 1). Se analizaron 78 muestras de *Engraulis anchoita* salada-madurada y 22 muestras de filetes para determinación de bacterias halófilas extremas y estrictas. Se prepararon según método 2 (ICMSF 1989), realizándose diluciones 10^{-1} a 10^{-3} sembrando 0,1ml en superficie por triplicado e incubando a 37° C por el término de 12 días en medio Gibbons (Bergey, 1989) y agar triptona-sal-extracto de levadura (Norma IRAM n° 15 139, 1988) y los caldos de ambos.

Diagrama de la elaboración de anchoita salada

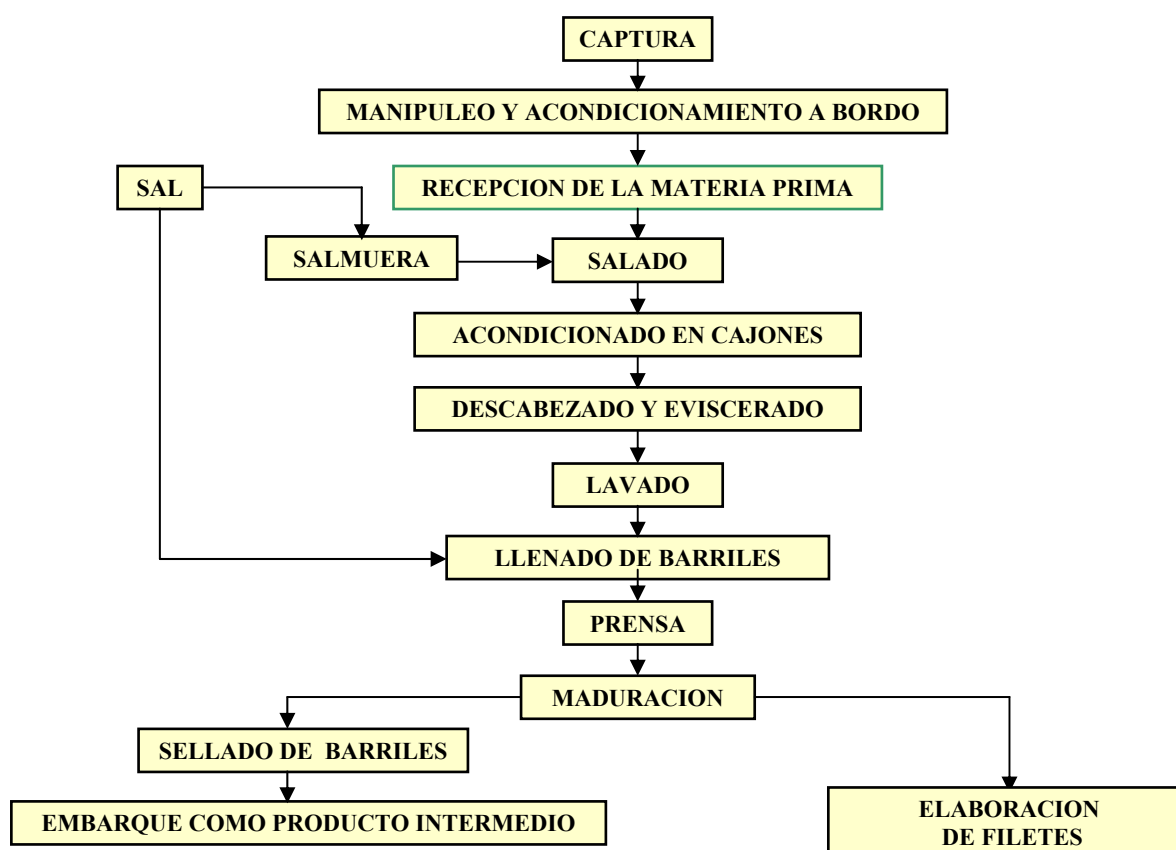


Figura 1. Diagrama de Flujo del proceso de salado y madurado de anchoita (*Engraulis anchoita*)

La identificación bacteriana se realizó observando las características de las colonias, tomando en cuenta su capacidad de producir pigmentos debido a la presencia de carotenoides (bacteriorrodopsinas y bacteriorruberas) (Rodríguez Valera y Barraquero, 1982). Se consideró resultado positivo la aparición de colonias rosado-rojo. La morfología celular se analizó por medio de la técnica de coloración de Gram, (Merck, 1994). Se determinaron sus características proteolíticas y lipolíticas (F.I.L-I.D.F 73, 1974). Para su caracterización se realizaron las siguientes pruebas: movilidad, oxidasa, ureasa, catalasa, indol, utilización de citrato, reducción de nitrato, fermentación de hidratos de carbono, producción de ácido sulfhídrico, hidrólisis de gelatina, decarboxilación de aminoácidos (lisina, ornitina, arginina) y pruebas con agar hierro triple azúcar (Mc Faddin, 1980). hidrólisis de tween 80 (ICMSF, 1989) y antibiograma (Daguet y Chabbert, 1977). Mediante el análisis de halofilismo según (Bergey's, 1989) realizado a

concentraciones salinas desde 0 hasta 20% de ClNa se determinó el tipo de bacteria hallada de acuerdo a sus requerimientos de sal.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se determinó que el 69% de las colonias halladas fueron halófilas extremas (3,0-5,0 M; 18-30% ClNa) y 31 % halófilas estrictas (1,5-4,0 M; 9-24% ClNa). Estos resultados corroboran los obtenidos previamente por Ramirez y col. (1997) y son similares a los obtenidos por Hernández-Herrero y col (1999) en *Engraulis encrasicolus* y por Vilhelmsson y col. (1997) en *Clupea harengus*.

El proceso de salazón y maduración implica una proteólisis y las bacterias extremadamente halófilas que son la flora predominante al final del proceso de maduración, encuentran un sustrato adecuado para su desarrollo. Estas bacterias pertenecen al Dominio Archaea junto con otros microorganismos extremófilos. Taxonómicamente están incluidas en el Orden Halobacteriales que comprende una sola familia Halobacteriaceae, con varios géneros (Kamekura y col., 1997; Ventosa, et al., 1999). Se desarrollan en los medios lentamente a diferencia de la mayoría de las bacterias y después de varios días forman colonias de color naranja a rojo debido a la presencia de carotenoides que protegen a las células de los efectos de la luz, dando en el producto y la salmuera circundante una típica coloración rojiza, que les ha valido la denominación de “bacterias halofílicas rojas” (Huss y Valdimarson, 1997; Ramirez y col., 1997; Ramirez y col., 2000).

De acuerdo a la metodología utilizada se reconoció un 31% de *Halococcus* sp.; 15% de *Haloferax* sp., 5% de *Halobacterium* sp y 7% de *Haloárcula* sp, quedando hasta el momento sin determinar el porcentaje restante.

Se determinó que un 30% de las bacterias halladas tienen actividad proteolítica, un 30% actividad lipolítica y un 15% capacidad proteolítica y lipolítica. La capacidad proteolítica de las mismas se sumaría a la proteólisis natural de estos productos acelerando el fin de su vida útil. Se ha determinado sensorialmente que la presencia de las mismas en recuentos que superan el 10^5 UFC/g determina en el producto un fuerte olor a putrefacción (sulfhídrico- amoniacal) (Gram y Huss, 1996). La capacidad lipolítica colaboraría con el aumento de los ácidos grasos y la rancidez.

Asimismo, en trabajos previos, se ha determinado que durante la maduración existe un aumento de histamina (Paredi y Yeannes, 1997) y que parte de la flora halófila tiene capacidad descarboxilante de la histidina (Ramirez y col., 1994), por lo que continuar los estudios en este sentido es de importancia para estos productos. .

CONCLUSIONES

La presencia de estas bacterias podría llevar a modificaciones irreversibles y no deseables en distintas características sensoriales tales como: olor, color y textura, pudiendo limitar la vida útil de estos productos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP) y ha contado con la colaboración de distintas empresas pesqueras de la ciudad de Mar del Plata. Los autores agradecen a UNMDP y a estas empresas. Se agradece la colaboración de la Sra. Irene Ameztoy en las tareas de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1989. Sec. 25 Archaeobacteria. Grupo III .3:2171-2233.

Connell, J. J. 1990. Quality deterioration and defects in products. En: Control of Fish Quality. Fishing News Books. Tercera Edición. Londres.

Daguet, G. L. y Chabbert, Y. A .1977. Técnicas en Bacteriología III. Editorial JIMS. Barcelona.

F.I.L. I.D.F. 73 (1974). Determinación de microorganismos lipolíticos de la manteca.

Filsinger, B. E. y Yeannes, M. I. 1994. Anchoíta (*Engraulis anchoíta*) de diferentes épocas del año salada y madurada. Proceedings del VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1er. Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur. 6 al 9 de abril. Bs. Aires. Argentina. Pag: 344- 346..

Gram, L. y Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International J. of Food Microbiol.* 33,121-137.

Hernández-Herrero, M.M., Roig-Sagués, A.X., Rodríguez-Jerez y Mora-Ventura, M.T. 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis esncrasicholus*). *J. Food Protection*, 62, 509-514.

Huss, H. H. y Valdimarson, G. 1990. *Microbiology of salted fish*. Fish Tech News. Vol. 10. N°1. Pg: 3-5.

ICMSF. 1983. Microorganismos de los Alimentos I. Técnicas de análisis microbiológicos. Ed. Acribia. España.

IRAM. 1988. Productos de la Industria Pesquera. Método para la determinación de Microorganismos Halófilos Extremos. Norma **15.139**

Kamekura , M.; Dyll-Smith, M. L.; Ventosa A. y Kates, M. (1997). Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for the transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to the genus *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* com. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 47, 853-857.

Mc Faddin J. F. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires.

Merck. 1994. Manual de medios de cultivo.

Paredi, María E. y Yeannes, María I. 1987. Histamina en Productos Pesqueros. *Revista de Ciencias Agrarias. Argentina.* 8 (1-2):5-12 (1987).

Ramirez, E. E.; Amezttoy, I.; Yeannes, M. I. 1994. Bacterias halófilas como formadoras de histamina. *Proceedings: VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1er. Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur. 6 al 9 de abril. Centro Cultural San Martín. Buenos Aires. Argentina.*

Ramirez, E; Filsinger, B.; Yeannes, M. I. 1997. Evaluación microbiológica del proceso de salado y madurado de anchoíta (*Engraulis anchoíta*). *X Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. VII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Costa Salguero. Buenos Aires.*

Ramirez, E. E.; Yeannes, M. I.; Lupín, H. M. 2000. Incidencia de hongos halófilos en anchoíta (*Engraulis anchoíta*) salada. *VI Congreso latinoamericano de Microbiología de Alimentos. II Simposio Argentino de Conservación de Alimentos. I Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. Bs Aires, Argentina, 20-24/11.*

Rodriguez Valera, F y Ruiz Berraquero, F (1982) Halobacterias. *Investigación y Ciencia* 39:94-102.

SAGPyA. 2005. Datos estadísticos de capturas de anchoíta (*Engraulis anchoíta*). Disponible en: www.sagpya.gov.ar

Ventosa A.; M. C., Gutierrez; M., Kamekura y M. L. Dyll-Smith. (1999). Proposal to transfer *Halococcus tukmenicus*, *Halobactrium trapanicum* JCM 9743 and Strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen.nov.,comb. Nov. *Int. Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 131-136.

Vilhelmsson, O., Hafsteinsson, H. y Kristjaánsón, J.K. (1997). Extremely halotolerant bacteria characteristic of fully cured and dried cod. *International J. Food Microbiol.* 36, 163-170.

Yeannes, M. I. 1991. HACCP in Anchovy Salting and Marinating. FAO/DANIDA Expert Consultation on Quality Assurance in The Fish Industry. Lyngby, Denmark, 26 August- 6 September 1991.

Yeannes, M. I. 1996. Implementing HACCP at fishery industry level in Argentina. Practical Experience. Proceedings: Seminar on HACCP Implementation and Training for Developing Countries Fishery Industries. FAO/DANIDA/NMFS- NOAA. Pascagoula, MS, USA. 28- 30 May. Doc. N° 10. 15 páginas.

Zugarramurdi, A. y Lupín, H. 1977. *Estudio sobre el salado de anchoíta II. Dinámica del Proceso.* Rev. Latinoam. Ing. Quim. Quim. Apl. 7: 25-38.

MICOFLORA CONTAMINANTE EN SOJA COSECHADA EN LA PRINCIPAL ZONA DE PRODUCCION DE LA REPUBLICA ARGENTINA

ZELAYA Manuel J.⁽¹⁾, GONZALEZ Héctor H.L.^(2,3), RESNIK Silvia L.^(1,4), PACIN Ana^(4,5) y MARTINEZ María J.⁽⁶⁾

⁽¹⁾ ANPCYT – INTA PICTO 2002 N° 08-12949; ⁽²⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; ⁽³⁾ Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires; ⁽⁴⁾ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires; ⁽⁵⁾ CIM, Universidad Nacional de Lujan; ⁽⁶⁾ INTA, Manfredi

Departamento de Industrias, F.C.E. y N., Universidad de Buenos Aires y CIM-UNLu

Ciudad Universitaria, (C1428EHA), Buenos Aires, ARGENTINA Teléfono y Fax: (54-11) 4576-3366, e-mail: lucas@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

El relevamiento micológico de 107 muestras de soja provenientes de la cosecha 2003/2004 en 6 localidades de producción, mostró que los géneros predominantes fueron: *Sclerotinia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, y *Rhizoctonia*. Entre las especies predominantes se hallaron *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium semitectum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium equiseti*. Se determinó la frecuencia y densidad relativa de la micoflora en medio YGC en muestras de Balcarce (378 aislados), Barrow (516), Manfredi (1.121), Tres Pozos (1.365), Rafaela (825) y Reconquista (1.586). La frecuencia de aislamiento y densidad relativa específica de la micoflora contaminante indicarían una alta probabilidad de ocurrencia de toxinas de *Alternaria*, tricotecenos y zearalenona en todas las localidades y de aflatoxinas, no confirmada, y ácido ciclopiázonico en Manfredi, Tres Pozos, Rafaela y Reconquista. Además, existe probabilidad de aparición de ocratoxina A, si las cepas de *Aspergillus niger* fueran toxicogénicas.

Palabras claves: soja, micoflora, micotoxinas, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*,

ABSTRACT

The micoflora screening of 107 samples of soybean from the 2003/2004 crop season at 6 locations showed that the predominant genera were: *Sclerotinia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* and *Rhizoctonia*. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium semitectum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium equiseti* were the predominant. It was determined the frequency and relative density of the mycoflora in YGC

isolation medium in samples of Balcarce (378 isolates), Barrow (516), Manfredi (1121), Tres Pozos (1365), Rafaela (825) and Reconquista (1586).

The fungal isolation frequency and relative density of the mycoflora would indicate a high probability of *Alternaria* toxins occurrence, trichothecenes and zearalenone in all the localities and aflatoxinas, not confirmed, and cyclopiazonic acid at Manfredi, Tres Pozos, Rafaela and Reconquista. Also, there is a probability of appearance ocratoxina if the *Aspergillus niger* isolates were toxigenic.

INTRODUCCION

El cultivo de la soja (*Glycine max* L.), en constante expansión desde sus inicios en Argentina, ha acelerado en la última década su crecimiento en superficie y producción, registrando en los últimos cuatro años un incremento del 38% en producción. Los mohos son la contaminación microbiana más común en granos y semillas, y su presencia puede derivar en distintos tipos de daños, como ser disminución de la germinabilidad, decoloración, producción de micotoxinas, y podredumbre total. El conocimiento acerca de los mohos asociados a granos y semillas es importante para determinar el riesgo de contaminación con micotoxinas. Se conocen especies fúngicas, pertenecientes principalmente a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, capaces de producir micotoxinas y origen de micotoxicosis en animales domésticos y en el ser humano [Betina, 1989]. Las especies de esos géneros varían desde patógenos primarios a saprófitos, y las micotoxinas por ellos producidas han sido bien estudiadas en diversos cereales y oleaginosas, tales como trigo, maíz y maní. Los estudios de la micoflora endógena contaminante asociada a las semillas de soja son escasos.

El objetivo de este trabajo es identificar las especies fúngicas presentes en esta leguminosa cosechadas en las principales provincias de producción en Argentina (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe) durante los años 2003/2004 y comparar la incidencia fúngica entre regiones, especialmente de aquellas especies con interés micotoxicológico.

MATERIALES Y METODOS

Muestreo.

Las muestras fueron colectadas en forma representativa de 3 lotes replicados para cada variedad de soja en cada localidad (Balcarce y Barrow en la Provincia de Buenos Aires; Manfredi y Tres Pozos en la Provincia de Córdoba, y Reconquista y Rafaela en la Provincia de Santa Fe). Este ensayo fue conducido durante la campaña sojera 2003/2004

empleando el método de INTA de Ensayos de Mega Ambientes (MET). Submuestras de 500 g cada una fueron destinadas al análisis de la micoflora contaminante.

Aislamiento de los mohos. Se tomaron al azar submuestras de 100 unidades de semillas de soja, las cuales fueron desinfectadas superficialmente en una solución al 5% de hipoclorito de sodio comercial durante 1 minuto, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, y se sembraron en una cabina biológica tipo II. Cien semillas de semilla de soja por muestra fueron dispuestas, a razón de 20 semillas por placa, en agar YGC (Yeast Extract-Glucose-Chloramphenicol Agar, Merck N° 16000). Las placas fueron incubadas en la oscuridad a 25°C por 4-7 días y las colonias fúngicas resultantes fueron traspasadas a placas con agar Papa Dextrosa (Potato-Dextrose Agar, Merck N° 10130) e identificadas. Se aislaron todos los mohos aún aquellos que crecieron en una misma semilla.

Identificación de los mohos. Los aislamientos de los mohos fueron identificados de acuerdo a las metodologías propuestas en la bibliografía para los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, y para especies de hongos dematiaceos y otros [Nelson y col., 1983; Pitt y Hocking, 1997]. Se calculó la frecuencia de aislamiento (*Fr*) y la densidad relativa (*DR*) de géneros y de especies en cada localidad estudiada [González y col., 1995].

Análisis estadístico. Para analizar posibles diferencias en las frecuencias de aislamiento (*Fr*) de las especies fúngicas más frecuentes en las 6 localidades se utilizó el test exacto de Fisher [Conover, 1980], empleando el programa Statistix [Versión 7.0, 2000].

Determinación de aflatoxina, zearalenona y deoxinivalenol (DON). Se llevaron a cabo de acuerdo a las metodologías habituales y estandarizadas en el CIM [AOAC, 1994; Croteau y col., 1994;].

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En la tabla 1 se pueden observar los géneros (23) y especies fúngicas (44) aisladas en las 6 localidades, a diferencia de lo encontrado en EEUU [Roy y col., 2001] donde se identificaron un mayor número de géneros (63) y especies (108). El género *Sclerotinia* presentó la mayor DR en la micoflora interna de soja en la cosecha 2003/2004, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Rhizoctonia* fueron los que presentaron una DR relevante. Otros géneros presentes en menor cantidad fueron *Papulospora*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Trichoderma*. Con respecto a la *Fr*, los géneros predominantes fueron *Alternaria*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Aspergillus* y *Rhizoctonia*, seguido por *Cladosporium* y *Penicillium*. *Alternaria alternata* es la especie predominante en *Fr* y *Sclerotinia sclerotiorum* en *DR*.

Tabla 1. Densidad relativa (*DR*) y Frecuencia de Asilamientos (*Fr*) de mohos aislados de semilla de soja.

Mohos	<i>DR (%)</i>		<i>Fr (%)</i>	
	Género	Especies	Género	Especies
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	36,8	36,8	53,3	52,3
<i>Alternaria alternata</i>	18,7	18,7	88,8	88,8
<i>Fusarium</i>	17,5		86,9	
<i>F. acuminatum</i>		0,03		0,9
<i>F. avenaceum</i>		0,1		2,8
<i>F. equiseti</i>		4,2		25,2
<i>F. graminearum</i>		0,4		10,2
<i>F. heterosporum</i>		0,2		4,7
<i>F. lateritium</i>		0,3		1,9
<i>F. oxysporum</i>		0,02		0,9
<i>F. poae</i>		0,3		1,9
<i>F. sambucinum</i>		1,4		0,9
<i>F. semitectum</i>		10,4		37,4
<i>Aspergillus</i>	10,5		39,2	
<i>A. flavus</i>		10,1		26,2
<i>A. niger</i>		0,2		7,5
<i>A. niveus</i>		0,1		1,9
<i>A. parasiticus</i>		0,05		1,9
<i>A. tamaris</i>		0,02		0,9
<i>A. wentii</i>		0,07		0,9
<i>Rhizoctonia solani</i>	8,4	8,4	39,2	39,2
<i>Papulospora</i> spp.	1,8		12,1	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,1	1,1	21,5	21,5
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1,0		0,9	0,9
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,9	0,9	8,4	8,4
<i>Nigrospora oryzae</i>	0,8	0,8	8,4	8,4
<i>Penicillium</i>	0,7		18,7	
<i>P. restrictum</i>		0,2		4,7
<i>P. citrinum</i>		0,1		2,8
<i>P. implicatum</i>		0,1		4,7
<i>P. decumbens</i>		0,09		0,9
<i>P. corylophilum</i>		0,07		2,8
<i>P. Chrysogenum</i>		0,05		1,9
<i>P. janthinellum</i>		0,02		0,9
<i>Curvularia lunata</i>	0,4	0,4	6,5	6,5
<i>Phoma</i> spp.	0,4		8,4	
<i>Eurotium chevalieri</i>	0,3	0,3	5,6	5,6
Rhizopus stolonifer	0,2		5,6	
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	0,1	0,1	3,7	3,7
<i>Epicoccum nigrum</i>	0,1	0,1	3,7	3,7
Otros mohos	0,6	0,6	6,5	6,5

Las otras especies que presentaron una alta *Fr* y *DR* fueron *Fusarium semitectum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium equiseti*.

Con respecto a los géneros potenciales productores de micotoxinas, *Alternaria alternata* se detectó en las 6 localidades con una elevada *Fr* y *DR* (tabla 2). *Aspergillus flavus* se encontró en mayor cantidad en Manfredi, seguida de Rafaela, y Tres Pozos. Otras especies de *Aspergillus* fueron detectadas pero con bajos niveles de incidencia. En el caso de *Fusarium* las especies que prevalecieron fueron dos: *Fusarium semitectum*, presente en las 6 localidades principalmente en Manfredi, Reconquista y Rafaela y *Fusarium equiseti* que fue aislada en las localidades de Rafaela, Reconquista, Tres Pozos y en menor medida en Balcarce. Otras especies de *Fusarium* fueron encontradas con bajos niveles de incidencia, con excepción de *Fusarium sambucinum* en Barrow.

El análisis estadístico de las *Fr* de las especies prevalentes mostró una diferencia significativa para *Aspergillus flavus* comparando Manfredi con Reconquista ($p=0,0221$) y Tres Pozos vs. Barrow ($p=0,0155$); para *Fusarium equiseti* la diferencia fue significativa entre Reconquista y Balcarce ($p=0,0339$); para *Fusarium semitectum* entre Reconquista y Balcarce ($p=0,0382$) y para *Rhizoctonia solani* entre Reconquista y Balcarce ($p=0,0471$) y entre Reconquista y Barrow ($p=0,0324$); para *Sclerotinia sclerotiorum* entre Tres Pozos y Barrow ($p=0,0201$) y entre Barrow y Rafaela ($p=0,0322$). Diferencias altamente significativas en la *Fr* se observaron para *Aspergillus flavus* comparando Manfredi vs. Barrow ($p=0,0077$), Reconquista vs. Rafaela ($p=0,0084$) y Barrow vs. Rafaela ($p=0,0014$). La *Fr* de *Fusarium equiseti* entre Balcarce y Rafaela presenta una $p=0,0039$, *Fusarium semitectum* entre Reconquista y Barrow, $p=0,0096$ y *Sclerotinia sclerotiorum* entre Reconquista y Barrow $p=0,0013$.

Con respecto a la presencia de micotoxinas, el análisis de las muestras con un mayor nivel de contaminación fúngica resultó negativo para aflatoxinas, zearalenona y DON.

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista fitosanitario las especies aisladas en mayor cantidad con el medio YGC son *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* que están presentes en todas las localidades analizadas. Se observó que *Rhizoctonia solani* tiene mayor probabilidad de producir pérdidas significativas (debido a una alta *Fr* y *DR*) en Manfredi; mientras que *Sclerotinia sclerotiorum* puede ser dominante en Reconquista y *Alternaria alternata* en Balcarce, Barrow y Rafaela.

Las especies fúngicas encontradas en las semillas de soja podrían indicar una posible contaminación por micotoxinas. Estas especies toxicogénicas, de acuerdo a las condiciones del medio ambiente durante la temporada de cultivo, podrían colonizar y producir micotoxinas. Observando las *Fr* y *DR* podrían biosintetizar toxinas de *Alternaria* como ácido tenuazónico, alternariol y alternariol monometil éter en todas las localidades, así como tricotecenos, y zearalenona debido a las presencias de *Fusarium semitectum* y

Fusarium equiseti. La aparición de *Aspergillus flavus* en los niveles presentados en Manfredi ($DR\%=30,2$) y en Tres Pozos y Rafaela (Tabla 2) sugieren la probabilidad de ocurrencia de aflatoxinas en el almacenamiento así como ácido ciclopiazónico. Cabe destacar la presencia de dos especies toxicogénicas menos habituales: *Aspergillus niger*, capaz de sintetizar ocratoxina A y *Penicillium citrinum*, citrinina.

Las diferencias observadas en el análisis estadístico entre Barrow y las otras localidades, podría explicarse por la menor humedad relativa presente en esta localidad, entre octubre de 2003 y abril de 2004.

BIBLIOGRAFIA

Betina V. Mycotoxins: Chemical, Biological and Enviromental Aspects. Elsevier, Amsterdam, 1989.

Nelson PE, Toussoun TA & Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.

Pitt JI and Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional, London-New York, 1997.

González HHL, Resnik SL, Boca RT & Marasas WFO. Mycoflora of Argentinean corn harvested in the main production area in 1990. Mycopathologia 1995, 130: 29-36.

Conover WJ. Practical Nonparametric Statistic. John Wiley & Sons, New York, 1980.

Statistix Versión 7.0. Analytical Software. Tallahassee, Florida, 2000.

AOAC Official Method 990.33 + Romer LCTFA-1, version 95.1. Aflatoxins in Corn and Peanut Butter. Liquid Chromatographic Method. First Action 1990. Final Action 1994

Croteau SM, Prelusky DB and Trenholm HL Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with Electron Capture Detection. J. of Agric. and Food Chem. 1994, 42: 928-934

Roy KW, Baird RE, Abney TS. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in north america, with methods and a key for identification of selected fungi. Mycopathologia 2001, 150: 15-27.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero del CONICET, de la CIC, de la UBA, del INTA y de la ANPC y T a través del Pictor N° 08-12949.

Tabla 2. Densidad relativa (*DR*) y frecuencia relativa (*Fr*) de mohos aislados de semillas de soja cosecha 2003/2004
nd: no detectado

	Manfredi		Reconquista		Balcarce		Tres Pozos		Barrow		Rafaela	
Numero de Aislamientos	1121		1586		378		1365		516		825	
Especies	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>	<i>Fr</i>	<i>DR</i>
<i>Alternaria alternata</i>	78,6	8,5	89,5	5,9	88,8	44,7	95,2	16,9	83,3	37,8	100,0	36,8
<i>Aspergillus flavus</i>	57,1	30,2	5,3	0,06	nd	nd	42,9	11,0	4,2	0,2	81,0	11,1
<i>Aspergillus niger</i>	21,4	0,4	nd	nd	5,6	0,3	14,3	0,2	4,2	0,4	nd	nd
<i>Aspergillus parasiticus</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,8	0,2	4,2	0,2	nd	nd
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	7,1	0,6	10,5	0,3	16,7	1,3	14,3	0,4	25,0	1,7	72,7	3,6
<i>Epicoccum nigrum</i>	nd	nd	nd	nd	5,6	0,3	nd	nd	4,2	0,2	18,2	0,6
<i>Eurotium chevalieri</i>	28,6	1,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18,2	0,2
<i>Fusarium acuminatum</i>	nd	nd	5,3	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Fusarium avenaceum</i>	nd	nd	10,5	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,1	0,3
<i>Fusarium equiseti</i>	nd	nd	47,4	6,1	5,6	1,1	33,3	2,0	nd	nd	91,0	14,2
<i>Fusarium oxysporum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,1	0,1
<i>Fusarium sambucinum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,2	16,1	nd	nd
<i>Fusarium graminearum</i>	7,1	0,1	10,5	0,1	16,7	2,9	19,0	0,6	nd	nd	9,1	0,1
<i>Fusarium heterosporum</i>	nd	nd	26,3	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Fusarium lateritium</i>	nd	nd	nd	nd	5,6	4,2	4,8	0,2	nd	nd	nd	nd
<i>Fusarium poae</i>	nd	nd	nd	nd	5,6	2,9	4,8	0,6	nd	nd	nd	nd
<i>Fusarium semitectum</i>	50,0	24,2	73,7	12,8	16,7	3,2	33,3	2,2	12,5	0,8	54,5	9,9
<i>Nigrospora oryzae</i>	nd	nd	nd	nd	5,6	2,6	9,5	1,5	16,7	1,5	18,2	0,6
<i>Papulospora spp</i>	nd	nd	68,4	6,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Penicillium corylophilum</i>	nd	nd	10,5	0,1	nd	nd	nd	nd	4,2	0,4	nd	nd
<i>Penicillium citrinum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,5	1,4	nd	nd
<i>Rhizoctonia solani</i>	42,9	22,7	10,5	0,2	55,6	6,9	23,8	7,4	58,3	13,0	45,4	4,61
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42,9	3,6	100,0	66,0	33,3	16,7	66,7	56,4	12,5	18,1	72,7	14,3
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	7,1	5,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Trichoderma harzianum</i>	14,3	0,2	5,2	0,06	16,7	7,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd

QUESO PATEGRÁS PROBIÓTICO CON *Bifidobacterium lactis*

BERGAMINI, Carina V.; HYNES, Erica; QUIBERONI, Andrea L.; ZALAZAR, Carlos A.

Instituto de Lactología Industrial – Facultad de Ingeniería Química (UNL). Santiago del Estero 2829, 3000 Santa Fe. Tel: 0342-4530302. E-mail: cvberg@figus.unl.edu.ar

RESUMEN

Se estudiaron la viabilidad de una cepa probiótica y su influencia en la proteólisis de un queso semiduro con el objetivo de desarrollar un nuevo alimento probiótico. Se realizaron elaboraciones de queso Pategrás testigo (sin bacterias probióticas) y experimentales con *Bifidobacterium lactis* adicionado mediante metodologías diferentes. La composición global de los distintos quesos fue similar. La población de *Bifidobacterium lactis* se mantuvo en niveles superiores a 10^7 UFC mL⁻¹ durante todo el período de maduración. La metodología de agregado no modificó la supervivencia. No se detectó influencia de las bacterias probióticas en los niveles de nitrógeno en las distintas fracciones solubles ni en los perfiles electroforéticos. Por otro lado, el análisis de los perfiles peptídicos demostró una gran variabilidad entre las muestras, y solamente se encontraron diferencias debidas al tiempo de maduración. Los resultados obtenidos en el estudio de la proteólisis sugieren una muy baja o nula actividad proteolítica y peptidolítica de la cepa estudiada, no alterando consecuentemente el perfil típico de maduración del queso.

Palabras claves: queso probiótico, elaboración de quesos, maduración de quesos, viabilidad, proteólisis, Bifidobacterias.

ABSTRACT

The viability of probiotic bacteria and their influence on proteolysis of semi-hard cheese were studied in order to develop a new probiotic food product. Control cheeses (without probiotic bacteria) and experimental cheeses (with the addition of probiotic bacteria using different methodologies) were manufactured. Gross composition of cheeses was similar. *Bifidobacterium lactis* population remained above 10^7 UFC mL⁻¹ during the ripening period. The addition methodology did not affect their viability. Probiotic bacteria showed no detectable influence on nitrogen levels found in different soluble fractions. Electrophoretic patterns were also very similar for all the cheeses. On the other hand, the analysis of peptide profiles showed a high variability among samples, and only detected differences

due to ripening time. The results suggest a very low or undetectable proteolytic and peptidolytic activity of studied strain and as a consequence the normal proteolytic profile of cheese was not altered.

INTRODUCCIÓN

El consumo y la popularidad de los alimentos probióticos han tenido una gran expansión en los últimos años, debido a la difusión de sus efectos benéficos en la salud de quienes los ingieren (Saarela y col., 2002). Por esta razón, recientemente se han propuesto nuevos alimentos probióticos, entre ellos los quesos (Stanton y col., 1998). En el desarrollo de dichos productos es de suma importancia tanto la supervivencia de las bacterias probióticas, como la influencia que pueden ejercer en el alimento, ya que ésta puede impactar en su calidad y condicionar la aceptabilidad del producto.

En el presente trabajo se estudió la viabilidad de una cepa probiótica de *Bifidobacterium lactis* y su influencia en la proteólisis en un queso semiduro, con el objetivo de desarrollar un nuevo alimento probiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de quesos a escala piloto

Se realizaron elaboraciones de queso Pategrás Argentino empleando la tecnología estándar de fabricación, adaptada a escala piloto (45L). Se utilizó como fermento láctico un cultivo liofilizado comercial, constituido por varias cepas de *Streptococcus thermophilus*, en una concentración aproximada de 10^6 UFC mL⁻¹ en la leche de elaboración. Como fermento probiótico se utilizó un cultivo liofilizado comercial de *Bifidobacterium lactis* en una concentración aproximada de 10^6 UFC mL⁻¹ en la leche de elaboración. Según los datos del proveedor esta cepa sobrevive en las condiciones del tracto gastrointestinal y el efecto probiótico atribuido a la misma es la protección contra la infección por *Salmonella*, y la inhibición de *E. coli* O111 y de *Listeria monocytogenes*.

Se fabricaron tres tipos de quesos en el mismo día y con la misma leche, realizándose tres réplicas de las elaboraciones en diferentes días:

- Testigo: sin fermento probiótico
- Experimental 1: con agregado del fermento probiótico directamente en forma liofilizada, resuspendido en una alícuota de leche de elaboración junto al fermento láctico.

- Experimental 2: con agregado del fermento probiótico pre-incubado en un sustrato lácteo graso, compuesto por leche descremada y crema de leche con una composición final de 14% de materia grasa y 5,2% de proteínas. Este sustrato fue pasteurizado a 80°C durante 5 minutos. Una vez enfriado se inoculó con las bacterias probióticas y se incubó a 37°C durante 5 hs. Luego se almacenó a 4°C hasta el día siguiente en que se elaboraron los quesos. La finalidad de esta forma de agregado fue estudiar un posible efecto protector hacia las bacterias probióticas y una mejor adaptación al medio de las mismas.

Muestreo y Análisis realizados

Se tomaron muestras de los quesos a los 0, 3, 15, 30, 45 y 60 días.

Se determinó el contenido de materia grasa, extracto seco, proteínas totales y pH a los 3 días de maduración por métodos normalizados.

La población de bacterias del starter y bacterias probióticas presentes en el queso fue determinada en todos los puntos de muestreo. El recuento de *Streptococcus thermophilus* se realizó en SMA (Skim Milk Agar), y el de *Bifidobacterium lactis* en agar MRS - Litio Propionato. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 hs, en aerobiosis para el fermento primario y en anaerobiosis para el fermento probiótico.

El nivel de proteólisis se evaluó en las muestras de 3, 30 y 60 días de maduración mediante fraccionamiento de nitrógeno, electroforesis (urea-PAGE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Las fracciones de nitrógeno estudiadas fueron: nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), nitrógeno soluble en ácido tricloroacético 12% (NS-TCA), y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA). En la electroforesis se estudió la fracción insoluble a pH 4,6, y por HPLC se estudió la fracción soluble en agua (Hynes y col., 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del sustrato lácteo graso

Durante el período de incubación y almacenamiento del sustrato lácteo graso inoculado con las bacterias probióticas, se observó una disminución del pH y un leve crecimiento de la población probiótica. Esto demostró que la población de *Bifidobacterium lactis* se encontraba viable y activa al ser agregada a los quesos experimentales tipo 2.

Composición global

Los quesos con y sin bacterias probióticas adicionadas no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de materia grasa, extracto seco, proteína total y pH (tabla 1). Estos resultados son contrarios a los informados por Mc Brearty y col. (2001), que encontraron que la incorporación de *B. lactis* en queso Cheddar afectó la composición global del queso, provocando una disminución del pH y un aumento de la humedad.

Tabla 1. Composición global de los quesos a los 3 días de maduración.

	Testigo	Experimental 1	Experimental 2
Materia grasa (%)	28,7 ± 1,2	28,8 ± 0,3	28,3 ± 2,5
Extracto seco (%)	55,31 ± 1,89	56,02 ± 0,66	55,27 ± 2,32
Proteína total (%)	3,50 ± 0,16	3,54 ± 0,17	3,40 ± 0,05
pH	5,33 ± 0,06	5,42 ± 0,12	5,42 ± 0,08

Análisis microbiológico

La evolución de las poblaciones de los fermentos primario y probiótico se presenta en la Figura 1. El recuento del fermento primario no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos quesos durante toda la maduración, lo que sugiere que no hubo interacciones significativas entre las floras láctica y probiótica.

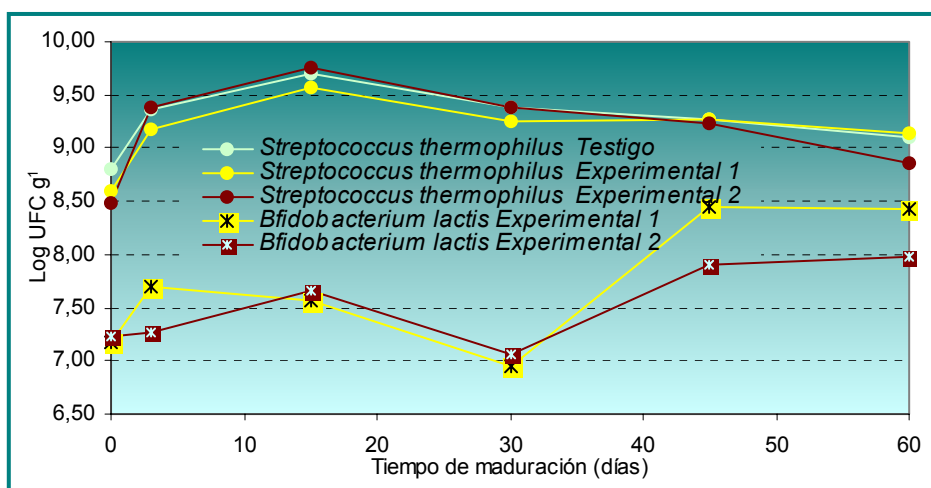


Figura 1. Evolución de las poblaciones de los fermentos primario y probiótico durante la maduración de los quesos.

Las bacterias probióticas fueron adicionadas de tal modo de alcanzar una concentración de 10^6 UFC mL⁻¹ en la leche de elaboración, y la población presente en la cuajada (día 0) fue de alrededor de $1,5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹ en ambos quesos experimentales. Estos resultados

indican que los probióticos se concentran en la cuajada, siendo mínimas las pérdidas de estas bacterias en el suero de elaboración ($< 10^5$ UFC mL⁻¹). La evolución del número de bacterias probióticas fue similar en los dos quesos experimentales y la concentración se mantuvo en valores superiores a 10^7 UFC mL⁻¹ durante todo el período de maduración. Desde el momento de la elaboración hasta los 60 días, la población probiótica aumentó 1,2 y 0,8 órdenes logarítmicos en los quesos experimentales tipo 1 y 2, respectivamente. El crecimiento observado de las bifidobacterias, sobre todo luego de los 30 días, podría atribuirse a la producción de péptidos de medio a bajo tamaño molecular, debidos a la proteólisis durante la primera etapa de la maduración, ya que se ha comprobado que los péptidos de pequeño tamaño promueven el crecimiento de las bifidobacterias (Gomes y col., 1998). Por otro lado, este hecho también podría deberse a la generación de un medio más anaerobio, producido por el metabolismo de las bacterias lácticas, y por lo tanto más favorable para las bifidobacterias, (Roy, 2005). De los diversos estudios sobre la viabilidad de bacterias probióticas en quesos, se observa que los resultados dependen de la cepa utilizada y del alimento en estudio. Por ejemplo, en queso fresco, Vinderola y col. (2000) encontraron una supervivencia de *B. longum* y *B. bifidum* mayor a 10^6 UFC mL⁻¹ durante 60 días, mientras que Roy y col. (1997) observaron un mantenimiento de *B. breve* y *B. longum* en la misma concentración solamente por 15 días. Por otro lado, estos autores han modificado la tecnología de elaboración para lograr una mayor concentración de las bacterias en el producto. En el presente trabajo se ha comprobado un mantenimiento de la viabilidad a altas concentraciones de la cepa estudiada, sin modificaciones en la tecnología estándar de elaboración.

Asimismo, no se observó ninguna inhibición entre el fermento primario y el fermento probiótico estudiado, lo que resulta importante para el desarrollo de un producto que mantenga sus características típicas inalteradas, y que a la vez contenga una concentración de bacterias probióticas suficientemente alta como para ser considerado un alimento funcional probiótico (Vinderola y col., 2001).

En cuanto a la metodología de agregado, no se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) en la supervivencia de las bifidobacterias en el queso entre ambas metodologías de adición empleadas. Daigle y col. (1999) elaboraron un queso tipo Cheddar con el agregado de una crema fermentada por *B. infantis*, indicando que esta metodología de agregado era un medio efectivo para obtener un producto con una alta concentración de bacterias probióticas. En nuestro estudio se observó que la incorporación de los probióticos en forma directa como liofilizado resultó la forma más eficiente de adición, ya

que se alcanzó la misma concentración de bacterias probióticas. Por otro lado, el trabajo de preparación es más simple e implica menos pasos de procesamiento con la consiguiente disminución en la posibilidad de infecciones fágicas.

Proteólisis

En la figura 2 se presenta la evolución en el contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles estudiadas, a lo largo de la maduración. Los niveles de nitrógeno no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos quesos, para ninguno de los días de muestreo estudiados. Tampoco se presentaron diferencias significativas en los perfiles electroforéticos. Estos resultados muestran que la influencia de *Bifidobacterium lactis* en la producción de péptidos grandes, medianos y pequeños y aminoácidos libres fue muy baja o nula. Este rasgo a su vez indica que la actividad proteolítica y peptidolítica de esta bacteria probiótica en el tipo de queso ensayado no resultó significativa.

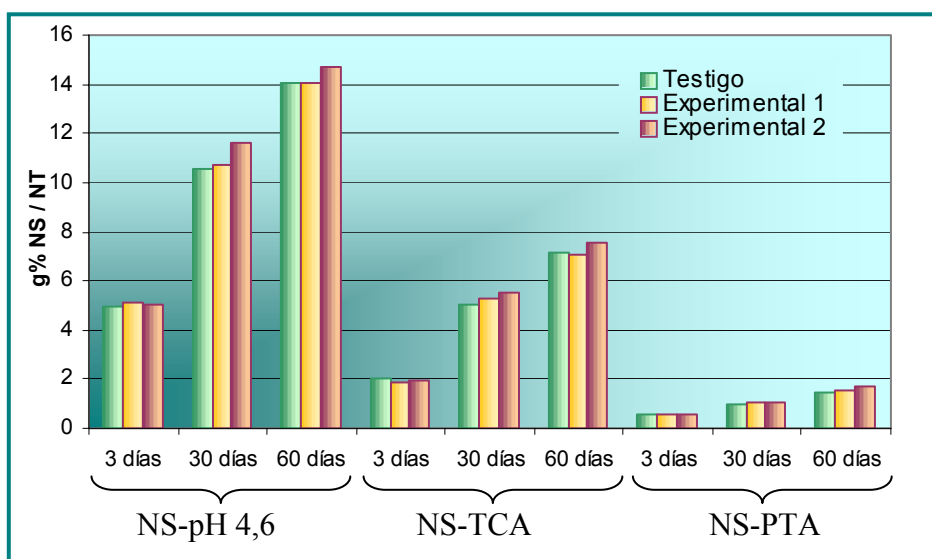


Figura 2. Evolución del contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles (NS-pH4,6, NS-TCA, NS-PTA), expresadas como porcentaje del nitrógeno total (NT), durante la maduración de los quesos.

Los cromatogramas mostraron un aumento en el número y el tamaño de los picos durante la maduración, pero la comparación visual de los perfiles no permitió encontrar diferencias entre los quesos con y sin probióticos. Para un examen más objetivo de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC, se aplicó un análisis estadístico multivariante por el

método de componentes principales (PC). En este análisis, se reveló una gran variabilidad entre las muestras, ya que fue necesario retener los seis primeros PC para explicar al menos el 90% de la variación. En el gráfico de los scores de las muestras para los dos primeros PC (figura 3) se pudo observar una separación de las muestras según el tiempo de maduración, pero no hubo agrupaciones según el tipo de queso. Estos resultados demuestran que la influencia de la cepa probiótica ensayada en la calidad y cantidad de péptidos producidos resultó nula o indetectable.

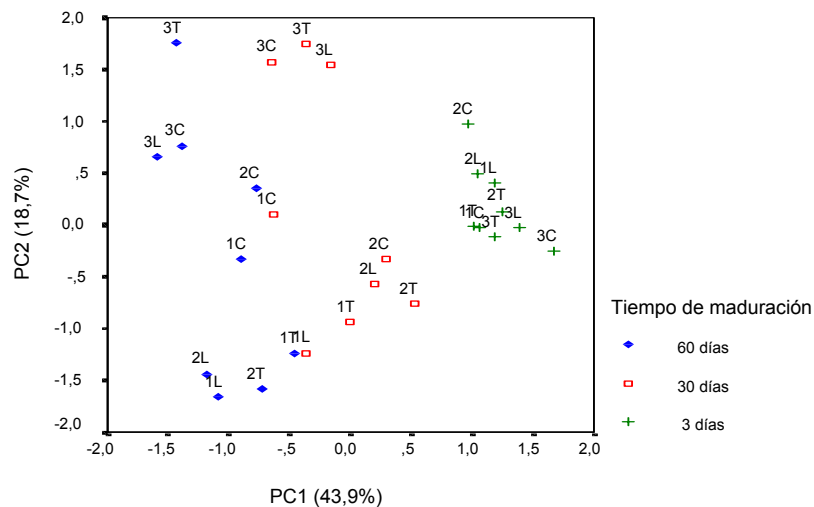


Figura 3. Gráfico de los scores de las muestras para PC1 vs. PC2 de los quesos testigo (T), experimental tipo 1 (E1) y experimental tipo 2 (E2).

El impacto de las bifidobacterias en el proceso de proteólisis durante la maduración, al igual que la viabilidad en el producto, es muy dependiente de la cepa y del tipo de queso ensayados, y por ello es muy importante el estudio del sistema matriz alimentaria-cepa en forma conjunta. Por ejemplo, Dinakar y Mistry (1994) observaron que *B. bifidum*, incorporado en queso Cheddar, no alteró el contenido de nitrógeno soluble, ni los perfiles electroforéticos, mientras que Mc Brearty y col. (2001) encontraron que *B. lactis* y *B. longum* produjeron un aumento en los niveles de aminoácidos libres en quesos Cheddar, pero no alteraron la distribución de peso molecular medio de los péptidos.

En nuestro trabajo, la cepa de *B. lactis* ensayada no demostró ninguna actividad sobre el proceso de proteólisis en el queso Pategrás.

CONCLUSIONES

El queso Pategrás y la cepa ensayada de *Bifidobacterium lactis* demostraron ser componentes adecuados para el desarrollo de un nuevo alimento funcional ya que, en conjunto, garantizan un producto con elevada población de microorganismos probióticos que mantiene inalterado el perfil típico de maduración de aquel queso.

BIBLIOGRAFÍA

Daigle, A., Roy, D., Bélanger, G. y Vuillermard, J. C. (1999). Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. Journal of Dairy Science, 82 (6), 1081-1091.

Dinakar, P.; Mistry, V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 77, 2854-2864.

Gomes, A.; Malcata F.; Klaver, F. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. Journal of Dairy Science, 81, 2817-2825.

Hynes, E. R., Bergamini, C. V., Suárez, V. B., 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.

Mc Brearty, S.; Ross, R., Fitzgerald, G.; Collins, J.; Wallace, J.; Stanton, C. (2001). Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. International Dairy Journal, 11, 599-610.

Roy, D.; Mainville, I.; Mondou, F. (1997). Selective enumeration and survival of Bifidobacteria in Fresh Cheese. International Dairy Journal, 7, 785-793.

Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. Le Lait 85, 39-56.

Saarela, M.; Lähteenmäki, L.; Crittenden, R.; Salminen, S.; Mattila-Sandholm, T. (2002) Gut bacteria and health foods – the European perspective. International Journal of Food Microbiology, 78, 99-117.

Stanton, C.; Gardiner, G.; Lynch, P. B.; Collins, J. K.; Fitzgerald, G.; Ross, R. P. (1998) Probiotic cheese. International Dairy Journal, 8, 491-496.

Vinderola, C.; Mocchiutti, P.; Reinheimer, J. (2001). Interactions among lactic starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85, 721-729.

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D. y Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83 (9), 1905-1911.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y CONTENIDO DE COLESTEROL EN QUESOS PATEGRÁS ARGENTINO CON ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

PEROTTI, María C., MERCANTI, Diego J., BERNAL, Susana M. y ZALAZAR, Carlos A.

Instituto de Lactología Industrial, Facultad de Ing. Química, Universidad Nac. del Litoral.
Santiago del Estero 2829, 3000 Santa Fe, Argentina.
Tel.: 0342-4530302. Fax: 0342-4571164. E-mail: azalazar@fiquis.unl.edu.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron la lipólisis y el contenido de colesterol en quesos Pategrás Argentino elaborados a escala piloto con y sin adición de bacterias probióticas comerciales. Se ensayaron dos cepas de *Lactobacillus acidophilus* y una cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, adicionadas al queso mediante dos métodos diferentes. Los ácidos grasos libres (AGL) desde C_{6:0} hasta C_{18:2} se cuantificaron por CG a los 3 y 60 días de maduración, y los perfiles obtenidos se analizaron con técnicas estadísticas multivariadas. El colesterol se determinó por GC al final de la maduración. No se encontraron diferencias significativas entre los quesos, tanto en lo referente a los perfiles de AGL como al contenido de colesterol. Los resultados obtenidos indican por lo tanto, que las cepas probióticas ensayadas no son lipolíticas ni son capaces de metabolizar el colesterol durante la maduración de este tipo de queso.

Palabras clave: bacterias probióticas, queso Pategrás Argentino, lipólisis, colesterol, maduración.

ABSTRACT

In the present work the lipolysis and cholesterol content of Pategrás Argentino cheeses made at pilot plant scale with and without commercial probiotic bacteria, were studied. Two strains of *Lactobacillus acidophilus* and one strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* were tested. Free fatty acids (FFA) from C_{6:0} to C_{18:2} were quantified at 3 and 60 days of ripening by gas chromatography (GC), and the chromatographic profiles obtained were analyzed by using multivariate statistical techniques. Cholesterol levels were determined by GC at the end of ripening. There were not significant differences between cheeses during ripening, both in the FFA's profile and the cholesterol concentration. From the results of the present study it can be stated that the probiotic strains assayed are not

lipolytic and they are not able to metabolize cholesterol during the ripening time of type of cheese.

Key words: probiotic bacteria, Pategrás Argentino cheese, lipolysis, cholesterol, ripening.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos elaborados con bacterias probióticas tienen efectos positivos sobre la salud, independientemente de su valor nutricional. Estas bacterias se han adicionado tradicionalmente a yogur, leches fermentadas y no fermentadas. Más recientemente, han sido incorporadas como cultivos secundarios a quesos, los cuales poseen una matriz sólida, mayor pH y alto contenido de materia grasa, características que favorecen la supervivencia de dichos microorganismos durante la maduración y también durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal (GIT). No obstante, para lograr un producto de alta calidad, su incorporación no debería afectar negativamente la composición, textura o características sensoriales del queso.

Durante la maduración de quesos se produce la degradación y transformación de proteínas, grasa y lactosa, reacciones fundamentales para la generación de compuestos de aroma y sabor. La liberación de ácidos grasos (lipólisis) se debe a la acción de la lipasa natural de la leche, lipasas presentes en algunos coagulantes, en microorganismos de fermentos primarios y secundarios, en hongos utilizados como cultivos adjuntos y otras lipasas exógenas. En quesos con hongos (Camembert, Roquefort) y en menor medida en quesos duros italianos (Grana Padano y Parmigiano Reggiano), la lipólisis es elevada y responsable de características típicas. En quesos semiduros y blandos, en cambio, el nivel de hidrólisis de la materia grasa es generalmente muy bajo.

Teniendo en cuenta que hasta el momento no existe ningún queso semiduro probiótico en el mercado nacional, el desarrollo de dicho producto tendría una gran importancia. No obstante, el mismo debería preservar sus propiedades originales, incluyendo el perfil de ácidos grasos libres (AGL) y nivel de lipólisis. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la evolución de los AGL durante la maduración de quesos Pategrás Argentino (queso semiduro) elaborados con la incorporación de cultivos comerciales de diferentes cepas de bacterias probióticas, con el propósito de detectar posibles diferencias con los mismos quesos sin bacterias probióticas. Se llevó a cabo asimismo el dosaje de colesterol durante la maduración a fin de verificar si la incorporación de las bacterias probióticas produciría algún cambio en su concentración.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Elaboración de quesos

Como fermento primario de acidificación se utilizó un cultivo liofilizado de *Streptococcus thermophilus* (Diagrama, Santa Fe, Argentina) y como fermentos adjuntos tres cepas probióticas comerciales obtenidas del mercado argentino: una de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y dos de *Lactobacillus acidophilus* (cepas A y B).

Se elaboraron dos quesos experimentales distintos, con adición de bacterias probióticas en forma de polvo liofilizado (**E1**) o luego de preincubarlas en un sustrato compuesto por leche y grasa de leche (**E2**), y quesos testigo sin adición de probióticos (**T**). Los quesos T, E1 y E2 se elaboraron por triplicado para cada cepa probiótica ensayada. La elaboración a escala piloto se realizó de acuerdo al proceso estándar para queso Pategrás Argentino (Zalazar *et al.*, 1999). La leche cruda (135 L), pH $6,70 \pm 0,05$, acidez $18^\circ \pm 1^\circ\text{D}$, provista por una industria láctea cercana, se pasteurizó a $65^\circ\text{C}/20$ min y se enfrió a 37°C . Se adicionó CaCl_2 0,02% (p/v) (Merck, Germany) y se dividió en tres alícuotas de 45 L. Teniendo en cuenta el aporte de materia grasa y proteínas que realiza el sustrato con las bacterias probióticas en el queso E2, se adicionó crema y leche en polvo descremada a la leche de los quesos T y E1 de manera de uniformar el contenido de materia grasa (3,8%) y sólidos no grasos. El fermento primario se dispersó en una pequeña alícuota de leche pasteurizada (como único cultivo en el queso T y junto al cultivo probiótico liofilizado en el E1) y se agregó a la leche para obtener una concentración final de 10^6 UFC mL^{-1} . En el queso E2, el cultivo probiótico liofilizado preincubado en el sustrato, se adicionó a la tina al mismo tiempo que el fermento primario. Tanto en E1 como en E2 las bacterias probióticas se agregaron a razón de 10^6 UFC mL^{-1} a la leche. Transcurridos 15 minutos, 1 g de quimosina (Maxiren 150, France) se dispersó en 25 mL de agua destilada y se agregó a la tina. Cuando el coágulo alcanzó la firmeza adecuada, se procedió al lirado hasta alcanzar el tamaño de granos de maíz. La mezcla de partículas de cuajada y suero se calentó hasta 45°C (1°C min^{-1}). Cuando la cuajada alcanzó la humedad adecuada fue separada y puesta en moldes, y el suero remanente fue descartado. De cada tina se obtuvo un queso de 4 kg aprox. Los quesos se prensaron durante 18 h y se salaron a 12°C durante 24 h en salmuera (20% p/v y pH 5,4). La maduración se llevó a cabo a 12°C y 80% de humedad relativa durante 60 días.

Se elaboraron 9 quesos (tres réplicas de T, E1 y E2) para cada una de las tres bacterias probióticas ensayadas, obteniéndose un total de 27 quesos.

2.2. Muestreo y composición global de los quesos

Se tomaron muestras de los quesos a 3 y 60 días de maduración (FIL-IDF, 1995) y se almacenaron a -18°C hasta el momento de su análisis. A los 3 días de maduración se determinaron el extracto seco y el contenido de proteína total según FIL-IDF (1982, 1993), y el contenido de materia grasa por el método APHA (Bradley *et al.*, 1993).

2.3. Análisis de ácidos grasos libres

Se cuantificaron por cromatografía gaseosa (CG) los AGL desde $\text{C}_{6:0}$ hasta $\text{C}_{18:2}$, en los 27 quesos al inicio (3 días) y al final (60 días) de la maduración. Los ácidos grasos se aislaron de la muestra de queso (4 g) empleando una extracción sólido – líquido continua con n-hexano durante 2 horas, se separaron de la fase de hexano mediante titulación con NaOH 0,1 N y la fase acuosa con las sales sódicas de los AGL se evaporó. Se realizó la derivatización de los AGL con ácido sulfúrico 5% (v/v) en etanol a $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ - 1 h, los ésteres etílicos se extrajeron con n-hexano y se analizaron por triplicado en el cromatógrafo empleando como estándares internos los ácidos enántico ($\text{C}_{7:0}$) y margárico ($\text{C}_{17:0}$) que se adicionaron a la muestra. Se empleó un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo 9000, equipado con inyector split-splitless, detector FID y columna capilar PE-Wax. El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: 50°C (4 min), $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 150°C (3 min), $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 230°C (5 min). El inyector se termostató a 220°C en modo split (relación 1/52), el FID a 275°C y se empleó N_2 como gas carrier ($3,3 \text{ mL min}^{-1}$). Las concentraciones en mg kg^{-1} para nueve AGL se calcularon con curvas de calibración que se prepararon con mezclas de estándares de $\text{C}_{6:0}$, $\text{C}_{8:0}$, $\text{C}_{10:0}$, $\text{C}_{12:0}$, $\text{C}_{14:0}$, $\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:0}$, $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{18:2}$ y los dos estándares internos (Perotti *et al.*, 2005). Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía para detectar diferencias entre los quesos. Además, se aplicaron Análisis por Componentes Principales (ACP) y Análisis de Clusters (AC). Los “scores” del ACP se emplearon para el AC con el objeto de verificar la influencia del tiempo de maduración y el tipo de fermento probiótico utilizado sobre los perfiles lipolíticos.

2.4. Análisis de colesterol

El contenido de colesterol de los quesos con 3 y 60 días de maduración, se cuantificó por CG. Se empleó 400 mg de queso que se saponificaron en tubos con 5 mL de NaOH 5,0 M en etanol, a 80°C - 15 min. Luego se adicionó 3 mL de agua, 5 mL de escualano (estándar interno) en n-hexano ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se agitó durante 1 min (Fletouris *et al.*, 1998). Una alícuota de la fase superior se analizó por CG empleando una columna capilar SE-30. El programa de temperaturas fue 50°C (1 min), $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 280°C (5 min). El inyector se termostató a 280°C en modo split (relación 1/6), el FID a 300°C y se empleó

N₂ como gas carrier (5,0 mL min⁻¹). Las concentraciones en mg kg⁻¹ se calcularon con curvas de calibración realizadas con soluciones estándares de colesterol y escualano, analizadas por CG de la misma manera que las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición global de los quesos

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para materia grasa, extracto seco y proteína total entre quesos testigos y experimentales. Los valores medios fueron $55,06 \pm 1,24$ % para materia seca; $28,45 \pm 1,88$ % para grasa y $21,76 \pm 0,95$ % para proteína total.

3.2. Perfiles de ácidos grasos libres

En la Figura 1 se muestra a modo de ejemplo los perfiles de AGL para los quesos T, E1 y E2 con *Lactobacillus acidophilus* (cepa A) a 3 y 60 días de maduración. Para *Lactobacillus acidophilus* (cepa B) y *Lactobacillus paracasei* se obtuvieron resultados similares. Los principales AGL fueron los ácidos oleico, palmítico, esteárico y mirístico.

Las concentraciones fueron similares en todos los quesos y no se incrementaron notoriamente durante la maduración.

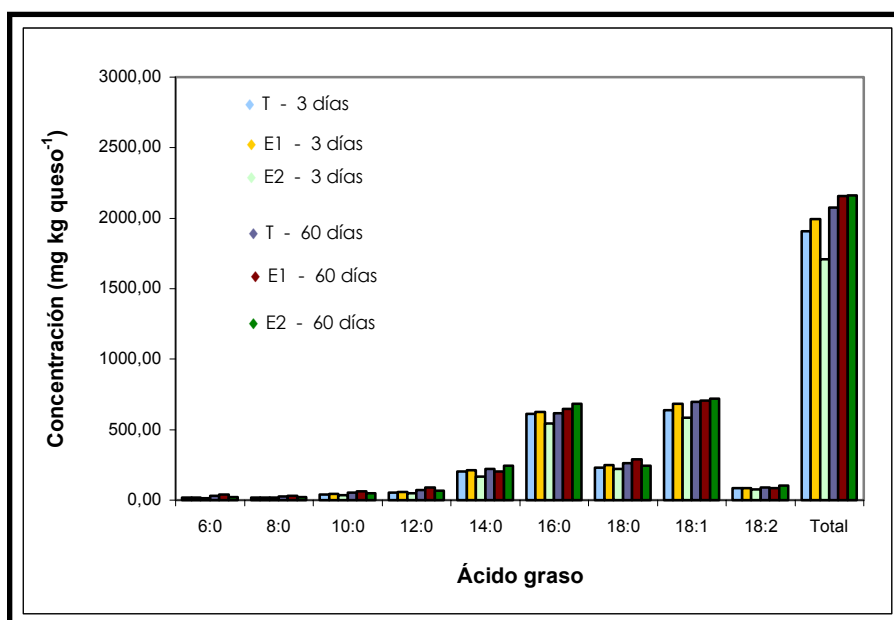


Figura 1. Evolución de la concentración de ácidos grasos libres para quesos testigos (T) y experimentales (E1 y E2) con *Lactobacillus acidophilus* (strain A) al comienzo y al final de la maduración.

3.3. Análisis multivariado de la lipólisis

Para detectar diferencias más sutiles que las evidenciadas por ANOVA, se realizó el APC con los quesos de 60 días maduración. Las variables se estandarizaron a media cero, lo que es equivalente a emplear la matriz variancia-covariancia (Pripp *et al.*, 2000).

Se seleccionaron los 2 primeros componentes principales (CP_1 y CP_2) que acumularon el 96,2% (84,4% CP_1 y 11,8% CP_2) de la variabilidad total. Con relación a las factoriales del CP_1 , se observaron 4 niveles de valores positivos que representan la importancia de cada ácido graso en el perfil lipolítico, mencionándose en orden decreciente el ácido oleico, palmítico, mirístico y esteárico y por último los AGL restantes. Con respecto al CP_2 , los cuatro ácidos mencionados presentaron las mayores cargas factoriales, siendo la carga de oleico negativo y la de los otros tres positivos. Los restantes ácidos tuvieron cargas muy bajas.

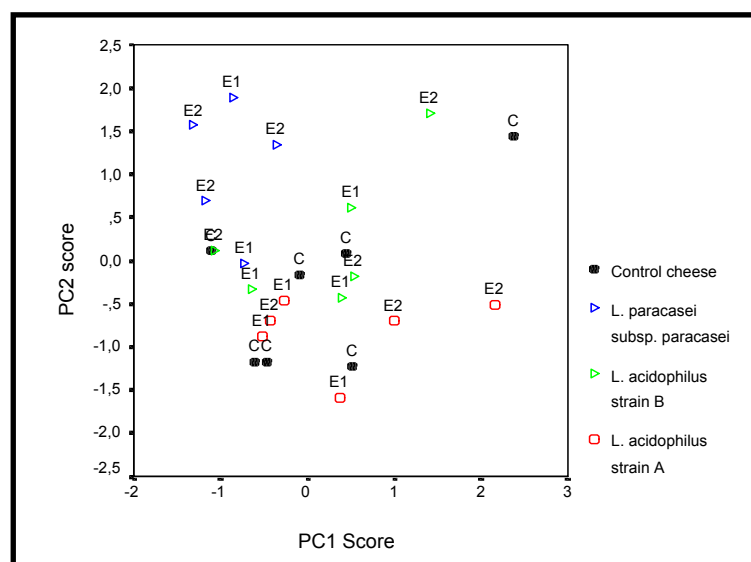


Figura 2. Scores de PC1 vs. PC2 para quesos al final de la maduración (60 días). T: quesos testigos; E1: quesos con cepas probióticas adicionadas liofilizadas; E2: quesos con cepas probióticas preincubadas en un sustrato lácteo graso.

El gráfico bidimensional de los scores de CP_1 vs. CP_2 permite la comparación visual de las muestras con el objeto de establecer posibles asociaciones entre ellas (Figura 2). El origen de coordenadas representa un perfil lipolítico medio. Se puede observar una alta dispersión entre muestras. Los quesos testigos y con *Lactobacillus acidophilus* (cepas A y B) se agruparon cerca del origen, mientras que los con *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mostraron un comportamiento ligeramente distinto. En el análisis de clusters, el cluster 1 agrupó los quesos testigos y con *Lactobacillus acidophilus* (cepas A y B),

mientras que en el cluster 2 se agruparon los quesos con *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (resultados no mostrados). Con respecto a la metodología de adición de las cepas probióticas, los quesos E2 mostraron mayor dispersión que los E1.

3.4. Análisis de colesterol

Los quesos testigos y experimentales mostraron contenidos similares de colesterol tanto a 3 como a 60 días de maduración. Como puede observarse en la Figura 3, al final de la maduración no hubo diferencias significativas entre quesos testigos y experimentales ($p > 0,05$). El nivel de colesterol resultó por otra parte muy similar a los $0,3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de grasa indicado para la leche (Fox, 1995).

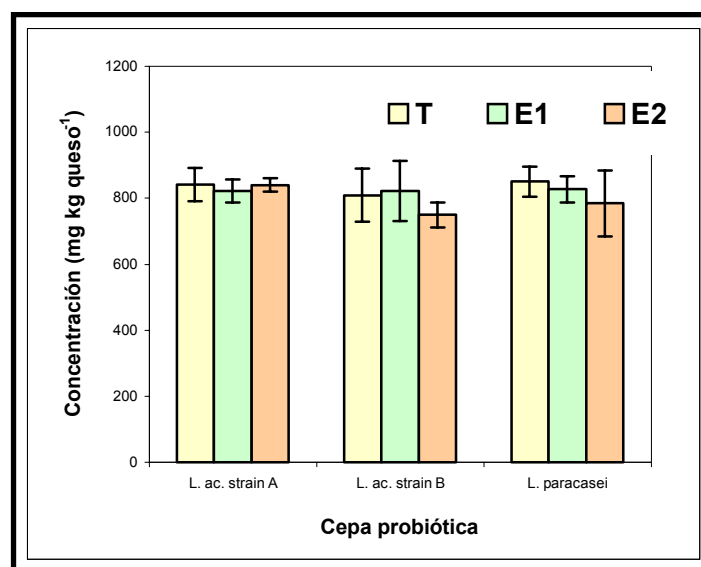


Figura 3. Contenido de colesterol (promedio de tres réplicas) para quesos a los 60 días de maduración. T: quesos testigos; E1: quesos con cepas probióticas adicionadas liofilizadas; E2: quesos con cepas probióticas preincubadas en un sustrato lácteo grasoso.

CONCLUSIONES

La incorporación de bacterias probióticas no alteró el perfil de lipólisis ni el contenido de colesterol en quesos Pategrás Argentino, indicando estos resultados que estas cepas no son lipolíticas ni metabolizan el colesterol durante la maduración en este tipo de queso. Por lo tanto podrían ser agregadas sin cambiar el perfil tradicional del queso desde el punto de vista estudiado en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Bradley RL, Arnold E, Barbano DM, Semerad RG, Smith DE, Vines BK (1993) Chemical and physical methods. En: R. Marshall (Ed), Standard methods for the examination of dairy products, American Public Health Association, Washington DC, p. 433–531.

Fletouris DJ, Botsoglou NA, Psomas IE, Mantis AI (1998) Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 81: 2833-2840.

FIL-IDF (1982) Formaggio e formaggio fuso. Determinazione de la matria secca. Metodi di riferimento, N° 4:A. Reggio Emilia: International Dairy Federation.

FIL-IDF (1993) Determinazione del azoto totale nel latte. Metodi di riferimento, N° 20:B. Reggio Emilia: International Dairy Federation.

FIL-IDF (1995) Lait et Produits Laitiers. Guide de L'échantillonnage, N° 50C. Bruxelles: International Dairy Federation.

Fox P. F. (1995). *Advanced Dairy Chemistry*. Vol. 2. Lipids. Segunda Ed. Chapman & Hall, Londres.

Perotti M.C. , Bernal S., Meinardi C.A., Zalazar, C.A. (2005). Free fatty acids profiles of Reggianito Argentino cheeses produced with different starters. *International Dairy Journal*, en prensa.

Prupp A, Stepaniak L, Sørhaug T (2000) Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10: 249–253.

Zalazar C, Meinardi C, Hynes E (1999) *Quesos Típicos Argentinos. Una revisión general sobre producción y características*. Centro de publicaciones, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS GENERADOS POR LACTOBACILOS TERMÓFILOS PARA EL DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES

HEBERT, Elvira M.¹; MAMONE, Gianfranco²; PICARIELLO, Gianluca²; SAVOY DE GIORI, Graciela¹ and FERRANTI, Pasquale²

¹ Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) CONICET- Chacabuco 145 – 4000 S. M. de Tucumán –Argentina. ²Istituto di Scienze dell'Alimentazione del C.N.R., I-83100 Avellino, Italy. ehebert@cerela.org.ar

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de cepas de lactobacilos termófilos para liberar, a partir de α -caseína (α -CN) y β -caseína (β -CN), péptidos antihipertensivos, es decir con actividad inhibitoria de la enzima convertora de angiotensina (ACE). Los hidrolizados de caseína que mostraron los mayores niveles de inhibición de ACE correspondieron a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, con valores de 53 y 40% para aquellos provenientes de α -CN y β -CN, respectivamente. Estos hidrolizados fueron fraccionados por cromatografía líquida de alta presión y algunos de los péptidos fueron secuenciados por espectrometría de masa. La fracción derivada de β -CN que presentó los mayores niveles de actividad inhibitoria de ACE contiene una mezcla de péptidos β -CN f194-206 (QEPVLGPVRGPPF) y f198-206 (LGPVRGPPF), los dos últimos aminoácidos de estas secuencias son iguales al octapéptido angiotensina II, producto de la actividad ACE. La bioactividad de estos péptidos necesita ser confirmada *in vivo*.

Palabras claves: péptidos bioactivos – alimentos funcionales – *Lactobacillus*- functional foods -proteinase

ABSTRACT

Several strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* were evaluated by their ability to release bioactive peptides, which inhibit the angiotensin-I-converting enzyme (ACE), from α -casein (α -CN) and β -casein (β -CN). Casein hydrolysates of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 showed the highest ACE-inhibitory activities, as measured by an *in vitro* ACE inhibition test, with values of 53 and 40% for α -CN and β -CN, respectively. These hydrolysates were fractionated by reversed-phase high pressure liquid chromatography and some of the active peptides were

sequenced by mass spectrum. The highest ACE-inhibitory fraction derived from β -CN contained a peptide mixture of β -CN f194-206 (QEPVLGPVRGPPF) and f198-206 (LGPVRGPPF), which have features in common with the octapeptide angiotensin II, the main product of the ACE enzyme. The bioactivities of these peptides need to be demonstrated *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos formados por hidrólisis a partir de proteínas presentes en los alimentos y que regulan determinados procesos fisiológicos en el hombre son denominados péptidos "bioactivos". Entre los péptidos bioactivos aislados de proteínas lácteas se pueden mencionar, entre otros, aquellos con efectos antihipertensivos, antitrombóticos, antimicrobianos, antimutagénicos e inmunomoduladores (1). Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva lo hacen principalmente por inhibición de la enzima convertora de angiotensina (ACE). Esta enzima es clave en la regulación de la presión sanguínea, catalizando la formación del vasoconstrictor angiotensina II y la inactivación del vasodilatador bradikinina. Las proteínas de la leche constituyen la principal fuente de un amplio rango de péptidos biológicamente activos. Estos se encuentran en un estado latente (inactivo) dentro de la secuencia proteica y pueden ser liberados por proteólisis enzimática, ya sea durante la digestión del alimento o durante su procesamiento. Las bacterias lácticas (BAL) pueden generar péptidos bioactivos durante la fermentación de alimentos lácteos, principalmente por acción de sus proteinasas sobre las caseínas. Así, uno de los criterios de selección de cepas para la generación de péptidos bioactivos en leches fermentadas, es la actividad proteolítica del cultivo iniciador. La utilización de estos fermentos, tradicionalmente empleados para la elaboración de diferentes leches fermentadas y quesos, constituye una alternativa interesante para la producción de nuevos alimentos funcionales.

El sistema proteolítico de *Lactobacillus helveticus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. lactis*) ha sido caracterizado previamente (2, 3). Estos microorganismos termófilos poseen una actividad proteolítica elevada en comparación con otras BAL. En el presente estudio se evaluó la capacidad de cepas de lactobacilos termófilos para liberar péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de ACE a partir de α -caseína (α -CN) y β -caseína (β -CN). Algunos de los péptidos que mostraron actividad antihipertensiva fueron luego purificados e identificados.

MATERIALES y METODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *L. lactis* CRL 581 y CRL 654, *L. helveticus* CRL 974, CRL 1062, CRL 1176, CRL 1177, CRL 1178 y CRL 1179. Los cultivos lácticos fueron inoculados en un medio químicamente definido (CDM; 2) a una densidad óptica a 560 nm (DO_{560}) de 0.08, incubados a 40°C, cosechados por centrifugación a una DO_{560} de 0.70 (fase exponencial de crecimiento), lavados dos veces con solución fisiológica conteniendo $CaCl_2$ 5 mM y resuspendidos a una DO_{560} de 10 en buffer fosfato de sodio (50 mM, pH 7.0). Esta suspensión se utilizó en los ensayos posteriores.

Actividad proteinasa

La actividad proteinasa se determinó en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0, a 40°C utilizando el sustrato cromogénico Succinil-alanil-alanil-prolilfenilalanina-*p*-nitroanilina (S-Ala, Sigma) de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (2). Una unidad de enzima (UE) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 nmol de nitroanilina por min. La actividad específica se expresó como UE por mg de proteína. La concentración de proteínas se determinó con el método descrito por Bradford utilizando el reactivo provisto por BioRad.

Hidrólisis de caseína

La degradación de las caseínas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (2). La suspensión de células enteras se incubó con 3 mg/ml de sustrato (α -CN y β -CN) disuelto en buffer fosfato 100 mM, pH 7.0, en una relación de 1:1 (vol/vol) a 40°C durante 4 hs. Luego las células se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes conteniendo las diferentes fracciones peptídicas se conservaron a -20°C para su posterior análisis. La hidrólisis de las caseínas se evaluó por SDS-PAGE (4), mediante tinción con plata (Bio-Rad).

Separación de péptidos mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) y análisis de los mismos por espectrometría de masa (MS)

Los hidrolizados de caseína se fraccionaron por HPLC utilizando una columna de fase reversa de 2.1 mm d.i. \times 250 mm, C18, 4 μ m (Phenomenex) con una velocidad de flujo de 0.2 ml/min en un sistema modular HP1100 (Agilent, Palo Alto, CA). La detección se realizó midiendo la absorbancia a 220 nm. El solvente A fue TFA 0.1% (v/v) y el solvente B fue acetonitrilo conteniendo TFA 0.1%. La separación de los péptidos se realizó

utilizando un gradiente desde 5 a 70% de solvente B durante 90 min. Las fracciones se recolectaron manualmente y se analizaron mediante espectrometría de masa. El análisis (ES/MS) se realizó utilizando un espectrómetro de masa de simple cuadrupolo (Micromass, Altrincham WA14 5RZ, UK), de acuerdo al procedimiento descrito por Mamone y col. (5). La desviación estándar de la medida de masa fue 0.01%.

Para el análisis MALDI/MS se utilizó como matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Las muestras fueron analizadas con un instrumento Voyager DE-Pro (Per-Septive Biosystem, Framingham, MA 01701, USA) equipado con un laser N₂ (337 nm) operando en línea o en modo reflectivo, el cual fue calibrado usando un estándar externo (PerSeptive Biosystems). nES tandem fue realizado con un espectrómetro de masa Q-STAR (Applied Biosystems). Las muestras fueron desaladas usando microcolumnas ZipTip C18 (Millipore, Bedford, MA, USA) y nebulizadas a partir de capilares de borosilicato recubiertos en oro (Protana). El voltaje usado fue de 800 V. Ciertos iones fueron seleccionados por el filtro masa cuadrupolo (MS1) e inducidos a fragmentarse por colisión. La energía de colisión fue de 30 V. El análisis de la disociación inducida por colisión fue realizado con el software Analyst 5 (Applied Biosystems).

Actividad ACE

La actividad ACE se cuantificó utilizando como sustrato Furanacryloyl-Phe-Gly-Gly (FAPGG) y extracto de pulmón de conejo como fuente de enzima (6). FAPGG (1 mM) fue mezclado con i) la fracción peptídica a analizar, ii) agua (control de actividad ACE) o iii) el péptido inhibidor captopril (control positivo de inhibición), y preincubado durante 2 min a 37°C. Luego se agregó el extracto enzimático ACE y la reacción se incubó durante 20 min a 37°C, determinándose el delta de absorbancia a 340 nm. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera: $(B - A) \div (B - C) \times 100$; donde *A* es la DO en presencia de ACE y péptido, *B* la DO sin el péptido y *C* la DO sin ACE.

RESULTADOS

Actividad Proteinasa

Se evaluó la actividad proteinasa (Prt) de ocho cepas de lactobacilos termófilos, utilizando el sustrato cromogénico S-Ala y α -CN y β -CN (Figura 1). Los lactobacilos estudiados se separaron en cuatro grupos de acuerdo al patrón electrofórico de degradación de α -CN y β -CN; eligiéndose un representante de cada uno de ellos para evaluar la presencia de péptidos con actividad inhibitoria de ACE. Los microorganismos seleccionados fueron *L.*

lactis CRL 581, *L. helveticus* CRL 1062, CRL 1177 y CRL 1179), siendo la cepa CRL 581 la que mostró niveles más elevados de actividad Prt (datos no mostrados).

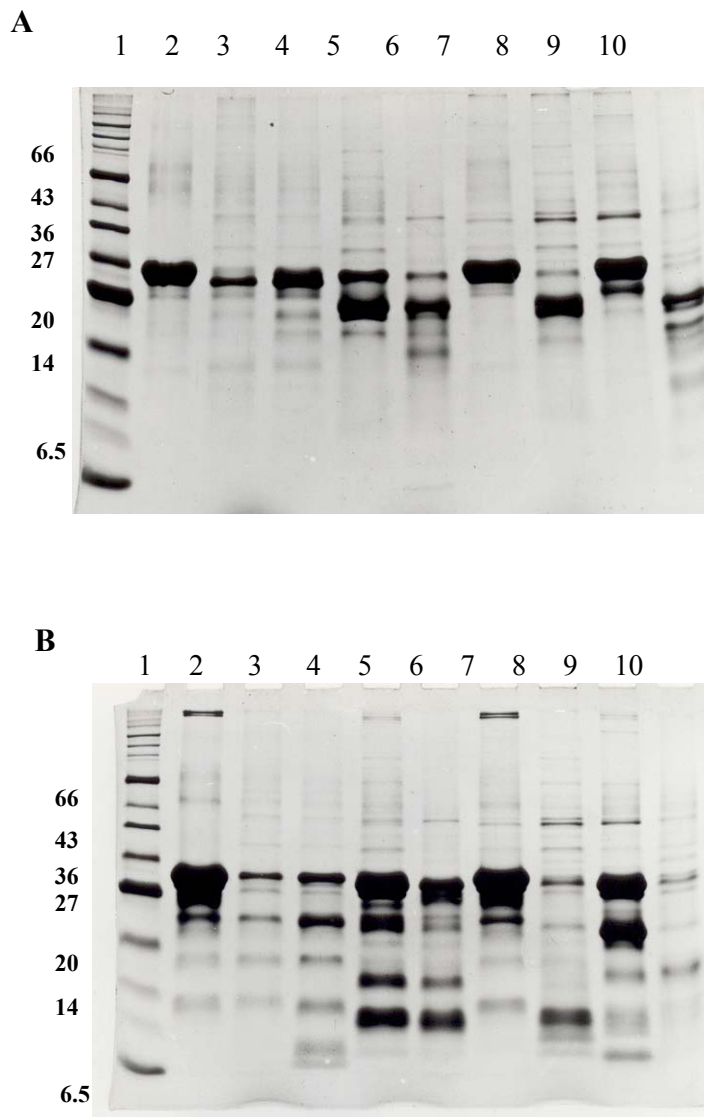


Figura 1. SDS-PAGE análisis de la hidrólisis de α -CN (A) y β -CN (B) por lactobacilos termófilos luego del crecimiento en medio químicamente definido. Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, sustrato sin degradar (control); línea 3, *L. lactis* CRL 581; línea 4, *L. lactis* CRL 654; línea 5, *L. helveticus* CRL 974; línea 6, *L. helveticus* CRL 1062; línea 7, *L. helveticus* CRL 1176; línea 8, *L. helveticus* CRL 1177; línea 9, *L. helveticus* CRL 1178, y línea 10 *L. helveticus* CRL 1179.

Caracterización de péptidos con actividad inhibitoria de ACE

Los hidrolizados de caseína mostraron actividad inhibitoria de ACE hasta un 53%, dependiendo de la cepa analizada (Tabla 1). Los mayores niveles de inhibición correspondieron a *L. lactis* CRL 581, con valores de 53 y 40% para α -CN y β -CN,

respectivamente. Este microorganismo fue seleccionado para realizar los análisis posteriores. En la Figura 2 se muestran los cromatogramas correspondientes al fraccionamiento de los hidrolizados de α -CN y β -CN mediante RP-HPLC, recolectándose 31 y 25 fracciones, respectivamente. El porcentaje de inhibición de actividad ACE de las fracciones más activas, así como el tiempo de retención de las mismas, se detallan en la Tabla 2. Las fracciones 1 y 3 derivadas de α -CN y la fracción 20 proveniente de β -CN presentaron los mayores porcentajes de actividad inhibitoria de ACE. La baja actividad antihipertensiva observada en algunas fracciones podría estar relacionada con la escasa recuperación de las mismas (Figura 2).

Tabla 1. Actividad inhibitoria de ACE de las fracciones peptídicas provenientes de la hidrólisis de α -CN y β -CN por acción de las proteinasas de lactobacilos termófilos.

Microorganismos	Inhibición de ACE (%) ^a	
	Péptidos de α -CN	Péptidos de β -CN
<i>L. lactis</i> CRL 581	53	40
<i>L. helveticus</i> CRL 1062	12	3
<i>L. helveticus</i> CRL 1177	9	0
<i>L. helveticus</i> CRL 1179	8	5

Secuenciación de péptidos

La secuencia de los posibles péptidos antihipertensivos separados mediante HPLC, fueron determinadas mediante MS. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 2. Las fracciones 1 y 3 de α -CN, presentaron una mezcla de péptidos, los cuales no han sido aún identificados. La fracción 20 derivada de β -CN consistió en una mezcla de péptidos, β -CN f194-206 y f198-206 (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La presencia de péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas está muy bien documentado (1). Sin embargo, pocos trabajos tratan sobre el potencial de las BAL para

la liberación de estos péptidos. Existen evidencias que indican la presencia de péptidos antihipertensivos en una leche fermentada ácida llamada Calpis, que contiene una asociación de *L. helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* (7). *L. lactis* y *L. helveticus* son bacterias lácticas usadas como fermentos para la elaboración de diferentes tipos de leches fermentadas y quesos tipo Suizos. En el presente estudio se evaluó la capacidad de cuatro cepas de lactobacilos termófilos para liberar péptidos con actividad inhibitoria de ACE a partir de α -CN y β -CN. *L. lactis* CRL 581 fue el microorganismo que mostró mayor actividad antihipertensiva, identificándose tres fracciones con actividad inhibitoria de ACE superior al 90%. Además, se identificaron los sitios de clivaje de la proteinasa de *L. lactis* CRL 581 sobre α -CN y β -CN, encontrándose que este microorganismo genera péptidos diferentes a los ya descritos para otros lactobacilos termófilos (datos no publicados).

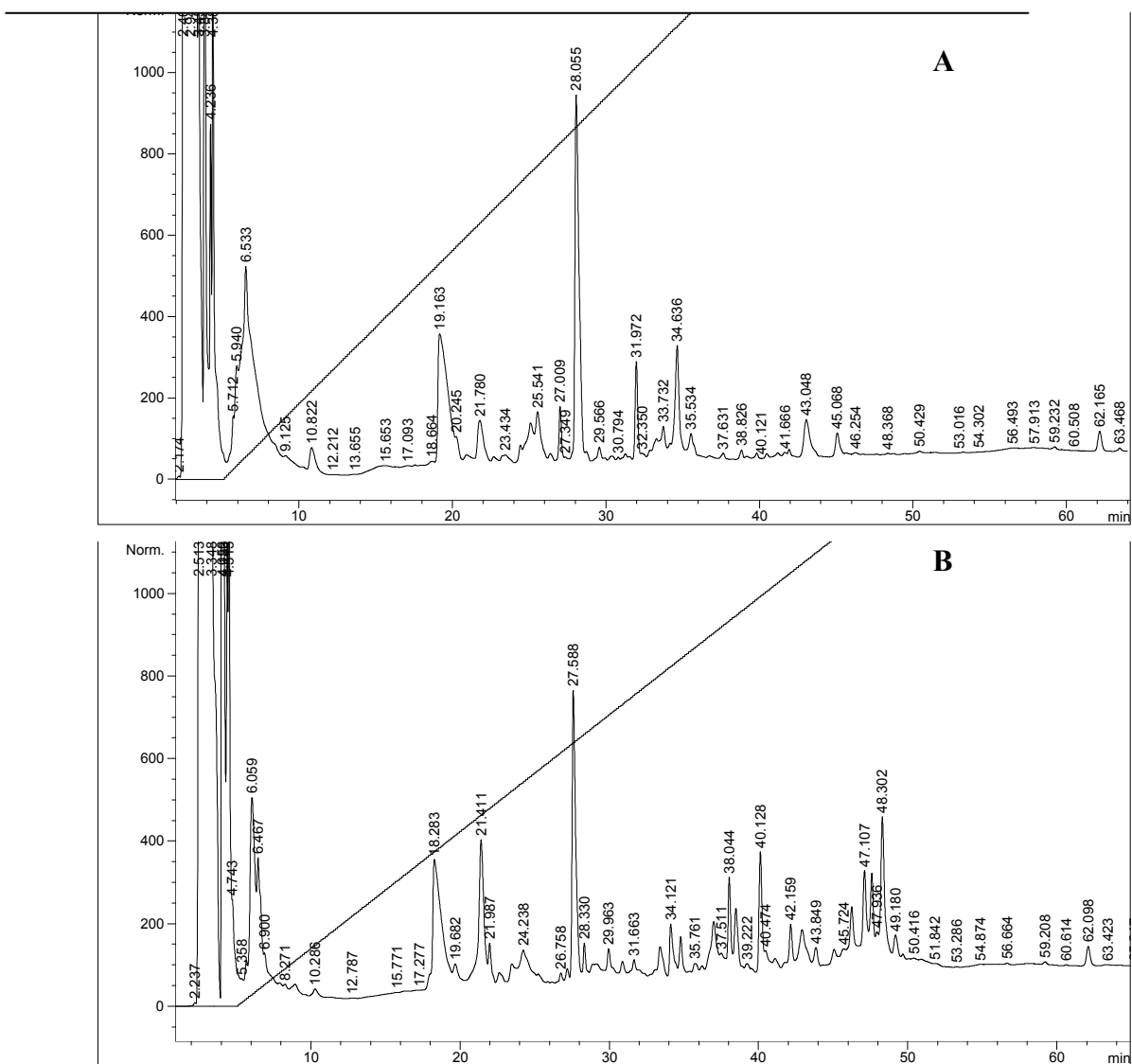


Figura 2. Cromatogramas de RP-HPLC de α -CN (A) y β -CN (B) hidrolizada por *L. lactis* CRL 581. Los números indican el tiempo de retención de las fracciones obtenidas

Tabla 2. Actividad inhibitoria de ACE de las fracciones peptídicas derivadas de α -CN y β -CN por acción de *L. lactis* CRL 581. Identificación de péptidos mediante espectrometría de masa.

Fracción Péptidica ^a	Tiempo de retención (min)	Inhibición ACE (%)	Posición	Secuencia	Método
alpha 1	2.2	93.55			
alpha 2	3.3	13.99			
alpha 3	4.6	97.85			
alpha 4	5.8	11.83			
alpha 11	22.0	13.99			
alpha 12	23.0	16.14			
alpha 13	23.5	13.99			
alpha 18	27.7	9.68	α -CN f 76-84;	VEQKHIQKE	LC/MS
alpha 19	30.8	9.68	α -CN f 110-121	EIVPNSAEERLH	LC/MS
Beta 1	6.1	13.88			
Beta 11	30.0	13.88			
Beta 20	42.2	98.61	β -CN f194-206, f198-206	QEPVLGPVRGPF ₂ , LGPVRGPF ₂	MALDI

^aLos números corresponden a las fracciones recolectadas por RP-HPLC. Las fracciones que no se detallan no presentaron actividad anti-ACE. Las caseínas sin degradar (tiempo 0 h) presentaron un tiempo de retención de aproximadamente 55 min.

ACE es predominantemente una ectoenzima con dos sitios catalíticos, uno en cada lóbulo de la porción extracelular (8). A pesar de que la relación entre estructura y actividad referente a péptidos inhibidores de ACE derivados de diversas proteínas alimenticias no ha sido aún completamente dilucidada (9), estudios de correlación entre estructura y actividad con diferentes péptidos inhibidores de ACE indican que la unión a la enzima es fuertemente afectada por la secuencia dipeptídica C-terminal del sustrato. ACE tendría preferencia por sustratos o inhibidores competitivos conteniendo aminoácidos principalmente aromáticos (W, Y, F), alifáticos (I, A, L, M) o prolina en última posición y aminoácidos aromáticos (Y, F), alifáticos (V, I, A) o arginina en la penúltima posición (9).

Esto explicaría el efecto inhibitorio mostrado por la fracción β -CN f194-206 (QEPVLPVVRGPF) y f198-206 (LGPVRGPF). En el hidrolizado de α -CN sin purificar se identificó, mediante MALDI-TOF, la presencia de péptidos conteniendo aminoácidos ramificados y aromáticos en el extremo C-terminal. Es importante notar que los dos últimos aminoácidos de la secuencia β -CN f194-206 son iguales al octapéptido angiotensina II (producto de la actividad ACE); algunas drogas utilizadas en el tratamiento de la hipertensión están basadas en compuestos parcialmente homólogos a este péptido que compiten con los receptores para este vasoconstrictor. De acuerdo a nuestros conocimientos, este es el primer trabajo que utiliza una cepa de *L. lactis* para la producción de péptidos bioactivos, con actividad inhibitoria de ACE, a partir de caseína. Dichos péptidos podrían consumirse como tales (sin purificación previa), formando parte directamente de los alimentos fermentados o bien como concentrados. Además de constituir productos alimenticios, tales hidrolizados, sus fracciones o los péptidos también podrían formar parte de productos farmacéuticos y contribuir así, en el tratamiento y prevención de enfermedades, particularmente, en el control de la presión arterial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con subsidios de SECYT (PICT 99-09-7210, Proy. IM40-2000) y de la Fundación Antorchas. También se agradece el apoyo financiero de la Agregaduría Científica de la Embajada de Italia y SECYT, a través de convenios de cooperación internacional. Agradecemos al Dr. Raúl Raya por la lectura crítica del manuscrito y por sus sugerencias.

BIBLIOGRAFÍA

- Meisel, H. (1997) *Biopolymers* **43**, 119-128.
- Hebert, E.M., Raya, R.R. and De Giori, G.S. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5316-5321.
- Hebert, E.M., Raya, R.R. and de Giori, G.S. (2002) *Curr. Microbiol.* **45**, 385-389.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Mamone, G., Cairra, S., Garro, G., Nicolai, A., Ferranti, P., Picariello, G., Malorni, A., Chianese, L. and Addeo, F. (2003) *Electrophoresis* **24**, 2824-2837.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W. (2002) *J. Biochem. Biophys. Methods* **51**, 75-87.
- Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. (1994) *J. Dairy Sci.* **77**, 917-922.

Johnston, C.I. (1992) *J. Hypertens. Suppl.* **10**, S13-26.

Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F. and Cushman, D.W. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 401-407.

ELABORAÇÃO DE PÃO SEM GLUTEN PARA CONSUMO POR CELÍACOS.

MOREIRA, Luzia. B. G ¹; MUFFONE, Anna Roberta ²; RIBEIRO, Elaine. P ²; ANDRADE, F. E.; ² MENEGHINI, Manoela. ² H. UNICKI, Priscila.C; ² ELÍSIO, Camila ²; IBÁÑEZ, Flaviane S. ²

¹ Profa. Curso de nutrição da UNIGUAÇU E-mail luziamoreira2002@yahoo.com.br; fone: 55-41-3016-61-77 ou 55-41-9193-56-49 ,

² alunas do curso de nutrição da FEPAR- Faculdade Evangélica do Paraná, rua Padre Anchieta, 2770, CEP 80.730.000, Curitiba-Pr., Brasil.

RESUMEN

La enfermedad celíaca es caracterizada por el intolerancia permanente do gluten, puede causar una mala absorción de los alimentos de la dieta y, por lo tanto, daños a las células epiteliales de la absorción, cuál implica daños a la mucosa del intestino fino. Lesión con el tiempo acaba destruyendo las biliosidades de la mucosa intestinal que resulta conocido como mucoso aplanado. Dañoso y el tóxico al intestino del paciente del intolerante gluten es "partes de gluten", que reciben diversos nombres para cada cereal: en el trigo, es el gliadina, en la cebada, el hordeína, en avena, el avenina, e en el centeno, el sacaliña. (Shike-1999). El único tratamiento para los celíacos es el completo quitado de éstos alimentos de la dieta durante toda la vida. Como la alimentación de estas muchas épocas provoca el estreñimiento intestinal, usted hace necesario desarrollar la dieta con las fibras de grapa. Las fibras insolubles no tienen gran capacidad de absorción del agua y prácticamente se eliminan intacto. Su acción fisiológica principal es: para reducir la absorción intestinal del azúcar, para aumentar la torta fecal y asistir al tránsito intestinal, favorecer la evacuación. Las fibras solubles retrasan el esvaziamiento gástrico mientras que eso los insolubles no. Las fibras solubles aumentan la torta fecal y la frecuencia de los movimientos intestinales. Ambas las fibras regulan el tránsito intestinal. Este trabajo fue consistido en el desarrollo de un pan sin gluten, usando como substituto de la harina de trigo una 'mezcla de harinas (tapioca, almidón de maíz, harina del arroz), leche , fibras conseguidas para el uso del pectina, agar, .El producto conseguido presentó 1,51% proteína , 2% de fibras alimenticias, 14, 93 % de los lipidos, 29,1% de carbohidratos, 1.82% de cenizas lixiviadas, exima de gluten. Se concluye a través de la prueba del perfil de características eso consiguió un alimento con sabor agradable, textura excelente, muy similar al pan convencional y con buen sensorio de aceptabilidad, estando con el

promedio 8.9 en la prueba de variar de la escala del hedónica de 0-9. El valor calórico para la feta del pan de 50 gramas es de 63kcal.

Palabras claves: enfermedad del celíaca; pan sin gluten;

ABSTRACT

The celiac disease is a chronicle syndrome of bad absorption characterised by the damage to the mucous membrane of the small intestine. The cause is unknown and it occurs due to an allergic reaction of the mucosa to the gliadin (protein found in gluten). The process makes the intestinal villosities become progressively smaller, thus reducing the absorption surface and interfering in the cellular functions in the digestion of food. The main symptoms of the carrier are: loss of weight, abdominal distension, swelling of legs, growth stagnation as a result of protein deficiency (lack of calories) and diarrhoea. Gluten is found in certain cereals such as flour, rye, barley and oat and ought to be totally removed from the alimentation of the carriers of the celiac disease. For this reason, a special kind of bread was developed, that is, with no addition of gluten, but enriched with "guar gum", which is a hydrophilic polysaccharide carbohydrate of high molecular weight (galactomannan) constituted of D-galactose and D-mannose. It is classified as insoluble fibre and prebiome, obtained from the seeds of *Cyamopsis psoraloides* and *Cyamopsis tetragonolobus* (Leguminosae). Its formulation also contains pectin, a polysaccharide found in the cellular walls of every vegetative tissue. It is obtained from citric fruit (lemon and orange) and from the apple pulp. It is formed by polygalacturonic acids partially methoxenous. It is a soluble fibre suitable for diarrhoea, constipation and obesity. The objective of the present work is to give suchlike patients the opportunity to add bread to their alimentation, causing them a psychological positive impact, as well as helping them regulate their intestinal flow as a result of the use of functional ingredients.

RESUMO

A doença celíaca é caracterizada pela intolerância permanente ao glúten, ocasionando uma má absorção de nutrientes da dieta e, conseqüentemente, danos às células epiteliais de absorção, as quais envolvem danos à mucosa do intestino delgado..O prejudicial e tóxico ao intestino do paciente intolerante ao glúten são "partes do glúten "como no trigo, a gliadina, na cevada, a hordeína, na aveia, a avenina, e no centeio, a secalina .(Shike - 1999),portanto devendo ser retirados da dieta destes. Como a alimentação muitas vezes provoca constipação intestinal, faze-se necessário incrementar a dieta com fibras. As

fibras insolúveis não têm grande capacidade de se ligar à água e são eliminadas praticamente intactas reduzindo a absorção intestinal do açúcar, aumentando o bolo fecal e auxiliando no trânsito intestinal. As fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico, aumentam o bolo fecal e a frequência dos movimentos intestinais. Este trabalho consistiu-se no desenvolvimento de um pão, isento de glúten, utilizando-se como substituto da farinha de trigo uma mistura de farinhas (tapioca, amido de milho, e farinha de arroz), leite de soja, e fibras obtidas pelo uso de pectina e agar. O produto obtido apresentou-se com um teor de 1,51% de proteína, 2% de fibras alimentar, 14,93 % lipídeos, 29,1% de carboidratos, 1,82% de cinzas, isento de glúten. Conclui-se através do teste de perfil de características que obteve-se um alimento com agradável sabor, excelente textura, e com boa aceitabilidade sensorial, ficando com média 8,9 no teste de escala hedônica variando de 0-9. O valor calórico por fatia de pão de 50 grs foi de 63 kcal.

INTRODUÇÃO

A doença celíaca, também conhecida como enteropatia sensível ao glúten, espru-celíaco ou espru-não tropical, é doença caracterizada por danos à mucosa do intestino delgado. A lesão com o tempo acaba destruindo as vilosidades da mucosa intestinal resultando numa mucosa conhecida como mucosa achatada. As enzimas digestivas se perdem e os alimentos são mal digeridos o que compromete a utilização de vários nutrientes pelo organismo, provocando perda de peso, parada de crescimento. Anorexia, vômito e irritabilidade com frequência acompanham este quadro. Em crises a criança alcança uma desnutrição importante com a hipotrofia muscular sendo bastante chamativa a hipotrofia do músculo do glúteo.

O prejudicial e tóxico ao intestino do paciente intolerante ao glúten são "partes do glúten" como no trigo, a gliadina, na cevada, a hordeína, na aveia, a avenina, e no centeio, a secalina. (Shike -1999), portanto devendo ser retirados da dieta destes. (Hdeaho-1995).

Como a doença é desencadeada pelo glúten, o tratamento dietético é fundamental e de certa forma problemático, pois requer a exclusão da dieta, dos alimentos à base de cereais (trigo, centeio, cevada e aveia). (Bernardin-1976). Como a alimentação muitas vezes provoca constipação intestinal, faze-se necessário incrementar a dieta com fibras.

Diversos estudos têm demonstrado os benefícios de uma dieta com alto teor de fibras na prevenção e no tratamento da constipação. Um estudo que comprova essa tese é o de

(Roma-1999). , onde foi constatado que as crianças que ingerem menor quantidade de fibras na dieta, possuem um risco 8 vezes maior de apresentar o distúrbio da constipação. De origem vegetal, as fibras são encontradas em todos os alimentos do grupo dos carboidratos. Como não são digeridas pelas enzimas, chegam ao intestino íntegras. Possuem capacidade de retenção de água e sofrem decomposição no intestino grosso. Podem ser classificadas por dois tipos: solúveis ou insolúveis, de acordo com a capacidade de incorporar água em sua estrutura. As fibras solúveis têm ação principalmente metabólica e as insolúveis, principalmente mecânica. Ambas se complementam e exercem o papel de reguladoras intestinais.

Vários estudos tem sido feitos para obtenção de pão livre de gluten , de qualidade aceitável na qual o produto obtido tenha um volume específico e textura agradável. A farinha de arroz é uma boa alternativa para pacientes celíacos, apesar do amido de arroz se retrogradar mais facilmente durante a armazenagem do que o amido de trigo. (Gugra,2003)

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um pão isento de glúten, que pudesse tornar os hábitos alimentares dos celíacos mais próximos do normal, garantindo assim uma melhor qualidade de vida e inclusão alimentar/social, utilizando-se como substituto da farinha de trigo uma mistura de farinhas (*tapioca, amido de milho, e farinha de arroz*), leite e fibras obtidas pelo uso de pectina e ágar , que também auxiliaram juntamente com o uso de gelatina em pó , na formação da estrutura de rede capaz de reter os gases formados durante o processo de fermentação da massa e com características físicas similares a estrutura que uma massa contendo glúten formaria, tornando o pão mais leve e atraente, diferenciado de outras elaborações comerciais que tornam o pão sem glúten “pesado” e compactado.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Para o desenvolvimento da pão , foi utilizada uma mistura de farinhas composta de 60 % de farinha arroz branco, 15% de farinha tapioca e 15% de amido milho. Também utilizou-se de fermento biológico, leite em pó, goma guar , pectina em pó, gelatina em pó, sal, açúcar, ovos , óleo de canola , vinagre.

O pão foi elaborado pelo método indireto, utilizando-se de misturadeira rápida MR-24 Perfecta(capacidade para 15 kg) para pré-mistura dos ingredientes secos por 7 minutos, posterior homogeneização com acréscimo dos ingredientes líquidos por mais 8 minutos e

45 minutos para descanso da massa que apresentou-se pastosa. A massa foi levada para assar em forno elétrico Vipão Perfecta a 180°C, em formas retangulares de inox para moldagem.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Bromatologia da Faculdade Evangélica do Paraná, em Curitiba. Foram determinadas as características físico-químicas e microbiológicas do produto. A composição centesimal (umidade, resíduo mineral fixo, lipídios e proteínas) foi efetuada segundo as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" (Instituto Adolfo Lutz, 1985), sendo os carboidratos calculados por diferença. O valor calórico foi calculado utilizando-se os seguintes fatores: nove para lipídios e quatro para proteínas e carboidratos (BRASIL, 1998a).

A determinação das fibras alimentares seguiu o método enzimático-gravimétrico da "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), modificado por Lee et al. (1992).

Realizaram-se análises sensoriais com um grupo de 18 pessoas, semi-treinadas, as quais concluíram teste de "Perfil de Característica das Amostras" e "Método da Escala Hedônica" (variando de 0-9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas encontram-se na Tabela 1. Conforme os dados obtidos para a análise microbiológica, observa-se que os valores estão dentro dos parâmetros de aceitação. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos a partir das somas das respostas das fichas individuais do "Teste de Perfil de Características". A formulação pré-selecionada foi submetida à análise de preferência sensorial do tipo Escala Hedônica estruturada de 9 pontos, com 18 provadores semi-treinados, apresentando o valor médio obtido de 8,9 na escala. Analisando-se os resultados, observa-se que o produto apresenta-se com excelente cor e aparência, textura, aroma e sabor, além de ser isento de glúten. Cabe salientar que os avéolos ficaram com aspecto bem uniforme e de pequeno tamanho, assegurando uma boa aeração da massa durante o processo de assamento. (Figura 1)

CONCLUSÕES

O processo utilizado, adaptado às técnicas disponíveis, possibilitaram a produção adequada do pão isento de glúten, com características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais confiáveis. O pão sem glúten formulado apresentou uma textura firme, aerada e macia, podendo ser classificado segundo a legislação brasileira vigente como "isento de

glúten”. A formulação selecionada apresentou boa aceitabilidade, uma vez que 89% dos provadores demonstraram intenção de compra. A isenção de glúten torna o produto adequado ao consumo de Celíacos. O valor calórico para 100g deste pão é de 125,49 Kcal.

TABELA 1 - Resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas do pão sem glúten elaborado.

Pão isento de glúten .	
<i>ANÁLISES</i>	<i>Valores obtidos (base seca).</i>
Valor Calórico Kcal p/ 100g	125,49
Umidade (g%)	51,18
Proteínas (g%)	1,51
Lipídeos (g%)	14,93
Carboidratos totais (%g)	29,16
Cinzas (g%)	1,82
Fibras Totais (g%)	1,40
Glúten	isento
Coniformes fecais NMP/g	0
Coliformes Totais NMP/g	0

TABELA 2-Teste perfil de características

CARACTERISTICA	VALOR
SABOR	9,5
AROMA	9,3
APARENCIA	9,7
COR	9,7
TEXTURA	9,5



FIGURA 1- pão sem glúten.

BIBLIOGRAFIA

BERNARDIN, J. E., SAUNDERS R. M., AND KASARDA D. D.. Communication to the Editor: Absence of Carbohydrate in Celiac-Toxic A-Gliadin. Copyright 1976 by the American Association of Cereal Chemists, Inc.

BRASIL, Leis, decretos, etc.- Portaria N 33/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária . Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 30 mar. 1998. Seç. 1, n. 60-E, p.5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR-Ingestão Diária Recomendado para as vitaminas, minerais e proteínas.1998a

GUJRA, HARDEEP SINGH L ; HAROS ,MÓNICA , AND ROSELL, CRISTINA M. . Starch Hydrolyzing Enzymes for Retarding the Staling of Rice Bread. Cereal Chem. 80(6):750-754. Copyright 2003 American Association of Cereal Chemists, Inc.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v.1, p.21-24, 266

L"HEAHO M.-L., VAINIO E., LEHTINEN M., PARKKONEN P., PARTANEN J., KOSKIMIES S., AND M. M"KI. Activation of Celiac Disease Immune System by Specific alpha –Gliadin Peptides. Copyright 1995 by the American Association of Cereal Chemists, Inc.

ROMA, ELEFThERIA ET AL., Diet and chronic constipation in children: the role of fiber. Journal of Pediatric Gastroenterology an Nutrition, v.28,n.2,p. 169=174, fev.1999.

SHIKE M. ans ROSS ^a C., Modern Nutrition in Health Disease, 9 ed., p. 923-935, 1999) Cereal Chem 53:612 - 614.

ACEPTABILIDAD SENSORIAL EN POSTRES FUNCIONALES

Dello Staffolo, Marina^{1,2}; Martino, Miriam N.^{1,2}; Bevilacqua Alicia E.^{1,2}

CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas¹, Facultad de Ingeniería², Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116, La Plata (1900), Argentina. Tel. y Fax: 0221-4254853.
Correo electrónico: marinads@cidca.org.ar

RESUMEN

El objetivo fue analizar características sensoriales de postres lácteos con y sin fibra dietaria y comparar los resultados con los obtenidos instrumentalmente. Se utilizó fibra dietaria de bambú, inulina, trigo, manzana, *Psyllium* y quitosano. El estudio sensorial se realizó con consumidores que evaluaron apariencia, sabor, textura y preferencia global de los postres mediante una escala hedónica. Se utilizó un texturómetro Texture Analyser-xT2i y colorímetro triestímulo Minolta, CR 300. Los resultados obtenidos se analizaron con los test ANOVA y Tukey. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos para todos los atributos sensoriales ($p < 0.05$). El postre con quitosano obtuvo el menor puntaje. El postre con fibra de psyllium mostró el valor más elevado y el postre con quitosano el menor en fuerza de compresión. La fibra de manzana produjo la mayor variación de color.

Palabras Clave: postre lácteo, fibra dietaria, aceptabilidad.

ABSTRACT

Sensory characteristics of dairy desserts with and without dietary fiber (10,9 g/kg) were evaluated by a nontrained panel. Surface color (Minolta, CR 300) and texture (Texture Analyser-xT2i) measurements were also analyzed. Dietary fibers of bambu, inuline, wheat, apple, *Psyllium* and chitosan were tested. Sensory analysis was carried out by panelists that commonly consume these kind of products. Appearance, flavor, texture and general preference were scored using a 1-10 hedonic scale. Statistical analysis were performed by ANAVA and Tukey tests. All sensory attributes showed significant differences between treatments. The dessert with chitosan gave the lowest sensory scores. For maximum compression force, the dessert with *Psyllium* fiber showed the highest value, while the one with chitosan gave the lowest. Apple fiber led to a brownish color.

INTRODUCCIÓN

La medida de la aceptabilidad sensorial, es un paso lógico y necesario antes de lanzar un producto al mercado. Este atributo es complejo e involucra propiedades gustativas, olfatorias, visuales, táctiles y quinesísticas (propiedades mecánicas: dureza, adhesividad), que son evaluadas en conjunto (Meilgaard y col., 1999). La percepción oral del alimento, depende de la composición y de la estructura del mismo que puede ser modificada por el uso de agentes gelificantes o espesantes (Lethuaut y col, 2003). Los ensayos sensoriales afectivos involucran consumidores, sus percepciones y preferencias y son muy utilizados para explorar la aceptabilidad del producto (Foegeding y col, 2003). Los consumidores valoran cada vez más aquellos alimentos beneficiosos para su organismo (Pupponen-Pimiä y col., 2002). Tal es el caso de los alimentos funcionales que contienen ingredientes (como fibra dietaria) que pueden ayudar al mejoramiento de los mecanismos de defensa, prevención o recuperación de enfermedades, retardo en el proceso de envejecimiento, etc., además de ser nutritivos (Sloan, A. E., 1999). El objetivo de este trabajo fue analizar características sensoriales de aceptabilidad en postres lácteos con y sin fibra dietaria y comparar los resultados con los obtenidos instrumentalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó leche entera en polvo (Nestle, Argentina) reconstituida con agua de red, almidón de maíz (Molinos Río de La Plata, Argentina), sacarosa (tipo A, Ledesma, Argentina), carragenina CC765 (mezcla de fracciones capa, iota, y lambda, Inmobal Nutrer, Argentina), goma guar y goma xántica (Saporiti, Argentina) como aditivos. Se ensayaron las fibras dietéticas de: inulina (Frutafit-inulin, Imperial Sensus, Holanda), fibra de manzana (Vitacel, JRS, Alemania), de trigo (Wheatcel, CFF, Alemania), bambú (Qualicel, CFF, Alemania), *psyllium plantago* (Metamucil, Procter & Gamble Co., USA) y quitosano (Merck, USA). Los postres contenían 862 g/kg de leche entera, 120 g/kg de sacarosa, base A: 17 y 1,7 g/kg de almidón y carragenina respectivamente y base B: 25 y 2,5 g/kg; y 10,9 g/kg de las distintas fibras. Se utilizó un agitador magnético durante 30 min. Se realizó un tratamiento térmico en baño termostático a 90°C durante 20 min con agitación constante a 100 rpm (Eurostar Power-5, Ika Labortechnik, Alemania). Se colocaron alícuotas, de la preparación en caliente, en recipientes de vidrio tapados (75 mm de diámetro por 80 mm de altura) hasta 40 mm de altura, para el ensayo instrumental o en vasos de polipropileno (40 mm de diámetro por 80 mm de altura) para el ensayo sensorial. Las muestras fueron almacenadas a 1°C por 24hs. Se utilizó un texturómetro Texture

Analyser-xT2i (USA) para obtener los parámetros de fuerza de compresión y fuerza de adhesión. El sensor P/0,5 R comprimía la muestra con una fuerza de 0,05 N penetrando 20 mm en el espesor del producto a una velocidad de 1 mm/s. Se ensayaron en primer lugar y por triplicado, postres base sin fibras conteniendo a) 25 g/kg de almidón y 2,5 g/kg de carragenina; b) 17 g/kg de almidón y 1,7 g/kg de carragenina; c) 25 g/kg de almidón; d) 25 g/kg de almidón y 2,5 g/kg de goma guar; e) 25 g/kg de almidón y 2,5 g/kg de goma xántica. De estos resultados se seleccionaron mezclas base para el agregado de las fibras y se realizaron los ensayos de textura por sextuplicado y la evaluación sensorial. Esta se llevó a cabo mediante un panel no entrenado de 40 adultos de ambos sexos, consumidores habituales de este producto, reclutados previa encuesta. Los postres se evaluaron según: apariencia, sabor, textura y preferencia global, utilizando una escala hedónica del 1 al 10 para cada atributo (Stone y Sidel, 1985). Se obtuvieron los parámetros L* (luminosidad), a* b* con un colorímetro triestímulo Chroma meter Minolta CR 300 (Japón). Para la calibración se utilizaron las placas provistos por el fabricante. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Se calculó el valor del ángulo Hue (H°) que corresponde a la cromaticidad como: $H^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*)$. Los resultados de todos los ensayos se analizaron estadísticamente mediante el test ANOVA para detectar diferencias significativas (DS) y el test de Tukey para comparar las medias ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los postres que contenían solo almidón y los que contenían almidón con goma guar o goma xántica no gelificaban. Los postres formulados con almidón y carragenina adquirieron una estructura de gel, presentando un máximo que corresponde a la fuerza de compresión y un mínimo que corresponde a la fuerza de adhesión (Figura 1).

Se eligió la carragenina como aditivo gelificante, descartando el agregado de goma guar y goma xántica. Con el agregado de las diferentes fibras dietarias la forma del perfil se mantuvo, sin embargo se modificaron significativamente los parámetros mencionados. Para las mezclas con 17 g/kg de almidón y 1,7 g/kg de carragenina (base A), la fuerza de compresión fue significativamente mayor con las fibras de *Psyllium* y manzana y menor con quitosano (Tabla 1). Los demás tratamientos mostraron valores intermedios y similares del parámetro. Para las mezclas con 25 g/kg de almidón y 2,5 g/kg de carragenina (base B), la fuerza de compresión de los postres con fibra de trigo y *Psyllium* fue significativamente mayor, mientras que el postre con quitosano presentó la menor fuerza. La fuerza de adhesión fue significativamente mayor para la base A con *Psyllium* y

manzana, mientras que los postres con quitosano e inulina, mostraron el menor valor. En el caso de la base B y fibra de trigo la fuerza de adhesión fue significativamente mayor, mientras que los postres con quitosano presentaron la menor fuerza (Tabla 1). Cada fibra mostró una interacción específica con el gel base. El quitosano presenta los menores valores para todos los sistemas. Esto podría ser debido al tamaño de sus partículas. No hubo DS de color entre las bases A y B, sin embargo, hubo DS entre los postres con y sin fibras en cada base (Tabla 1). La fibra de manzana produjo DS de L^* y H° con respecto a los otros tratamientos, ya que posee color marrón.

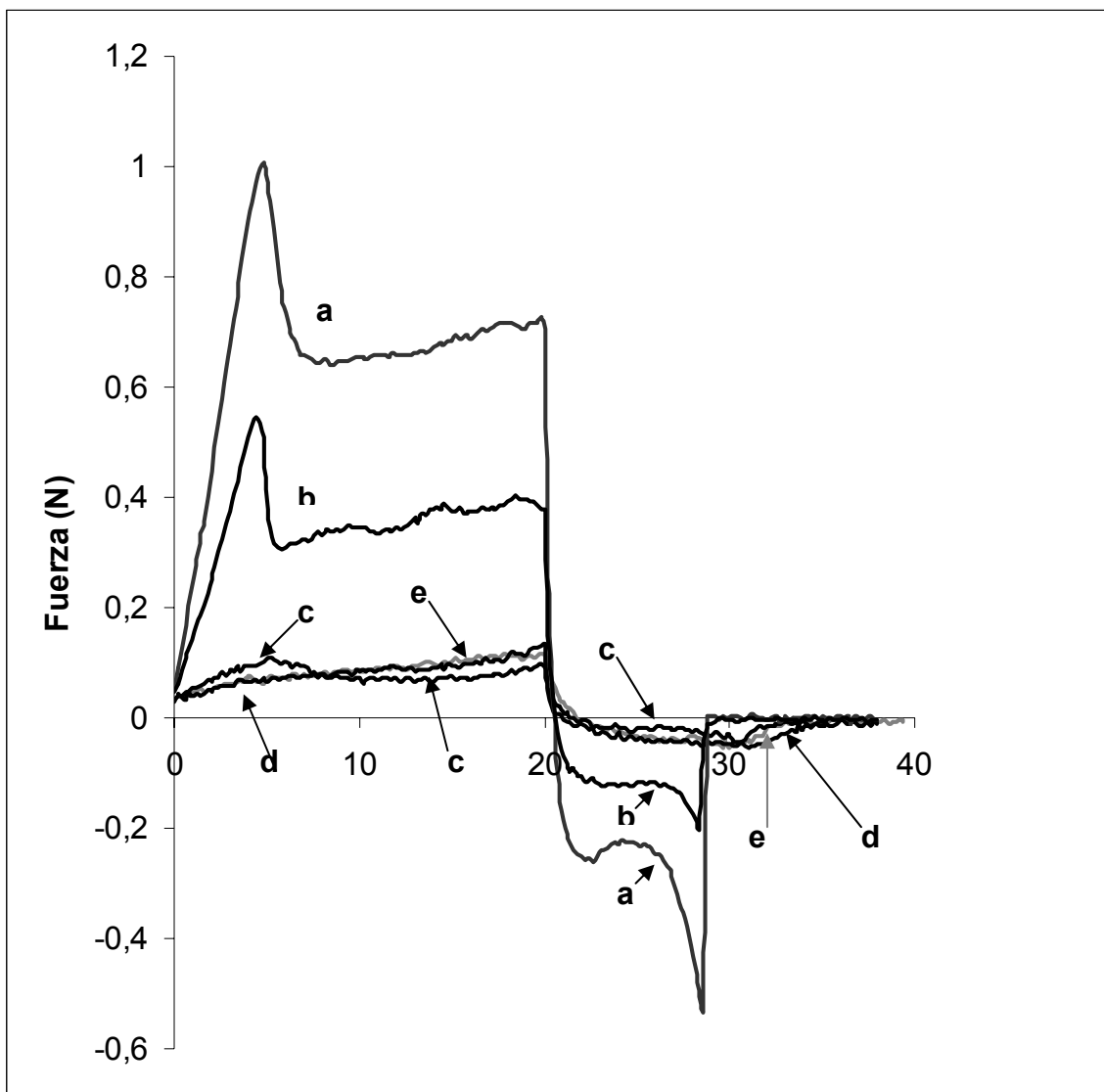


Figura 1- Perfil de textura mostrando Fuerza de Compresión versus tiempo para postres con: **a)** 25 g/kg⁻¹ de almidón y 2,5 g/kg⁻¹ de carragenina; **b)** 17 g/kg⁻¹ de almidón y 1,7 g/kg⁻¹ de carragenina; **c)** 25 g/kg⁻¹ de almidón; **d)** 25 g/kg⁻¹ de almidón y 2,5 g/kg⁻¹ de goma guar; **e)** 25 g/kg⁻¹ de almidón y 2,5 g/kg⁻¹ de goma xántica

Tabla 1- Fuerza de Compresión, Fuerza de Adhesión, Luminosidad (L*) y Cromaticidad (H°) para los postres con y sin fibra. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p< 0,05)

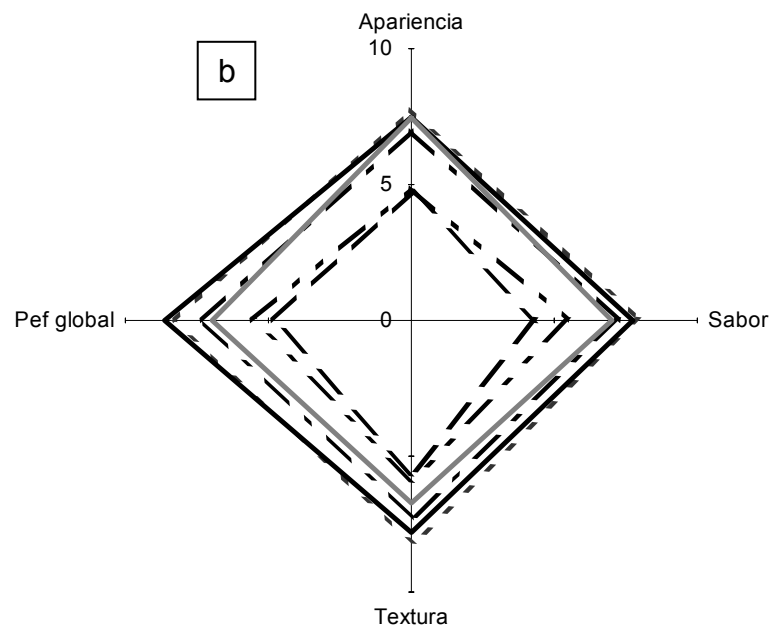
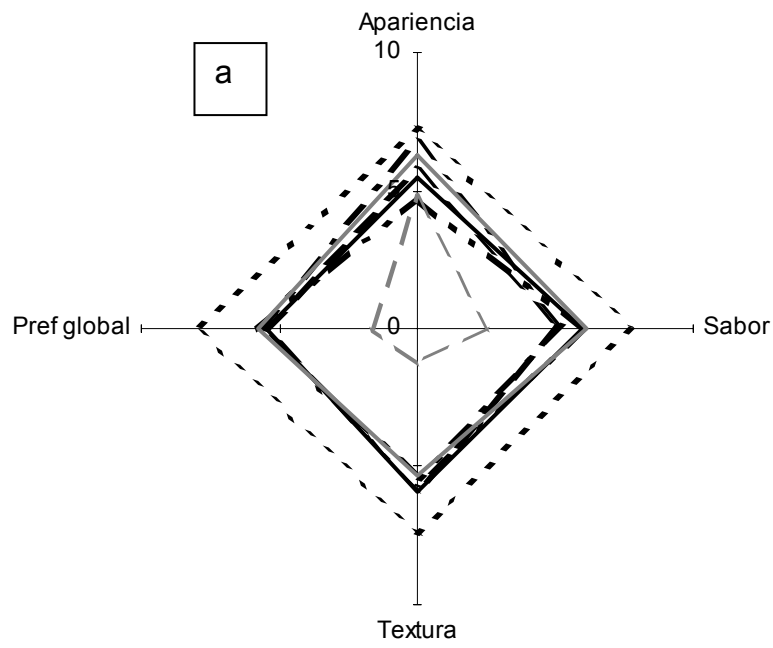
Postre	Fuerza de Compresión (N/mm)		Fuerza de Adhesión (-N/mm)		L*	H°
	Base A	Base B	Base A	Base B		
Sin fibra	0,62 ^a □ 0,02	1,16 ^a □ 0,05	0,22 ^a □ 0,04	0,45 ^a □ 0,07	97,18 ^a □ 0,20	86,61 ^a □ 1,17
Bambú	0,65 ^a □ 0,03	1,32 ^a □ 0,05	0,21 ^a □ 0,02	0,49 ^a □ 0,04	97,83 ^b □ 0,15	82,80 ^b □ 1,69
Inulina	0,59 ^a □ 0,02	1,25 ^a □ 0,05	0,18 ^b □ 0,02	0,44 ^a □ 0,06	96,09 ^c □ 0,05	89,15 ^a □ 1,13
Manzana	0,83 ^b □ 0,03	1,22 ^a □ 0,03	0,33 ^c □ 0,02	0,52 ^a □ 0,03	80,13 ^d □ 0,15	58,50 ^d □ 0,45
Psyllium	1,12 ^b □ 0,02	1,52 ^b □ 0,13	0,28 ^c □ 0,04	0,42 ^a □ 0,03	96,96 ^e □ 0,50	68,57 ^c □ 2,03
Quitosano	0,43 ^c □ 0,02	0,62 ^c □ 0,01	0,14 ^b □ 0,02	0,23 ^c □ 0,02	95,96 ^c □ 0,32	76,28 ^e □ 1,76
Trigo	0,65 ^a □ 0,07	1,45 ^b □ 0,03	0,23 ^a □ 0,03	0,56 ^b □ 0,02	97,19 ^a □ 0,08	69,85 ^c □ 4,39

Según el gráfico radial de la Figura 2-a para la base A, la fibra dietaria provoca una disminución en la valoración de todos los atributos en el análisis sensorial. Para la apariencia, el postre sin fibra no tenía DS con los postres con fibra de bambú, manzana, trigo e inulina; pero variaba con los postres con fibra de *Psyllium* y quitosano. El sabor, la textura y la preferencia global de los postres sin fibra y con quitosano presentaron DS con respecto a los demás postres. La base B (Figura 2-b) obtuvo mejor puntuación que la base A para todos los atributos. Los postres con base B y con fibra de manzana y *Psyllium* mostraron valoraciones significativamente más bajas para todos los atributos. No se utilizó quitosano ya que obtuvo con la base A una valoración muy pobre.

CONCLUSIONES

Las formulaciones con la base B sin fibra o con inulina, trigo o bambú no presentaron DS entre ellas y mostraron similares resultados por ambos métodos. Se descartó el quitosano ya que disminuyó significativamente los parámetros de textura y la valoración sensorial. La fibra de manzana podría ser utilizada en postres con colorantes y saborizantes adecuados.

Figura 2 - Valoración de los atributos sensoriales para **a)** postres base A y **b)** postres base B sin fibra (—) y con inulina (- · -), bambú (- - ·), manzana (———), trigo (- - -), quitosano (.....) y *Psyllium plantago* (— · · — · ·)



BIBLIOGRAFÍA

- **Foegeding E. A., Brown, J., Drake, M. A. y Daubert, C. R. (2003)**. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal* 13, pag: 585-591.
- Meilgaard, M. M., Civille, G. V. y Carr, T. (1999)**. Descriptive analysis techniques. In: *Sensory evaluation techniques (3rd ed)*. New York, NY: CRC Press.
- **Pupponen-Pimiä, R., Aura, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., Myllärinen, P., Saarela, M., Mattila Sandholm, T. y Poutanen K. (2002)**. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology* 13, pag: 3-11.
- **Sloan, A. E. (1999)**. The new market: foods for the not-so-healthy. *Food technology*, Vol. 53, N° 2, pag: 54-60.
- **Stone, H. y Sidel, J. L. (1985)**. *Sensory Evaluation Practices*, capítulo 7. Academic Press, Florida, USA.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLISACÁRIDO AISLADO DE GRÁNULOS DE KEFIR

MEDRANO, Micaela^{1,2}; RIMADA, Pablo S.²; PÉREZ, Pablo F.^{1,2,3}; ABRAHAM, Analía G.^{1,2,3}

¹CONICET; ²CIDCA; ³Fac. de Ciencias Exactas, UNLP
CIDCA (UNLP-CONICET) Calle 47 y 117, La Plata (1900), Argentina
Tel/Fax: 54 0221 424 9287
aga@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

El kefiran es un exopolisacárido producido por gránulos de kefir o por microorganismos aislados de éstos. Con el objetivo de evaluar su potencialidad como aditivo funcional en alimentos, se caracterizó su contribución a las propiedades reológicas de geles lácteos y su capacidad de disminuir la citotoxicidad de sobrenadantes de cultivo de *Bacillus cereus*. Se encontró que está compuesto por glucosa y galactosa (1:1), y que su peso molecular es del orden de 10^7 Da. El agregado de kefiran incrementó la viscosidad de geles lácteos, así como los módulos elástico G' y viscoso G'' . Redujo la citotoxicidad de los sobrenadantes sobre enterocitos y eritrocitos. Estos resultados demuestran una potencial nueva aplicación del kefiran como aditivo funcional, ya que mejora las características de textura de los productos fermentados y podría intervenir en la modulación de efectos adversos de microorganismos patógenos a nivel intestinal.

Palabras Claves: kefiran, exopolisacáridos bacterianos, geles lácteos, *Bacillus cereus*, alimentos funcionales

ABSTRACT

Kefiran is an exopolysaccharide produced by kefir grains or by microorganisms isolated from them. The aim of the present work was to study the potential of kefiran as a functional food-grade ingredient. The effects of EPS concentration on rheological properties of the glucono- δ -lactone -induced gels were evaluated. Technological aspects as well as the role of kefiran in the interactions between *Bacillus cereus* and intestinal epithelial cells were studied. Kefiran obtained from grains contains equal amounts of glucose and galactose, and has a molecular weight of 10^7 Da. The storage modulus G' and the viscous modulus G'' of gels increased with increase of EPS concentration. A protective effect against

B.cereus toxigenic factors was observed in a decrease in percent of haemolysis and detaching cell activity in the presence of EPS. The results of the present work shows that kefir obtained from grains improve texture of milk gels and plays a protective role against *B.cereus* virulence factors giving a new insight on the functional properties of kefir.

INTRODUCCIÓN

Los polisacáridos de alto peso molecular se utilizan en la industria alimentaria como agentes espesantes, gelificantes, capaces de estabilizar espumas, controlar la cristalización, inhibir la sinéresis y formar films. La mayoría de los espesantes utilizados son de origen vegetal, no aportan todas las características requeridas y deben modificarse químicamente para mejorar sus propiedades reológicas. Una fuente alternativa de polisacáridos espesantes la constituyen los polisacáridos microbianos (De Vuyst y col., 1999), que son producidos por muchos microorganismos con status GRAS (Generally Recognized As Safe) como son las bacterias lácticas.

El kefirán es un glucogalactano ramificado, hidrosoluble, producido por la flora microbiana presente en los gránulos de kefir, compuesta por bacterias lácticas, acéticas y levaduras. El kefirán es liberado al medio de cultivo alcanzando valores de 218 mg/L en leche y 247 mg/L en suero (Rimada y Abraham, 2003). Estos valores varían de acuerdo a las condiciones de fermentación (Garrote y col., 1998). El contenido de EPS retenido en los gránulos es de alrededor de 8 gr cada 100 gr de gránulo (Abraham y De Antoni, 1999). Los gránulos de kefir aumentan su biomasa a través de los sucesivos repiques (Rimada y Abraham, 2001).

Bacillus cereus es un microorganismo Gram (+) cuyo hábitat primario es el suelo; sin embargo, debido a la resistencia de sus esporas y a su velocidad de crecimiento, es un contaminante frecuente en alimentos, y es capaz de producir en el hombre dos tipos de síndrome: emético y diarreico. Se han descrito varios factores como citolisinas (Henderson y col., 1999; Alouf, 2000), fosfolipasas (Beecher y col., 2000) y hemolisinas (Agata y col., 1995; Lund y Granum, 1997; Beecher y col., 2000). Se ha estudiado la interacción de *B.cereus* con células de epitelio intestinal como otro factor de virulencia (Minnaard y col., 2004). Para estudiar el efecto de *B.cereus* en el contexto de la infección intestinal, se ha seleccionado un modelo de células provenientes de adenocarcinoma de colon como la línea celular Caco-2, las cuales poseen la capacidad de diferenciarse espontáneamente en cultivo, mostrando microvellosidades, uniones estrechas funcionales

y actividad enzimática asociada al ribete en cepillo, que semejan a las halladas en los enterocitos humanos (Pinto y col., 1983).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el kefirán aislado de gránulos para su potencial aplicación como aditivo funcional en alimentos, considerando dos aspectos: la mejora de las propiedades reológicas de productos fermentados y la modulación de la virulencia de un microorganismo esporulado a nivel intestinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de kefirán

Se trabajó con gránulos de kefir CIDCA AGK1, cultivados a 20°C en leche descremada UHT al 10 % peso/vol., cambiando el medio cada 48 h. Se sometieron a sucesivos pasos de disolución en agua caliente, precipitación con etanol helado y centrifugación (Rimada y Abraham, 2003). Finalmente, la solución se liofilizó. De este modo se obtuvo un EPS con un grado de pureza superior al 99 %. Se verificó ausencia de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976) y de lactosa por TLC. Se cuantificó el contenido de EPS por el método de Antrona (Southgate D.A.T., 1991). **Determinación de la composición química y el peso molecular**

Determinación de la composición química y el peso molecular

El EPS se hidrolizó con HCl 1.25 N, se sembró en placa de sílica gel con patrones de glucosa, lactosa y galactosa, usando n-propanol/ácido acético/agua como solvente de corrida. La placa se reveló con ácido p-amino benzoico y ácido o-fosforico en metanol (Zweig y Sherma, 1978). El peso molecular se determinó por HPLC de exclusión molecular (columna SHODEX OH pax modelo S-805HQ) asociado a un detector de índice de refracción. Para establecer la relación entre el tiempo de retención en la columna y el peso molecular se realizó una curva de calibración con patrones de dextrano de peso molecular conocido (R=0.98).

Preparación de geles lácteos ácidos químicamente y determinaciones reológicas

Se prepararon geles utilizando leche descremada UHT acidificada con δ -glucono-lactona 1% a la que se adicionaron diferentes concentraciones de kefirán (0, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L). Se incubaron 3 h. a 37°C y se conservaron 24 h. a 4°C. El pH de los geles fue de 4.6.

La viscosidad aparente (η app) de los geles fue medida en un Viscosímetro Haake Rotavisco RV2 con un sistema sensor NV a 25°C. Los geles se agitaron con varilla de vidrio antes de colocarse en el viscosímetro, el cual fue programando de manera que la

velocidad del rotor aumente de 0 a 700 s⁻¹ en 3 minutos. La η_{app} se midió a 300 s⁻¹ y fue expresada en milipascales x segundo (mPa.s).

Para determinar las características viscoelásticas de los geles se utilizó un reómetro Haake RheoStress 600 usando un sensor de platos paralelos con una separación de 1 mm. La temperatura se mantuvo en 25°C mediante un baño de agua circulante. Se determinaron los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en rango de frecuencias desde 0.0368 a 10.0 Hz. para la misma deformación (1%) dentro del rango de viscoelasticidad lineal.

Obtención de sobrenadantes de *B.cereus*

La cepa B10502 de *B.cereus* fue incubada en BHI adicionado con glucosa 0.1% durante 16 hs. a 32°C con agitación. El cultivo se centrifugó (10000 x g, 10 min.) y se filtró con membrana de 0.45 micrones a fin de eliminar las células.

Cultivo de enterocitos

Enterocitos de la línea Caco-2 (ATCC HTB-37) se cultivaron en placas de 24 fosas en DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) suplementado con aminoácidos no esenciales, antibiótico, antimicótico y suero fetal bovino (20% vol/vol). Se cultivaron en estufa a 37°C con atmósfera de 95% de CO₂. El medio se cambió cada 2 días. Los ensayos se realizaron con células en postconfluencia tardía (14 días en cultivo) a fin de obtener células diferenciadas. Se trabajó con enterocitos entre los pasajes 56 y 60.

Evaluación del efecto del kefirán sobre la actividad hemolítica y citotóxica de *B.cereus*

Se realizaron diluciones seriadas 1/3 del sobrenadante, se incubaron con soluciones de kefirán en PBS en concentraciones de 0, 500, 800 y 1000 mg/L y se agregaron glóbulos rojos humanos resuspendidos en PBS al 0.66% final. Las suspensiones se colocaron en cubetas individuales, se llevaron a 37°C y se tomaron medidas de la turbidez cada 10 minutos a 600 nm en espectrofotómetro, previa agitación.

La actividad citopática se midió evaluando el desprendimiento de los enterocitos al ser incubados durante 2 horas a 37°C con distintas diluciones del sobrenadante y kefirán en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS, y las que permanecieron adheridas se fijaron con formaldehído 2 %, se tiñeron con cristal violeta (20 min.), se lavaron, y se trataron con etanol al 50% durante 1 h. a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 650 nm para cuantificar el colorante extraído que resulta proporcional a la cantidad de células no desprendidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso molecular y composición química

La composición de azúcares del kefirán obtenido de gránulos de kefir CIDCA AGK1 analizada por TLC indicó una relación glucosa y galactosa 1:1 en concordancia con los resultados previamente descritos. Por cromatografía de exclusión se determinó que el peso molecular de este EPS presente en gránulos es del orden de 10^7 Da.

Efecto de la adición de kefirán en las propiedades reológicas de geles lácteos

La adición de 100 mg/L de kefirán aumentó significativamente la viscosidad aparente de los geles medida a 300s^{-1} , alcanzando el máximo valor con un agregado de 300mg/L. Adiciones mayores no provocaron aumento significativo en la viscosidad (Figura 1). Los geles obtenidos con concentraciones de kefirán superiores a 500 mg/L mostraron una marcada sinéresis, indicando inestabilidad del sistema, probablemente por depleción inducida por este polisacárido (Kleerebezem y col., 1999).

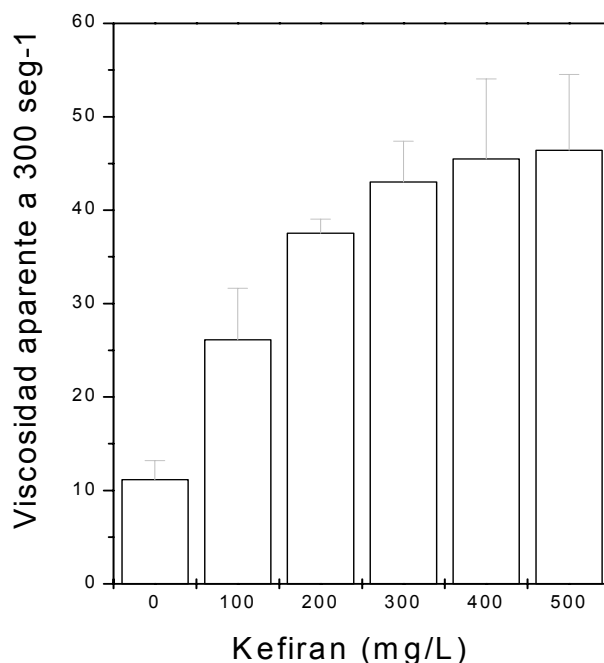


Figura 1: Viscosidad aparente a 300 s^{-1} de geles lácteos acidificados artificialmente con δ -glucono-lactona, preparados con distintas concentraciones de kefirán.

Una adición de 300 mg/L de kefiran provocó en los geles un aumento del módulo de almacenamiento G' y del módulo viscoso G'' (Figura 2). Este incremento podría ser atribuido a la interacción entre el kefiran y los constituyentes de la leche. En sistemas lácteos la interacción entre proteínas y polisacáridos puede ser segregativa (depleción) o asociativa (Kleerebezem y col., 1999). En un sistema asociativo el EPS tendería a adsorberse a la superficie de las proteínas conduciendo a la formación de puentes entre éstas, lo que se manifiesta en un incremento de G' . En un sistema segregativo el incremento en G' puede ser explicado debido a que el polisacárido puede inducir interacciones proteína-proteína (Hassan y col., 2003). En nuestro caso la segunda opción sería la más probable dado que al aumentar la concentración de EPS aumenta la sinéresis.

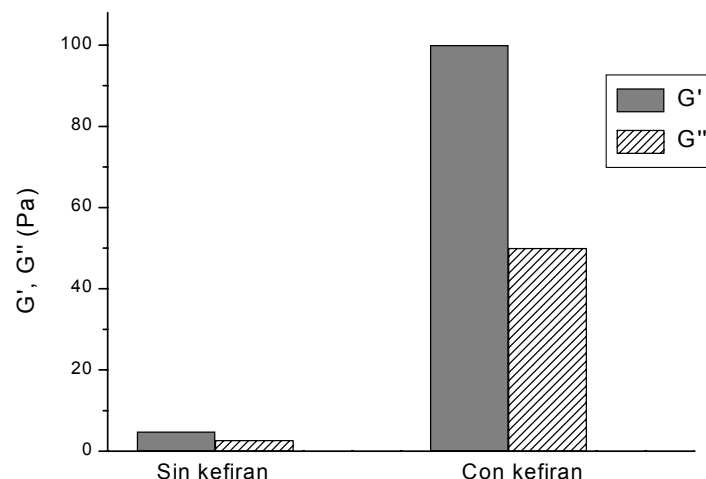


Figura 2: Módulo elástico G' \square y módulo viscoso G'' \square de los geles preparados sin kefiran y con 300 mg/L de kefiran a una frecuencia de 1 Hz.

Efecto del kefiran sobre la actividad biológica de los sobrenadantes de *B.cereus*

La virulencia de *B.cereus* está, en parte, relacionada con su capacidad de sintetizar factores exocelulares capaces de causar en los enterocitos en cultivo cambios drásticos como desorganización del citoesqueleto, desprendimiento de las células al sustrato, pérdida de microvellosidades, pérdida de actividad enzimática y necrosis.

En eritrocitos, causan la lisis. Todos estos eventos tienen un efecto cepa-dependiente (Minnaard y col. 2001). Los resultados obtenidos con sobrenadantes la cepa B10502 de

B.cereus incubados con eritrocitos provocaron diferentes títulos de hemólisis según la concentración de los mismos, y el tiempo de incubación.

Para concentraciones de toxina bajas (1/384) la presencia de kefiran disminuyó el grado de hemólisis a observándose un efecto dosis respuesta (Figura 3). Este efecto se observó tanto a tiempo 0 como en el transcurso de la cinética.

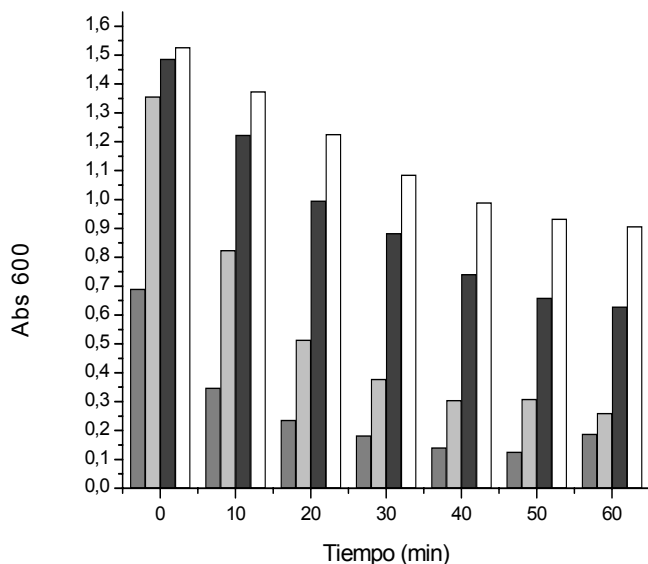


Figura 3: Cinética de hemólisis producida por sobrenadantes de cultivo de la cepa B10502 de *B.cereus* (dilución 1/384) en ausencia de kefiran □, con el agregado de 500 mg/L ■, 800 mg/L ■ y 1000 mg/L ■ de kefiran. La hemólisis se cuantificó mediante la lectura de la Abs. a 600 nm (turbidez). Valores bajos de turbidez representan mayor porcentaje de lisis, mientras que valores altos indican mayor cantidad de eritrocitos sin lisar.

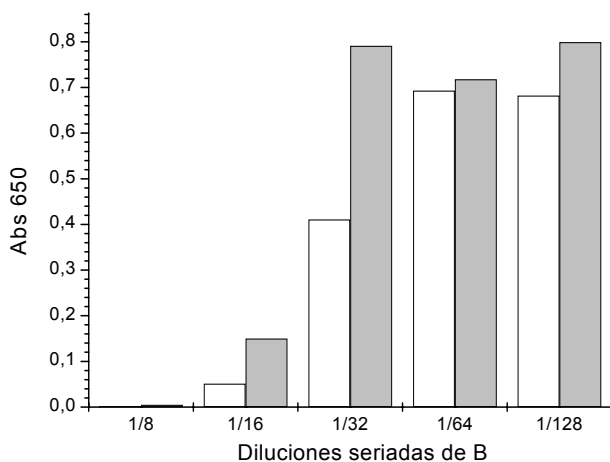


Figura 4: Desprendimiento de células Caco-2 por acción de sobrenadantes de cultivo de la cepa B10502 de *B.cereus* a distintas diluciones en ausencia □ y con 800 mg/L de kefirán ■. La cantidad de células que permanecieron adheridas al la cubeta se cuantificó mediante la tinción con cristal violeta y lectura de Abs. a 650nm.

En concentraciones altas de toxina, modificó la cinética, observándose menor porcentaje de hemólisis a tiempos cortos de incubación con respecto a los controles sin kefirán.

La acción de los sobrenadantes de la cepa B10502 de *B.cereus* sobre enterocitos se muestra en la Figura 4. Cuando las monocapas de enterocitos fueron incubadas con los sobrenadantes durante 2 horas, se observó desprendimiento de las células hasta una dilución 1/64. La presencia de kefirán disminuyó el título de desprendimiento con respecto a las células tratadas con toxina. Cuando se utilizaron diferentes concentraciones de kefirán pudo observarse un efecto dosis respuesta de la actividad protectora.

El kefirán podría estar modulando la acción de estas toxinas, neutralizando su acción y/o interfiriendo en su interacción con las células.

Su composición química hace que sea de esperar que ciertos receptores de la superficie celular puedan interaccionar con el mismo para desencadenar respuestas o modificar las surgidas de otras interacciones, ya que sustancias con restos glucídicos son capaces de competir por los sitios de unión de estructuras asociadas a la virulencia de distintos microorganismos (Henderson y col., 1999).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha demostrado que el polisacárido de kefir obtenido a partir de gránulos, en concentraciones de 300 a 1000 mg/L, causa una reducción de la citotoxicidad provocada por sobrenadantes de cultivo de *B.cereus*, disminuyendo el desprendimiento celular y la lisis de glóbulos rojos, observándose en ambos casos un efecto dosis respuesta.

Por otro lado, el kefirán mejora las propiedades reológicas de geles lácteos, observándose un aumento de la viscosidad aparente haciéndolo adecuado para su uso como agente espesante en yogures batidos.

Su potencial aplicación en yogures firmes se manifiesta por un aumento en las características viscoelásticas determinadas por un incremento en los módulos elástico y viscoso.

De acuerdo a los resultados observados se concluye que este polisacárido tiene potencialidad para ser utilizado en la industria como aditivo funcional ya que mejora las

propiedades reológicas de geles lácteos, interviene en la modulación de efectos adversos provocados por microorganismos patógenos a nivel intestinal, con el beneficio adicional de ser sintetizado por microorganismos GRAS.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham A. G., De Antoni G. 1999.** Journal of Dairy Research 66: 327-333
- Agata, N.; Ohta, M.; Mori, M., Isobe, M. 1995. FEMS Microbiology Letters 129: 17-20.
- Alouf, J.E. 2000.** Bacterial protein toxins, p. 1-26. *In* O.Holst (ed.), Bacterial toxins. Methods and protocols, vol. 145. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, N.J.
- Beecher, D. J.; Olsen, T. W.; Somers, E. B., Wong, A. C. L. 2000.** Infection and Immunity 68: 5269-5276.
- Bradford, M., 1976.** Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- de Vuyst, L., Degeest, B. 1999. FEMS Microbiology Reviews 23: 153-177
- Garrote, G., Abraham, A., De Antoni, G. 1998.** J. Dairy Research 65: 149-154
- Garrote, G., Abraham, A., De Antoni, G. 2000.** J Food Prot. 63 (3): 364-369
- Hassan, A.N., Ipsen, R., Janzen, T., Qvist, K., 2003.** Journal of Dairy Science 86: 1632-1638.
- Henderson, B.; Wilson, M.; McNab, R., Lax, A. J. 1999.** Bacterial protein toxins. Chapter 7 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed. John Wiley & Sons. UK.
- Kleerebezem, M., van Kranenburg, R., Tunier, R., Bolees, I., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J. , de Vos, W. 1999.** Antonie van Leeuwenhoek 76: 357-365.
- Lund, T. , Granum, P. E. 1997.** Microbiology. 143: 3329-3336.
- Minnaard, J.; Humen, M. A. , Pérez, P. F. 2001.** J Food Prot. 64:1535-41.
- Minnaard, J.; Lievin-Le Moal, V. ; Coconnier, M-H.; Servin, A. L., Pérez, P. F., 2004.** Infect Immun. 72:3106-12.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. 1983.** Biol.Cell. 47: 323-330.
- Rimada P., Abraham A. 2001.** Journal of Dairy Research 68: 653-661
- Rimada P., Abraham A. 2003.** Le Lait 83: 79-87
- Rimada P., Abraham A. 2005.** International Dairy Journal (en prensa)

Southgate D.A.T., 1991. Selected methods, in: Southgate D.A.T. (Ed.), Determination of Food carbohydrates, Elsevier, Applied Science, London, UK, pp. 99-144.

Zweig, G., Sherma, J. 1978. Handbook series in chromatography, section A: general data and principles volume II, pp. 124-130. Florida, USA: CRC Press, Inc.

GALLETAS CON AGREGADO DE FRUCTANOS, VITAMINAS Y MINERALES

WITTIG DE PENNA Emma (1); HECHENLEITNER Mélica (1); SOTO Delia (1); VILLARROEL Mario (2); GARRIDO Fernando (3); SANTAMARÍA Alicia (4); ZULETA Ángela (5)

(1) Facultad de Ciencia de Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. ewitting@uchile.cl. (2) Departamento de Agroindustrias. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile. (3) Escuela de Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. (4) Laboratorios ORDESA, Barcelona, España. (5) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

El objetivo fue formular y desarrollar galletas para el adulto mayor con vitaminas, minerales y fructanos, reemplazando la sacarosa por sucralosa. La variable respuesta en la optimización, se obtuvo mediante análisis sensorial (panel altamente entrenado y test de calidad de Karlsruhe). La galleta optimizada contiene 5,27% de inulina y 3,52% de oligofruktosa, 42,74% de harina y 8,54% de margarina, con 30% del IDR de vitaminas y entre 10 y 20% del IDR de minerales. La aceptabilidad (con adultos mayores y escala hedónica) fue buena, entre 96 y 99% para las 6 repeticiones realizadas. Los adultos mayores prefirieron la galleta con 0,013% de sucralosa. El estudio de vida útil consideró controles microbiológicos, sensoriales, instrumentales y determinaciones de aw e índice de peróxidos, correspondiendo a 90 días a 25 ° C. La prefactibilidad técnico- económica del proyecto de elaboración y comercialización del producto desarrollado indicó que es un proyecto rentable.

Palabras clave: galleta funcional, adulto mayor, fructanos, sucralosa, optimización, vida útil

ABSTRACT

The objective of the study was the formulation and development of cookies for the elderly. In the product, sucrose was replaced by sucralose and vitamins, minerals and fructans were added. In the optimization process, the response variable was obtained by sensory analysis. A highly trained panel carried out the Karlsruhe quality test. The optimized cookie contains 5,27% inulin, 3,52% oligofruktose, 42,74% flour, 8,54% margarine, and supply the 30% of the vitamin DRI and the 10 - 20% of the mineral DRI. The acceptability determined by the elderly using the hedonic scale, was good. Results between 96% and

99% for the 6 trials carried out, were obtained. The elderly consumers preferred the cookie containing 0.013% sucralose. Through microbiological, sensory and instrumental controls, and analyzing water activity and peroxide index, a shelf life of 90 days at 25°C was established. According to the technical and economical feasibility, the project of elaboration and commercialization of the product was rentable

INTRODUCCION

En Chile los cambios sociodemográficos produjeron modificaciones en el tamaño y en la composición etaria de la población, produciéndose un transitar del país hacia el envejecimiento demográfico de su población (INE, 1999). El envejecimiento está asociado a factores relacionados con el estilo de vida, incluyendo las prácticas dietéticas, en que se reflejan los patrones alimentarios tradicionales. La alimentación para una persona anciana en buen estado de salud no difiere significativamente de la del adulto más joven. Sin embargo, la frecuente existencia de diversas alteraciones metabólicas y funcionales hace necesario efectuar algunas adaptaciones en cuanto al suministro y prácticas dietéticas. El objetivo de la dietoterapia en el senescente debe ser mantener o recuperar el estado nutricional normal por lo que la buena nutrición del anciano dependerá de una ingesta de nutrientes adecuada a sus necesidades reales. (Soto y col., 1996). Es de importancia considerar la pérdida de la sensibilidad gustativa y olfativa que reduce la capacidad de distinción de las características propias de los alimentos, lo cual conduce a un rechazo del alimento o a una excesiva condimentación. El sabor dulce es el que mejor se percibe y el que más perdura existiendo una notoria diferencia entre la población joven y anciana para la percepción de los gustos ácido y salado. Estudios anteriores han revelado el escaso consumo de fibra, vitaminas y minerales como parte de la alimentación del adulto mayor Soto y col, 1996), lo que habitualmente ha sido tratado administrando fórmulas farmacéuticas. Nuestra propuesta es ofrecer alimentos funcionales especialmente diseñados para el adulto mayor, dentro de ellos sopas crema, pan, postres instantáneos, helados, etc. Continuado con esta línea de trabajo se presenta el desarrollo de galletas de miel enriquecidas con fructanos, vitaminas y minerales, y sucralosa como edulcorante

MATERIALES Y METODOS

Las materias primas empleadas en las formulaciones fueron: harina (Molinera San Cristóbal), margarina con leche (Dorina), sucralosa (Quimatic), bicarbonato de sodio (IBC S. A.), clavos de olor (IBC S. A.), miel de abejas (Agromiel), oligofruktosa (Orafti), inulina

(Orafti) leche descremada (Nestlé). Como envase se usó un film bilaminado (espesor 65 μm , capa interna de polietileno de baja densidad y capa externa de polipropileno)

Elección de la formulación base de galleta de miel: Las distintas alternativas de galletas de miel fueron evaluadas por 30 consumidores, ordenándolas según preferencia de sabor y textura. **Dulzor relativo de sucralosa:** Se usó el método de comparaciones pareadas frente a una solución 8% de sacarosa (Wittig de Penna, 1981). **Incorporación de vitaminas y minerales:** Se estableció en 30% de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) (NAS, 2002) sobre-dosificado según referencias (Roche) y Etiquetado Nutricional de Alimentos. Mediante tests triangulares se verificó que estas concentraciones no produjeran modificaciones de las características sensoriales.. Participaron 10 jueces entrenados, que realizaron 2 repeticiones para vitaminas y 2 repeticiones para minerales. Los datos fueron analizados por chi cuadrado. **Diseño Experimental.** Para la optimización de las formulaciones se aplicó un diseño factorial central compuesto $2^3+\alpha$. Las variables independientes fueron: fibra (inulina + oligofruktosa), margarina y harina, con 2 niveles cada variable. Las variables dependientes (ponderadas) fueron: color (0,1), forma (0,2), olor (0,1), sabor (0,25), textura (0,35) y calidad total (calculada). Se realizaron 15 corridas experimentales y 5 repeticiones del punto central .Para definir los límites de las concentraciones a ensayar, se consideró el manejo de la masa cruda y las características texturales de la galleta horneada. Los resultados se evaluaron por ANOVA de dos vías (jueces y muestras) y test de comparaciones múltiples de Duncan (Statgraphics Plus 4.0). **Caracterización de la formulación optimizada:** Se realizaron determinaciones de dureza (Lloyd), midiendo la fuerza máxima de penetración (punto de quiebre), la máxima fuerza de flexión (quiebre de 3 puntos) y la fuerza máxima de cizalla, con una celda de carga de 500-5000 N conectadas a un registrador para análisis de datos (Dapmat 40- 0465, 3.05). **Índice de peróxidos:** Se hizo al comienzo y al final del estudio (AOAC, 1996). **Análisis proximal:** Se determinó: humedad, proteínas, materia grasa, fibra cruda, cenizas y ENN (AOAC, 1996). **Análisis de vitaminas y minerales:** La vitamina C por valoración colorimétrica (AOAC, 1996), las demás vitaminas fueron determinadas por HPLC, A, E y B₃ (AOAC, 2000) y B1, B2, B6 por el método oficial francés. Los minerales se determinaron por espectroscopia de absorción atómica, previa hidrólisis parcial con HCl. **Actividad de agua (aw).** Se midió a 25° C (higrómetro Novasina). **Determinación de inulina y oligofruktosa:** Se usó HPLC previa extracción con agua caliente (Zuleta y Sambucetti, 2001). **Estudio de vida útil:** Se realizó con el producto optimizado envasado en bolsas bilaminadas, en condiciones ambientales (20-

25° C y 50-65% HR), Los controles microbiológicos se hicieron los días 0, 30, 60 y 90; controles de textura instrumental, los días 45, 75 y 105, y de actividad de agua los días 10, 60 y 105. Los controles sensoriales se realizaron los días 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90. Se utilizó un panel entrenado de 10 jueces que evaluaron calidad con el test de Karlsruhe. (Wittig de Penna, 1981). Los datos se analizaron por ANOVA y Duncan (Statgraphic Plus 4,0). **Aceptabilidad durante la vida útil:** Se hizo con un grupo de 40 adultos mayores de centros dependientes de municipios, empleando escala hedónica de 5 puntos. **Control microbiológico:** Según normas nacionales (MINSAL 2000). **Evaluación Sensorial:** Con la escala de Karlsruhe se evaluaron los parámetros color, forma, olor, sabor y textura. La calidad total se calculó como la sumatoria de los parámetros ponderados. **Preferencia entre dos intensidades de dulzor:** Se trabajó con 80 individuos de ambos sexos y test de Comparaciones Pareadas Preferencia. Se entregaron 2 galletas elaboradas con diferente concentración de sucralosa (0,024% y 0,010% en base a harina), Los datos se analizaron por Tablas y por χ^2 (Wittig de Penna, 1981) **Estudio de prefactibilidad técnico-económica:** Se calcularon los indicadores TIR y VAN para determinar la rentabilidad de la elaboración a escala industrial y su comercialización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La formulación base seleccionada correspondió a: harina (100%), miel (53,07), sacarosa (13,27), margarina (13,27), manteca hidrogenada (2,12), leche en polvo 1,06), agua (10,61), bicarbonato de sodio (1,06), clavos de olor (0,01). El dulzor relativo de la sucralosa correspondió a 481,93. Al sustituir el 100% de la sacarosa se incorporó 0,053% de sucralosa.

Una vez realizados los tests triangulares para vitaminas y minerales, las concentraciones equivalentes al 30% del IDR que no modificaban las características organolépticas de las galletas incluyendo los valores de sobredosificación fueron: A (8,84 ug ER), B₁ (1,01mg), B₂ (1,32 mg), niacina (13,23 mg EN), B₆ (1,51mg), B₁₂ (0,67 ug), C (29,98 mg), D₃ (1,41ug cole-calciferol), E (41,94 mg α -TE), ácido fólico (0,10 ug), Ca (85,53 mg), Fe (1,23 mg), Zn (12,35 mg), Mg (0,89 mg)

En la Tabla 1 se presentan los resultados de evaluación sensorial de las formulaciones del diseño experimental. Se observa que en general los puntajes promedio están sobre 6.0 que corresponde a una calidad satisfactoria. Al utilizar el criterio de selección basado en favorecer aquellas formulaciones de mejor calidad sensorial, se escogieron las 4 formulaciones que alcanzaron puntaje 8 o superior a lo menos en uno de los parámetros

de calidad y que los otros atributos sensoriales no fueran inferiores al puntaje 7, correspondiente a galletas típicas. Con las 4 formulaciones se realizaron tests de ordenamiento preferencia con adultos, obteniéndose preferencias significativas entre las muestras. (Tabla 2).

Tabla 2: Selección de la formulación optimizada por preferencia

Consumidores	n	(1) Ordenamiento para preferencia (mismo trazo indica iguales preferencias)	(2) Pareado preferencia $H_0: F_{12} = F_{20}$ valores de χ^2
Adultos	35	$F_{12} \quad \underline{F_{20}} \quad \underline{F_7} \quad \underline{F_3}$	
Adultos Mayores	50	$\underline{F_{12}} \quad \underline{F_{20}} \quad \underline{F_7} \quad \underline{F_3}$	
Adultos totales	85	$F_{12} \quad F_{20} \quad \underline{F_7} \quad \underline{F_3}$	4,706 * F_{12} es preferido al 0,05 % de significación

Al realizar las comparaciones de promedios se obtuvo que la formulación preferida fue F_{12} ($p= 0,05$) cuya fórmula en base a harina 100% es: miel (45,66), bicarbonato de sodio (0,91), sucralosa (0,02), leche en polvo (0,91), agua (9,13), clavos de olor (0,01), harina (100%), margarina (15,59), inulina (15,59), oligofruktosa 812,05), premix vitaminas (0,30), premix minerales (2,8). Los análisis de la galleta optimizada comprueban su buena calidad nutricional. (Tabla 3).

En la Tabla 4 se resumen los controles de vida útil, que confieren 90 días de duración al producto. El análisis de prefactibilidad demostró que es un proyecto altamente rentable (Tabla 5).

CONCLUSIONES

Es técnicamente factible elaborar galletas de miel para el adulto mayor,. adicionadas de 5,27% de inulina, 3,52% de fructo oligosacáridos y 8,54% de materia grasa, con 30% del IDR de vitaminas y entre 10 y 20% del IDR de minerales, y 0,013% de sucralosa en reemplazo de la sacarosa. La aceptabilidad de la galleta alcanzó entre 96 y 99%. La vida útil de 10 unidades del producto envasado en film bilaminado (capa interna de polietileno

de baja densidad y capa externa de polipropileno), a 25° C y 55-60 % H.R., señaló 90 días.

La prefactibilidad técnico-económica de la elaboración a escala industrial y comercialización del producto, según los estimadores económicos calculados VAN (19%) de \$174 185 660 (equivalentes a US\$ 290 311) y TIR (10%) de 104%, señalaron que el proyecto es rentable

Tabla 3: Controles de la formulación optimizada (F 12)

Parámetros químicos(%)	Valores experimentales
Humedad	10.7
Proteína	5.6
Materia grasa	7.8
Fibra cruda	< 0.1
Inulina	3,59
Cenizas	2.1
E. N. N.	74
Vitamina A (ug ER)	140
Tiamina (mg)	1.93
Riboflavina (mg)	2.06
Niacina (mg EN)	33.24
Piridoxina (mg)	1.68
C (mg)	26
D ₃ (ug cole-calciferol)	1.52
E (mg a-TE)	9.43
Calcio	249
Hierro	3.96
Magnesio	106.8
Zinc	9.32
Parámetros físicos	
Aw	0,539
Dureza (Quiebre en 3 puntos)	81,32 N/mm ²
Dureza (Penetración)	244.21 N/mm ²
Dureza (Cizalla)	1473.09 N/mm ²

Tabla 5: Pre factibilidad técnico-económica: Aspectos considerados para el cálculo de VAN y TIR

•	Producciones anuales : Año 1: 15 000 Kg, año 2: 22 320 Kg, año 3: 30 000 Kg	
•	Inversiones de activos fijos	
•	Capital de trabajo	
•	Costo total por paquete (elaboración + insumos + suministros + materias primas + gastos generales y administrativos + depreciación + amortización) -----	\$ 194
•	Precio de venta----- (sin IVA)-----	\$ 243
•	Ingresos	
•	Flujo de caja	
•	Ingresos y egresos proyectados a 10 años	
	TIR (10%)-----	\$. 104%
	VAN (19%) -----	\$174 185 660
	En US\$-----	290 311

BIBLIOGRAFÍA

AOAC Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington USA (1996)

INE. Instituto Nacional de Estadísticas. Chile y los adultos mayores: Impacto en la sociedad del 2000. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Santiago, Chile. (1999).

NAS. National Research Council. Food and Nutrition Board. National Academic Press, Washington USA (2002)

MINSAL Ministerio de Salud (2000) Reglamento Sanitario de Alimentos Chilenos.

Soto D, Cariaga L, Gaete M^a C Nutrición y Alimentación del anciano. En: Ruz M Araya H, Atalah E, Soto D. En: Nutrición y Salud. Universidad de Chile. Facultad de Medicina . Depto. Nutrición. Santiago, Chile (1996) 253-263.

Wittig de Penna. Evaluación sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. Talleres Gráficos USACH, Santiago, Chile. (1981). En línea: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/wittinge01/index.html

Zuleta A., Sambucetti ME. Inulin determination for labeling (Determinación de inulina para etiquetado). J. Agric. And Food Chem. (2001) 49, 4570-4572

Tabla 1: Puntajes de los parámetros sensoriales para las formulaciones de galletas de miel

Formulaciones	Variables independientes			Variables dependientes					
	Fibra	Margarina	Harina	Color	Forma	Olor	Sabor	Textura	Calidad Total
				Puntaje±ds	Puntaje±ds	Puntaje±ds	Puntaje±ds	Puntaje±ds	Puntaje±ds
F1	95	25	480	7.09 ±1.30	7.73 ±0.90	7.09 ±0.70	6.91 ±1.58	7.09 ±1.30	7.17 ±0.98
F2	125	25	480	7.36 ±1.12	7.73 ±1.01	7.27 ±1.27	7.55 ±0.69	7.64 ±0.92	7.57 ±0.68
F3	95	70	480	7.36 ±1.18	8.09 ±1.84	8.36 ±1.29	8.09 ±1.41	8.00 ±1.51	8.01 ±1.29
F4	125	70	480	7.64 ±1.03	7.45 ±1.29	7.45 ±0.82	7.64 ±0.67	7.18 ±1.25	7.42 ±0.63
F5	95	25	615	6.73 ±1.10	7.82 ±0.98	8.09 ±0.83	7.45 ±1.04	6.00 ±1.18	7.01 ±0.81
F6	125	25	615	7.00 ±0.67	7.00 ±0.83	7.45 ±0.50	7.00 ±1.04	6.55 ±1.10	6.89 ±0.70
F7	95	70	615	7.64 ±0.92	8.45 ±0.69	8.09 ±0.70	8.09 ±0.94	7.09 ±1.04	7.77 ±0.64
F8	125	70	615	8.00 ±1.18	7.64 ±1.03	7.64 ±1.12	7.64 ±0.92	7.91 ±0.70	7.77 ±0.50
F9	84.77	47.5	547.5	7.18 ±0.98	8.09 ±0.94	7.18 ±1.17	7.64 ±1.21	7.27 ±1.19	7.51 ±0.87
F10	135.23	47.5	547.5	7.18 ±1.66	7.73 ±1.01	7.18 ±0.60	6.82 ±1.54	6.73 ±1.42	7.04 ±1.03
F11	110	9.66	547.5	7.36 ±1.21	7.55 ±1.37	7.27 ±1.27	7.27 ±1.19	6.00 ±1.00	6.89 ±0.81
F12	110	85.35	547.5	7.36 ±0.50	8.00 ±0.77	8.27 ±0.79	8.00 ±0.77	7.55 ±0.69	7.80 ±0.51
F13	110	47.5	433.97	7.82 ±0.87	7.91 ±0.70	7.82 ±1.08	7.73 ±1.19	7.18 ±1.17	7.59 ±0.60
F14	110	47.5	661.04	7.00 ±1.00	8.00 ±0.89	7.91 ±1.04	7.55 ±1.13	5.91 ±0.70	7.05 ±0.70
F15	110	47.5	547.5	6.64 ±1.12	8.00 ±0.77	7.82 ±0.87	7.82 ±0.60	7.36 ±1.21	7.58 ±0.69
F16	110	47.5	547.5	8.09 ±0.70	8.00 ±1.00	7.27 ±0.90	7.18 ±0.98	7.36 ±1.21	7.51 ±0.69
F17	110	47.5	547.5	7.36 ±1.21	7.91 ±0.94	7.36 ±1.03	7.82 ±0.98	7.45 ±0.82	7.62 ±0.66
F18	110	47.5	547.5	7.55 ±1.04	8.00 ±0.89	7.36 ±1.12	7.09 ±1.30	7.82 ±0.98	7.60 ±0.78
F19	110	47.5	547.5	7.18 ±0.98	7.64 ±1.12	7.36 ±1.03	7.82 ±1.08	7.73 ±0.90	7.64 ±0.76
F20	110	47.5	547.5	7.45 ±1.37	8.09 ±0.70	7.91 ±1.04	8.00 ±0.89	7.27 ±0.90	7.70 ±0.62

Formulaciones en negrita pasan a la etapa de selección por preferencia

Tiempo (días)	<i>Parámetros sensoriales y calidad sensorial total</i>						Cal. Microbiológica Hongos/levaduras (ufc/g)	Otros valores	
	Color	Forma	Olor	Sabor	Textura	Cal. total		Dureza	l. peróxidos
0	8,00 ± 0,76	7,50 ± 0,53	8,25 ± 0,71	7,88 ± 0,35	6,75 ± 0,46	7,46 ± 0,36	ausencia	81,32 N/mm ²	1,6meq O ₂ / Kg
15	7,75 ± 0,62	7,63 ± 0,51	7,88 ± 0,68	7,88 ± 0,50	6,63 ± 0,48	7,38 ± 0,37	---	--	--
30	7,88 ± 0,61	7,63 ± 0,50	7,50 ± 0,74	7,75 ± 0,56	6,75 ± 0,46	7,36 ± 0,33	< 10 ³		--
45	7,50 ± 0,61	7,88 ± 0,48	7,75 ± 0,72	8,00 ± 0,55	6,75 ± 0,46	7,46 ± 0,32	---	90,4 N/mm ²	--
60	7,50 ± 0,60	7,50 ± 0,49	7,38 ± 0,78	7,63 ± 0,59	6,88 ± 0,54	7,30 ± 0,32	ausencia		--
75	7,63 ± 0,58	7,75 ± 0,48	7,63 ± 0,77	7,13 ± 0,62	6,38 ± 0,59	7,09 ± 0,35	---	69,0 N/mm ²	--
90	7,63 ± 0,57	7,50 ± 0,52	7,13 ± 0,78	7,00 ± 0,65	6,38 ± 0,59	6,96 ± 0,37	<10 ¹		--
105	7,75 ± 0,58	7,38 ± 0,53	7,13 ± 0,77	7,25 ± 0,66	6,13 ± 0,61	6,92 ± 0,39	---	86,49 N/mm ²	4,2meq O ₂ / Kg

Tabla 4: Controles realizados en el estudio de vida útil

“IOGURTE” DE SOJA ENRIQUECIDO COM VITAMINAS E MINERAIS PARA CONSUMO DE INDÍVIDUOS COM INTOLERÂNCIA À LACTOSE

MOREIRA, L. B. G.*; RODRIGUEZ, C. L.; CORDEIRO, C. ; SERRA, E. F.; TECHY, L.L. ; BUSNARDO, R. .

Departamento de Nutrição, Faculdade Evangélica do Paraná - FEPAR-PR, rua Padre Anchieta, 2770, CEP 80.730.000, Curitiba-Pr - Brasil.

*Profa. UNIGUAÇU: E-mail luziamoreira2002@yahoo.com.br ou Prof_luzia@uniguacu.edu.br
Fone:55-41-9193-56-49

RESUMEM

La intolerancia a la lactosa es una incapacidad para digerir dosis significativas de hidrato de carbono de la leche, debido a la deficiencia de una enzima llamada lactasa. Esta deficiencia ocurre en 58 millones de brasileños adultos (mayores de 15 años). (COSTA, 1999). El "yogur" de la soja es un producto fermentado que usa como base el extracto acuoso de soja (la leche de la soja). La leche normalmente tiene buena aceptabilidad, costo reducido y posee un elevado valor proteico. Este trabajo consistió en el desarrollo de un "yogur" de soja conteniendo extracto de soja, extracto de cebada, goma guar, lactato de calcio, maltodextrina, sacarosa, aroma, colorante, fermento lácteo, vitaminas y minerales. Se determinaron las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales básicas. Se obtuvo una comida de costo bajo y de buena aceptabilidad cuanto al sabor y olor, con apariencia agradable y con alto tenor de proteínas.

Palabras claves: "iogurte", soja, intolerância a lactose.

ABSTRACT

Intolerance to lactose is the incapacity to digest significant doses of milk carbohydrate, due to the deficiency of enzyme lactase. This deficiency occurs in 58 million adult Brazilians (15 years old and above). (Costa, 1999).

The soy extract, being lactose free, is a good example of functional food, supplying important nutrients, presented in the raw material from which it is done. The soy "yogurt" is a fermented product that uses the aqueous extract of soy (soy "milk") as the processing base. It usually has good acceptability, reduced costs and it holds a high value of protein.

This work consisted in developing a soy "yogurt " containing soy extract, barley extract, guar gum, lactato of calcium, maltodextrina, sucrose, perfuming, coloring, milky ferment, vitamins and minerals. The physiochemical and sensorial basic characteristics were also determined. A food of low cost and good acceptability was obtained, with flavor, odor and pleasant appearance, with high tenor of proteins.

Key-words: yogurt, soy, intolerance to the lactose

INTRODUÇÃO.

A intolerância à lactose é uma incapacidade para digerir doses significativas de carboidrato do leite, devido à deficiência da enzima lactase. Essa deficiência ocorre em 58 milhões de brasileiros adultos (maiores de 15 anos). (Costa, 1999).

A possibilidade do uso de alimentos funcionais nas áreas de nutrição e de alimentação é justificada pelo reconhecimento da relação saúde-nutrição-doença, assim como, dados de pesquisas clínicas e levantamentos epidemiológicos da evolução de conceitos relativos às recomendações nutricionais. Além dos fenômenos sócio-econômicos, epidemiológicos e perspectivas industriais.

Houve uma mudança nos conceitos referentes ao estabelecimento das necessidades e recomendações nutricionais. Passamos da idéia de nutrientes, prevenindo ou combatendo as “deficiências nutricionais”, chegando ao conceito de nutrientes – e outros compostos bioativos – para “promoção de saúde”. (Lajolo, 2001).

O extrato de soja, isento de lactose, é um bom exemplo de alimento funcional, fornecendo nutrientes importantes, presentes na matéria-prima a partir do qual é feito. Quando comparado ao leite de vaca, apresenta menor teor de gorduras totais; menor teor de gorduras saturadas; isento de colesterol; 3 vezes mais fibras; 10 vezes mais ferro; 10 vezes mais cobre; 75 % menos sódio; dobro de niacina e contém fitonutrientes que reduzem o risco de doenças do coração e câncer (Sears, 2003).

Um produto com essas características é o “iogurte” de soja, produto fermentado que utiliza como base de processamento o extrato aquoso de soja (“leite” de soja). Normalmente, tem boa aceitabilidade, custo reduzido e possui um elevado valor protéico. Além disso, desempenha um papel terapêutico na doença cardiovascular, previne câncer e osteoporose, assim como alivia os sintomas da menopausa. Apesar de ser uma bebida fermentada e, por essa razão, não utilizar leite, apenas extrato de soja, o produto recebe o nome de iogurte por ter as mesmas características e processos de fabricação da bebida Láctea. (Sears, 2003).

O "iogurte" de soja apresenta características nutricionais similares aos produtos fermentados tradicionais. Mas é deficiente, principalmente, em cálcio. O teor de cálcio no "iogurte" de soja pode ser aumentado através da adição de 600 mg/litro de cálcio elementar na forma de carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio (Umbelino et al.2001). Acrescentando também, um agente quelante para promoção da estabilidade da proteína de soja, visto que a adição de cálcio é particularmente difícil, pois as proteínas da soja são sensíveis e precipitam pela ação deste mineral (Yazici, F. 1997).

O processo de fabricação do iogurte tradicional utilizando-se de leite de vaca, envolvendo o uso de culturas simbióticas de *Lactobacillus delbruckii* ssp. *bulgariscus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus*. Esses elementos metabolizam o açúcar do leite, denominado lactose, e obtém como produto final o ácido láctico, responsável pelas alterações de sabor e textura do iogurte, pois abaixa o pH, que por sua vez, provoca desequilíbrio das micelas da caseína, precipitando um pH próximo de 4.6 – 4.7. Dessa forma, causará uma coagulação das proteínas do leite e formará um gel. As proteínas da soja presentes no extrato ("leite") de soja possuem uma boa capacidade de coagulação devido a sua capacidade de reter água e agir como um agente gelificante. Como o extrato de soja é isento de lactose, fonte de energia para a bactéria do ácido láctico (*Lactobacillus delbruckii* ssp. *Bulgariscus*), este é substituído pela adição de glicose ou dextrose, o qual será convertida em ácido láctico pela bactéria e promoverá a coagulação das proteínas da soja, conferindo características organolépticas específicas. Amidos modificados, caragena ou pectina são substâncias estabilizantes hidrocoloidais alternativas que previnem a separação do produto, aumentando a viscosidade e favorecendo a formação do gel, além de manter o flavor. (FSHN yo-so 1997).

Este trabalho consistiu-se no desenvolvimento de um "iogurte de soja", contendo extrato de soja fresco, goma guar, lactato de cálcio, glucose, sacarose, aromatizante, corante, fermento lácteo, vitaminas e minerais. Foram determinadas as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais básicas. Obteve-se um alimento de baixo custo e boa aceitabilidade, com sabor, odor e aparência agradáveis, contendo um alto teor de proteínas.

MATERIAIS E MÉTODOS.

O "iogurte" de soja foi elaborado com extrato de soja fresco, lactato de cálcio, de estabilizante (goma guar), lactobacilos, sacarose, glucose, mix de vitaminas, aromatizante, saborizante e corante.

O fluxograma do processo anexo descreve os procedimentos de fabricação, onde os ingredientes foram homogeneizados em liquidificador piloto, aquecidos a 45 graus celcius, e mantidos por 6 horas em iogurteira sem refrigeração. O aromatizante e o saborizante foram adicionados ao final da coagulação do produto e este foi embalado e mantido sob refrigeração para posteriores análises.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Bromatologia da Faculdade Evangélica do Paraná, em Curitiba. Foram determinadas as características físico-químicas e microbiológicas do produto. A composição centesimal (umidade, resíduo mineral fixo, lipídios e proteínas) foi efetuada segundo as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" (Instituto Adolfo Lutz, 1985), sendo os carboidratos calculados por diferença. O valor calórico foi calculado utilizando-se os seguintes fatores: nove para lipídios e quatro para proteínas e carboidratos (BRASIL, 1998a).

A determinação das fibras alimentares seguiu o método enzimático-gravimétrico da "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), modificado por Lee et al. (1992).

Realizaram-se análises sensoriais com um grupo de 18 pessoas, devidamente treinadas, as quais concluíram teste de "Perfil de Característica das Amostras" e "Método da Escala Hedônica" (variando de 0-9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas e bromatológicas estão listados na tabela 1, e os resultados do teste "Perfil de Características" estão na tabela 2.

A formulação do "iogurte" de soja apresentou aceitação pelos provadores, através dos testes sensoriais, ficando com média 8,7 para o teste de escala hedônica de nove pontos. Observa-se um produto, com bom teor de proteínas e isento de lactose, o que o torna adequado para consumo por indivíduos com intolerância a lactose. O valor calórico para 100 g do "iogurte" de soja é de 14,64 kcal o que demonstra mais um benefício do produto que pode ser consumido por pessoas com restrição calórica. As figuras 3 e 4 mostram a aparência do produto.

As principais dificuldades encontradas na elaboração do "iogurte" inicialmente estavam relacionadas à obtenção de um sabor agradável, a coagulação do extrato e a estabilidade do produto, problema estes que foram solucionados com a adição de um agente estabilizante (goma guar) e adequação do aromatizante .

Tabela 1: Análises Físico-Químicas E Microbiológicas Do Produto

AMOSTRA IOGURTE DE SOJA	“resultados em base seca”
Análise	
Umidade (%)	78,8
Proteínas (%)	9,6
Lipídeos (%)	traços
Fibras totais (%)	1,54
Carboidratos totais (%)	7,69
Cinzas (%)	2,37
Lactose	isento
PH	3,6
Coliformes totais NMP/g	Negativo
Coliformes fecais NMP/g	Negativo
Valor calórico (kcal/100g produto)	14,64

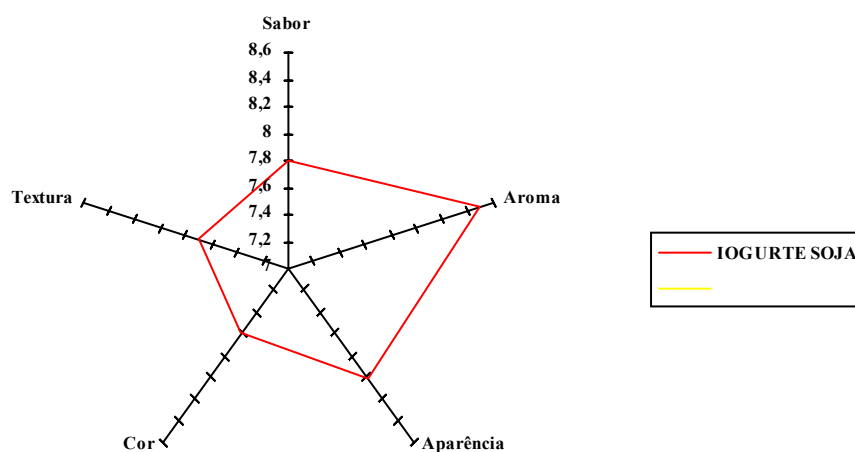


Figura 1: Teste Perfil De Características (Análise Sensorial)

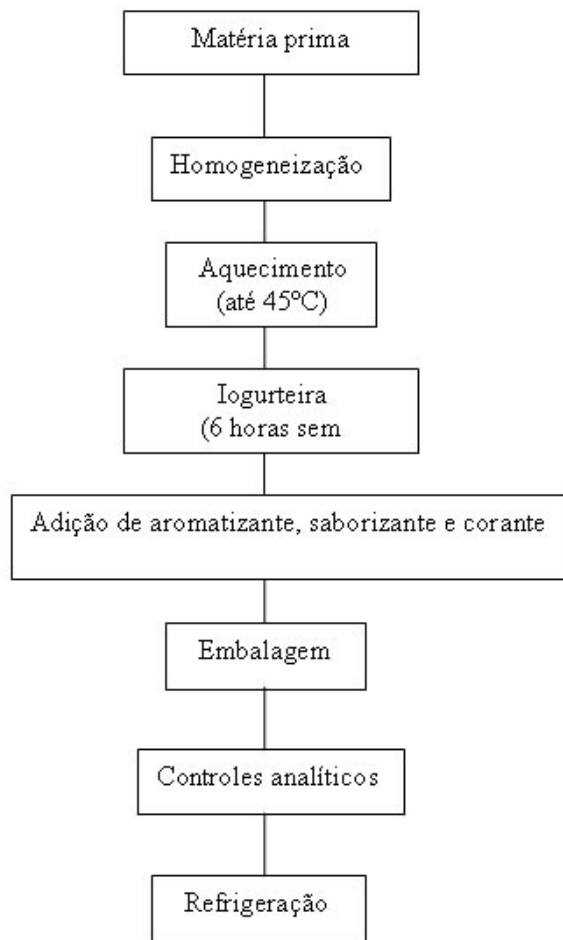
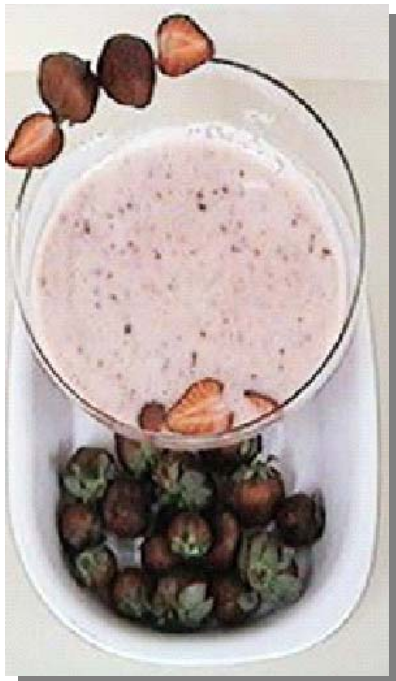


Figura 2: Fluxograma Do Processoamento



Figuras 3 E 4: Fotos Do Produto Final

CONCLUSÕES.

O processo utilizado, adaptado às técnicas disponíveis possibilitaram a produção adequada do iogurte de soja com características físico-químicas que confirmaram a ausência de lactose, alto teor protéico e pH menos ácido quando comparado aos iogurtes tradicionais, as microbiológicas mostraram adequadas condições do produto com ausência de coliformes totais e fecais e quanto ao aspecto sensorial apresentou boa aceitabilidade quanto ao sabor, aroma, aparência, cor, textura e consistência.

Embora a produção tenha sido em pequena escala, torna-se possível afirmar a viabilidade técnica para a elaboração do iogurte de soja.

BIBLIOGRAFIA

BRASIL, Leis, decretos, etc.- Portaria N 33/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 30 mar. 1998. Seç. 1, n. 60-E, p.5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR-Ingestão Diária Recomendado para as vitaminas, minerais e proteínas.1998a

COSTA, V. R. O 'Gosto amargo' do leite: NUTRIÇÃO. Deficiência de enzima que digere a lactose provoca intolerância à bebida em 37 milhões de brasileiros adultos. **Ciência Hoje**, São Paulo, n.152, ago., 1999.

GENERAL FORMULATIONS OF YO-SO. Disponível em:< www.fshn.uiuc.edu/courses/fshn399/general.process.htm>. Acesso em 30/07/2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v.1, p.21-24, 266.

JOY of soy. Disponível em: < www.askdrsears.com>. Acesso em 29/07/2004.

LAJOLO, F.M. Alimentos Funcionais: uma visão geral. In: DE ANGELIS, R.C. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia de nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas, São Paulo: Atheneu, 2001.

LEE, S. C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, Mês-TRIS Buffer: collaborative study. Journal of Association of Official Analytical Chemistry International, v.75, p.395-416, 1992.

MAGALHÃES, A.L. Iogurte. Como fabricar iogurte e bebida Láctea. Disponível em: <www.engetecno.com.br/tecnologia_iogurte.htm> Acesso em 30/07/2004.

UMBELINO D.C. et al. Aspectos tecnológicos e sensoriais do “iogurte” de soja enriquecido com cálcio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, n.3, set./dez., 2001.

YAZICI, F., ALVAREZ, V.B., HANSEN, P.M.T. Fermentation and properties of calcium-fortified soy milk. *J. Food Sci*, v. 62, p. 457-61, 1997.

AGRADECIMENTOS

Top Term (*Dr. Hans Henrik Knudsen*) (fornecimento dos lactobacillus e iogurteira),

Duas Rodas Industrial-SC (fornecimento de aromas, espessante)

Witmarsun-Pr (fornecimento de soja),

D'Vicz-Pr (fornecimento de corante).

BISCOITO ENRIQUECIDO COM MINERAIS OBTIDOS DE MIX DE FARINHAS (BABAÇU, COGUMELO AGARICUS BRAZILIENSES E CASCA DE OSTRAS), PROTEÍNAS E ÓLEO LÁURICO PARA O CONSUMO DE CRIANÇAS PORTADORAS DO VÍRUS HIV

Luzia B. G. MOREIRA², Ariane A. C. F. MONTEIRO¹, Michelly R. BERTIN¹, Priscila C. STEELE¹, Rosicler O. COUTINHO

¹Alunas do Curso de Nutrição da Faculdade Evangélica do Paraná. ²Professora do Curso de Nutrição da UNIGUAÇU E-mail:luziamoreira2002@yahoo.com.br ou fone:55-41-9193-56-49 Departamento de Nutrição, Faculdade Evangélica do Paraná - FEPAR-PR, rua Padre Anchieta, 2770, CEP 80.730.000, Curitiba-Pr - Brasil.

RESUMEN

Pesquisas apontam el babaçu como un excelente agente estimulador del sistema imunologico, aumentando las células de defensa del organismo (linfócitos CD4 e CD8) de los portadores del virus del la AIDS hasta uns nível comparable al del las personas sanas. El babaçu presenta calidades antivirales e antifungicas debido al su teor de acido laurico (50%) y acido caprico (6-7%). El acido laurico puede destruir virus revestidos con gorduras, como el herpes, citomegalovirus, influenza, y varias bacterias patogenicas incluyendo Listeria, monocitogenes, Heliobacter pylori y protozoários como la Giárdia lamblia. El acido caprico presenta efectos antivírais contra el HIV, herpes simplex y acciones antibacterianas contra la clamídia. Muchos de los organismos patogenicos, responsables por las infecciones oportunistas en personas portadoras del HIV, volverse inativos por estos lipideos antimicrobiais. Este trabajo se consituyo en el desarrollo en escala piloto, de un bizcocho, del tipo cookie, enriquecido con farinas alternativas (de mesocarpo Babaçu, produto residuale del champiñón Agaricus brazilienses y cáscara de ostra), bien como farina, farelo y copos de avena y albumina en polvo, a fin de enriquecimiento mineral y proteico con propiedades funcionais de protection del sistema imunologico. Fueron determinadas las características fisico-quimicas, microbiologicas y sensoriais classicas, evaluandose la composición y el valor nutricional del producto obtido. Conseguióse produzir un alimento con gusto agradable, con excelente textura, con teor de 13,9% de proteínas; 8,8% de lipides e 11,2% de umidad, lo que se resultó en una alternativa de bajo custo y alto valor nutricional con facil aceptación por los chicos portadores del virus HIV.

Palabras clave: babaçu, sistema inmunológico , portadores HIV

ABSTRACT

Research points babaçu as an excellent agent stimulant of the immune system, increasing the defense cells of the organism (lymphocytes CD4 e CD8) of carriers of the virus from AIDS until a comparable level to the individuals without the virus. Babaçu presents properties capsizes and antifungal given to its content of lauric acid (50%) and caprylic acid (6-7%). The lauric acid can destroy coated viruses of fats, as the HIV, herpes, cytomegalovirus, influenza, pneumonovirus some pathogenic bacteria would include listeria, monocitogenes and helicobacter pylori. The caprylic acid presents effect capsizes against HIV and antiviral effect against simplex herpes and effect antibacterial against clamídia. Many of the pathogenic organisms inactivated by these antimicrobial lipids are known by being responsible for opportunist infections in individuals with HIV virus. This work consisted of the development in scale pilot, of a biscuit like cookie, enriched with alternative flours (pulp of babaçu, by-product of the mushroom *Agaricus brazilienses*, rind of oyster), as well as flour, bran and oatmeal and albumen in dust, in order of mineral and proteic enrichment with functional properties of protection of the immune system. The characteristics had been determined physico-chemistries, microbiological and sensorias classic, evaluating themselves it composition and the nutritional value of the gotten product. It was obtained to produce a food of pleasant palate, with excellent texture, with a content of 13,9% of proteins; 8,8% of lipid and 11,2% of humidity, what it was an alternative of low cost and high nutritional value with easy acceptance of consumption for children with HIV virus.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas de saúde pública crescente nas duas ultimas décadas é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A AIDS foi identificada em 1981 e se caracteriza pela perda da imunidade celular, com a supressão dos linfócitos T₄ . A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) é uma doença infecciosa que ataca o sistema imunológico, debilitando o organismo e permitindo que algumas infecções oportunistas, causadas por vírus e bactérias, se instalem com facilidade. (MAHAN et al). No Brasil, as primeiras crianças com AIDS foram notificadas em 1984 e no final de 2003 somam mais de 959 casos em crianças de 05 a 12 anos, o que corresponde a 1,1% da população infectada pelo vírus HIV. Destes, mais de 65% das crianças adquirem a

infecção através da transmissão perinatal, que vem crescendo rapidamente nos últimos anos. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS)

O estado nutricional de crianças com infecção do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) tem um papel importante no seu estado funcional e sobrevivência com o passar do tempo. (WAITZBERG, L. DAN)

A AIDS é caracterizada por período prévio de longa latência e múltiplas manifestações clínicas, dependendo sobre tudo das complicações presentes. Em muitos casos, a moléstia precede sobre como uma doença degenerativa crônica progressiva grave, acompanhada por desnutrição durante sua evolução existe relação inversa entre sobrevivida dos pacientes com AIDS e perda de massa magra corpórea. A infecção por HIV pode causar desnutrição através de uma variedade de mecanismos, como invasão das células gliais no sistema nervoso central, levando a demência ou a neuropatia, que pode interferir com alimentação própria; pode haver também ataque direto do HIV sobre as células da mucosa intestinal (enteropatia), diminuindo a absorção de nutrientes. Ainda a ocorrência de múltiplas infecções oportunistas conduz a rápida depleção nutricional por aumentar as necessidades metabólicas simultaneamente à ingestão calórico-protéica por anorexia, disfagia e má absorção intestinal. (ROSS, A. C et al); (CARVALHO, S. et al)

Pesquisas apontam o óleo de babaçu como um excelente agente estimulante do sistema imunológico, aumentando as células de defesa do organismo (linfócitos CD4 e CD8) de portadores do vírus da AIDS até um nível comparável ao de indivíduos sãos. O babaçu é um óleo de propriedades antivirais e antifúngicas dado ao seu teor de ácido láurico(cerca de 50 %) e ácido cáprico(cerca de 6-7%). O teor de gorduras da farinha de babaçu é de cerca de 69 % . O ácido láurico é capaz de destruir vírus revestidos de gorduras , como o HIV, herpes, citomegalovírus, várias bactérias patogênicas incluindo listeria, monocitogenes, *Helicobacter pylori* e protozoários como a *Giardia lamblia* e o ácido cáprico apresenta efeitos antivirais contra HIV e herpes simplex e efeitos antibacteriais contra clamídia .

A **aveia** se caracteriza por ser um cereal de alta qualidade nutricional, rica em quantidade de proteínas e elevada concentração lipídica de ácido oléico e linoléico .O alto conteúdo de vitaminas também lhe confere propriedade antioxidante.É uma excelente fonte de fibras solúveis, em especial ,as gluconas.

O farinha do Cogumelo (**Agaricus brasiliensis**), é um produto altamente protéico obtido de ingredientes de baixo custo, por tratar-se de um subproduto obtido do rejeito de produção do cogumelo (bulbo inferior), o qual é desidratado e transformados em pó.

Devido ao seu valor nutricional e medicinal, destacam-se seus efeitos imunomoduladores e anti-tumorais, bem como sua ação na redução da glicose sanguínea e do colesterol. Os elevados teores de ergosterol, precursor da vitamina D, lhe conferem, ainda, atributos de importância no combate a enfermidades ósseas, como raquitismo e osteoporose.

A farinha da concha da ostra apresenta uma composição de 80 a 95% de carbonato de cálcio podendo ser utilizada como fonte de cálcio quando introduzido em formulações alimentícias.

A Sucralose é o único adoçante derivado do açúcar, sendo 600 vezes mais doce que o mesmo. Não é reconhecida pelo corpo como carboidrato, por isso não é metabolizado e não afeta a taxa de glicemia, podendo ser usada seguramente por diabéticos e indicada para alimentos infantis por evitar as cáries.

Este trabalho consistiu-se no desenvolvimento em escala piloto, de um biscoito tipo cookie, enriquecido com farinhas alternativas (de mesocarpo Babaçu, de subproduto do cogumelo *Agaricus brazilienses* , de casca de ostra), bem como farinha, farelo e flocos de aveia, a fim de enriquecimento mineral e protéico com propriedades funcionais de proteção do sistema imunológico para consumo de crianças imunodeprimidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental apresenta-se descrito no Fluxograma de Processamento, correspondente a Figura 01, com a seqüência do processo para a produção do Cookie Enriquecido. Os biscoitos foram elaborados com :Lecitina, Farinha de babaçu, Farelo de aveia, Flocos de aveia, Fermento, Bicarbonato de Sódio, Ovos, Chocolate meio amargo, Litesse ,sucralose ,Albumina, Caseína, Farinha de *Agaricus b.*, Óleo de babaçu e Propionato de Cálcio pelo método direto, utilizando batedeira planetária industrial perfecta e forno industrial.

A massa resultante da homogeneização foi disposta em formas próprias para biscoito, a qual foi levada ao forno previamente aquecido num tempo de 10min, à uma temperatura de 170°C. Os biscoitos permaneceram no forno em temperatura inicial e constante por 20 minutos, alcançando o devido cozimento final.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Bromatologia da Faculdade Evangélica do Paraná, em Curitiba. Foram determinadas as características físico-químicas e microbiológicas do produto, avaliando-se a composição, o valor nutricional do produto obtido e aspectos higiênicos.

A composição centesimal (umidade, resíduo mineral fixo, lipídios e proteínas) foi efetuada segundo as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" (Instituto Adolfo Lutz, 1985), sendo os carboidratos calculados por diferença. O valor calórico foi calculado utilizando-se os seguintes fatores: nove para lipídios e quatro para proteínas e carboidratos (BRASIL, 1998a). A determinação das fibras alimentares seguiu o método enzimático-gravimétrico da "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), modificado por Lee et al. (1992).

Realizaram-se análises sensoriais com um grupo de 18 pessoas, devidamente treinadas, as quais concluíram teste de "Perfil de Característica das Amostras" e "Teste de Escala Hedônica" (variando de 0-9).

RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os resultados finais das análises físico-químicas e microbiológicas apresentam-se na tabela 01, relatando um produto rico em fibras (aproximadamente 50 %) e proteínas (quase 14%), valores considerados em base seca para um produto com 11,2% de umidade. O valor calórico por unidade de biscoito de 30 g foi de 69,4kcal.

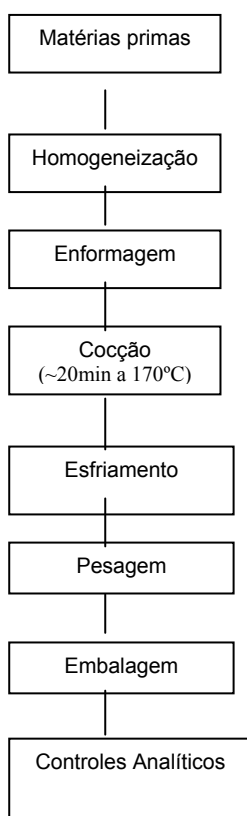


Tabela 1. Análises Físico-Químicas E Microbiológicas

Análise	Enriquecido
Valor Calórico	229
Kcal p/100g (~7 biscoitos)	
Umidade (%)	11,2
Proteínas (%)	13,9
Lipídeos (%)	8,8
Fibras totais	50,6
(%)	
Açúcares (%)	11,5
Cinzas (%)	4,1
Cálcio (%)	6,5
PH	2,1
Coliformes	Negativo
totais NMP/g	
Coliformes	Negativo
fecais NMP/g	

Figura1. Fluxograma de Processamento

Na Tabela 02 estão contidos os dados obtidos através da soma das fichas individuais do teste de “Perfil de Características” que indicam agradabilidade e a boa aceitabilidade do produto. Apesar de ser um produto formulado com alto teor de fibras, os provadores consideraram a textura agradável, crocante mas não duro devido a incorporação do óleo de babaçu que apresenta uma textura semi-sólida , formando filmes com a massa e agindo como umectante .

O teste de “Escala Hedônica de nove pontos” apresentou uma média 8,5, o que corresponde a um conceito intermediário entre “gostei muito” e “gostei muitíssimo”. A figura 2 mostra a aparência final do produto.

O processo utilizado, adaptado às técnicas disponíveis, possibilitou a produção adequada de biscoitos com características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais confiáveis, sendo que as análises microbiológicas mostraram adequadas condições do produto com ausência de coliformes totais e fecais.

TABELA 2. ANÁLISE SENSORIAL – “TESTE PERFIL DE CARACTERÍSTICAS”

Amostra Normal	Média
SABOR	8,5
AROMA	8,5
APARÊNCIA	8,8
COR	9,5
TEXTURA	9,0

FIGURA 2 : BISCOITO TIPO :COOKIE



Para 520g de massa o rendimento é de 34 biscoitos contendo cada unidade 15g, a um baixo custo (U\$1,00 /34 cookies).

Beneficiado pela presença do ácido láurico em sua formulação, devido ao uso da farinha e do óleo de babaçu, este cookie torna-se um produto alimentício alternativo, capaz de estimular o consumo deste ingrediente com propriedades funcionais de aumentar a resistência imunológica, o que é de grande benefício para crianças imunodeprimidas.

BIBLIOGRAFIA

AIDS PORTUGAL. O Papel da Avaliação Nutricional Regular nos Cuidados aos Pacientes VIH Clinical Infectious Diseases 36:S63-S68. 1 de Abril de 2003. Disponível em: - <http://www.aidsportugal.com/article.php?sid=2704>

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS. Dados do Brasil. Disponível em : http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/boletim_dezembro_2003/brasil.asp. Acesso em 23/11/2004.

BRASIL, Leis, decretos, etc.- Portaria N 33/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária Ministério da Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 30 mar. 1998. Seç. 1, n. 60-E, p.5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR-Ingestão Diária Recomendado para as vitaminas, minerais e proteínas.1998a

CARVALHO, S. EDUARDO; CARVALHO, B. WERTHER. Terapêutica e Prática Pediátrica. Editora Atheneu. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte.

DE SÁ RM & SOARES et al. Concentração de beta-glucanas nas diferentes etapas do processamento da aveia (avena sativa L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18 (4): 425-427, 1998

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v.1, p.21-24, 266.

LAURIC.ORG adds its thoughts to the Fauci review of “ The AIDS Epidemic-considerations for the 21st Century ” ;-[OCT 6, 1999; 08:45 - distribution: web, reuters, ap]

LEE, S. C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, Mês-TRIS Buffer: collaborative study. **Jornal of Association of Official Analitical Chemistry International**, v.75, p.395-416, 1992.

MAHAN, L. KATHEEN; Scott, Sylvia. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 9ªedição. Editora Roca

MEZITIS N, KOCH P, MAGGIO C, QUODDOOS A, PI-SUNYER FX: Glycemic Response to Sucralose, A Novel Sweetner, in Subjects with Diabetes Mellitus. Diabetes Care,1996; 19(9); 1004-1005

ROSS, A. C.; OLSON, J. A.; SHILS, M. E.; SHIKE, M.. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. Edição: 2002. Editora: Manole.

WAITZBERG, L. DAN. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. Edição 2002.
Editora: Atheneu

AGRADECIMENTOS:

FERLA (aveia), TOVANI BENZAQUEN (sucralose) ,FEPAR

INFLUENCIA DE LA RELACION pH-CALCIO EN LA INTERACCION PROTEINAS-LECITINA DE SOJA Y LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES ACEITE EN AGUA (O/W).

IACOVELLI, MARIA C.; COMAS, DORINA; WAGNER, JORGE R. y TOMAS, MABEL C.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) – Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET) - 47 y 116, (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. e – mail: mabtom@hotmail.com

RESUMEN

Las proteínas y lecitinas de soja están presentes en alimentos naturales y formulados. El objetivo del trabajo fue investigar la interacción proteínas de soja - lecitina en función de su entorno químico (pH, calcio), evaluando la estabilidad de emulsiones aceite en agua (O/W 25:75 p/p). Los resultados mostraron una disminución de la estabilidad de las emulsiones en presencia de calcio para todos los valores de pH estudiados con respecto al sistema control (sin calcio). Un comportamiento diferencial en función del pH fue evidenciado mediante las cinéticas de cremado, presentando mayor estabilidad los sistemas a pH 2.0 y 7.0, alejados del punto isoeléctrico de las proteínas ensayadas. La presencia de gluconato y lactato de calcio produjo una mayor desestabilización por cremado en las diversas condiciones de pH estudiadas, debido a factores de tipo estérico y de carga asociados al contraion.

Palabras clave: estabilidad, emulsiones, interacción proteínas-lecitinas, entorno químico, calcio

ABSTRACT

Proteins and lecithins are present in many natural and formulated foods being their interaction very important in the formation and stability of emulsions. The objective of this work was to study this interaction as a function of the chemical environment (pH, calcium) evaluating the stability of oil in water emulsions (O/W 25:75 w/w). The results obtained showed a diminution of the stability in the presence of calcium for all pH values studied respect to the control system (without calcium). A differential behavior as a function of pH was recorded by creaming kinetics, presenting more stability the systems at pH 2.0 and 7.0, values not closed to the isoelectric point of the proteins assayed. The presence of calcium gluconate and lactate produced a major destabilization by creaming at different pH conditions studied, probably due to esteric and charge factors associated to the counterion.

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones constituyen sistemas presentes en numerosos alimentos naturales y formulados (mayonesa, leche, cremas, sopas, margarina, manteca, etc.) (1) siendo sistemas termodinámicamente inestables. La inestabilidad de una emulsión puede involucrar diversos mecanismos, los cuales contribuyen a su transformación desde un sistema uniformemente disperso a un sistema de fases totalmente separadas (2).

Las proteínas y lecitinas de soja están presentes en alimentos naturales y formulados. La interacción entre estos componentes -con interesantes propiedades superficiales- es de gran importancia para la formación y estabilidad de sistemas alimenticios coloidales.

Por otra parte, la estructura de las proteínas y su funcionalidad puede verse afectada por las condiciones de su entorno químico tales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la concentración de iones calcio así como también por la presencia de fosfolípidos (3, 4, 5).

En el caso de las proteínas y fosfolípidos de soja y sus interacciones a nivel interfacial, las mismas no están aún totalmente dilucidadas en cuanto a la estabilización de las emulsiones ni al efecto de las condiciones del medio (6).

Dicha interacción entre proteínas, fosfolípidos e iones, puede traducirse en una alteración de la actividad superficial, en el desplegamiento de la estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas, en cambios de la carga neta y la viscoelasticidad, así como en la incorporación de proteínas en el interior de las micelas y vesículas de fosfolípidos (7). Además, tanto los iones Ca^{+2} como los contraiones pueden actuar como puentes entre las moléculas proteicas -cargadas en forma similar a los fosfolípidos-, afectando la estabilidad de las emulsiones (8).

Cabe señalar que el calcio juega un rol importante a nivel nutricional siendo un mineral esencial para el individuo, aunque una proporción significativa de la población no alcanza a ingerir los niveles recomendados para lograr un desarrollo saludable. Por ello, la deficiencia de calcio en la dieta trata de ser atenuada mediante la fortificación de los alimentos, con niveles similares a los existentes en los productos lácteos. En ese sentido, se emplean fundamentalmente sales inorgánicas como el carbonato y cloruro de calcio y orgánicas, tales como el gluconato y lactato de calcio.

El objetivo del trabajo fue investigar la interacción proteínas - lecitina de soja en distintas condiciones de su entorno químico (pH, sales de calcio), evaluando su efecto sobre la estabilidad de emulsiones aceite en agua (O/W 25:75 p/p).

MATERIALES Y MÉTODOS

- ◆ Aceite refinado de girasol como constituyente de la fase oleosa
- ◆ Lecitina de soja en polvo (Lec), caracterizada previamente mediante HPLC-ELSD (PE 31,9 %; PI 13,4 %; PC 44,1 %; PA y PS 10,4 %). Se preparó una solución madre de lecitina de soja en aceite refinado de girasol a 45 - 50 °C.

Obtención de aislados de proteínas nativas de soja (ANS): Se preparó un aislado nativo de soja (ANS), de acuerdo a Sorgentini y Wagner, 1999. (9)

Preparación de la fase acuosa: se prepararon soluciones buffer fosfato de sodio 0.01M ajustadas a pH 2.0, 5.5 y 7.0 adicionadas con diferentes sales de calcio: cloruro de calcio (CLO), gluconato de calcio (GLU) y lactato de calcio (LAC), La concentración final de Ca^{+2} fue de 10.00 mg de Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa, siendo determinado el contenido de calcio por espectroscopía de absorción atómica (IL457 Instrumentation Lab.) en el CINDECA– FCE (UNLP).

Se prepararon dispersiones de ANS (2 mg/ml) en buffer fosfato de sodio 0.01M a los distintos pH sin y con sales de calcio.

Preparación de la fase oleosa: A partir de la solución madre de lecitina de soja previamente descrita, se tomaron alícuotas correspondientes a 15 mg de Lec, ajustando el volumen final a 25 g con aceite refinado de girasol.

Preparación de las emulsiones: Se prepararon emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ($\phi = 0.25$) mediante un homogeneizador UTRATURRAX T25, a una velocidad de 20.000 rpm durante 30 segundos, usando aceite de girasol y lecitina como fase lipídica y dispersiones acuosas de aislados nativos de soja (ANS) como fase acuosa. Se ensayaron emulsiones control en ausencia de Lec o ANS en sus respectivas fases.

Caracterización óptica de las emulsiones: Las emulsiones fueron caracterizadas ópticamente mediante la utilización de un analizador vertical de barrido (Quick Scan) determinando los mecanismos y cinéticas de desestabilización involucrados en cada caso.

Cinéticas de desestabilización: Se realizó el estudio de cada emulsión durante un período de 2 h con mediciones efectuadas a intervalos de 1 minuto.

Distribución del tamaño de partículas: Se realizaron mediciones de la distribución del tamaño de partículas de las emulsiones a tiempo inicial mediante el empleo de un analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer (Malvern Instruments Ltd., UK) basado en difracción láser.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta la cinética de desestabilización de emulsiones ANS-Lec a pH 2.0, observándose una menor estabilidad en presencia de sales de calcio, con respecto al sistema control (sin calcio), registrándose que el lactato de calcio es la sal que más afecta a las mismas.

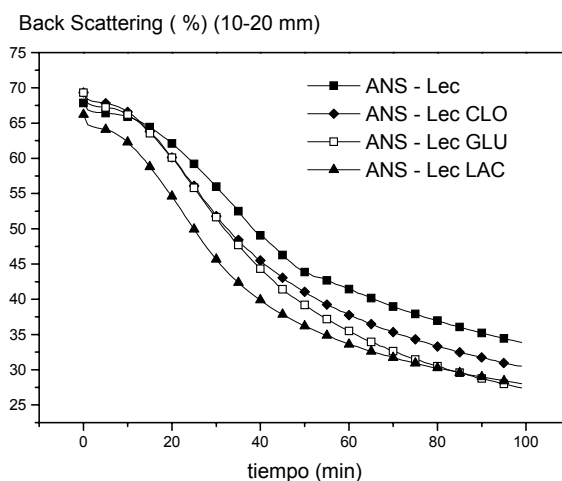


Figura 1 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 formuladas con distintas sales de calcio (10.00 mg Ca^{+2} / 100 ml de fase acuosa) a pH 2.0

Por otra parte, a pH 7.0 se registró una importante inestabilidad inicial en los sistemas ANS – Lec, lo cual se evidencia en las cinéticas de cremado mediante un descenso pronunciado en el Back Scattering (%). En este caso, las tres sales de calcio utilizadas inciden negativamente en la estabilidad de las emulsiones, siendo más relevante su efecto en el caso del gluconato de calcio, seguido por el cloruro y el lactato de calcio (**Figura 2**). Así, aunque la concentración de Ca^{2+} total en solución es equivalente (10 mg%), la cantidad de iones Ca^{2+} es diferente y depende del grado de disociación, siendo marcadamente mayor en el cloruro de calcio. Además, los resultados muestran que el efecto de las sales de calcio no depende sólo de la cantidad de calcio iónico que generan en el medio sino de factores de tipo estérico relacionadas con el tipo de contraion presente al pH dado.

El efecto negativo se pone de manifiesto más acentuadamente a pH 5.5 donde las tres sales de calcio citadas son igualmente desestabilizantes. Este comportamiento puede estar asociado a que este nivel de pH se encuentra en las cercanías del punto isoeléctrico de las proteínas constituyentes del aislado de proteínas de soja empleado. (**Figura 3**).

Las cinéticas de cremado de los sistemas ANS-Lec en función de los distintos valores de pH estudiados muestran el siguiente orden de estabilidad decreciente: 2.0 > 7.0 > 5.5, para todas las sales de calcio citadas. Así, a pH 2.0 se registra un mayor valor de Back Scattering (%) inicial, el cual permanece en su nivel presentando una cinética de cremado más lenta. En la **Figura 4** se visualiza este fenómeno en el caso del gluconato de calcio.

Figura 2 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 formuladas con distintas sales de calcio (10.00 mg Ca⁺²/ 100 ml de fase acuosa) a pH 7.0

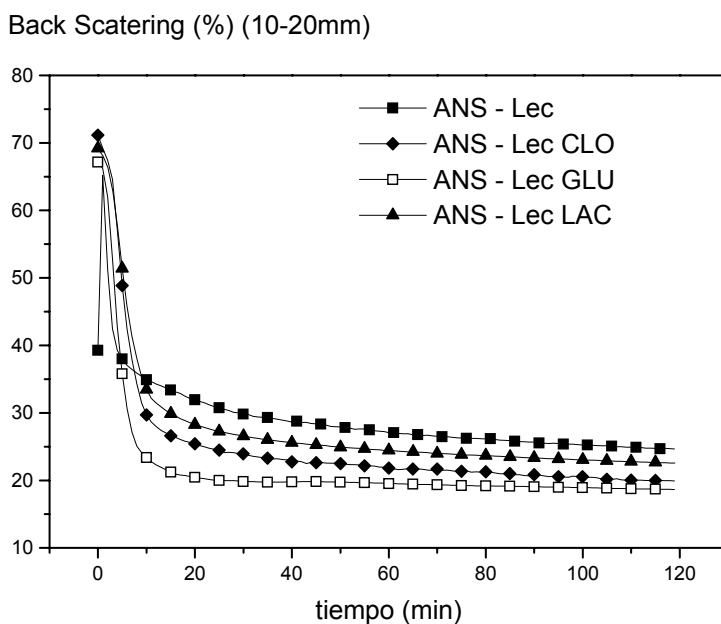
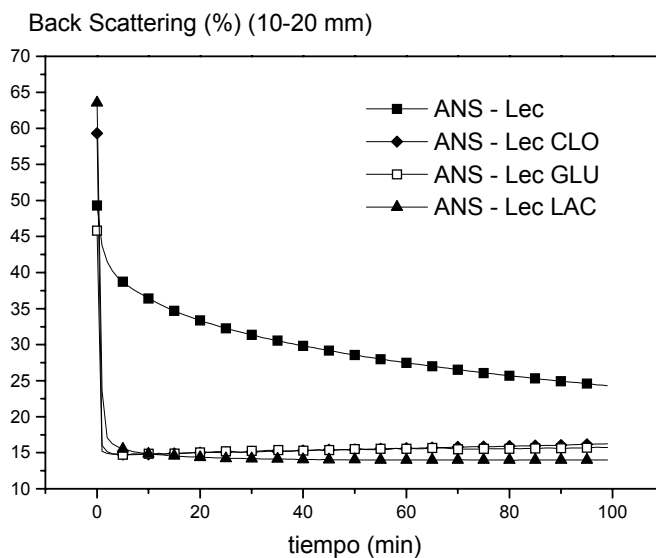


Figura 3 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 formuladas con distintas sales de calcio (10.00 mg Ca⁺²/ 100 ml de fase acuosa) a pH 5.5



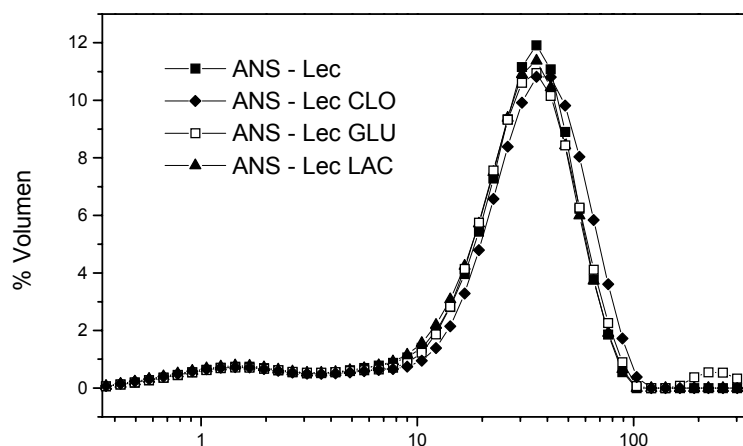


Figura 4 Cinética de desestabilización de emulsiones O/W 25:75 (% p/p) ANS - Lec 10:1 con gluconato de calcio (10.00 mg Ca²⁺/ 100 ml de fase acuosa) a distintos valores de pH

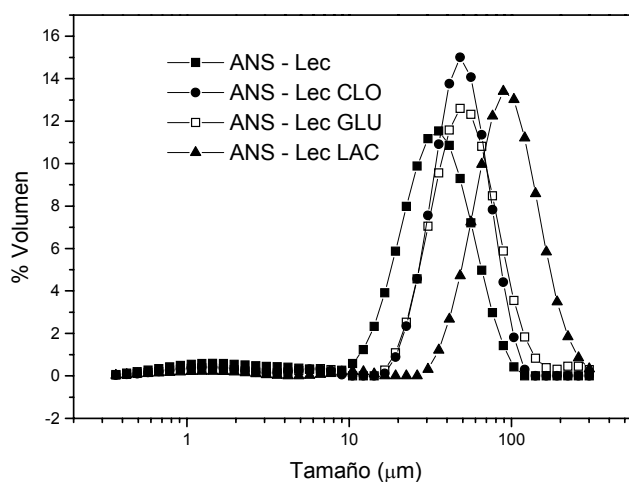


Figura 5. Distribución en volumen del tamaño de partículas correspondiente a emulsiones O/W 25:75 (% p/p) con ANS – LEC formuladas con distintas sales de calcio (10 mg Ca²⁺/ 100 ml de fase acuosa). **A)** pH 2.0 **B)** pH 5.5

Cabe señalar que a pH 2.0, la fracción proteica 11S se encuentra desnaturalizada en virtud del medio ácido por lo cual, en esas condiciones, el sistema presenta una mayor hidrofobicidad superficial, lo que puede traducirse en una mayor interacción proteínas-lecitinas y por ende, en una mayor estabilidad.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la determinación de la distribución del tamaño de partículas muestran un comportamiento similar para los distintos sistemas a pH 2.0 y 7.0, presentando los sistemas ANS - Lec una distribución bimodal para las tres sales estudiadas (**Figura 5 A**). A pH 5.5, se observa un desplazamiento hacia un mayor tamaño de partículas para las emulsiones formuladas en

presencia de calcio con respecto al sistema control, especialmente en el caso del lactato de calcio (**Figura 5 B**).

CONCLUSIONES

La estabilidad de las emulsiones O/W formuladas con lecitina de soja a los distintos valores de pH ensayados fue afectada por la presencia de sales de calcio. Se evidenció un comportamiento diferencial en función del pH, presentando mayor estabilidad los sistemas a pH 2.0 y 7.0, alejados del punto isoeléctrico de las proteínas ensayadas. Las emulsiones obtenidas con gluconato y lactato de calcio produjo una mayor desestabilización por cremado en las diversas condiciones de pH estudiadas. Este resultado puede atribuirse a factores de tipo estérico y de carga asociados al contraion, lo cual demuestra que el efecto desestabilizante no es sólo dependiente de la concentración de ión calcio en el medio. Los resultados obtenidos pueden ser de utilidad para la formulación de productos emulsionados en la industria alimentaria, ya que permite adecuar la elección de sales de calcio según el pH del producto final.

BIBLIOGRAFIA

Mc Clements, D. J. (1992), Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques, edited by CRC Press, New York, USA.

Friberg, S. y Larsson, K. (1997), Food Emulsions, Marcel Dekker, NY, USA.

Molina y Wagner, (1999), Food Research International **32**, 135.

Scuriatti, M.P., Tomás, M.C. y Wagner, J.R.,(2003), JAOCS **80** (11), 1093.

Comas, D. I., Wagner, J.R., Tomás, M.C., (2004), Proc. Food Colloids, Interactions, Microstructure and Proc., Harrogate, UK

van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, (1998), Fett/Lipid 100, Nr. 7, S 282.

Nylander y Ericsson, 1997, Lipids. In "Food Emulsions", . Principles, Practice and Techniques, edited by CRC Press, New York, USA.

Dickinson y Mc Clements, (1995), Advances in Food Colloids, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.

Sorgentini y Wagner, 1999, J. Food Biochem., 23 (5) 489.

AGRADECIMIENTOS - Proyecto PICT 2002-09-10768, ANPCyTy X390 UNLP

- Refinerías de Maíz S.A. por la provisión del Analizador de micropartículas Mastersizer (Malvern, Inst, UK).

ESTIMACIÓN DEL CONSUMO DE ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (EDTA) EN ESCOLARES.

CAGNASSO Carolina .E; LÓPEZ Laura .B y VALENCIA Mirta .E.

Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. CP 1113. Buenos Aires. Argentina. Tel/Fax: 49648242-3. E-mail: [HYPERLINK mailto:laulop@ffyb.uba.ar](mailto:laulop@ffyb.uba.ar) laulop@ffyb.uba.ar

RESUMEN:

El objetivo del presente trabajo fue estimar el consumo de EDTA por parte de escolares para evaluar la posibilidad de la utilización de FeNaEDTA como fortificante.

Se analizaron encuestas de frecuencia de consumo efectuadas a niños de clase media que asisten a escuelas públicas y a niños de clase media alta que asisten a una escuela privada, de la Capital Federal con el objeto de determinar si había diferencias significativas en el consumo de ambos grupos.

En los escolares de escuelas públicas la Ingesta Diaria Potencial (IDP) de EDTA promedio fue de 0,07 mg/kg, con un rango de 0 a 0,71 mg/Kg y en los escolares de escuelas privadas el IDP promedio fue de 0,12 mg/kg, con un rango de 0 a 2,34 mg/Kg. No se hallaron diferencias significativas entre los promedio de los dos grupos estudiados. Entre los alimentos evaluados, los principales aportadores de EDTA en la dieta por kilogramo de peso fueron las bebidas sin alcohol y las mayonesa.

ABSTRACT

The purpose of this study was to descriptively evaluate the potential EDTA intake in Argentine children attending, both, public and private schools, in order to establish if there is any significant difference between the two groups. The food additive intake was evaluated using a food frequency questionnaire.

Children who attend to public schools had an average intake of EDTA of 0,07mg/kg/day with a range of 0 to 0,71 mg/kg/day, and those who attend to private schools had an average intake of 0,12 mg/kg/day with a range of 0 to 2,34 mg/kg/day. No significant difference was found between the additive intakes of the two groups. The main sources of EDTA per kilogram per day were the non- alcoholic drinks and the mayonnaises.

Palabras Clave: EDTA – FeNaEDTA- ingesta diaria potencial - encuestas de frecuencia de consumo - escolares

INTRODUCCIÓN

La situación nutricional Argentina es similar a la de diversos países de Latinoamérica y se caracteriza por una población donde predominan los niños y las mujeres en edad fértil. En estos últimos años la situación económica local ha generado que millones de personas se encuentren bajo la línea de pobreza viéndose limitada la satisfacción de necesidades básicas, de las cuales uno de los más afectados es la alimentación (Taller Isla Margarita, 1994).

En distintos países de América Latina se ha observado un deterioro en el consumo de energía alimentaria, así como de macro y micronutrientes. La deficiencia de hierro constituye la carencia nutricional más común en la región (Taller Isla Margarita, 1994). La anemia por deficiencia de hierro retrasa el desarrollo mental y la maduración del lactante. En el niño en edad escolar, altera el desarrollo cognitivo y limita el rendimiento escolar. Las embarazadas y los niños anémicos tienen menor resistencia a las infecciones.

El FeNaEDTA es la sal férrica del ácido etilendiaminotetraacético. A nivel Internacional, diversas organizaciones promueven el uso en países en desarrollo de FeNaEDTA como fortificante.

En nuestro país el Código Alimentario Argentino (CAA), permite el agregado de EDTA en ciertos alimentos para los que establece límites de concentración. Este posee una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 2,5 mg/kg. Hay dos tipos de poblaciones donde la ingesta de EDTA, debe ser cuidadosamente controlada, los niños pequeños y la población de estratos económicos más altos (Taller Isla Margarita, 1994).

El objetivo del presente trabajo fue estimar el consumo de EDTA por parte de escolares para poder asesorar y determinar características y niveles de empleo adecuados, frente a la posibilidad de la utilización de FeNaEDTA como fortificante, para lo cual se compararon dos poblaciones de escolares, una perteneciente a una escuela pública y la otra a una escuela privada de la Ciudad de Buenos Aires.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población encuestada: Se encuestaron 118 escolares de ambos sexos de escuelas públicas de clase media (3 a 18 años de edad), y 83 escolares de ambos sexos de una escuela privada de clase media alta (10 y 12 años de edad). Las encuestas se realizaron en la Ciudad de Buenos Aires.

Encuesta: Se realizó una encuesta de frecuencia de consumo considerando únicamente los alimentos en los que se encuentra permitido por el CAA el agregado de EDTA como aditivo.

Los grupos de alimentos utilizados para la confección de la encuesta fueron:

Aderezos

Bebidas sin alcohol gasificadas

Bebidas sin alcohol no gasificadas.

Polvo para preparar bebida sin alcohol

Margarina

Helados

Para cada grupo de alimentos se solicitó el detalle de las marcas de consumo más frecuente.

Análisis de las encuestas:

- Para considerar a cada producto aportador de EDTA se tuvo en cuenta la declaración de dicho aditivo en el respectivo rótulo.
- Para establecer la concentración de EDTA en un alimento se consideró la concentración máxima permitida por el CAA (CAA; 2004) para los distintos alimentos (Dasso; 1997; European Commission, 2001).
- Los tamaños de porciones fueron considerados según los establecidos en la Resolución Técnica MERCOSUR 47/03 (Mercosur, 2004)
- Para el procesamiento y análisis de datos se utilizó el aplicativo Infostat versión 2004e.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los escolares de escuelas públicas el IDP de EDTA promedio fue de 0,07 mg/kg, con un rango de 0 a 0,71 mg/kg y en los escolares de escuelas privadas el IDP de EDTA promedio fue de 0,12 mg/kg, con un rango de 0 a 2,34 mg/kg. El Grafico 1 representa la distribución de frecuencias de Ingestas Diarias Potenciales (IDP) de ambos grupos. No se hallaron diferencias significativas entre los promedio de consumo potencial de los dos grupos estudiados ($p > 0,05$), y aunque si bien se considera que las poblaciones de mayor poder adquisitivo consumen mayor cantidad de productos industrializados (Dasso; 1997) y por ende mayor cantidad de aditivos, en este caso hemos observado que en estas poblaciones estudiadas el consumo de alimentos que contiene EDTA como aditivo, es semejante. Por lo tanto se considerarán a los 201 escolares (118 proveniente de una

escuela pública y 83 de una escuela privada) dentro de una única población con una IDP promedio de 0,09 mg/kg lo que representa el 3,6% de la IDA para el EDTA (2,5mg/kg).

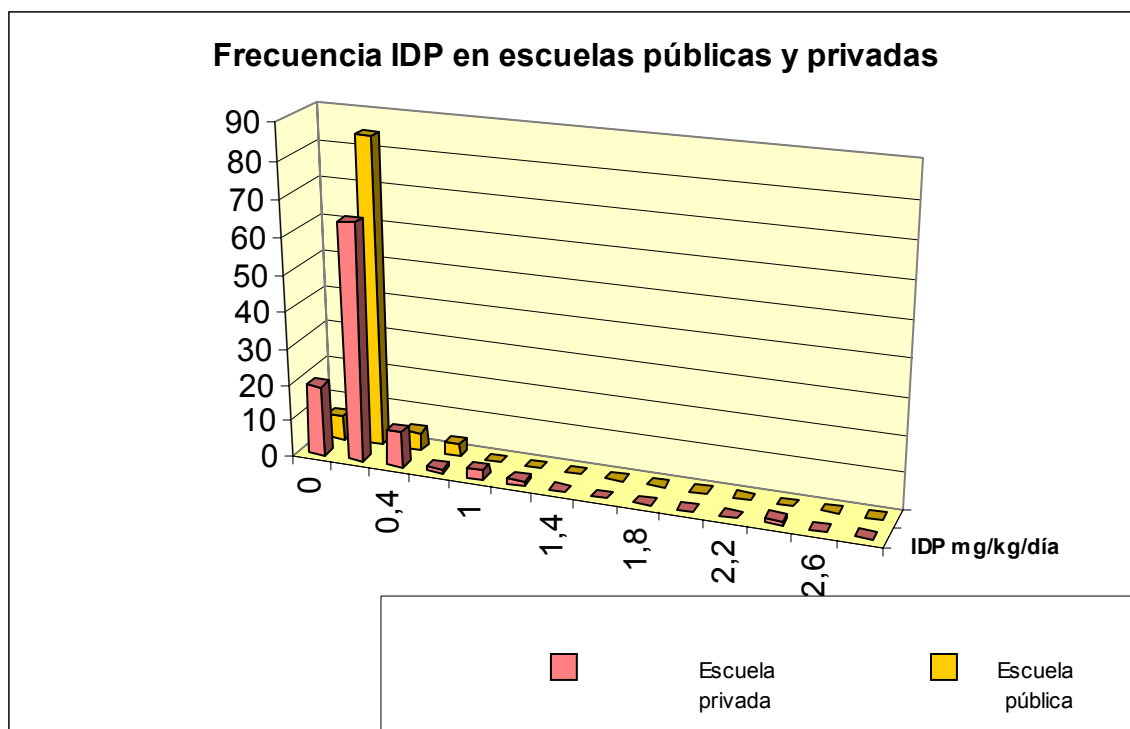


Gráfico 1: Distribución de frecuencias de IDP en escuela pública y escuela privada de la ciudad de Buenos Aires

En ambos grupos se hallaron “consumidores exagerados” siendo los IDP de los mismos 0,71 y 2,34 mg/kg. Estos valores pueden deberse no solo a un consumo exagerado real, si no también a la sobrestimación del encuestado sobre su propio consumo (Pao,1997).

Al analizar los distintos grupos etéreos no se hallaron diferencias significativas entre los promedios de IDP (no es $p < 0,05$). La Ingesta Diaria Potencial promedio de EDTA de Niños en jardín de infantes y preescolar (de 3 a 5 años) es de 0,12 mg/kg, para los niños de escolaridad primaria (de 6 a 12 años) es de 0,11mg/kg y para los jóvenes de escolaridad secundaria (13 a 18 años) es de 0,04 mg/Kg. Tampoco se hallaron diferencias entre ambos sexos. Si bien los niños son considerados como un grupo de riesgo de superar la IDA de ciertos aditivos debido a su bajo peso con respecto a su ingesta calórica, los adolescentes, en el caso del EDTA también adquieren particular importancia ya que este aditivo se encuentra en alimentos tales como los bebidas gaseosas y aderezos (mayonesas, mostazas) que los adolescentes suelen consumir con mucha frecuencia.

El consumo de EDTA promedio en nuestro país es muy inferior a la IDA, lo que concuerda con estudios similares realizados en Brasil, Chile y México, donde las IDP promedio halladas fueron 0,18 mg/kg; 0,40 mg/kg y 0,48 mg/kg respectivamente (Isberg, 2002).

Entre los alimentos evaluados, los principales aportadores de EDTA en la dieta por kilogramo de peso fueron las bebidas sin alcohol y mayonesas. En el gráfico 2, se observa el consumo promedio por kilogramo de peso en función de los distintos alimentos. De los 0,09 mg/kg (100%) promedio de consumo de EDTA, 0,053 mg (59%) son aportados por las bebidas sin alcohol gasificadas; 0,016 mg (18%) aportados por las bebidas sin alcohol no gasificadas; 0,012 mg (13%) por las mayonesas; 0,006 mg (7%) por los polvos para preparar bebidas sin alcohol; y los 0,002 mg restantes son aportados por el resto de los alimentos, (principalmente aderezos).

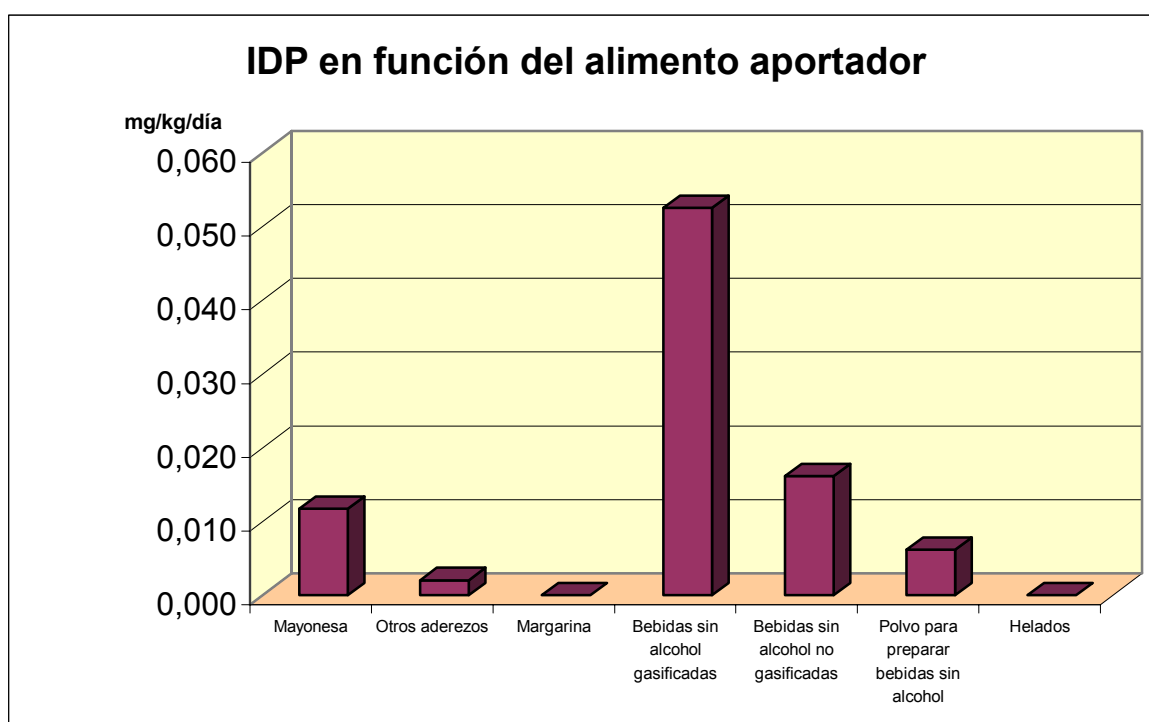


Gráfico 2: IDP en función del Alimento aportador de EDTA.

CONCLUSIÓN

De las encuestas realizadas surge que la IDP promedio para el consumo de EDTA, de una población de clase media a media alta es de 0,09 mg/kg, no hallándose diferencias significativas (no es $p < 0,05$), entre alumnos de escuelas públicas y de escuelas privadas de la Ciudad de Buenos Aires, ni dentro de los distintos grupos etáreos. El valor de IDP promedio obtenido en el presente trabajo es muy inferior a la IDA para este aditivo (2,5 mg/kg) y representa el 3,6% de la misma. Resultados similares fueron obtenidos por estudios realizados en Brasil, México y Chile (Isberg, 2002).

Dentro de los alimentos evaluados, hallamos que los principales aportadores de EDTA a la dieta son las bebidas gasificadas o no y las mayonesas, cubriendo entre ellos el 90% de la IDP promedio hallada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se evaluará el impacto de la fortificación de alimentos, tales como cereales para desayuno, sobre la IDP de FeNaEDTA,

BIBLIOGRAFÍA:

(Taller Isla Margarita, 1994) Informe de la reunión. Taller realizado en la isla Margarita, 15-20 de marzo de 1994. "La alimentación del niño menor de 6 años en América Latina. Base para el desarrollo de guías de alimentación". Arch Latinoamer Nutr 1994; 44:176-198

(CAA; 2004) Código Alimentario Argentino. www.anmat.gov.ar. Acceso el: 15 de Julio de 2004

(Dasso, 1997) Dasso Irene "Ingesta de Aditivos Alimentarios". DIAETA n78/97. Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionistas Dietistas

(Mercosur, 2004) Resolución Técnica Mercosur 47/03. www.puntofocal.gov. Acceso el: 21 de Septiembre 2004.

(Pao, 1997) Eleano M. Pao y Yasmin S. Cypel. "Cálculo de la ingesta alimentaria". Conocimientos Actuales de Nutrición, 7ma. Edición. 1997.

(Isberg, 2002) Isberg, R.M; Torres, E.A.F.S; Morimoto, J.M; Fisberg, M; Araya, L. H; Vera, A. G; Tostado, E. C; Loyola, M.A.; García, O. P; Almeida, N. "Estimativa do consumo de EDTA em escolares". Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutri. Sao Paulo, SP. v24, p 71-83, dez, 2002.

(European Comission, 2001) European Commission: Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate C - Scientific Opinions C2 - Management of scientific committee; scientific co-operation and networks - Scientific Committee on Food SCF/CS/ADD/GEN/26 Final. 12 July 2001 "Guidance on Submissions for Food Additive Evaluations by the Scientific Committee on Food". (opinion expressed on 11 July 2001)

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a las autoridades y docentes del Colegio Santa Brígida por permitirnos realizar las encuestas para el presente trabajo.

ACEITUNAS VERDES FERMENTADAS CON MENOR APORTE DE SODIO

DIP, Gladys; RAIMONDO, Emilia; OBERTI, Gabriela; FEMENIA, Juliana.

Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Cuyo. Dirección: Alte. Brown 500 – Chacras de Coria - Luján de Cuyo. Mendoza. M5528AHB. Tel: 0261-4135010- Int. 1304. E-mail: eraimondo@fca.uncu.edu.ar - gdip@fca.uncu.edu.ar

RESUMEN

Se estudió la reducción de sodio, para diferentes tratamientos de lavado, en aceitunas verdes fermentadas, para disminuir el aporte de sodio en las dietas. Se encontró una técnica de lavado sencilla, factible de realizar a nivel hogareño, para disminuir el contenido de este catión, potenciando de este modo el valor nutricional de las olivas.

Se determinó que lavándolas durante 24 horas con una renovación total de agua a las 12 horas, el contenido de sodio se reduce en un 75%.

Las aceitunas quedaría con 800 mg de sodio cada 100 g de pulpa (aproximadamente 16 a 20 aceitunas), con lo cual podrían recomendarse en dietas hiposódica estándar o para personas sanas donde se recomiendan dietas con menor aporte de sodio, y de este modo fomentar el consumo de aceitunas, que son ricas en ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico 60%) e insaturados (ácido linoleico 14%), los cuales son beneficiosos para la salud.

Palabras claves: aceitunas verdes, sodio, lavado, difusión, nutrición.

ABSTRACT

Different wash treatments of fermented green olives were studied in order to decrease sodium in diets. It was found a simple wash technique to decrease this cation, easy to made at home, to increase nutritional value of olives.

Washing olives during 24 hs with total water renewing at 12 hs, sodium content is reduced in 75%. Olives remain with 800 mg of sodium each 100g of pulp (16 to 20 olives approximately).

These olives could be recommended in standard hyposodic diets, and for healthy persons who need diets with less sodium, increasing olive consumption. Olives are rich in monounsaturated (oleic acid 60%) and unsaturated fatty acids (linoleic acid 14%), which are beneficial for health.

INTRODUCCIÓN:

Si bien el sodio es un catión importante en nuestro organismo, dado que controla el equilibrio hídrico corporal, la transmisión nerviosa y la contracción muscular, actualmente hay un exceso en su consumo, lo que crea importantes problemas de metabolismo, alteración del pulso cardíaco, hipertensión arterial, accidentes cerebrovasculares y enfermedades cardio-vasculares; por lo cual la tendencia es a disminuir su ingesta.

El sodio es el principal catión del medio extracelular. Junto con el cloro y los bicarbonatos tiene gran importancia en el equilibrio ácido-básico. Su misión es mantener la presión osmótica en el medio extracelular y evitar así una pérdida excesiva de agua. El sodio tiene también cierta importancia en el mantenimiento de la excitabilidad normal del músculo y en la permeabilidad celular. Sus necesidades dependen de las pérdidas que deben ser compensadas; las pérdidas mínimas por orina y por las heces son de 23 mg/día, mientras que las pérdidas dérmicas normales mínimas oscilan entre 46 y 99 mg (2 a 4 mEq) diarios. Por lo tanto se puede decir que el requerimiento mínimo, por término medio, en los adultos, en condiciones de adaptación máxima y sin una excesiva sudoración es de 5 mEq, es decir, aproximadamente 115 mg diario, que corresponden a 300 mg de cloruro de sodio (ClNa) al día. Si tenemos en cuenta la amplia variación de los patrones de actividad física y el clima, la ingesta mínima se situaría en 500 mg/día de ClNa.

Las necesidades de sodio aumentan en caso de: diarreas, vómitos, temperaturas altas y transpiraciones exageradas (Cervera, y col; 1994, Casanueva, y col; 1995).

La dieta pobre en sodio no es una dieta estandarizada. La restricción puede ser muy moderada o muy importante.

Clasificación:

- *Hiposódica estándar*: contiene de 1,500 a 2,000 mg de sodio. Indicada en patologías que requieren una restricción de sodio y están en fase compensada sin edema y ascitis.
- *Hiposódica estricta*: contiene de 600 a 1,000 mg de sodio. Se utiliza cuando los edemas y ascitis son de mayor importancia.
- *Hiposódica severa*: contiene de 200 a 400 mg de sodio. Se emplea solamente en medio hospitalarios, en casos muy concretos.(Cervera y col; 1994).

Dado que la aceituna no es un alimento apropiado en dietas para hipertensos, por su elevado contenido en sodio, se ensayaron distintas formas de lavado, factible de realizar a

nivel hogareño, para disminuir el contenido de este catión, potenciando de este modo el valor nutricional de estos frutos.

El objetivo planteado fue: *estudiar la reducción de sodio, con diferentes tratamientos de lavado, en aceitunas verdes fermentadas, para disminuir el aporte de sodio en las dietas.*

MATERIALES Y MÉTODOS:

Para llevar a cabo este estudio se trabajó con aceitunas verdes, variedad "Arauco", de tamaño razonablemente uniforme tipo "C", con diámetros ecuatoriales comprendidos entre 20 – 22 mm de 16 a 20 unidades por kg, (C.A:A; 2004) las cuales fueron sometidas a tratamiento alcalino durante 8 horas con hidróxido de sodio al 3,0%, para eliminarle el sabor amargo producido por la oleoeuropeína. Luego se lavaron, durante 12 horas con renovación total del agua a las cuatro horas y finalmente se fermentaron hasta un pH = 3,9. Para realizar la etapa de encurtido, que duró 45 días, se utilizó una salmuera al 6%, con ácido acético al 2 por mil. Estos pasos son semejantes a los realizados a nivel industrial. (Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO' 81; 1981)

Cuando se consideró que las aceitunas estaban listas para su consumo, se procedió a realizar los siguientes tipos de lavado.

⇒ Un lavado de 24 horas (sin renovación de agua), con extracción de agua y aceitunas a las 4, 8, 12 y 24 horas. Siendo la relación aceituna – agua de lavado 200 g de aceitunas y 200 ml de agua [1+1]

⇒ Luego se establecieron dos relaciones aceitunas – agua:
de 200 g de aceitunas y 400 ml de agua [1+2]
de 200 g de aceitunas y 600 ml de agua [1+3];

En ambos casos se realizaron tres tratamientos de lavado:

- a) 8 horas con renovación total del agua a las 4 horas
- b) 12 horas, con renovación total del agua a las 6 horas
- c) 24 horas con renovación total del agua a las 12 horas.

En todos los casos para establecer contenido de sodio en aceitunas o en el agua, las muestras fueron extraídas por quintuplicado, los datos que se observan en los resultados son el promedio de estas determinaciones.

La determinación de sodio se efectuó por fotometría de llama, para ello se utilizó un fotómetro marca Metrolab 315 y material convencional de laboratorio.

Para poder efectuar la lectura de sodio sobre la pulpa de aceitunas, estas fueron molidas, calcinas en mufla a $500^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y luego retomadas con ácido clorhídrico al 5% y agua

desmineralizada. Esta metodología no es necesaria en agua de lavados, donde la lectura se realiza directamente, previa dilución de la misma (Maldonado M. y col; 2003 – Zuritz, C. y col; 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis de datos se obtuvieron los siguientes resultados:

La concentración inicial de sodio en el agua de lavado fue de 39 ppm \pm 0 ppm, en la pulpa de aceituna de 15042,4 ppm \pm 70,19 y en la salmuera de cobertura de 19915 ppm \pm 623,24. Ver tabla 1.

Tabla 1 Contenido de sodio en pulpa de aceitunas sin lavar, salmuera y agua de red.

	Rango [ppm]	Promedio [ppm]	Desviación estándar [ppm]
Concentración de sodio en pulpa de aceitunas sin lavar	14933- 15127	15042,4	70,19
Concentración de sodio en salmuera inicial	19275 - 20520	19915,0	623,24
Concentración de sodio en agua de red, usada para el lavado.	39 - 39	39	0

En la tabla 2 se observa como se reduce el contenido de sodio en la pulpa, a diferentes horas de muestreo, para un lavado de 24 horas sin renovación de agua, con una relación aceituna – agua [1+1], es decir 200 g de aceitunas lavadas con 200 ml de agua. El porcentaje total de reducción para esta forma de tratamiento fue del 50%.

Tabla 2: Concentración de sodio en **pulpa** de aceitunas para una relación aceituna - agua [1+1], realizando un lavado de 24 horas sin renovación de agua

TIEMPO (horas)	Rango [ppm]	Promedio [ppm]	Desviación estándar [ppm]
0	14933- 15127	15042,4	70,19
4	11352 – 11473	11413,1	60,50
8	10164 – 10269	10216,2	52,99
12	9195 – 9339	9266,9	72,13
24	7785 - 7668	7726,6	58,63

En la tabla 3 se observa como se incrementa el contenido de sodio en el agua de lavado, para este mismo tratamiento.

Tabla 3: Incremento de la concentración de sodio en **agua** de lavado, para una relación aceituna - agua [1+1], realizando un lavado de 24 horas sin renovación de agua.

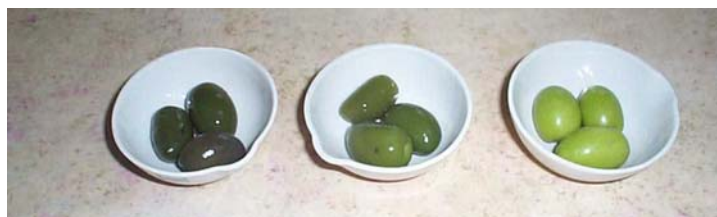
TIEMPO (horas)	Rango [ppm]	Promedio [ppm]	Desviación estándar [ppm]
0	39 - 39	39,0	0
4	3569 – 3629	3598,9	24,78
8	4793 – 4933	4863,3	70,00
12	5712 – 5839	5775,4	63,74
24	7244 – 7436	7331,7	96,95

En la tabla 4 se ha resumido los resultados de todos los tratamientos efectuados. En la misma se observa el porcentaje de disminución de sodio para diferentes relaciones aceituna – agua, variando los tiempos de contacto.

Tabla 4: Porcentaje de reducción de sodio en pulpas de aceitunas para diferentes relaciones agua - aceitunas y tiempos de contacto.

Tratamiento			Contenido de sodio en pulpa de aceituna ppm	Porcentaje de reducción de sodio después del lavado
Aceituna sin tratar			15042,4	
Tiempo	Relación	Cambio de agua		
24 hs	[1+1]	No	7726,6	48,63
8 hs	[1+2]	A las 4 horas	10293,8	31,56
12 hs	[1+2]	A las 6 horas	7407,1	50,76
24 hs	[1+2]	A las 12 horas	4360,5	71,01
8 hs	[1+3]	A las 4 horas	9147,8	39,18
12 hs	[1+3]	A las 6 horas	5984,9	60,21
24 hs	[1+3]	A las 12 horas	4468,4	74,49

En la figura se observa las aceitunas al final de los lavados (izquierda), las aceitunas ya fermentadas sin lavar (centro) y las aceitunas cortadas de la planta sin tratar (derecha).



CONCLUSIONES:

La mayor reducción de sodio se obtiene con una relación aceituna - agua de [25% - 75%], para un tiempo de contacto de 24 horas con cambio total de agua a las 12 horas. Esta es una técnica de lavado sencilla, factible de realizar a nivel hogareño, que permite reducir el contenido de sodio de este producto, con el fin de disminuir la ingesta diaria del mismo, y por otra parte fomentar el consumo de aceitunas, que son ricas en ácidos grasos monoinsaturados, lo cual es beneficioso para la salud.

Sugerencias para la preparación en el hogar

- Lave únicamente las aceitunas que va a consumir, en un periodo máximo de 15 días.
- Vierta las aceitunas (sin el líquido de cobertura) en un bols y coloque el triple de su volumen en agua. Deje las aceitunas en contacto con el agua por lo menos 24 horas, renovando totalmente el agua tres veces en el día.
- Si el lavado ha sido correctamente realizado, en las aceitunas no se debe percibir gusto a sal.
- Para conservarlas, sáquelas del agua, colóquelas en un frasco cubiertas de aceite y manténgalas refrigeradas (4°C).
- Conviene consumirlas a las 24 horas de agregado el aceite, dado que este le mejora el perfil de sabor. Además del aceite se pueden agregar especias a gusto.
- Una vez consumidas, el aceite se puede utilizar para otro tipo de preparaciones culinarias, dado que contienen ácidos grasos monoinsaturados provenientes de las aceitunas.

BIBLIOGRAFÍA

CASANUEVA, E ET AL, (1995) "Nutrología Médica", Editorial Médica Panamericana, México

CERVERA P. CLAPES J; RIGOLFAS, R. (1994) "Alimentación y Dietoterapia". Segunda edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España

C.A.A. CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO ACTUALIZADO (2004). Editorial De la Canal y Asociados. Buenos Aires, Argentina.

BOLETÍN DE SERVICIOS AGRÍCOLAS DE LA FAO 81, (1981) "Elaboración de aceitunas de mesa", Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.

MALDONADO, M., ZURITZ, C., GASCÓN, A., REY E. (2003) "Difusión de sodio en aceitunas verdes durante el tratamiento alcalino I: efecto de la concentración de la Lejía". International Journal of fat and oil (Revista Grasas y Aceites)- Instituto de la Grasa-Sevilla. Vol. 54 fasc. 4 2003. 358-364

ZURITZ, C., MALDONADO, M., GASCÓN, A. (2003) "Difusión de sodio en aceitunas verdes durante el tratamiento alcalino II: efecto de la temperatura de la Lejía". International Journal of fat and oil (Revista Grasas y Aceites)- Instituto de la Grasa-Sevilla. Vol. 54 fasc. 4 2003. 365-370

COMPLEMENTACIÓN PROTEICA – UNA IDEA VIABLE PARA MEJORAR LA CALIDAD BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES

LIMA, MATEUS S.; OKADA, LETÍCIA Y.; SANTOS, CHAVELE F.; FLÔRES, SIMONE H.; JONG, ERNA V.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Av. Bento Gonçalves, 9500 – CP 15090, Porto Alegre/RS – Brasil. CEP 91501.970 – E-mail: vogt@ufrgs.com.br

RESUMEN

El aislado de soja es un producto con alto valor agregado que, a pesar de ser una fuente proteica de buena calidad, es deficiente en aminoácidos azufrados. La industrialización del arroz genera una gran cantidad de salvado. La mezcla de los productos mejora el valor biológico de la proteína debido a la complementación entre aminoácidos esenciales. Fue realizado un experimento con 42 ratas Wistar, evaluándose la digestibilidad verdadera, la razón de eficiencia proteica y el coeficiente de eficiencia alimentar. Los animales fueron distribuidos en tratamientos diferenciados por la fuente proteica: caseína, aislado de soja y sustituciones crecientes de 10, 30, 50 y 60% de la proteína del aislado de soja por la proteína del salvado de arroz. En los grupos alimentados con dietas conteniendo un aumento progresivo de salvado de arroz, hubo una mejora progresiva en las respuestas nutricionales, sin embargo se observa un comportamiento inverso con la digestibilidad.

Palabras claves: Complementación proteica, aislado de soja, salvado de arroz

ABSTRACT

The isolated soybean protein is a high added value product that although it has a good quality protein source it is deficient in sulfurated amino acids. The rice industrialization produces an expressive amount of bran. The blend of these products (isolated soybean protein and rice bran) improves the biological value of the protein due to the complement of essential amino acids. An experiment using 42 Wistar rats was conducted to evaluate the true digestibility, the reason of protein efficiency and the coefficient of efficiency of feeding of the blend. Six diets were used: casein, isolated of soybean and increasing substitutions of 10, 30, 50 and 60% of the isolated soybean protein by the rice bran protein. Addition of rice bran protein to the isolated soybean protein caused a progressive

improvement in the nutritional answers, however an inverse behavior was observed about the digestibility.

Key words: Protein complementation, soybean isolated, rice bran

INTRODUCCIÓN

En la industria de alimentos existe una búsqueda constante por tecnologías capaces de minimizar los costos y agregar valor a los productos industrializados, siendo la soja uno de los ejemplos más discutidos. Originaria del oeste de Asia, la soja (*Glycine max*), fue utilizada como fuente alimenticia desde milenios (Waggle; Kolar, 1979). Sus granos se caracterizan por contener poco de almidón, cerca de 20% de aceite y 40% de proteína (Sgarbieri, 1996).

El aislado proteico de soja se destaca como un producto de gran interés industrial, con cerca de 90% de proteína, obtenido como subproducto de la extracción del aceite, fibras y azúcares del grano integral. La proteína de la mayoría de las leguminosas, como la soja, es abundante en lisina pero deficiente en aminoácidos azufrados. Además, contiene inhibidores de proteasa. Otro inconveniente de la soja es la presencia de rafinosa y de estaquiosa, que sufren fermentación por las bacterias del intestino grueso, favoreciendo la formación de gases (Ferrer, 1997; Sgarbieri, 1996).

La base de una vida saludable es una alimentación adecuada y suficiente, siendo fundamental la búsqueda de alternativas que garanticen el acceso a alimentos de las poblaciones de bajos recursos. Una de las alternativas consiste en complementar la proteína del aislado de soja, con el objetivo de mostrar que es posible invertir en la dinámica de los conocimientos científico-tecnológicos para la reducción del valor de un producto en favor de las poblaciones de bajos recursos.

La deficiencia de aminoácidos de una proteína puede ser suplementada o complementada por otra para formar una de mayor valor biológico. Es el caso de los cereales que, ricos en aminoácidos azufrados, pueden ser combinados con proteínas de leguminosas, ofreciendo un *score* de aminoácidos mucho mejor que el de la proteína original (Wilson; Fisher; Fuqua, 1975).

Con aproximadamente doce millones de toneladas, Brasil es el mayor productor de arroz (*Oryza sativa*) fuera del eje asiático (IRGA, 2004). Este cereal, que botánicamente pertenece a la familia de las gramíneas, provee 18% de las calorías y 12% de las proteínas de la dieta de los brasileños (EMBRAPA, 1999).

Después de la industrialización del arroz, se obtiene el salvado, que corresponde a 9% del grano y posee la mayor parte de los lípidos y de las proteínas, siendo su bajo precio una de sus principales ventajas para su utilización (Lam-Sánchez y col., 1993-1994).

A pesar de su gran valor nutricional, la inestabilidad del producto y sus factores antinutricionales impidieron la utilización más extensiva del salvado de arroz como alimento. En el caso de la inestabilidad, una alternativa posible sería inactivar las enzimas responsables por la rancificación de los lípidos, a través del tratamiento térmico adecuado (Barber; Barber; Martínez, 1981; Lima y col., 2002).

La fibra puede afectar la disponibilidad de nutrientes como las proteínas, el almidón e los minerales ya que es una barrera para el libre movimiento de los constituyentes de los alimentos durante la digestión. El fitato, por ser un ácido fuerte cargado negativamente, puede quelar iones metálicos cargados positivamente, reduciendo su biodisponibilidad (Harland y Narula, 1999; Santana y col., 2000).

La gran cantidad de materia prima disponible, la posibilidad de estabilización de los lípidos y las características de la proteína, justificaron la realización de ensayos biológicos con el objetivo de verificar si la complementación del aislado proteico de soja con el salvado de arroz pudiese mejorar el valor biológico de la proteína resultante y al mismo tiempo reducir su precio. Además, era necesario saber cuanto de la proteína podría ser cambiada sin alterar su aprovechamiento, por la cantidad de fibra presente en el salvado de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo biológico fue realizado en el Bioterio del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Federal de Río Grande del Sur (UFRGS). Fueron utilizadas 42 ratas albinas machos, cepa Wistar, con 21 días de edad y peso de aproximadamente 50 g, provenientes del Bioterio Central de la UFRGS.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en siete tratamientos diferenciados por la fuente de proteína: padrón (CASEÍNA), aislado de soja (ISOJA), aislado de soja complementado con 10% de salvado de arroz (IS90+FA10); aislado de soja complementado con 30% de salvado de arroz (IS70+FA30); aislado de soja complementado con 50% de salvado de arroz (IS50+FA50) y aislado de soja complementado con 60% de salvado de arroz (IS40+FA60) y un grupo sin proteína (APROTEICOS).

Los animales fueron colocados en jaulas individuales, a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 60-70% y luminosidad en ciclos de 12h luz/oscuridad. Las raciones fueron formuladas según Reeves; Nielsen; Fahey (1993).

Agua y raciones estuvieron disponibles en todo momento. El consumo de alimento, el peso de las ratas y de las heces fueron evaluados dos veces por semana y utilizados para el cálculo de Relación Proteica Neta (NPR) y Digestibilidad verdadera (Dv%), según Miller y Bender (1955), Relación de Eficiencia Proteica (PER), según Sgarbieri (1996) y Coeficiente de la Eficiencia Alimentaria (CEA), según Pellet y Young (1980). La determinación del nitrógeno fecal y de la proteína de las raciones fue realizada a través del método semi-micro-Kjeldahl (Williams, 1973).

El salvado de arroz proveniente de una industria del municipio de Viamão (Río Grande del Sur), fue recolectado en la misma mañana de su industrialización. Las enzimas lipolíticas fueron inactivadas el mismo día de la colecta, a través de calor seco (aproximadamente 90°C por 15 minutos). El aislado proteico de soja fue comprado en un mercado local, listo para su utilización.

Los datos fueron tratados por análisis de variancia (ANOVA una vía del programa Microsoft Excel), donde las diferencias entre los valores medios de los tratamientos fueron determinadas por la prueba de Tukey, al nivel de 5% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados, expresados como media de los índices obtenidos en este experimento se encuentran en la Tabla 1.

El tratamiento padrón (CASEÍNA) presentó los mejores resultados debido al perfil de aminoácidos de la caseína, mientras que el aislado de soja (ISOJA) sin complementación mostró resultados compatibles con la deficiencia de aminoácidos azufrados, descritos por Young (1991). El mismo comportamiento fue observado por Dresch y Jong (1998) y por Lucchin y col. (2002), que compararon el valor biológico de la caseína y del concentrado de soja con y sin complementación con otra proteína.

El mayor aumento de peso en las ratas tratadas con la proteína padrón ya fue constatado por Moura y Zucas (1981) y es justificado, cuando se compara con las proteínas vegetales, por el menor valor biológico de estas últimas. El contenido de aminoácidos encontrados en aislados proteicos de soja es próximo al de la caseína, pero la cantidad de aminoácidos azufrados limita el valor nutricional de muchas proteínas de origen vegetal, como la de la soja (Friedman y col., 1996). Los resultados crecientes en la calidad

de la proteína de soja con salvado de arroz pueden ser entendidos por la complementación de sus aminoácidos limitantes con los provenientes de la proteína del cereal.

Tabla 1 – Valores medios para el aumento de peso (GP), consumo de alimento (Cons), relación de eficiencia proteica (PER), coeficiente de eficiencia alimentaria (CEA), relación proteica neta (NPR) y digestibilidad verdadera (Dv).

	GP (g)	Cons (g)	PER	CEA	NPR	Dv %
CASEÍNA	123,23^a	361,97^a	3,30^a	0,34^a	5,16^a	94,46^a
ISOJA	41,85^d	235,25^c	1,72^d	0,18^c	3,44^c	90,96^{ab}
IS90+FA10	53,37^{cd}	276,14^{bc}	1,86^{cd}	0,19^c	3,56^c	88,54^{bc}
IS70+FA30	61,78^c	285,13^b	2,07^{bc}	0,21^{bc}	4,04^{bc}	84,68^c
IS50+FA50	94,49^b	357,16^a	2,11^{bc}	0,23^b	4,41^b	77,82^d
IS40+FA60	93,59^b	371,03^a	2,23^b	0,24^b	4,34^b	74,91^d

*Valores medios con letras iguales en la misma columna indican que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

Los valores de digestibilidad verdadera mostraron que hubo una disminución en la absorción de proteínas por el organismo de los animales que recibieron complementación con salvado de arroz (Figura 2). Estos resultados son similares a los encontrados por Dresch y Jong (1998), que constataron la influencia de la fibra en la digestibilidad de las proteínas.

Resultados similares fueron obtenidos por Lima y col. (2002) que, al sustituir parte de la caseína por salvado de arroz, percibieron una reducción de la digestibilidad. Conte (2002) verificó la influencia de los fitatos en la absorción de nutrientes, al constatar que la adición de fitasa mejoró la disponibilidad del fósforo del salvado de arroz en dietas de pollos de corte.

Según Sgarbieri (1996), los inhibidores y las fibras presentes en el salvado de arroz, perjudicaron la digestibilidad proteica. En el presente experimento ellos contribuyeron de forma negativa en la digestibilidad de la proteína, pudiéndose inferir que la composición de aminoácidos generada por la mezcla del aislado de soja con el salvado de arroz, fue el aspecto determinante para la mejoría de los demás índices nutricionales.

El PER mostró diferencias significativas entre los grupos caseína y aislado de soja, pero fue mejorando con el aumento de la utilización del salvado de arroz. Según Friedman y

col. (1996), valores de PER mayores que 2,0 indican una proteína de buena calidad. Los grupos alimentados con dieta con caseína y con aislado proteico de soja complementado con 30%, 50% y 60% de salvado cumplen este requisito.

La Figura 1 muestra la calidad de la proteína complementada, pues a pesar de la reducción en la digestibilidad, hubo una mejora en el aprovechamiento (indicado por los valores mayores de PER).

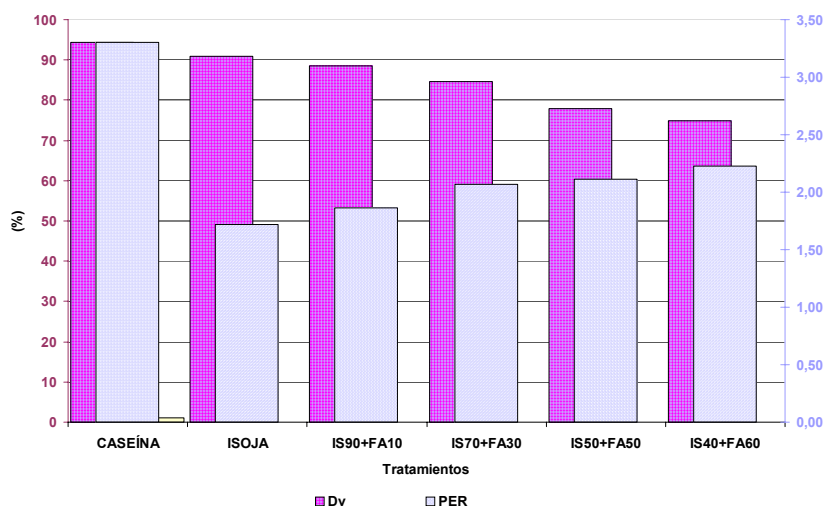


Figura 1 – Comparación entre los índices PER y Dv.

En las curvas de crecimiento (Figura 2) se puede observar que, en las dietas complementadas con salvado de arroz, hubo índices de crecimiento mayores a partir de la tercera semana del experimento. Las respuestas no fueron directamente proporcionales al nivel de complementación.

CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos en el experimento, se concluye que:

A medida que la proteína del aislado de soja fue sustituida por la del salvado del arroz, hasta el nivel de 60%, mejoraron las respuestas nutricionales, demostrando que la deficiencia de aminoácidos azufrados de la soja fue complementada gradualmente por esos aminoácidos de la proteína del cereal.

A pesar de que la digestibilidad de la proteína haya disminuido a medida que se aumenta la cantidad de salvado de arroz, hubo una mejora en el aprovechamiento biológico de la misma.

El experimento cumplió su objetivo, pues fue posible probar que se puede invertir conocimiento científico-tecnológico para encontrar una fuente proteica alternativa, capaz de reducir el precio de un alimento y mejorar su calidad nutricional.

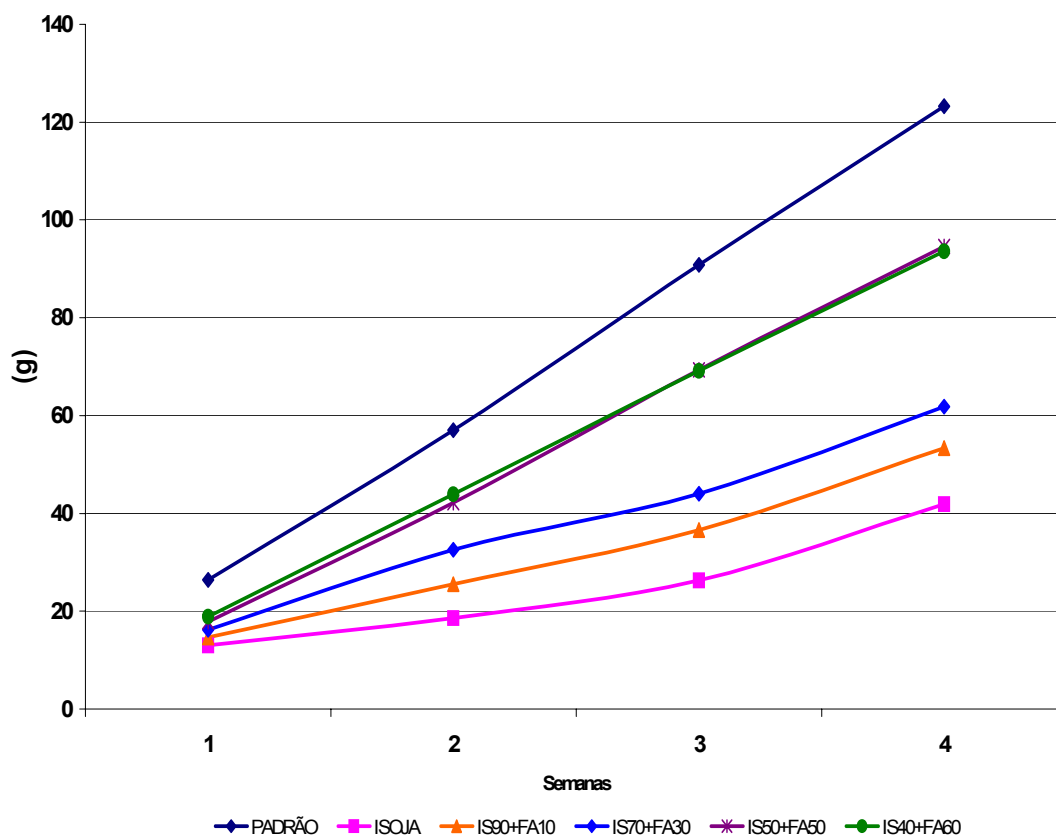


Figura 2 - Curvas de crecimiento de los animales alimentados con dietas experimentales

BIBLIOGRAFÍA

Barber, S.; Barber, C.B.; Martínez, J. Proteínas del salvado de arroz: valor potencial de las fracciones de salvado de arroz como ingredientes de alimentos proteicos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, ES, v. 21, n.2, p.247-258, 1981.

Conte, A.J. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 547-552, abr. 2002.

Dresch, R.R.; Jong, E.V. Influência da percentagem de fibra na digestibilidade de proteínas. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v.1, p.657-660

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Arroz irrigado no Rio Grande do Sul: generalidades e cultivares**. Pelotas, 1999. 58p.

Ferrer, S. Proteínas de soja: cómo elegirlas correctamente. **La Industria Cárnica Latinoamericana**, Buenos Aires, n.107, p.41-45, ago. 1997.

Friedman, M. y col. Factors value of proteins from different food sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.1, p.6-29, 1996.

Harland, B.F.; Narula, G. Food phytate its hydrolysis product. **Nutrition Research**, Tarrytown, US, v. 19, n. 9, p. 947-961, 1999.

IRGA. Instituto Riograndense de Arroz. **Dados da colheita de arroz, safra 2003/04**. Porto Alegre, 2004. Disponível em: <www.irga.gov.br> . Acesso em: 3 jun. 2004.

Lam-Sánchez, A. y col. Estudos nutricionais com arroz (*Oryza sativa*, L.). **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 5, p. 37-48, 1993-1994.

Lima, M.S. y col. Efeito da substituição da caseína pela proteína do farelo de arroz estabilizado, com ou sem suplementação de lisina, em ratos Wistar em crescimento. In: Salão de Iniciação Científica, 14., 2002, Porto Alegre; Feira de Iniciação Científica, 11., 2002, Porto Alegre. **Livro de resumos...** Porto Alegre: PROPESQ/UFRGS, 2002. p.169.

Lucchin, G.L.C. y col. Análise da viabilidade do uso de resíduo sólido, conseqüente do tratamento de efluentes com tanino, como fonte protéica para elaboração de ração animal. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p.28, 2002, Porto Alegre. **Anais ...** Porto Alegre: SBCTA., 2002. 1CD-ROM.

Miller, D.S.; Bender, A.E. The determination of the net utilization of protein by a shortened method. **British Journal of Nutrition**, London, v. 9, n. 8, p. 382-389, 1955.

Moura, E.C.V.; Zucas, S. Ensaio nutricional da proteína de soja, suplementada com farinha de castanha do Pará. **Revista ABIA/SAPRO**, São Paulo, n. 57, p. 6-17, 1981.

Pellet, P.L.; Young, V.R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 62p.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and HocWriting Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

Santana, L.F.R. y col. Valor nutritivo e fatores antinutricionais de multimisturas utilizadas como alternativa alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.3, p.129-135, 2000.

Sgarbieri, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 519p.

Waggle, H.; Kolar, W.C. Types of soy protein products. In: Wilcke, H.L. y col. (Ed). **Soy protein and human nutrition**. New York: Academic Press, 1979. p. 19-49.

Williams, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science and Food Agriculture**, London, v.24, n.3, p.343-348, 1973.

Wilson, E.D.; Fisher, K.H.; Fuqua, M.E. **Principles of nutrition**. 3.ed. New York: John Wiley y Sons, 1975. 598p.

Young, V.R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 91, p. 400-405, 1991.

CONTENIDO DE ZINC EN HUEVO FRESCO DE CONSUMO EN ARGENTINA

FISSORE Eliana¹, RESNIZKY Sara M.² y GÓMEZ Rosa G.³

¹Alumna de la Fac.de Agronomía y Cs Agroalimentarias. Univ. de Morón. ²CNEA. ³FCEyN. UBA .
²Grupo Técnicas Analíticas Nucleares. CNEA. Av. del Libertador 8250. 1429 - Bs.As. Argentina. Tel/Fax 5 411 6779812. E-mail: resnizky@cae.cnea.gov.ar; ³Dpto Quím. Orgánica. Área Bromatología. FCEyN. UBA .Ciudad Universitaria. 1428-Bs.As. Argentina. Tel/Fax 5 411 4 5763346. E-mail:rgomez107@hotmail.com

RESUMEN

Se determinó el contenido de zinc en lotes de huevos frescos de consumo, provenientes de catorce grandes productores de localidades de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos utilizando la técnica de Análisis por Activación Neutrónica. Los contenidos de Zn en clara y yema (Promedio \pm DS) fueron de $0,05 \pm 0,07$ y $4,1 \pm 0,6$ mg/100g, con rangos de 0,005–0,265 y 3,05–5,21 respectivamente. De acuerdo a los datos encontrados, se estima que un huevo entero de 65 g, 40,6 g de clara y 18,5 g de yema aportaría 0,80 mg de Zn, lo que representa el 7,3 y 10 % de los 11 y 8 mg diarios de la Ingesta Dietética de Referencia para hombres y mujeres adultos respectivamente. Estos datos son un aporte importante debido a la importancia del zinc como micronutriente esencial y a la escasa información de su contenido en alimentos argentinos.

Palabras claves: zinc, huevos de gallina, micronutrientes, análisis por activación neutrónica

ABSTRACT

The Zn content of fresh eggs has been determined. These eggs were obtained from fourteen main eggs producers located in the provinces of Entre Ríos and Buenos Aires. The determination of Zn has been done through Neutron Activation Analysis. Zn concentration values (mean \pm SD) in white and yolk were $0,05 \pm 0,07$ and $4,1 \pm 0,6$ mg/100g with, ranges of 0,005–0,265 and 3,05 –5,21, respectively. According to these data, a whole egg (65 g, white 40,6 g and yolk 18,5 g) will provide 0.80 mg of Zn, which represents 7,3 and 10% of the daily RDA (11 and 8 mg, for adult men and women respectively). These data becomes an important contribution due to the scarce information about trace elements contents on Argentine foodstuffs.

Key words: zinc, hen eggs, trace elements, neutron activation analysis

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de zinc es un problema grave que afecta a la población mundial, tanto de países en vías de desarrollo como desarrollados, con graves efectos sobre la salud dependiendo fundamentalmente del grado de incidencia y de la magnitud de la deficiencia. Según un estudio realizado por investigadores médicos de la Universidad de las Naciones Unidas (UNU), una de cada 5 personas de la población mundial sufre carencia del zinc necesario en su dieta. Se considera que la ingesta promedio de zinc a nivel mundial oscila entre 50 y 80 % de su requerimiento diario (WHO, 1992; Ruz, 1994; Alnwick, 1998; Ananda y col, 2001). Las principales causas de la deficiencia de zinc se deben a una baja ingesta, situaciones de pobreza, baja biodisponibilidad e incremento de las demandas de zinc. Los principales grupos de riesgo son lactantes, niños, adolescentes, embarazadas y mujeres en edad reproductiva. Sin embargo, es importante remarcar que la deficiencia de zinc también puede afectar a ancianos, hombres adultos y mujeres postmenopáusicas (Cousins y col, 1990; Portela, 1993; Black, 1998; Milne y col, 2001).

Las consecuencias de la deficiencia implican entre otras, incremento del riesgo de aborto, aumento en la incidencia de partos prematuros, mortalidad materna y/o fetal, retardo en el crecimiento, desarrollo disminuido de las funciones cognitivas y psicomotoras, respuesta inmune inadecuada, desórdenes emocionales, anorexia en adolescentes, disfunción gonadal en hombres (Shankar y col, 1998; Prasad, 2000; Ananda y col, 2001). En adultos esta deficiencia produce una significativa reducción de la capacidad de trabajo y productividad, con serias consecuencias a nivel sanitario, social y económico en países con altos índices de incidencia, agravando aún más la situación de la población en su totalidad (Cousins y col, 1990; Salgueiro y col, 2000a; Salgueiro y col, 2000b). En la década pasada se reconocieron más de 2000 factores de transcripción zinc dependientes involucrados en la expresión genética de varias proteínas (Coleman, 1992; Salgueiro y col, 2002). El campo del metabolismo del zinc y la relación con otros microminerales es un área de investigación muy interesante y amplia para clínicos, bioquímicos, inmunólogos, biólogos moleculares y epidemiólogos nutricionales (Ananda y col, 2001). Un eficiente procedimiento para prevenir la deficiencia nutricional de zinc es la fortificación de los alimentos, sin dejar de lado la importancia de la educación nutricional de la población (Boccio, 2002). Para poder aplicar estos procedimientos en forma adecuada debe conocerse el status nutricional y el contenido de zinc de los alimentos consumidos por la población involucrada.

En la actualidad en Argentina, debido a las campañas solidarias posteriores al 2001, la dieta infantil no es deficitaria en calorías ni proteínas, pero sí en micronutrientes como hierro, zinc, calcio y vitaminas A y C, debiéndose no sólo a situaciones de pobreza, sino a una inadecuada alimentación, que acarrea consecuencias en su vida adulta (Britos, 2004; Calvo, 2004; O'Donnell, 2004). Dada la importancia del zinc como micronutriente esencial y debido a la escasa información de su contenido en alimentos argentinos se decidió evaluar el mismo en huevo, por ser un alimento componente de la dieta habitual, de gran valor nutricional, bajo costo, gran aceptabilidad y consumo.

El objetivo de este trabajo es aportar datos sobre alimentos nacionales que puedan resultar de utilidad en la evaluación de la situación sanitaria, la educación nutricional, la investigación epidemiológica sobre las relaciones entre dieta y enfermedad y la planificación de dietas en especial para grupos de bajos recursos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La elección de las muestras representativas de huevos frescos consumidos en el país se realizó teniendo en cuenta la producción nacional, siendo las provincias de mayor importancia Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fé y Córdoba, con aportes de 45 %, 25 %, 11% y 8 % respectivamente, según datos publicados por la Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA).

Siguiendo este criterio, algunos lotes de 30 a 60 huevos fueron provistos directamente por los mayores productores a través de la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA) y otros comprados en supermercados de venta masiva.

Se analizaron 14 lotes de granjas avícolas de las localidades de Pergamino (2 lotes), González Catán, Pilar, Moreno, Manuel Ocampo, General Las Heras, General Rodríguez, Victoria y Marcos Paz de la provincia de Buenos Aires y Ejido Colón - Colonia San José, Viale, Ejido Crespo - Aldea San Rafael, y Crespo de la provincia de Entre Ríos. Los lotes analizados fueron de huevos blancos, de 65g de peso medio, provenientes de gallinas ponedoras de jaula de las líneas híbridas Hy Line, HW Blancas, B300 y Lomans, alimentadas con mezcla de balanceado comercial compuesto por harina de carne, maíz, soja, trigo, girasol, vitaminas y minerales.

Se seleccionó un total de 168 huevos, 12 de cada lote tomados al azar descartando los que presentaban defectos. La muestra analítica consistió de 6 huevos por duplicado de cada lote o granja avícola, según AS 1383 Standards Association of Australia (1974).

Los huevos fueron luego roturados en forma manual separándose yema, clara y cáscara. Se pesó cada huevo, yema y cáscara individualmente previo lavado y secado de la última; la masa de clara se obtuvo por diferencia. Se prepararon “pools” compuestos por 6 yemas y 6 claras separadamente, los que se homogeneizaron cuidadosamente con varilla de vidrio evitando la formación de espuma. Para prevenir posibles contaminaciones se evitó el uso de elementos metálicos. Los “pools” de yema y clara se analizaron por duplicado para determinar su contenido de humedad, cenizas y zinc. La determinación de humedad se realizó según método 925.30 AOAC (1990), en estufa de vacío a 100 ± 2 °C hasta peso constante. La determinación de cenizas se realizó según método 945.46 AOAC (1990), en mufla a 550 ± 5 °C hasta peso constante. El contenido de zinc fue determinado utilizando la Técnica de Análisis por Activación Neutrónica (AAN) en su forma Instrumental. Las muestras de clara y yema previamente liofilizadas, los patrones de comparación y los materiales control fueron envasados en forma adecuada, acondicionados en cápsulas de irradiación de aluminio e irradiados durante 10 horas en el reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza (7 MW de potencia, flujo térmico nominal de 6×10^{13}). Después de un tiempo de decaimiento de 25 a 30 días, muestras, patrones y material control fueron medidos en un detector de Germanio Hiperpuro (30% eficiencia, resolución 1,8 keV para el pico de 1332,5 keV de ^{60}Co). Se utilizó el software Gamma Vision para la adquisición de datos y un programa desarrollado en el laboratorio para el cálculo de las concentraciones. La determinación se realizó a través de ^{65}Zn de 243 días de período de semidesintegración, y energía gamma característica de 1115,5 keV. (I.A.E.A, 1990; Bode, 1996).

Como control de calidad analítico, se analizó un material de referencia certificado, V -10 Hay Powder de IAEA (International Atomic Energy Agency), encontrándose un valor de concentración de Zn de $21,8 \pm 1,1$ µg/g, siendo su valor certificado e intervalo de confianza del 95% de 24 (21-27) µg/g.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor medio de los pesos de yema, clara, cáscara y huevo entero y del contenido medio de cenizas y humedad de los lotes provenientes de 14 granjas avícolas situadas en Buenos Aires y Entre Ríos, provincias productoras del 70% de los huevos frescos consumidos a nivel nacional, se muestran en la Tabla 1. Los valores de humedad y cenizas para clara y yema determinados están en el orden de los valores citados en bibliografía (Naber, 1979; Murcia y col, 1999; USDA, 2004).

Tabla 1. Valores de peso, humedad, cenizas en clara y yema de huevos frescos y peso de cáscara y huevo entero de 14 granjas avícolas de localidades de las provincias de Buenos Aires (*) y Entre Ríos (**).

Localidades	clara			yema			cáscara peso g	huevo entero peso g
	peso g	humedad %	cenizas %	peso g	humedad %	cenizas %		
Pergamino 1 *	40,80	36,2	0,33	18,10	9,4	0,33	6,40	65,30
Pergamino 2 *	40,83	37,3	0,32	18,13	8,2	0,35	5,00	63,96
Gonzalez Catán *	39,55	34,8	0,30	15,72	7,7	0,24	5,05	60,32
Pilar *	42,28	37,1	0,32	16,67	8,6	0,27	6,40	65,35
Moreno *	40,28	35,3	0,29	18,18	9,2	0,30	6,41	64,87
Manuel Ocampo *	36,18	32,1	0,26	14,30	7,5	0,23	5,34	55,81
Gral Las Heras *	47,70	42,1	0,34	19,39	10,0	0,32	7,01	74,10
Gral.Rodriguez *	36,98	32,4	0,25	19,25	9,9	0,31	5,2	61,35
Victoria *	38,05	33,5	0,19	18,60	9,8	0,29	5,71	62,36
Marcos Paz *	38,91	33,8	0,16	21,14	11,5	0,29	5,89	65,94
E.Colón-San José **	35,07	30,8	0,23	16,85	8,6	0,24	5,94	57,87
Viale **	47,13	41,2	0,36	25,41	13,2	0,50	6,71	79,26
E. Crespo-S.Rafael **	44,22	38,8	0,33	19,99	10,0	0,42	7,26	71,49
Crespo **	40,47	35,6	0,16	19,69	10,0	0,34	6,63	61,78
Promedio	40,60	35,8	0,27	18,67	9,5	0,32	6,06	64,98
Desvío standard	3,90	3,3	0,07	2,65	1,5	0,07	0,74	6,31
	35,07	-	-	14,30	-	-	-	55,81
Rango	47,70	30,8 – 42,1	0,16 – 0,36	25,41	7,5 – 13,2	0,23 – 0,50	5,00 – 7,26	79,26

En la Tabla 2 se presentan los resultados de contenido de Zn expresados en miligramos por 100 gramos de muestra (clara o yema), calculados como promedio de dos determinaciones independientes, acompañados del correspondiente desvío estándar. Los contenidos totales de Zn por clara y por yema fueron estimados a partir de las concentraciones y las masas promedio de clara o yema correspondientes. Se detalla el rango de valores, el promedio, el desvío estándar y el desvío estándar relativo porcentual. Los contenidos determinados en clara son muy variables, coincidiendo en su gran mayoría con los valores más bajos reportados en otros países, mientras que los de yema resultaron comparativamente mayores. Se puede considerar observando estos resultados que el aporte de zinc de huevos frescos está dado prácticamente por la yema.

El contenido medio de zinc para un huevo entero fresco de peso medio de 65 g, 40,6 g de clara y 18,5 g de yema fue estimado de 0,8 mg, a partir de los valores determinados para yema y clara que se presentan en la Tabla 2. De acuerdo a lo estimado para huevo entero el contenido de zinc resulta considerablemente mayor que el informado para huevos de otros países (Kiliç y col, 2002; Fakayode y col, 2003; FAO, 2003; USDA, 2004).

El consumo de un huevo fresco de 65g contribuiría al 7,3 y 10 % de los 11 y 8 mg diarios de la Ingesta Dietética de Referencia de zinc, para hombres y mujeres adultos sanos respectivamente (Food Nutrition Board, 2004).

Tabla 2. Contenido de zinc en clara y yema de huevos frescos de 14 granjas avícolas de localidades de las provincias de Buenos Aires (*) y Entre Ríos (**).

Localidad	Zn en clara		Zn en yema		
	mg/ 100 g ± SD	mg/ clara	mg/ 100 g ± SD	mg/yema	
Pergamino 1 *	0,084 ± 0,003	0,034	3,65 ± 0,09	0,66	
Pergamino 2 *	0,148 ± 0,005	0,061	4,30 ± 0,11	0,78	
Gonzalez Catán *	0,025 ± 0,002	0,009	5,22 ± 0,13	0,82	
Pilar *	0,030 ± 0,002	0,013	3,55 ± 0,10	0,59	
Moreno *	0,073 ± 0,005	0,029	5,04 ± 0,13	0,92	
Manuel Ocampo *	0,014 ± 0,002	0,005	4,63 ± 0,13	0,66	
Gral Las Heras *	0,012 ± 0,001	0,006	5,05 ± 0,12	0,98	
Gral.Rodriguez *	0,007 ± 0,001	0,003	3,74 ± 0,07	0,70	
Victoria *	0,012 ± 0,001	0,004	3,05 ± 0,10	0,64	
Marcos Paz *	0,009 ± 0,001	0,003	3,99 ± 0,11	0,67	
E. Colón-San José **	0,256 ± 0,009	0,095	3,62 ± 0,09	0,70	
Viale **	0,011 ± 0,002	0,005	3,66 ± 0,16	0,93	
E. Crespo-S. Rafael **	0,005 ± 0,001	0,002	3,90 ± 0,16	0,78	
Crespo **	0,024 ± 0,003	0,010	3,80 ± 0,06	0,63	
Promedio	0,05	0,020	4,09	0,75	
SD	0,07	0,027	0,66	0,12	
RSD%	142	137	16,1	16,5	
Rango	0,005-0,256	0,002-0,095	3,05-5,22	0,59-0,98	

CONCLUSIÓN

Los valores presentados en este trabajo permiten estimar con buena aproximación los contenidos de zinc en huevos frescos consumidos a nivel nacional. La información aportada puede resultar de utilidad para evaluar la situación sanitaria, las relaciones entre dieta y enfermedad y la planificación de dietas, especialmente para grupos específicos, dada la importancia del zinc sobre la salud y considerando al huevo alimento básico en la dieta habitual. Sería necesario contar con datos en otros alimentos representativos de la dieta de nuestro país con el fin de conocer el estado nutricional de zinc.

AGRADECIMIENTOS

A la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA) por la información brindada y provisión de muestras y a la Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Morón por el apoyo económico que hizo posible la presentación de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Alnwick, D. (1998). Combating micronutrient deficiencies: Problems and perspectives. *Proceedings of the Nutrition Society*, London, v.57, p.137-147.

Ananda, S. and Prasad, M.D. (2001). Discovery of Human Zinc Deficiency: Impact on Human Health. *Nutrition*, 17,7/8.

Association of Official Analytical Chemists (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15 th ed.

Black, M. M. (1998). Zinc deficiency and child development. *Am. J. Clin.Nutr.*, 68; 464.

Boccio, J. (2002). Strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutrition Review*, New York, v.60, p.52-58.

Bode, P. (1996). Instrumental and Organisational Aspects of a Neutron Activation Analysis Laboratory. Delft University of Technology, Holland.

Britos S., Centro de Estudios de Nutrición Infantil (CESNI) (2004). *Jornada Científica "La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro"*.www.lanación.com.ar.

Calvo E.,coordinadora del Area de Nutrición de la Dirección Nacional de Salud Materno-infantil del Ministerio de Salud. (2004). *Jornada Científica "La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro"*.www.la nación.com.ar.

Coleman, J. E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcriptions factors and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.*,61;897.

Cousins, R., Hempe, J. (1990). Zinc. Present knowledge in nutrition. *International Life Sciences Institute*. 6. ed. ILSI. North America, 289-308.

Fakayode S.O. and Olu-Owolabi I. B. (2003). Trace metal content and estimated daily human intake from chicken eggs in Ibadan, Nigeria. *Archives of Environmental Health*, 58,41, 245-251.

Food and Agricultural Organisation (2003). *Food Composition*.
www.fao.org/infoods/data

Food Nutrition Board (2004). *Dietary Reference Intakes 1997–2001*. Institute of Medicine, USA.

I.A.E.A (1990). Practical Aspects of Operating a Neutron Activation Analysis Laboratory. International Atomic Energy Agency, TEC-DOC-564, Vienna.

Kiliç Z., Acar O., Ulaşan M. and Ilim M. (2002). Determination of lead, copper, zinc, magnesium, calcium and iron in fresh eggs by atomic absorptionspectrometry. *Food Chemistry*,76, 107-116.

- Milne, D. V., Davis C.D., and Nielsen, F. H. (2001).** Low Dietary Zinc Alters Indices of Copper Function and Status in Postmenopausal Women. *Nutrition*, 17;701-708.
- Murcia, M.A., Martinez-Tomé, M., Del Cerro, I., Sotillo, F., Ramírez, A. (1999).** Proximate Composition and Vitamin E Levels in Egg Yolk: Losses by Cooking in a Microwave Oven. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1550-1556.
- Naber, E.C. (1979).** The Effect of Nutrition on the Composition of Eggs. *Poultry Science*,58: 518-528.
- O'Donnell A., director del Centro de Estudios de Nutrición Infantil (CESNI). (2004).** *Jornada Científica "La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro"*. www.lanación.com.ar.
- Portela, M. (1993).** Vitaminas y minerales en nutrición. *Libreros Lopez*, Buenos Aires, Argentina.
- Prasad A.S. (2000).** Effects of zinc deficiency on immune functions. *J. Trace Elem. Exp. Med*, 13:1; 1202.
- Ruz, M. Trace element intake and nutriture in Latin America. (1994).** *Proceedings of the international congress of nutrition*, Australia, p.296-300.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M.B, Lysionek, A., Caro, R. A., Weill, R. and Boccio, J. R. (2002).** The Role of Zinc in the Growth and Development of Children . *Nutrition*,18; 510-519.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M.B, Lysionek, A., Cremaschi, G., Sarabia, I., Caro, R. A., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R. and Boccio, J. R. (2000b)** Zinc status and immune system relationship: a review. *Biological Trace Element Research*, Clifton, v.76, p.193-205.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M.B, Lysionek, A., Sarabia, I., Caro, R. A., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J. R. (2000a).** Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutrition Research*, St. John's, v.20, p.737-755.
- Shankar, A. S. and Prasad A.S. (1998).** Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.*,68(suppl):447S.
- Standards Association of Australia. (1974).** *Methods for the Chemical Examination of Eggs and Egg Products*, AS 1383.
- USDA. (2004).** *National Nutrient Database for Standard Reference*. Release 17.
- World Health Organization. Commission on Health and Environment. (1992). Report of the panel on food and agriculture, *World Health Organization*, Geneva.

HUEVO FRESCO COMO APORTADOR DE HIERRO EN ARGENTINA

FISSORE Eliana¹, GÓMEZ Rosa G.² y RESNIZKY Sara M.³

¹Alumna de la Fac.de Agronomía y Cs Agroalimentarias. Univ. de Morón. ²FCEyN. UBA. ³CNEA. ²Dpto Quím. Orgánica. Area Bromatología. FCEyN. UBA. Ciudad Universitaria. 1428-Bs.As. Argentina. Tel/Fax 54 11 45763346. E-mail: rgomez107@hotmail.com. ³Grupo Técnicas Analíticas Nucleares. CNEA. Av. del Libertador 8250. 1429 - Bs.As. Argentina. Tel/Fax 54 11 67798126. E-mail: resnizky@cae.cnea.gov.ar;

RESUMEN

La técnica de Análisis por Activación Neutrónica fue utilizada para la determinación del contenido de hierro en catorce lotes de muestras de huevos provenientes de grandes productores de Buenos Aires y Entre Ríos (70 % de la producción del país). Los valores obtenidos expresados como mediana y su desvío y rango fueron de 0,08; 0,03 y 0,02 - 2,29 mg/100 de clara y 5,40; 0,52 y 3,88 – 7,01 mg/100 g de yema.

Se puede estimar que un huevo entero medio de 65 g (40,6 g de clara y 18,5 g de yema) aportaría 1,03 mg de hierro lo que representa aproximadamente el 15 y 10% de la IDR de 7 y 10 mg diarios para niños de 1 a 3 y de 4 a 8 años respectivamente. Este trabajo resulta de interés dada la falta de datos de composición de alimentos nacionales y la importancia del Fe como el micronutriente de mayor deficiencia.

Palabras claves: hierro, huevos de gallina, micronutrientes, análisis por activación neutrónica

ABSTRACT

Neutron Activation Analysis was used for iron determination in fresh eggs from Buenos Aires and Entre Ríos provinces (70% of the country production).

The values obtained (median, median deviation and range) were 0,08; 0,03 and 0,02 – 2,29 mg/100 g in white and 5,40; 0,52 and 3,88 – 7,01 mg/100 g in yolk. Taking into account this data, a whole egg (65 g, white 40,6, yolk 18,5) could provide 1,03 g of Fe, which represent 15 and 10 % of daily RDI for children among 1 and 3 years, and 4 to 8 years respectively (7 and 10 mg).

The data presented are relevant due to the lack of information about national foodstuff and the importance of Fe deficiency.

Key words: iron, hen eggs, trace elements, neutron activation analysis

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hierro es la más frecuente dentro de los micronutrientes, siendo en la actualidad, a pesar del creciente conocimiento en este campo de investigación, uno de los mayores problemas nutricionales en el mundo (Santos y col, 1996; Devi, 2000; Torrejón y col, 2004). La Organización Mundial de la Salud estima que la mitad de la población mundial no llega a cubrir las necesidades de hierro y una cuarta parte sufre de anemia (WHO,1996; Torrejón y col, 2004). La deficiencia de este micronutriente afecta no sólo a la población de países en vías de desarrollo sino también a la de países desarrollados, con graves consecuencias sobre la salud y la economía en aquellas regiones significativamente afectadas. Los grupos más vulnerables son los lactantes, niños menores de dos años, adolescentes, embarazadas y mujeres en edad reproductiva (WHO,1996; De Henauw y col, 2001; Perrone, 2004). Las principales consecuencias de la deficiencia de hierro son aumento de la frecuencia de partos prematuros, muerte materna y del recién nacido, y disminución del desarrollo psicomotor (Grantham-McGregor y col,2001; Torrejón y col, 2004). Las principales causas son baja cantidad y/o baja biodisponibilidad de hierro ingerido. Las estrategias para solucionar su deficiencia son fortificación de alimentos, suplementación farmacológica y educación nutricional del consumidor (Freire,1998; Salgueiro y col, 2002).

En Argentina las encuestas nutricionales indican que dos de cada tres niños tienen déficit de hierro (Calvo, 1990; Andraca y col, 1997; O'Donnell, 2004). Según los especialistas esta situación se asocia a la pobreza en grupos carenciados, y a hábitos de alimentación inapropiados acentuados en adolescentes en las clases media y alta (Calvo y col, 1990; Britos, 2004; Calvo, 2004; Larguía, 2004; O'Donnell, 2004).

Para prevenir la deficiencia de hierro y sus consecuencias se han fortificado algunos alimentos, sería conveniente además la implementación de campañas de educación nutricional para modificar hábitos alimenticios (Portela, 1993; Alnwick, 1998; Boccio, 2002; Di Marino, 2002; O'Donnell, 2004).

Las principales fuentes primarias de hierro son las carnes y las secundarias las legumbres, los vegetales de hoja y el huevo. El huevo fresco es muy importante como alimento de la dieta diaria, accesible por su bajo costo para gente de bajos recursos, de alto valor nutricional y aceptabilidad en diversas preparaciones culinarias, prácticamente sin desperdicio dado el escaso peso de la cáscara. Se considera como aportador de hierro en especial por su contenido en yema, si bien la biodisponibilidad de acuerdo a las

referencias bibliográficas son contradictorias (Callender y col, 1970; Miller y col, 1983; Rao, 1994; Kiliç y col, 2002).

El objetivo de este trabajo, dada la importancia de poder contar con datos nacionales, fue evaluar huevos de gallina frescos argentinos como aportadores de hierro, determinando su contenido en yema y clara debido a sus distintas formas de consumo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los lotes de huevos frescos analizados fueron provenientes de distintos productores de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, que representan el mayor volumen de producción (70%) y distribución en todo el país, según datos publicados por la Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPYA). Algunos lotes de 30 a 60 huevos fueron provistos directamente por los mayores productores a través de la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA) y otros comprados en supermercados de venta masiva. Se analizaron 14 lotes provenientes de granjas avícolas de las localidades de Pergamino (2 lotes), González Catán, Pilar, Moreno, Manuel Ocampo, General Las Heras, General Rodríguez, Victoria y Marcos Paz de la provincia de Buenos Aires y Ejido Colón - Colonia San José, Viale, Ejido Crespo - Aldea San Rafael, y Crespo de la provincia de Entre Ríos. Los lotes analizados fueron de huevos blancos, de 65g de peso medio, provenientes de gallinas ponedoras de jaula de las líneas híbridas Hy Line, HW Blancas, B300 y Lomans, alimentadas con mezcla de balanceado comercial compuesto por harina de carne, maíz, soja, trigo, girasol, vitaminas y minerales.

Se seleccionó un total de 168 huevos, 12 de cada lote tomados al azar descartando los que presentaban defectos. La muestra analítica consistió de 6 huevos por duplicado de cada lote o granja avícola, según AS 1383 Standards Association of Australia (1974).

Los huevos fueron luego roturados en forma manual separándose yema, clara y cáscara. Se pesó cada huevo, yema y cáscara individualmente previo lavado y secado de la última; la masa de clara se obtuvo por diferencia. Se prepararon pools compuestos por 6 yemas y 6 claras separadamente, los que se homogeneizaron cuidadosamente con varilla de vidrio evitando la formación de espuma. Para prevenir posibles contaminaciones se evitó el uso de elementos metálicos. Los pools de yema y clara se analizaron por duplicado para determinar su contenido de humedad y hierro. La determinación de humedad se realizó según método 925.30 AOAC (1990), en estufa de vacío a 100 ± 2 °C hasta peso constante.

La determinación de hierro se realizó utilizando la Técnica de Análisis por Activación Neutrónica Instrumental. Las muestras de clara y yema fueron liofilizadas, envasadas en forma adecuada, y finalmente acondicionados en cápsulas de irradiación de aluminio junto con patrones de comparación y materiales control e irradiadas durante 10 horas en el reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza (7 MW de potencia, flujo térmico nominal de 6×10^{13}). Después de un tiempo de decaimiento de 25 a 30 días, muestras, patrones y material control fueron medidos en un detector de Germanio Hiperpuro (30% eficiencia, resolución 1.8 keV para el pico de 1332.5 keV de ^{60}Co). Se utilizó el software Gamma Vision para la adquisición de datos y un programa desarrollado en el laboratorio para el cálculo de las concentraciones. La determinación de hierro se realizó a través de la medición del ^{59}Fe , de 45,6 días de período de semidesintegración, se utilizaron las energías gamma de 1099,3 y 1291,5 keV para la realización de los cálculos (I.A.E.A,1990; Bode,1996). Asimismo, como control de calidad analítico se analizó un material de referencia certificado, V -10 Hay Powder del IAEA (International Atomic Energy Agency), encontrándose un valor de concentración de Fe de $185 \pm 14 \mu\text{g/g}$, siendo el valor certificado de 185 (177 - 190) $\mu\text{g/g}$.

Tabla 1. Contenido de hierro y peso de huevo entero, clara, yema y cáscara de huevos frescos de 14 granjas avícolas de localidades de las provincias de Buenos Aires (*) y Entre Ríos (**).

Localidad	Fe en clara		Fe en yema		Peso (g)			
	mg/100g \pm SD	mg/clara	mg/100g \pm SD	mg/yema	clara	yema	cáscara	huevo
Pergamino 1 *	0,14 \pm 0,02	0,06	4,91 \pm 0,02	0,89	40,80	18,10	6,40	65,30
Pergamino 2 *	0,07 \pm 0,02	0,03	5,39 \pm 0,37	0,98	40,83	18,13	5,00	63,96
González Catán *	0,05 \pm 0,02	0,02	6,70 \pm 0,66	1,05	39,55	15,72	5,05	60,32
Pilar *	0,10 \pm 0,02	0,04	5,28 \pm 0,43	0,88	42,28	16,67	6,40	65,35
Moreno *	0,05 \pm 0,03	0,02	6,35 \pm 0,50	1,16	40,28	18,18	6,41	64,87
Manuel Ocampo *	0,07 \pm 0,03	0,02	6,61 \pm 0,58	0,94	36,18	14,30	5,34	55,81
Gral. Las Heras *	0,12 \pm 0,03	0,06	7,01 \pm 0,43	1,36	47,70	19,39	7,01	74,10
Gral. Rodríguez *	0,02 \pm 0,01	0,01	5,91 \pm 0,43	1,10	36,98	19,25	5,20	61,35
Victoria *	0,12 \pm 0,03	0,05	3,88 \pm 0,39	0,82	38,05	18,60	5,71	62,36
Marcos Paz *	0,03 \pm 0,01	0,01	5,89 \pm 0,37	0,99	38,91	21,14	5,89	65,94
Ej.Colón-San José **	2,29 \pm 0,13	0,85	4,86 \pm 0,34	0,94	35,07	16,85	5,94	57,87
Viale **	0,10 \pm 0,03	0,05	5,00 \pm 0,59	1,24	47,13	25,41	6,71	79,26
Ej.Crespo-S.Rafael **	0,08 \pm 0,02	0,03	5,41 \pm 0,58	1,08	44,22	19,99	7,26	71,49
Crespo **	0,06 \pm 0,02	0,03	4,87 \pm 0,33	0,81	40,47	16,69	6,63	61,78
Mediana	0,08	0,03	5,40	1,00				
Desvío de la mediana	0,03	0,01	0,52	0,10				
Rango	0,02-2,29	0,01-0,85	3,88-7,01	0,82-1,36	35,07 47,70	14,30 25,41	5,00 7,26	55,81 79,26
Promedio					40,60	18,67	6,06	64,98
DS					3,90	2,65	0,74	6,31

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos de los pesos de yema, clara, cáscara y huevo entero de los lotes provenientes de 14 granjas avícolas situadas en Buenos Aires y Entre Ríos, provincias productoras del 70% de los huevos frescos consumidos a nivel nacional se muestran en la Tabla 1. El contenido de humedad (valor medio \pm el desvío estándar y rango) fue de $9,54 \pm 1,50$ y $7,50 - 11,51$ % para yema y $35,78 \pm 3,31$ y $30,76 - 42,06$ % para clara.

Las concentraciones de hierro en las muestras analizadas se encuentran en la Tabla 1. Las mismas son el promedio de dos determinaciones independientes, expresadas en miligramos de Fe por 100 gramos de muestra de clara o de yema. En la Tabla se detallan además las medianas y los desvíos de las medianas y el rango de los valores mencionados. Los contenidos determinados en clara presentan una gran dispersión. Para poder estimar los contenidos de Fe en clara y en yema se consideraron las concentraciones en las muestras (expresadas como medianas de los valores obtenidos) y las masas promedio de clara o yema. Los valores determinados en este trabajo indican concentraciones mayores de hierro en yema y similares en clara al compararse con los reportados en otros países, no considerándose la biodisponibilidad (Kiliç y col, 2002; Fakayode y col, 2003; FAO, 2003; USDA, 2004).

Teniendo en cuenta los valores hallados, se estimó un contenido de hierro de 1,03 mg para un huevo entero medio de 65,0 g, 40,6 g de clara y 18,5 g de yema. Un huevo fresco aportaría 15 y 10 % de la Ingesta Dietética de Referencia de 7 y 10 mg diarios para niños de 1 a 3 y de 4 a 8 años respectivamente, sin considerar la biodisponibilidad (Food Nutrition Board, 2004).

CONCLUSIONES

La información que surge de este trabajo puede contribuir como una guía más adecuada de los contenidos de hierro en huevos frescos consumidos a nivel nacional, que el uso de información proveniente de fuentes extranjeras. Estos datos podrían ser de utilidad en la planificación de dietas alimentarias y en la estrategia de educación nutricional para prevenir y disminuir las consecuencias de su deficiencia, entre ellas la anemia ferropénica en grupos vulnerables de la población argentina.

AGRADECIMIENTOS

A la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA) por la información brindada y provisión de muestras y a la Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias de la

Universidad de Morón por el apoyo económico que hizo posible la presentación de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Alnwick D. (1998) Combating micronutrient deficiencies: Problems and perspectives. *Proceedings of the Nutrition Society*, London, .57, 137-147.

Andraca I, Castillo M., Walter T.(1997) Desarrollo psicomotor y conducta en lactantes anémicos por deficiencia de hierro. Deficiencia de hierro. *CESNI*, Buenos Aires, Argentina, 107-117.

Association of Official Analytical Chemists. (1990) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15 th ed.

Boccio, J. (2002) .Strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutrition Review*, New York, v.60, p.52-58.

Bode, P. (1996). Instrumental and Organisational Aspects of a Neutron Activation Analysis Laboratory. Delft University of Technology, Holland.

Britos S., Centro de Estudios de Nutrición Infantil (CESNI) (2004).*Jornada Científica “La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro”*. www.lanación.com.ar

Calvo E., coordinadora del Area de Nutrición de la Dirección Nacional de Salud Materno-infantil del Ministerio de Salud (2004) *Jornada Científica “La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro”*.www.lanación.com.ar.

Calvo E. and Gnazzo N. (1990) Prevalence of iron deficiency in children aged 9-24 mo from a large urban area of Argentina. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52, 534-540.

Callender S. T., Marney S. R. and Wagner S. T.(1970) Eggs and iron Absorption. *Br. J. Haemato.*, 18, 857-885.

De Henauw S., Matthys C., Bellemans N., Maeyer M. and De Backer G. (2001). Iron intake and dietary sources of iron in the diet of 14-18 years old belgian adolescents. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 45, 483.

Devi A. C.,(2000) Iron nutrition status assesssment. *Nutrition Research*, 20,3, 445-448.

Di Marino S. (2002) El huevo fuente de vida.www.latinsalud.com.ar/Temas/Huevo.htm.

Fakayode S.O. and Olu-Owolabi I. B. (2003).Trace metal content and estimated daily human intake from chicken eggs in Ibadan, Nigeria. *Archives of Environmental Health*, 58,41, 245-251.

Food and Agricultural Organisation (2003). *Food Composition*.
www.fao.org/infoods/data

- Food Nutrition Board (2004).** *Dietary Reference Intakes 1997–2001*. Institute of Medicine, USA.
- Freire W. (1998).** Iron deficiency anemia: FAO/WHO strategies to fight it. *Salud Publica Mexico*, Mexico, 40, 199-205.
- Grantham-McGregor S. And Ani C. (2001)** A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J. Nutrition*, 131:649S.
- I.A.E.A (1990).** Practical Aspects of Operating a Neutron Activation Analysis Laboratory. International Atomic Energy Agency, TEC-DOC-564, Vienna.
- Kiliç Z., Acar O., Ulaşan M. and Ilim M. (2002).** Determination of lead, copper, zinc, magnesium, calcium and iron in fresh eggs by atomic absorptionspectrometry. *Food Chemistry*, 76, 107-116.
- Larguía M. (2004)** *Jornada Científica “La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro”*. www.lanación.com.ar.
- Miller J.and Hendu H. (1983)** Bioavailability of iron in cooked egg yolk to maintenance of hemoglobin levels in growing rats. *J. Nutr.*, 113, 1169-1175.
- O’Donnell A., director del Centro de Estudios de Nutrición Infantil (CESNI) (2004).** *Jornada Científica “La alimentación de los niños argentinos de hoy y su futuro”*. www.lanación.com.ar.
- Perrone M. (2004)** *Minerales- Comunidad*.www.nutrar.com. 16-Portela, M. (1993) *Vitaminas y minerales en nutrición Libreros Lopez*, Buenos Aires, Argentina.
- Rao B. S. N. (1994).** Methods for the determination of bioavailability of trace metals. A critical evaluation. *J. Fd. Sci. and Technol.*, 31, 353-361.
- Salgueiro M., Zubillaga M., Lysionek Caro R., Weill R., and Boccio J. (2002)** Strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutrition Review*, New York, .60, 52-58.
- Santos V. D., Bianchi M. L. P, Latunde-Dada and Danfluzzi J. C. (1996).** Bioavailability of iron from home prepared weaning foods. *Nutrition Research*, 16, 5, 1601-1605.
- Standards Association of Australia, (1974).** Methods for the Chemical Examination of Eggs and Egg Products, AS 1383.
- Torrejón C. S., Castillo-Durán C., Hertrampf E. D. and Ruz M. (2004)** Zinc and iron nutrition in chilean children fed fortified milk provided by the complementary National Food Program. *Nutrition*, 20, 117-180.
- USDA (2004).** *National Nutrient Database for Standard Reference*. Release 17.
- World Health Organization. (1996)** Trace elements in human health and nutrition. Geneva. *World Health Organization*.

EVALUACION BIOLOGICA DEL MEJORAMIENTO NUTRICIONAL DE HARINA DE TRIGO Y SÉMOLA CON PROTEÍNAS DE SUERO

MARCHESICH Claudia, CABRERA Mildred, MARCHINI Mariano, CLOSA Sara J.

Departamento de Tecnología. Nutrición. Universidad Nacional de Luján.
C.C. 221 (6700) Luján. Bs.As. ARGENTINA. E-mail: mccmnut@mail.unlu.edu.ar

RESUMEN

El suero de lechería es usado en la industria alimentaria deshidratado y/o concentrado generalmente por sus propiedades funcionales. En este trabajo se plantea el uso del suero para mejorar la calidad proteica de alimentos de consumo masivo como pastas y panificados.

Se evaluaron las proteínas de suero, sémola, harina de trigo y las mezclas de suero con harina o con sémola. La mezcla de sémola con suero se formuló con 12% de suero y en la harina de trigo la proporción de suero en la mezcla fue del 5%. Se determinó la calidad proteica por los métodos de Utilización Proteica Neta (UPN) y el valor de Relación Proteica Neta Relativa (RNPR) en ratas de la cepa Wistar siguiendo la metodología estandarizada.

El agregado de proteínas de suero tanto a la sémola como a la harina de trigo mejora notablemente los parámetros de calidad proteica VB, UPN y RNPR. Los valores concuerdan con que las proteínas del suero, ricas en lisina, complementan la proteína del trigo (gluten) cuyo primer limitante es precisamente este aminoácido.

Por lo tanto, se pudo demostrar la ventaja de realizar la suplementación proteica planteada, dado que incrementa la utilización de la proteína ingerida.

ABSTRACT

Whey is used dehydrated or concentrated in food industry, mainly for its functional properties. Utilization of whey to increase protein quality in basic food (as bread and pasta) is proposed.

Whey, semola, wheat flour and its mixtures were evaluated. Semola and whey mixture was formulated with whey at level 12% and with flour, whey rate was 5%.

Protein quality was determined by Net Protein Utilization (NPU) method and Relative Net Protein Rate (RNPR) value using rats (Wistar) according to standardized methodology. Added whey protein to semola and flour improve protein quality parameters Biological

Value (BV), NPU y RNPR, since whey protein are rich in lysine and complement to wheat protein (gluten) where this aminoacid is the 1° limitant. Concluding, advantage of making described protein supplementation was demonstrated as well as ingested protein utilization is increased.

Palabras Clave: Harina, sémola, proteínas, suero.

INTRODUCCIÓN

Según el Codex Alimentarius (Codex, 1995), se entiende por sémola y harina de trigo los productos elaborados con granos de trigo duro (*Triticum durum*) por medio de procedimientos de trituración o molienda en los que se separa la mayor parte del salvado y del germen. Tanto la harina como la sémola son ingredientes básicos de gran consumo en la población. Los datos correspondientes a los últimos años marcan una clara tendencia alcista en el consumo de harinas, llegando a los 92 kg *per cápita* en el año 2003 (FAIM, 2004). El 74% de la harina industrializada está destinada a la elaboración de pan tradicional (SAGPyA, 2003). La sémola se utiliza para la fabricación de alimentos moldeados y desecados especialmente las pastas alimenticias. La industria de pastas secas utiliza principalmente sémola de trigo candeal y, en menor cantidad, semolín, harina trigo pan o harina integral. Aproximadamente el 40% de las pasta secas se elabora con sémola, que permite lograr un producto de mayor calidad, más consistente y resistente en la cocción. El consumo nacional de pastas secas es de 7 kg/hab./año, y presenta características estacionales, siendo mayor en el invierno (SAGPyA, 2004)

Más allá de que la principal característica de los alimentos farináceos es el de proveer energía, la cantidad de proteínas que aportan la harina y la sémola no es despreciable. Si bien su calidad nutricional es baja, dado que el gluten contiene poca cantidad de lisina, estas proteínas son muy importantes por sus propiedades funcionales ya que tienen la capacidad de regular la absorción del agua para formar una red proteica elástica.

Resulta entonces muy interesante poder complementar las propiedades funcionales de la proteína del trigo con la calidad nutricional de alguna fuente proteica de mayor calidad. No obstante, debe considerarse que para panificación se debe mantener esta funcionalidad de las proteínas del trigo lo que limita la cantidad de otro tipo de proteínas que puede agregarse a la harina. Sin embargo, el uso de la sémola es principalmente para pastas que no requiere de estas propiedades y por ello es que permite la incorporación de mayor cantidad de suero.

El suero de lechería contiene proteínas de excelente calidad: las albúminas y globulinas de la leche, entre las que se pueden mencionar la β -Lactoglobulina (β -Lg), α -

Lactoalbúmina (α -La), Inmunoglobulinas (Ig), Bovinseroalbúmina (BSA), Proteosa-peptona, Lactoferrina y Lactoperoxidasa. Estas proteínas poseen una muy buena relación de aminoácidos y se destaca el alto contenido de lisina, triptofano y treonina (Maubois, 1988). De acuerdo a la bibliografía, el lactosuero obtenido de la elaboración de quesos contiene aproximadamente 9 g de lisina por cada 100 g de proteínas, bastante más incluso que el contenido de este aminoácido en la leche humana (Marshall, 1988).

La valorización del suero en nuestro país tiene sus comienzos en la segunda mitad de la década de los 90, ya que anteriormente era considerado como un subproducto desechable para uso en la alimentación animal. Actualmente este derivado es deshidratado o concentrado y en algunos casos parcialmente deslactosado para ser usado en la industria alimentaria

En este trabajo se plantea la posibilidad de mejorar la calidad proteica de alimentos de consumo masivo como pastas y panificados, que son los que llegan a los sectores poblacionales con mayor riesgo de padecimiento de carencias nutricionales (INDEC, 2004). Con este objetivo se formularon y evaluaron mezclas de harina de trigo y sémola con proteínas de suero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

-Harina de trigo "000" - según el Código Alimentario Argentino (C.A.A., 2004) -, de primera marca, fraccionada en envases de 1 kg, adquirida en supermercados de la zona de influencia de la Universidad.

-Sémola: fue adquirida en local de venta minorista que comercializa productos a granel.

-Concentrado de proteínas de suero: fue provisto por empresas lácteas nacionales.

-Mezcla de harina de trigo y suero: se hizo al 5% de suero. La industria actualmente usa al suero como ingrediente en una proporción variable entre 1 y 2%, La proporción elegida se determinó por la mejora de la calidad proteica estimada por el cálculo teórico del Chemical Score (CS).

-Mezcla de sémola y suero: la sémola se utiliza fundamentalmente para la elaboración de pastas secas por lo tanto admite una mayor proporción de suero, por lo que la mezcla se realizó al 12% de suero.

Métodos:

Se realizaron las determinaciones y ensayos enumerados a continuación, según la metodología descripta:

-Proteínas: Suero: FIL/IDF 20B:1993 (FIL, 1993) y Manual FAO (FAO, 1986) (*N x 6,38*); Harina y sémola AOAC 920.87 y 979.09 (AOAC, 1984),.respectivamente (*N x 5,7*).

-Ensayos biológicos: en ratas de la cepa Wistar (edad promedio de 32 días), los animales, distribuidos en lotes, fueron alimentados durante 10 días con las dietas preparadas con las fuentes proteicas a evaluar de acuerdo a la metodología estandarizada. (Miller, 1955), (Morrison, 1963), (Pellet, 1980):

- Utilización Proteica Neta (UPN) y Digestibilidad (D): se utiliza para determinar la calidad proteica por evaluación indirecta a partir de los datos de agua corporal y la edad del animal. Se calculó el Valor biológico (VB) con los datos de UPN y D y la Utilización Proteica Neta estandar (UNPst).
- Relación Proteica Neta Relativa (RNPR), que evalúa la relación entre la ganancia de peso y la ingesta de la proteína en estudio y la de una proteína patrón (caseína suplementada con metionina) al que se le asigna un valor de 100% y se la toma como referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla I Resultados de la evaluación biológica de la calidad proteica

	%Prot	UPN	D	VB	RNPR	UPN st
Harina de trigo	8,1	42	87	48	51	43
Sémola	9,0	42	95	44	55	42
Conc. Prot. Suero	9,2	83	90	92	95	91
Harina de trigo + Suero (5%)	10,6	52	92	56	65	62
Sémola + Suero (12%)	10,6	71	93	76	92	78

En lo que se refiere a la evaluación biológica los resultados de los ensayos muestran que la adición de suero a las materias primas estudiadas mejora la calidad de sus proteínas.

En el ensayo de UPN, el VB de la harina de trigo fue de 48 y en el ensayo de RNPR el valor obtenido fue de 51, en tanto que su mezcla con suero al 5% incrementó estos parámetros a 56 y 65 respectivamente.

En el caso de sémola al permitir mayor proporción de suero (12%) los ensayos mostraron un aumento mayor de la calidad tal que el VB pasa de 44 a 76 y RNPR de 55 a 92.

Los ensayos biológicos corroboran la alta calidad nutricional del concentrado de suero que presenta un VB elevado (92) ya que el alto valor nutritivo (UPN) se completa con una alta digestibilidad (90)

En todos los casos, la digestibilidad de las proteínas de las dietas experimentales resultó ser superior a 90.

CONCLUSIONES

El agregado de proteínas de suero, tanto a la sémola como a la harina de trigo, mejora notablemente los parámetros de calidad proteica VB, UPN y RNPR, de acuerdo a los resultados de la evaluación biológica realizada. En términos de balance nitrogenado, las mezclas de harina y sémola con suero contribuyeron a incrementar la proporción de nitrógeno retenido del total de nitrógeno ingerido, ya que las proteínas del suero son ricas en lisina y la proteína del trigo (gluten) tiene a este aminoácido como primer limitante.

Los resultados obtenidos demostraron particularmente la ventaja de realizar la suplementación de la proteína de trigo con bajas proporciones del concentrado de suero, dado que mejora notablemente la utilización de la proteína ingerida.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. Official methods of analysis. Helrich K editor. 14th Ed. Washington, DC. The Association of Official Analytical Chemists, 1984.

Codex Alimentarius (1995). Norma del Codex para la Sémola y la Harina de Trigo duro. CODEX STAN 178-1991 (Rev. 1-1995).

Código Alimentario Argentino (2004) - Ley 18.284. C.A.A. - Tomo I. De la Canal Ediciones. FAIM (2004) – Estadísticas de Molinera de trigo pan y producción de harinas en la República Argentina. Federación Argentina de la Industria Molinera.

Federation Internationale de Laiterie. - International Dairy Federation (FIL - IDF).

International IDF Standard 20B: 1993 – Milk and Milk products: Determination of nitrogen content.

INDEC (2004) – Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares (ENGH). En www.indec.mecon.gov.ar.

Manuals of Food Quality Control. Food Analysis Techniques: additives, contaminants and composition. FAO Food and Nutrition Paper 14/7. FAO, Rome. 1986, p.228.

Marshall K., Harper W. (1988). Whey protein concentrates. Bulletin of the IDF 233 / 1988, 21-22.

Maubois, J.L., Pierre A., Fauquant, J. Piot, M. (1988) - Industrial fractionation of main whey proteins. IDF Bulletin 212: 154-159.

Miller D., Bender A. (1955) – The determination of the Net Utilization of Proteins by shortened method. Brit. J. Nutr. (9): p. 382-388.

Morrison A., Sabry Z., Gridgeman N., Campbell J. (1963) – Evaluation of protein in foods. VIII. Influence of quality and quantity of dietary protein on Net Protein Utilization. Can. J. Of Biochem. And Physiology (41): p. 275-281.

Pellet P., Young V. Eds. (1980) – Evaluation of protein quality in experimental animals. En: Nutritional Evaluation of protein foods. The United Nations University. World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin, Suppl. 4, Cap. 4, p 41-57.

SAGPyA (2003) - Harina de Trigo. Documento de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos en: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>

SAGPyA (2004) – Pastas Secas. Documento de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos en: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>

INFLUENCIA DE DISTINTOS COMPONENTES DE LA DIETA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD POTENCIAL DE HIERRO .

BINAGHI María J, GRECO Carola B., LÓPEZ Laura B., RONAYNE Patricia A., VALENCIA Mirta E.

Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. 2do piso. Buenos Aires. Argentina. Tel/Fax: (011)4964-8243. E-mail: jbinaighi@ffyb.uba.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de distintos componentes de la dieta sobre la biodisponibilidad (Bd) del hierro en pan elaborado con harina fortificada. Las muestras analizadas comprendieron mezclas del pan con: 1) componentes individuales de la dieta, 2) bebidas de consumo habitual, y 3) dietas infantiles completas elaboradas con los ingredientes y las bebidas. Los ingredientes individuales fueron: papillas de zapallo, papa, sémola, manzana y banana; las bebidas fueron agua, leche fortificada, infusión-cocción de leche con yerba mate y mezcla leche/mate cocido (50/50). La biodisponibilidad potencial de Fe se determinó usando un método in vitro que mide la dializabilidad de Fe (D%Fe). La D%Fe del pan (10,7) no se modificó en las mezclas con zapallo y con papa (12,5 y 9,7); disminuyó significativamente con manzana, con la infusión-cocción y con mate cocido (7,6; 4,8 y 5,1) y muy significativamente con sémola, banana y leche (3,0; 2,1 y 1,5). La D%Fe del pan en mezcla con la dieta y agua (14,0) disminuyó significativamente con la mezcla leche/mate cocido (4,5) y con mate cocido (5,3). Los resultados obtenidos muestran el efecto de los componentes habituales de las dietas infantiles sobre la biodisponibilidad potencial de hierro.

Palabras Claves: Dializabilidad de hierro, pan fortificado con hierro, alimentación complementaria

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the influence of different dietary components on potential iron bioavailability in bread made with fortified flour.

Samples subjected to analysis comprised mixtures of bread made with ferrous sulphate fortified flour with: 1) individual dietary components, 2) usually consumed beverages, and 3) whole infant diets made up with those ingredients and beverages. The individual ingredients were mashes of pumpkin, potato, wheat grits, apple and banana; the

beverages were water, iron fortified milk, “mate” infusion and a 50:50 mixture of milk with a “mate” infusion.

Potential iron bioavailability was assessed using an *in vitro* modified method, which measures iron dialyzability (FeD%) under controlled pH conditions, after a digestion simulating physiological processes.

Bread FeD% (10.7) was not modified by pumpkin (12.5) or potato mashes (9.7); diminished significantly with apple (7.6), milk + “mate” (4.8) and “mate” infusion (5.1) and even more with wheat grits (3.0), banana (2.1) and milk (1.5). Bread FeD% in the whole diet together with water as beverage (14.0) diminished significantly when the beverages were either milk + “mate” (4.5) or “mate” infusion (5.3).

These results show the effect of components of habitual infant diets on fortification iron potential bioavailability.

INTRODUCCIÓN

La fortificación de alimentos de consumo masivo es una de las mejores estrategias costo-beneficio para prevenir la deficiencia poblacional de hierro (Carmuega E,1999). Sin embargo, debe tenerse en cuenta la fuente de hierro elegida, el alimento a fortificar, y la interacción de esa fuente con los demás componentes del alimento y/o dieta. En nuestro país, un problema frecuente en los lactantes y niños es la anemia causada, entre otros factores, por la baja disponibilidad del hierro de los alimentos que consumen. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de los distintos componentes de la dieta habitual de este grupo, sobre la biodisponibilidad (Bd) de hierro de panes elaborados con harina de trigo fortificada con sulfato ferroso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras analizadas comprendieron: pan elaborado con harina fortificada con sulfato ferroso, mezclado con papillas dulces o saladas y distintas bebidas de consumo habitual. Las papillas fueron de zapallo, papa, sémola, manzana, banana y una dieta que contenía zapallo, papa, sémola y manzana (TABLA 1); las bebidas estudiadas fueron: leche comercial fortificada con Fe, infusión-cocción con yerba mate y mezclas leche / mate cocido (50/50). La infusión-cocción se preparó calentando 10,5g de yerba mate junto con 400 ml de leche fortificada con sulfato ferroso (0,8 mg Fe/100 ml de leche) hasta ebullición durante cinco minutos, luego se dejó en reposo 10 minutos más y por último se coló la yerba mate. El mate cocido se preparó calentando 10,5 g de yerba mate en 400 ml

de agua ultrapura durante cinco minutos a ebullición, para luego dejar reposar diez minutos y por último colar la yerba mate. Además se analizó el pan más la dieta con el agregado de distintas bebidas: agua, mezcla leche/mate cocido (50/50) y mate cocido.

Tabla N° 1: Composición porcentual de la dieta

INGREDIENTE	COMPOSICIÓN PORCENTUAL (%)
Papa	15
Zapallo	15
Sémola	15
Manzana	20
Bebida	30
Pan	5

La dializabilidad de Fe (D%Fe) como un indicador de la Bd potencial fue determinada por medio del método *in vitro* de Miller (Miller D, et. Al. 1981), modificado por Wolfgor y col. (Wolfgor R y col 2002). El procedimiento involucra una digestión enzimática en condiciones que simulan las fisiológicas. Cada muestra fue homogeneizada para facilitar su posterior análisis. Alícuotas de 50 g de los homogeneizados fueron incubadas con 5 ml de una solución acuosa al 3% de α -amilasa, durante 30 minutos a 37° C con agitación. Luego, el pH se ajustó a 2 con solución valorada de HCl 6N, y se agregaron 1,6 ml de pepsina-HCl (16 g/100 ml en HCl 0,1N), incubándose la mezcla a 37° C durante dos horas, con agitación. Dos alícuotas de 15 g del digerido se colocaron en erlenmeyers con bolsas de diálisis (Spectrapore Molecular Weight cut-off 6000-8000) conteniendo 18,75 ml de buffer PIPES 0,15 M y pH variable. El pH del buffer a utilizar fue establecido luego de hacer ensayos previos en base a la matriz alimentaria en estudio, para obtener un pH final uniforme de $6,5 \pm 0,2$, al final de la segunda incubación a 37° C. Después de una hora de incubación, cuando el pH alcanzó un valor mínimo de 4,5, se agregaron 3,75

ml de una mezcla de bilis-pancreatina (2,5% bilis y 0,4% pancreatina en NaHCO₃ 0,1N) prosiguiéndose la incubación durante dos horas a 37° C. Las bolsas de diálisis fueron removidas y enjuagadas con agua ultrapura y los dializados se transfirieron a tubos tarados y se pesaron. El hierro dializado se determinó por espectroscopía de absorción atómica. (Analytical Method for Atomic Absorption Spectrophotometry y AOAC 2000.)

El contenido de hierro total de las muestras fue determinado en el digerido de pepsina por espectroscopía de absorción atómica previa mineralización con una mezcla HNO₃-HClO₄ (50:50).

La dializabilidad de Fe fue calculada como el porcentaje del mineral dializado con respecto a la concentración total de mineral presente en cada muestra.

$$\text{Dializabilidad \% de Fe} = \frac{\text{mg de Fe en el dializado}}{\text{mg de Fe en el digerido}} \times 100$$

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y Test de Dunnet a posteriori.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presentan las D%Fe correspondientes al pan y a las mezclas del pan con las diferentes papillas analizadas. La D%Fe del pan solo (10,7) no mostró diferencia significativa en las mezclas con zapallo y con papa (12,5 y 9,7 respectivamente); pero disminuyó significativamente ($p < 0,001$) con manzana, sémola y banana (7,6; 3,0 y 2,1).

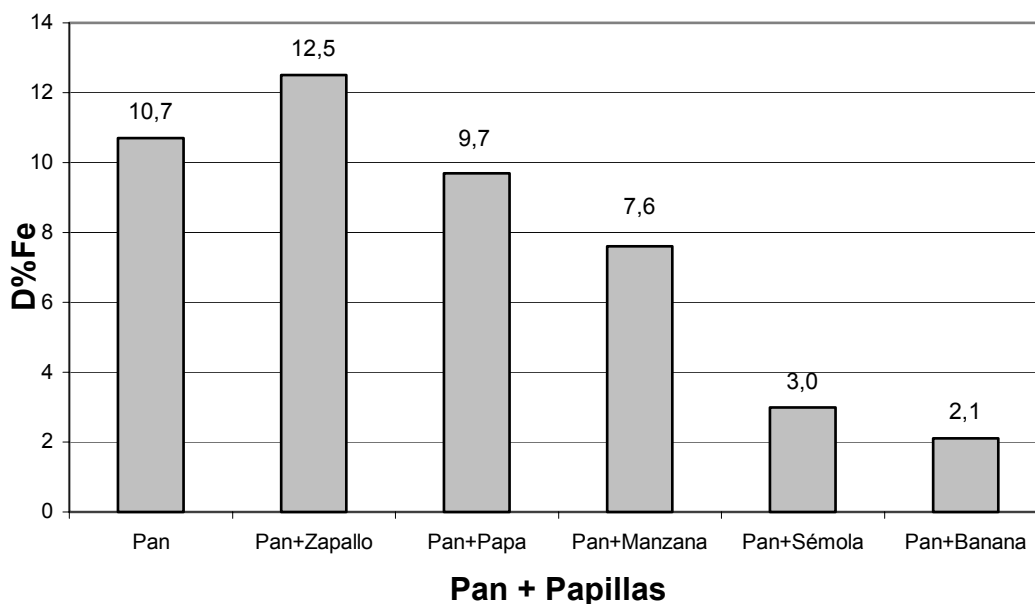


FIGURA 1. Dializabilidad de hierro en mezclas de pan fortificado con papillas

Al evaluar la D%Fe en las mezclas del pan con las bebidas (Figura 2) se observó que al mezclarlo con mate cocido y con la infusión-cocción de leche con yerba mate la disminución fue significativa: 5,1 y 4,8 respectivamente ($p < 0,001$). En la mezcla con leche la disminución fue mucho mayor (1,5). También existió diferencia significativa entre la leche y las mezclas que contienen yerba mate ($p < 0,001$).

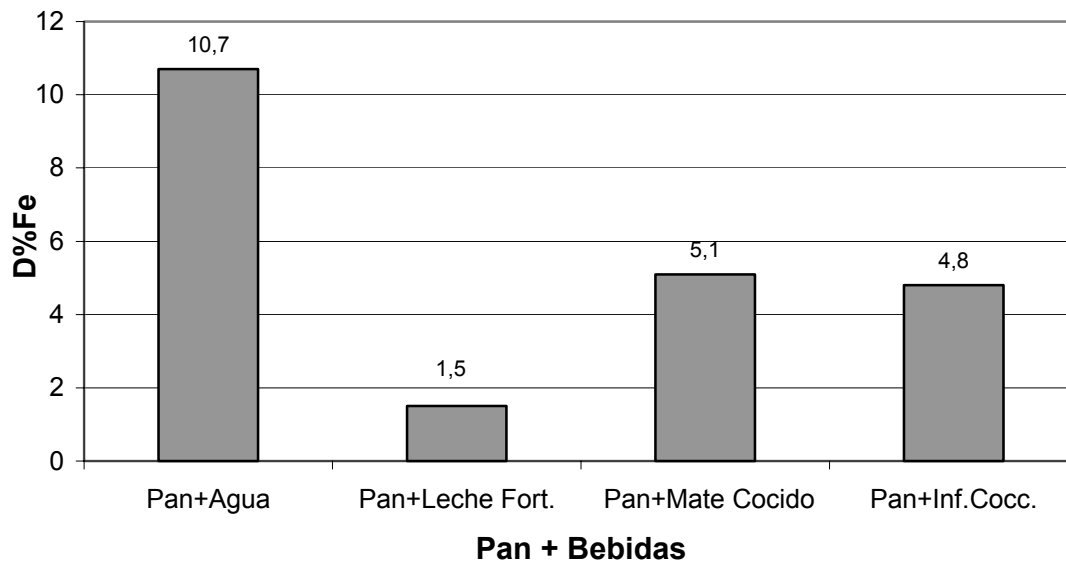


FIGURA 2. Dializabilidad de hierro de pan fortificado en mezclas con distintas bebidas.

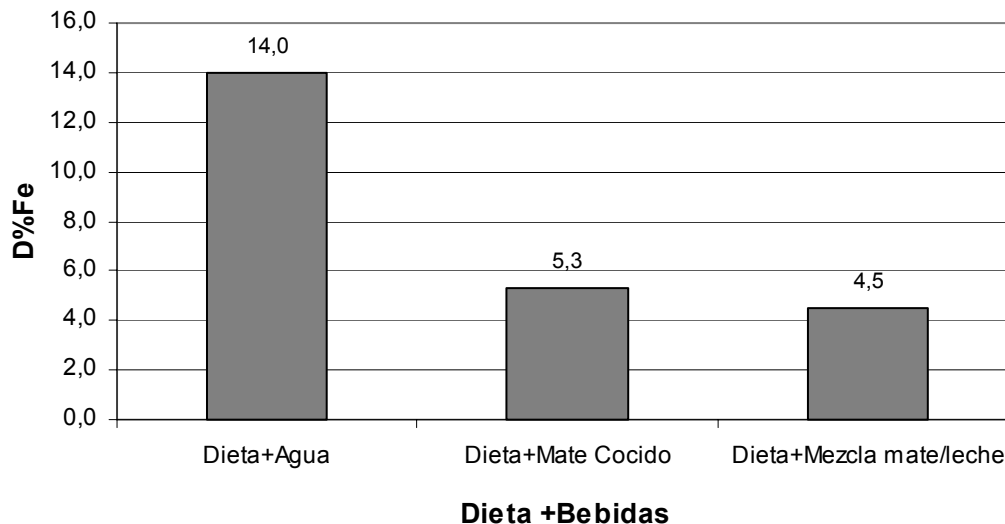
Se estudió además la mezcla de la dieta y las diferentes bebidas (Figura 3). Se pudo observar una importante disminución de la D%Fe desde 14,0 con agua hasta 5,3 al incluir mate cocido y 4,5 con la mezcla mate cocido / leche. Con ambas bebidas se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,001$).

La dieta comprende: pan fortificado + zapallo + papa + sémola + manzana

FIGURA 3. Dializabilidad de hierro en una dieta con pan fortificado mezclado con diferentes bebidas.

La cantidad de hierro de una comida que es absorbida depende de las interacciones del catión con los ligandos competitivos en el tracto digestivo. Los polifenoles presentes en la infusión de yerba mate y en frutas como manzana y banana son ligandos inhibidores de la absorción del hierro no hemínico presente en los alimentos fortificados. Estudios en ratas demostraron que los polifenoles forman complejos insolubles con hierro que precipitan y por lo tanto no pueden dializar. Estos complejos también pueden ser de un alto peso molecular lo que impediría su diálisis como su absorción in vivo. (Brown RC. et al 1990)

Otros ligandos inhibidores de la absorción del hierro son los derivados hexa y penta fosfatos del ácido fítico, presentes en la sémola los que forman complejos insolubles a un pH cercano a la neutralidad impidiendo de esta manera la dializabilidad del hierro. (Zhou JR et al 1995)



La absorción de hierro en las dietas que contienen leche es afectada adversamente por la presencia de proteínas lácteas y calcio. La presencia de grupos fosfoserina en las subunidades de caseína que ligan cationes como el hierro, puede explicar la unión del hierro a péptidos de caseína insolubles y por lo tanto, la disminución de la D%Fe.

Las sales de calcio alteran la absorción de hierro cuando están presentes en las mismas comidas. El efecto inhibitorio del calcio se produce como consecuencia de interacciones fisicoquímicas en el tracto gastrointestinal que también influyen en la dializabilidad del Fe. (Jackson LS. 1992. y Hurrell RF. 1997)

CONCLUSIÓN

El impacto de los distintos componentes de la dieta sobre la biodisponibilidad de hierro de fortificación hace necesario conocer la magnitud de su influencia a fin de poder evaluar con mayor exactitud el porcentaje de cobertura de la IDR con estos productos fortificados.

AGRADECIMIENTOS

Parcialmente financiado por PICTR 2002-00110 y UBACYT B063.

BIBLIOGRAFÍA

- Carmuega E. Capitulo 6. La Calidad de la Dieta de los primeros 2 años de vida en De Hoy y Mañana. Salud y Calidad de Vida de la Niñez Argentina. pp. 157-94 O' Donnell A., Carmuega E. Publicaciones Cesni. 1999.
- Miller D., Schrinken B.R., Rassmussen R.R. 1981. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. Am J Clin Nutr 34:248-56
- Wolfgor R., Drago S.R., Rodriguez V., Pellegrino N., Valencia M.E. 2002. In Vitro measurement of availability iron in fortified foods. Food Res Int 35: 85-90.
- Calcio, Hierro y Zinc: Perkin-Elmer Corp. Analytical Method for Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwolk Cl., 1971.
- Official Method of Analysis of AOAC International, 17th Edition. Washington DC, USA. Association of Official Analytical Chemists: 3, 2000.
- Brown R.C., Klein A., Simmons W., Hurrell R.1990. The Influence of Jamaican herb teas and other polyphenol-containing beverages on iron absorption in the rat. Nutr Res 10: 343-53
- Zhou JR, and Erdman JW. (1995). Phytic acid in health and disease. Critical Review in Food Science and Nutrition 35 (6): 495-508.
- Jackson LS. 1992. The effect of dairy products on iron availability. CRC Crit Rev Food Sci Nutr 31:259-70.
- Hurrell RF. 1997. Bioavailability of iron. In: Assessment of the bioavailability of micronutrients. Proceedings of an ILSI Europe Workshop. Eur J Clin Nutr 51:54-8.

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE ALGUNOS NUTRIENTES MINERALES EN *Porphyra columbina* PRESERVADA TRADICIONALMENTE Y CON TRATAMIENTO DE DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA

SAMILLÁN BECERRA, Silvia M¹; LANGINI, Silvia H¹; FAJARDO, María A²; PORTELA, María L¹.

¹Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). ²Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Argentina. Junín 956 2do (1113) Buenos Aires. Tel/FAX 0114964-8242/3 , samillan@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Se estudió el contenido de algunos minerales en *Porphyra columbina* tratada con deshidratación osmótica (DO) y con secado tradicional (T). Las algas, recolectadas en Punta Maqueda (Santa Cruz, Argentina), fueron lavadas con agua destilada (C) e impregnadas con solución ternaria (sal, azúcar y agua). En C, T y DO se determinó: Na y K (Fotometría de llama); Ca, Mg, Fe y Zn (Espectrofotometría de Absorción Atómica); P (Gomori); yodo (titrimetría). Los resultados (promedio±DE) (mg/100g peso seco) fueron, en C, T y DO, respectivamente: Na: 1333±481, 5480±300 y 2600±200 ($p<0.001$), K: 1701±199, 1830±100 y 31.5±1.5 (C y T vs DO, $p<0.001$); Ca: 104±13, 99± 5, 30±1; Mg: 512±57, 635±35, 38±2 (C y T vs DO, $p<0.001$); no se observaron pérdidas significativas de P, Fe ni Zn. Tampoco en el contenido de yodo entre C y DO: 4,09±0,17 vs 4,24±0,06. Por consiguiente, la DO provocó cambios importantes en minerales de importancia nutricional.

Palabras claves: algas, *Porphyra columbina*, deshidratación osmótica, minerales esenciales.

ABSTRAT

The variations of some mineral nutrients were studied in *Porphyra columbina* after osmotic treatment (O) and dried with traditional methods (T). Algae were collected in Punta Maqueda (Santa Cruz, Argentina), washed with destilated water (C) and treated with a ternary solution (salt, sugar and water). Determinations were: Na and K (Flame fotometry); Ca, Mg, Fe and Zn (Atomic Absorption Spectrometry); P (Gomori); iodide (titrimetric method). The results (men±SD) (mg/100g dried weight) were (C, T and O, respectively: Na: 1333±481; 5480±300; 2600±200 ($p<0.001$), K: 1701±199; 1830±100; 31.5±1.5 (C and

T vs DO, $p < 0.001$); Ca: 104 ± 13 , 99 ± 5 , 30 ± 1 ; Mg: 512 ± 57 , 635 ± 35 , 38 ± 2 (C and T vs DO, $p < 0.001$). P, Fe and Zn did not show different values between treatments. Either iodine content did not changed between C and O: $4,09 \pm 0,17$ vs $4,24 \pm 0,06$. Therefore, osmotic treatment caused important changes in some essential minerals.

Key words: *algae, Porphyra columbina, osmotic dehydration, essential minerals.*

INTRODUCCIÓN

Las algas constituyen un alimento muy estimado y de elevado consumo en los países orientales (China, Japón, Corea) desde hace miles de años (Xia B and Abbott I, 1987; Jiménez E and Goñi C, 1999). Sus virtudes asociadas a la alimentación y a la salud se han atribuido a su contenido en proteínas, relativamente mayor al de los vegetales terrestres, minerales esenciales (calcio, magnesio, fósforo, hierro, yodo, cobre, potasio, etc), vitaminas (C y E) y provitamina A. Por otra parte, sus efectos beneficiosos sobre la salud humana se relacionan con la presencia de un elevado contenido en polisacáridos no digeribles, que favorecen el tránsito intestinal y reducen el nivel de colesterol (Pak N and Araya H, 1996), glucosa en sangre y con su bajo contenido en lípidos (Jiménez E and Goñi C, 1999).

Porphyra es un alga roja que se ubica taxonómicamente dentro de la división RODOPHYTA (Strasburger E y col., 1991; Jensen W and Salisbury F, 1988). Es un alga cosmopolita, que se adhiere a la formación arcillosa de la zona intermareal y abunda en las costas patagónicas del Atlántico Sur (Fajardo M, 1998). Su complejidad estructural le permite sobrevivir en condiciones adversas, como consecuencia del constante impacto de las olas, de la acción abrasiva de las partículas de arena y el estrés osmótico por la desecación a consecuencia de la exposición, dos veces al día, a grandes fluctuaciones de humedad, luz, temperatura y salinidad (Jensen W and Salisbury F, 1988; Burritt D y col., 2002).

Porphyra sp. es una de las algas de mayor consumo en Japón, donde se comercializa como producto precocido, “*nori*”, secado a temperaturas entre $45-50$ °C ó al Sol (Rouxel C y col., 2001). **Porphyra columbina** es abundante en las costas del sur de Argentina, donde es consumida por comunidades chilenas que conservan hábitos alimentarios de su país de origen; para ello es secada al sol y comercializada en forma de polvo llamada “algarina” (Fajardo M, 1998; Samillán S, 2004).

El proceso de deshidratación por secado es uno de los métodos tradicionales de preservar alimentos; sin embargo, puede generar un deterioro considerable de la calidad

nutricional y sensorial de los productos. Por ello, durante las últimas décadas ha aumentado el interés por mejorar la calidad de los productos secos, especialmente de frutas y vegetales. Con este fin se han desarrollado métodos que tienden a mejorar la estabilidad y conservar las propiedades del producto (Fennema O, 2000) utilizando temperaturas de proceso más bajas que las del secado convencional. La DO es una de las tecnologías que ha demostrado utilidad por la sencillez del proceso, ahorro considerable de energía y calidad de los productos obtenidos. Como su nombre lo indica, es un proceso que extrae parcialmente el agua de un producto mediante el uso de la fuerza osmótica aportada por una solución concentrada de solutos diversos (Torreggiani D, 1995).

Actualmente la incorporación de las algas en las dietas occidentales es creciente, por lo que resulta de interés contribuir a la elección de una forma de preservación que sea la más adecuada para el consumo humano. Dado que la DO es un método de conservación de alimentos relativamente sencillo, de bajo costo de inversión y adecuado a nuestras condiciones socio económicas, el objetivo del presente trabajo fue aportar información acerca del efecto de este tratamiento sobre algunas características nutricionales de ***Porphyra***. Para ello se evaluó el contenido de varios elementos minerales esenciales (sodio, potasio, calcio, fósforo, hierro, zinc y yodo) luego de someter el alga al tratamiento de DO utilizando solución ternaria. Estos resultados se compararon con el contenido mineral de ***Porphyra*** luego de someterla al tratamiento de preservación tradicional, el cual se realiza lavando el alga con agua de mar y posterior secado al Sol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras del alga ***Porphyra columbina*** Montagne fueron provistas por la Cátedra de Bromatología y Nutrición, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina. Las algas fueron recolectadas en Punta Maqueda, situada a 46° 01', LS, 67° 34' LW, en el Golfo de San Jorge, a 30 Km de la ciudad de Comodoro Rivadavia, Provincia de Santa Cruz (Argentina). Los muestreos fueron realizados manualmente de acuerdo a criterios biológicos de mantenimiento de recursos renovables, en una zona de muy bajo nivel de contaminación, en el mes de septiembre de los años 1994, 1995, 1999 y 2001. Las muestras de los años 1994 y 1995 fueron tratadas "in situ" y luego transportadas a la Cátedra de Nutrición, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, hasta su análisis. Las muestras de los años 1996 y 2001 fueron transportadas en bolsas plásticas conteniendo agua de mar, a la

Cátedra de Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), almacenándolas a -20° C en bolsas plásticas conteniendo agua de mar, hasta la realización del proceso de deshidratación osmótica (DO) y de las respectivas determinaciones.

METODOLOGÍA

Se analizaron muestras del alga *Porphyra columbina* sometidas a las siguientes condiciones experimentales: (T) muestras lavadas con abundante agua de mar y secadas a temperatura ambiente (20-25 °C, en condiciones de laboratorio) (tratamiento tradicional); (C) muestras lavadas con agua destilada (Control) y (DO) muestras lavadas con agua destilada, que luego fueron impregnadas con solución ternaria por 72 hs con agitación a temperatura ambiente (tratamiento de DO). El tratamiento de impregnación osmótica se realizó sumergiendo 10 g de alga, previamente lavada con agua destilada y secada con papel absorbente, en 150 ml de solución ternaria, $a_w \sim 0,780$. Luego de la impregnación, las algas fueron lavadas con abundante agua destilada y secadas con papel absorbente.

La solución ternaria se preparó utilizando NaCl 11 % p/p y sacarosa 46 % p/p en agua destilada, obteniéndose una $a_w \sim 0,780$. Se añadió sorbato de potasio para evitar el crecimiento fúngico, obteniendo un sistema de pH $\sim 3,2$.

La determinación de minerales se realizó por cuadruplicado, luego de realizar la digestión de las muestras por vía húmeda con ácido nítrico concentrado de calidad pro-análisis (Merck), en un horno de microondas, utilizando “bombas” Parr (Sapp R and Davidson, 1991). Se prepararon diluciones adecuadas para la determinación de los minerales estudiados.

El contenido de sodio y potasio se determinó por Fotometría de llama, según A.O.A.C., 12th. Ed. (A.O.A.C. 1985); calcio, magnesio, hierro y zinc se analizaron por Espectrofotometría de Absorción Atómica utilizando un espectrofotómetro Varian Spectra AA-20 de doble haz con corrección de fondo y lámparas específicas de cátodo hueco (Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry, 1971); para las determinaciones de calcio, magnesio y zinc se agregó cloruro de lantano como supresor de interferencias. El fósforo se determinó por el método colorimétrico de Gomori (Gomori, 1942). La cuantificación de yodo se realizó luego de someter las muestras a mineralización alcalina, por titulación con tiosulfato de sodio 0,01N, según el Food Chemical Codex Method (Food Chemical Codex, 1975).

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante análisis de varianza de un criterio (ANOVA) (Sokal and Roth , 1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra el contenido de los elementos minerales estudiados en *Porphyra columbina* lavada con agua destilada, lavada con agua de mar y secada al a 25 °C y en el alga luego de la impregnación con solución ternaria. Esto permitió analizar el contenido mineral intrínseco del alga, su contenido luego del proceso de preservación tradicional y del tratamiento de DO, respectivamente.

Tabla 1 Contenido de minerales en *Porphyra columbina* lavada con agua destilada, con tratamiento de preservación tradicional y con DO

	Alga lavada con agua destilada (C) (1 y 3)	Alga lavada con agua de mar (T) (2)	Con tratamiento de DO (3)
Minerales	(mg /100 g de alga comestible seca)		
Sodio	1.333 ± 481 ^a	5.480 ± 300 ^b	2.600 ± 200 ^c
Potasio	1.701 ± 199 ^a	1.830 ± 100 ^a	31,5 ± 1,5 ^b
Calcio	103,7 ± 13 ^a	98,5 ± 5,3 ^a	30,3 ± 1 ^b
Magnesio	512 ± 57 ^a	635 ± 35 ^a	37,5 ± 1,5 ^b
Fósforo	265 ± 12	246 ± 14	168 ± 8
Hierro	20,6 ± 9	4,1 ± 0,28	14, 2 ± 3,6
Zinc	2,3 ± 0,8	3,5 ± 0,2	1,95 ± 0,3
Yodo	4,09 ± 0,17	ND	4,24 ± 0,06

(1 y 2) Promedio de los resultados de Fajardo, 1998.

(3) Muestras recolectadas en el mes de septiembre de 1999 y 2001, lavadas con agua destilada e impregnadas con solución ternaria $a_w \sim 0,780$ por 72 h.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tratamientos.

ND: no determinado

La comparación del contenido mineral luego de someter el alga a ambos procesos de preservación evidenció que el contenido de sodio aumentó tanto con el proceso T como con DO respecto de C ($p < 0,0001$). El incremento de sodio es más evidente con la forma de preservación tradicional, pese a que la concentración de sodio en el agua de mar es de

alrededor de 8,6 g/l (Fajardo M, 1998), mientras que la solución ternaria utilizada en el presente trabajo contenía 11 % p/p de cloruro de sodio (~ 44 g de Na/l) (Samillán, 2004). No se observaron variaciones significativas en el contenido de potasio con T respecto del contenido intrínseco del alga. Sin embargo, la pérdida fue muy evidente con DO ($p < 0.0001$), siendo de destacar la disminución drástica con el proceso DO (1701 vs 31,5 mg K/100 g en peso seco). Esto indica que a pesar de que el ión potasio se encuentra formando parte de la composición intracelular (Jensen y col., 1988; Fajardo 1998) se pierde lentamente durante la DO.

La incorporación de sodio en la estructura del alga se puede atribuir al contenido de cloruro de sodio (sal de mesa) en la solución ternaria. *Porphyra* presenta gran capacidad para resistir la desecación ya que dispone de mecanismos de osmorregulación. Sin embargo, un medio hiperosmótico la hace más susceptible a plasmólisis (Dawes C, 1981). Como consecuencia de ello, luego del tratamiento de DO, la relación Na/K en el alga se incrementó, si bien también contribuyó a ello la pérdida de K. El posible uso de sales de potasio como componente de la solución ternaria evitaría la alteración de ésta relación y habría que estudiar su efecto sobre los otros minerales.

El calcio es un mineral que se encuentra ligado a polisacáridos de la pared celular y unido a alginatos en *Porphyra columbina*. Este mineral evidenció variaciones estadísticamente significativas con DO ($p < 0,0001$) respecto de C y de su contenido con el proceso de elaboración tradicional “*nori*” (Fajardo M, 1998).

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de magnesio en el alga con tratamiento tradicional y el alga control; sin embargo, se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar C y T con DO ($p < 0.0001$). Éste efecto es probablemente debido al cambio de pH, al pasar el alga de un medio natural como es el agua de mar (pH = 7,5 a 8,5) (Samillán S, 2004) al de la solución osmótica (pH = 3,2). Esto desequilibra la estructura de pigmentos propios de *Porphyra*, en los que éste mineral forma parte de su estructura, especialmente de la clorofila (Fennema O, 2000).

No se observaron pérdidas significativas en el contenido de fósforo, hierro y zinc con los procesos T y DO, respecto de C.

En relación al contenido de yodo, no se observó cambio significativo en su concentración luego del tratamiento DO respecto del contenido intrínseco en *Porphyra*.

CONCLUSIONES

El empleo del proceso de DO como forma alternativa para la preservación del alga *Porphyra columbina* generó cambios importantes en el contenido de algunos nutrientes minerales, afectando aspectos nutricionales del alga.

Se observó un elevado incremento en el contenido de sodio, pérdidas importantes de potasio y magnesio, pérdidas moderadas de calcio y fósforo, y menores de hierro y zinc, sin variación en el contenido de yodo.

BIBLIOGRAFÍA

Burritt, D.J, Larkindale, J. and Hurd, C.L. (2002) Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* 215 (5): 829-38.

Dawes, C.C. (1981) Marine Botany. United States of American: A Wiley- Interscience publication.

Fajardo, M.A. (1998) Estudio de las algas Patagónicas de género *Porphyra* para su aprovechamiento en la alimentación humana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Argentina.

Fennema, O.R. (2000) Química de los Alimentos. 3ª Edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

Food Chemical Codex (1975) *Kelp*. 2º Suppl. de la 2ª Ed. Codex, National Academy of Sciences. Washington D.C.

Gomori, GA. (1942) Modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab Clin. Med.* 27: 955-960.

Jensen, W.A. and Salisbury, F.B. (1988) Reino Plantae: Algas. En: Botánica. 2ª Edición. Editorial Mc Graw- Hill. México.

Jiménez, E.A. y Goñi, C.I. (1999) Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49 (2): 114 – 120.

Pak, N; Araya, H. (1996) Macroalgas comestibles de Chile como fuente de fibra dietética: Efecto de la digestibilidad aparente de proteínas, fibra, energía y peso de deposiciones en ratas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 46(1): 42-46.

Rouxel, C., André, D., Jérôme, M., Etienne, M. and Fleurence, J. (2001) Species identification by SDS-PAGE of red algae used as seafood or a food ingredient. *Analytical, Nutritional and clinical Methods Section. Food Chemistry* 74(3): 349-353.

Samillán, S. (2004) Efecto de diferentes tratamientos de preservación sobre el contenido de algunos nutrientes minerales y vitamina C en el alga *Porphyra columbina*”, Tesis de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en el área Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos.

Sapp, R.E., and Davidson, S.D. (1991) Microwave digestion of multicomponent foods for sodium analysis by atomic absorption spectrophotometry. *Journal food Science* 5(5): 1412-1414.

Sokal, R.R. and Roth, F.J. (1969) The Principle and practice of statistic in biological research. WE Freeman & Company, San Francisco.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H y Schimper, A. F. W. (1991) Tratado de Botánica. 8ª Ed. Ediciones Omega, S.A.

Torreggiani, D. (1995) Technological aspects of osmotic dehydration in foods. En *Food Preservation by Moisture Control: Fundamentals and Applications ISOPW Practicum II*. Barbosa-Cánovas, G.V.Y. Welti-Chanes J. (Eds). Technomics Publishing Co., Lancaster, U.S.A. p. 281-304.

Xia, B., Abbott, I.A. (1987) Edible seaweeds of China and their place in the chinese diet. *Economic Botany* 41(3): 341-353.

YERBA MATE ADICIONADA CON ROSA MOSQUETA: UN APOORTE IMPORTANTE DE ACIDO ASCORBICO.

GROSSI, Graciela V⁽¹⁾.; MIRANDA, María José⁽¹⁾.; PAULINO, Carolina A⁽¹⁾.; SCHMIDT, Amelín⁽¹⁾.; CORIA, Santiago R.⁽²⁾.; OHACO, Elizabeth⁽²⁾.; OCHOA, Mónica⁽²⁾.

(1) Alumnos y (2) Docentes de la Cátedra Química de los Alimentos, Asentamiento Universitario Villa Regina, Fac. de Ingeniería, Univ. Nac. del Comahue. Villa Regina – Río Negro Tel: 02941-463200, e-mail: mochoa@auvr.com.ar

RESUMEN

El mate en Argentina es la bebida más consumida después del agua corriente, sin distinción de clases sociales. Una yerba mate "fortificada" con Rosa Mosqueta deshidratada (RMD) significaría un aporte importante de vitamina C en la población, teniendo en cuenta que en el 90 % de los hogares se consume mate. La dosis diaria de Ácido Ascórbico recomendada por FAO / OMS es 60 mg por día. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la extracción de Ácido Ascórbico al tomar mate, en función de la temperatura del agua, de la concentración de RMD en la yerba y el agregado de azúcar o edulcorante.

Se adicionó a una yerba mate elaborada de origen comercial 5; 7,5 y 10% de RMD.

Los resultados mostraron que el consumo de aproximadamente 30 mates por día en dos mateadas de 15 mates cada una con yerba mate adicionada con 7,5% de RMD y agua a 70° C provee el 100% del Acido Ascórbico recomendado.

Palabras clave: rosa mosqueta deshidratada, ácido ascórbico, yerba mate.

ABSTRACT

Mate is the most consumed beverage after running water without any distinction among social classes. A dehydrated - rose hip - fortified "yerba mate" would mean a very important vitamin C supply in the population, taking into account that mate is consumed in 90% of Argentine homes. The daily dose of Ascorbic Acid recommended by FAO/OMS is 60 mg. The aim of this paper was to study the extraction of Ascorbic Acid when drinking mate according to water temperature, the concentration of DRH in the "yerba mate" and the addition of sugar or sweeteners.

5 %, 7.5 % and 10 % of DRH were added to a commercial "yerba mate". The results showed that the intake of approximately 30 mates a day in two times with a 7.5 % of DRH and water at 70°C provide 100% of the Ascorbic Acid recommended.

Key words: dehydrated – rose hip; ascorbic acid; “yerba mate”.

INTRODUCCIÓN

La rosa mosqueta, cuyo nombre científico es *Rosa Rubiginosa*, es una planta originaria de Europa, y fue introducida a nuestro país desde Chile. Este fruto puede aprovecharse para la obtención de: infusiones, licores, mermeladas, dulces y jaleas, bases para sopas cremas y aceite de semillas de frutos de la rosa mosqueta. En la mayoría de estas aplicaciones se requieren frutos deshidratados. (Fernández y col., 2004; Pirone y col., 2002)

Los frutos de la rosa mosqueta se caracterizan, entre otros, por su alto contenido en vitamina C o ácido L ascórbico, entre 500 y 2200 mg por 100 g de fruta fresca, según la fecha de recolección, el grado de maduración, las condiciones climáticas imperantes y la zona de donde se la obtiene. (Pirone y col., 2002)

El ácido L ascórbico es una lactona provista de un grupo enodiol (éster cíclico de un ácido hidroxicarboxílico). El producto de oxidación del ácido L ascórbico, el ácido dehidroascórbico, es un 2,3-dicetal que en solución existe predominantemente en forma de un dicitro hidratado. Tanto el ácido ascórbico como el dehidroascórbico poseen actividad biológica, teniendo una importancia nutricional muy relevante. Cabe destacar que son los isómeros L de estos ácidos los que tienen actividad vitamínica. (Fernández, y col., 2004; Wong, 1995)

La deficiencia de esta vitamina, que se encuentra naturalmente en frutas y hortalizas frescas, da lugar al *escorbuto*, que vuelve al individuo más propenso a contraer infecciones, inflamación articular, hemorragias subcutáneas, incapacidad de los osteoplastos para formar sustancias intercelulares, etc. Las necesidades del adulto varían desde 45 a 80 mg por día, siendo la dosis diaria recomendada por la FAO / OMS de 60 mg. (Fernández, y col., 2004; FAO/OMS, 1975)

Además de su función como nutriente esencial, el ácido ascórbico se utiliza ampliamente como ingrediente / aditivo alimentario debido a sus propiedades antioxidantes y reductoras. (Fennema., 2000)

El mate es una infusión que se hace con el polvo formado por las hojas trituradas y secas de cierta especie de Aquifoliácea, el *Ilex Paraguarienses* (Yerba mate); se prepara en una calabaza pequeña, propiamente llamada mate, de la cual se sorbe mediante un tubo de latón o plata llamado bombilla; tiene propiedades nutritivas, tónicas y estimulantes. Este último efecto se debe a su contenido en teína, cuya acción es idéntica a la de la cafeína.

Se consume mucho en Sudamérica, especialmente en Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay, donde está considerada bebida nacional.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la extracción de Ácido Ascórbico al tomar mate, en función de la temperatura del agua, de la concentración de RMD en la yerba y el agregado de azúcar o edulcorante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se trabajó con frutos de la rosa mosqueta cosechados en la zona de El Bolsón (provincia de Río Negro) deshidratados hasta una humedad residual del 10% , posteriormente separada la parte comestible (cascarilla) de la no comestible (semilla) y procesada con molinillo hasta lograr un tamaño de partícula de 1 mm². Se utilizó yerba mate elaborada con palo de origen comercial.

Preparación del Mate

Se mezcló la yerba mate con distintas cantidades de RMD a fin de obtener diferentes concentraciones y se homogeneizó. Se utilizaron 35 g de mezcla que fueron colocados en un embudo Buchner con papel de filtro Whatman N° 1.

Se simuló la extracción aplicando vacío en forma discontinua a medida que se agregaban porciones de 25 ml de agua hasta un total de 375 ml (15 mates), ya que es habitual en nuestro país realizar dos “mateadas” por día de unos 15 mates cada una. Se desechó el volumen correspondiente al primer mate.

Condiciones estudiadas.

- Temperatura del agua: 70, 74 y 78 °C.

- Porcentaje de RMD: 5, 7,5 y 10 %

- Agregado de edulcorantes:

a.- Azúcar: 0,5 g por mate.

b.- Edulcorante 1: (Aspartamo: 1,1 % Acesulfame K: 1,1 %) 7,5 g en 375 ml de agua.

c.- Edulcorante 2: (Sacarina sódica: 10%, Aspartamo: 3,8%) 7,5 g en 375 ml de agua.

- Se evaluó la variación en la extracción de Ac. Ascórbico a lo largo de una “mateada” cada tres mates.

Determinación del Acido Ascórbico

Se realizaron determinaciones de Acido Ascórbico en los extractos correspondientes a 15 mates de cada una de las variables mencionadas, en el de yerba mate sin RMD, en las mezclas indicadas, en RMD sola y en la solución acuosa de cada edulcorante.

Todos los análisis se realizaron por el método del 2,6 diclorofenol indofenol (Loeffler Y col., 1942)

Análisis sensorial

A fin de evaluar la aceptabilidad del producto en función de la concentración de RMD y con agua a la temperatura de mayor extracción de Acido Ascórbico (70°C), se integró un panel de 42 degustadores de ambos sexos y de edades y ocupaciones diferentes, que no recibió entrenamiento previo a la calificación. El análisis sensorial de preferencia se realizó utilizando una escala hedónica de 7 puntos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA 1 se detalla la cantidad de Acido Ascórbico extraído en yerba sin RMD y en las diferentes mezclas con RMD a las tres temperaturas estudiadas.

Tabla 1: mg de Acido Ascórbico extraídos en 15 mates de acuerdo a la variación del porcentaje de RMD en la yerba mate, y la temperatura del agua.

Concentración	Temperatura (°C)	mg de Acido Ascórbico c/ 15 mates
0%	70	8,33
	74	6,92
	78	5,43
5%	70	23,53
	74	22,89
	78	21,27
7,5%	70	35,39
	74	30,27
	78	29,96
10%	70	45,92
	74	43,3
	78	41,85

Se observó que la cantidad de Acido Ascórbico extraído cada 15 mates oscila entre 22 y 46 mg, obteniéndose el mayor valor para la yerba adicionada con 10% de RMD.

Con agua a 70° C se obtuvo la mayor extracción de la sustancia en todos los casos, observándose que el aumento de temperatura provoca una degradación del Acido

Ascórbico presente en la mezcla, por tal razón se realizó el análisis sensorial y el estudio sobre edulcorantes a 70°C (Fig. 1).

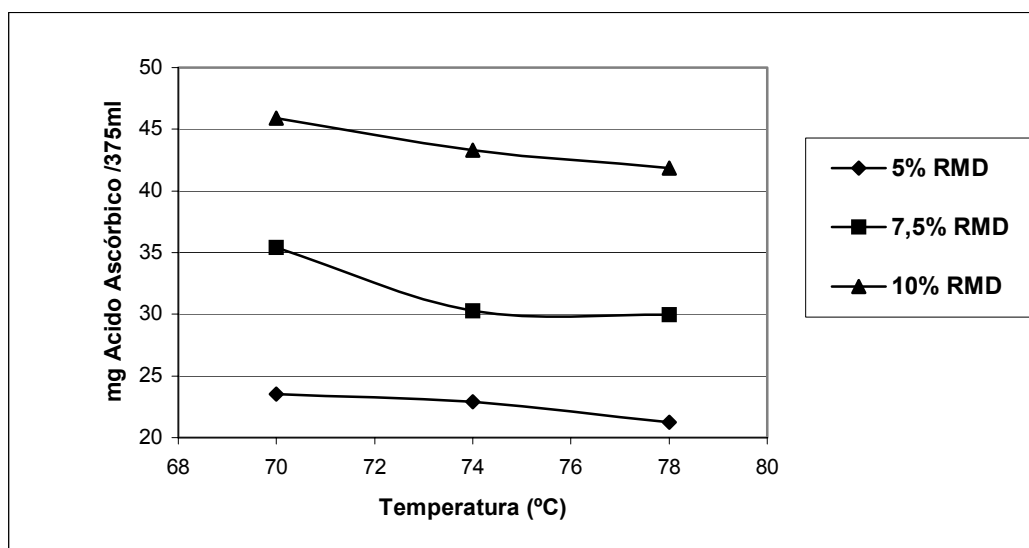


Figura 1: Variación del contenido de Acido Ascórbico respecto a la temperatura del agua para las tres concentraciones de RMD

Se analizó el contenido de Acido Ascórbico en yerba y en RMD obteniéndose los siguientes valores: 36,0 mg y 1650 mg del ácido por cada 100 g de yerba seca y 100 g de RMD, respectivamente.

Con respecto a los resultados de la consulta de preferencia, las dos yerbas más aceptadas fueron las de 5 y 7,5% de RMD, y los porcentajes de aceptación de ambas no muestran diferencias (Fig. 2). Por esta razón las determinaciones siguientes se realizaron para ambas concentraciones. La tendencia general es que la yerba con 7,5 % de RMD agrada preferentemente al consumidor de yerba mate de sabor fuerte.

En la TABLA 2 se informa la cantidad de Acido Ascórbico extraído cuando se agregó azúcar y edulcorantes a la yerba adicionada con 5 y 7,5% de RMD utilizando agua a 70°C, así como los valores obtenidos para azúcar solo y edulcorantes solos. La columna que indica mg Acido Ascórbico reales surge de restar a cada resultado obtenido para cada una de las formulaciones, el resultado obtenido para cada endulzante en forma aislada.

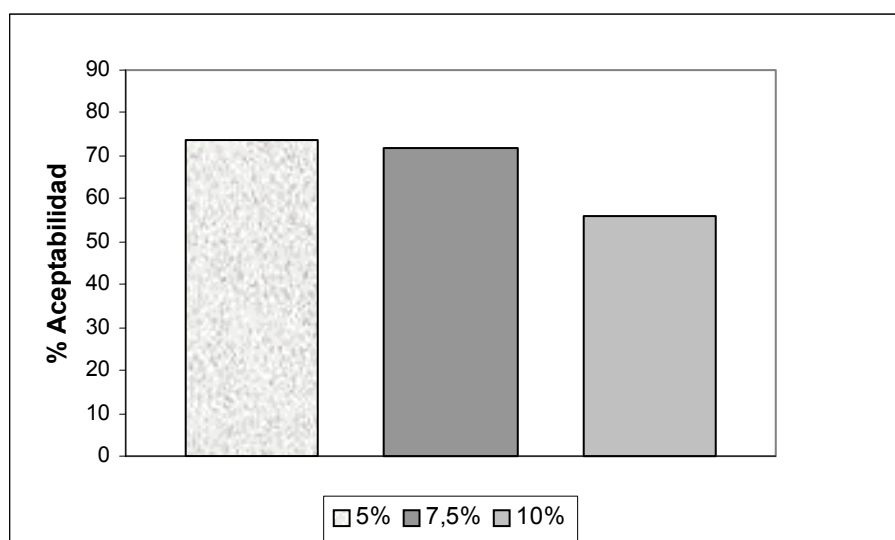


Figura 2: Porcentajes de aceptabilidad sensorial de las tres variedades

Tabla 2: mg de Acido Ascórbico extraídos en función del agregado de distintos endulzantes, para las dos concentraciones de mayor aceptación y temperatura del agua 70 °C

Endulzante	Concentración de RMD	mg de Acido Ascórbico extraídos	mg de Acido Ascórbico reales
Azúcar	5	19,81	11,48
	7,5	31,7	23,37
Edulcorante 1	5	25,38	19,13
	7,5	36,07	29,82
Edulcorante 2	5	29,68	22,14
	7,5	36,84	29,30
Azúcar (solo)	7,5 g en 375 ml	8,33	---
Edulcorante 1 (solo)	1,2 g en 500 ml	6,25	---
Edulcorante 2 (solo)	7,5 g en 375 ml	7,54	---

Se observa que el agregado de azúcar provoca una disminución del Acido Ascórbico que oscila entre 34 y 51%, mientras que los edulcorantes comerciales evaluados provocan una disminución en la cantidad extraída del nutriente entre 6 y 18%.

La FIGURA 3 muestra el contenido de Acido Ascórbico en el volumen extraído cada tres mates (75 ml) para una mateada de 15 mates con 7,5% de RMD y agua a 70°C. Los resultados muestran la presencia de tres etapas en la extracción: una primera donde el

ácido ascórbico comienza a solubilizarse lentamente, debido al lento proceso de humectación de la yerba; la segunda donde la extracción es máxima y por último un decaimiento en la cantidad de ácido extraído producto únicamente de su escasez en la matriz. La mayor cantidad de Acido Ascórbico se obtiene en el volumen correspondiente a los mates 8° + 9°+10°.

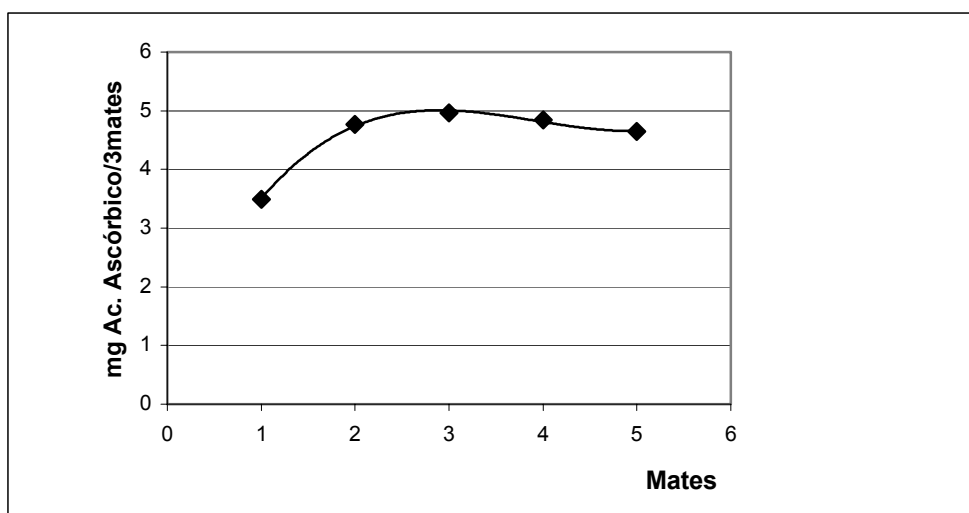


Figura 3: Variación del contenido de Acido Ascórbico cada tres mates a lo largo de una “mateada”

CONCLUSIONES

Comparando la cantidad de Acido Ascórbico presente en la yerba mate adicionada con RMD con la hallada en la yerba no adicionada, puede afirmarse que la primera puede constituir un aporte importante de Acido Ascórbico en la población.

El consumo de aproximadamente 30 mates diarios en dos mateadas de 15 mates cada una, que es bastante habitual en nuestra población, con yerba adicionada con 7,5 % de RMD y agua entre 70 y 78° C provee del 90 al 100 % de la dosis diaria recomendada por la FAO / OMS (60 mg) y el 78,5 % si la adición de RMD es del 5 %. De acuerdo a estas afirmaciones el producto podría ser considerado “alimento fortificado” según el CAA.

En cuanto al agregado de endulzantes, se advierte que el azúcar provoca una degradación importante del nutriente en contraste con el efecto de los edulcorantes artificiales.

Según nuestro análisis de preferencia una infusión preparada a partir de yerba mate adicionada con RMD sería sensorialmente aceptada por la población.

BIBLIOGRAFIA:

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO . Capítulo XVII, artículo 1363

FAO / OMS (1975) *MANUAL SOBRE NECESIDADES NUTRICIONALES DEL HOMBRE*.

Fennema, O. (2000) *QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS*, 2º Edición, Editorial Acribia. Capítulo 8, pag. 676

Fernández, M; Hernández, P.; Mercado, T.; Monsalvez, G.; Ochoa, M; Ohaco, E.; Pirone, B.; Pucheta, M.; San Martín, N.; Ventureira, J. y Zapata, S. (2004) *INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS*. Cuaderno de Facultad N° 005/2004, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Pág.18 –23

Loeffler, H. J. y Pointing, J.D (1942) *ASCORBIC ACID: RAPID DETERMINATION IN FRESH, FROZEN OR DEHYDRATED FRUITS AND VEGETABLES*. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14:846

Pirone, B.; Ochoa, M.; Kessler, A. y De Michelis. A. (2002) *EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE EL PROCESO DE DESHIDRATACIÓN DE FRUTOS DE LA ROSA MOSQUETA (ROSA EGLANTERIA L.)*, Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA Vol. 31, N ° 1 pag. 85-98

Wong, D. (1995) *QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS, MECANISMOS Y TEORÍA*. Editorial Acribia, Capítulo 10, pág. 407-411.

SIMULACIÓN DE MONTECARLO DE UN MODELO ECONOMICO DE EMPRESA CITRÍCOLA

CHEZZI, Carlos M.; RODRÍGUEZ, Cristina B.; TITO, María J.; HEGGLIN, Daniel R.; AZZALI, Martín.

Universidad Tecnológica Nacional. Unidad Académica Concordia.
Universidad Tecnológica Nacional. Unidad Académica Concordia. Salta 277. +54-345-4214590.
carlos_chezzi@uac.utn.edu.ar.

RESUMEN

Se utiliza el método de simulación de Montecarlo y el Software @Risk para la implementación de un modelo, analizando las distribuciones de probabilidad estimada del Valor Actual Neto (VAN) y de la Tasa Interna de Retorno (TIR), en función de la variable estocástica Precio de Venta (PV), considerando las demás variables determinísticas. El PV, es a priori, la variable más sensible de los emprendimientos. Las variedades cítricas que se consideran son: Naranja Valencia, Mandarina Ellendale, Mandarina Satsuma y Mandarina Común, que permiten desestacionalizar la producción. Las inversiones y costos se relevaron para una propiedad de 50 hectáreas, representativa de la media de una PyME de la zona, con plantaciones de 12 hectáreas por variedad. Las muestras de precios, permitieron obtener un duplicado teórico, reflejando diferentes distribuciones para cada variedad. De la distribución del VAN y el análisis de sus estadísticos se observa que la media estimada es de \$ 446445,84 con una desviación estándar de \$ 192304,19 y de la distribución de la TIR se observa que su media es de 21,99%, con una desviación estándar de 7,15%. Se logra una herramienta para la toma de decisiones que muestra para el caso modelado buenos resultados económicos frente a la inversión.

Palabras Claves: Modelos Económicos. Simulación. Montecarlo. Análisis de Riesgo. VAN. TIR.

ABSTRACT

The simulation method of Montecarlo and the Software @Risk are used for the implementation of a model, analyzing the estimated probability distribution of the Net Present Value (NPV) and the Internal Rate of Return (IRR) in terms of the estocastic variable Sale Price (SP), considering the other deterministic variables. The SP is a priori the most sensitive variable of the undertaking. The citric varieties that are considered are

Valencia Orange, Ellendale Tangerine, Satsuma Tangerine and Común Tangerine that allow a production including the different seasons. The investments and costs were exempted for a 50 hectares property representative of the average of a PyME² in the region, with plantations of 12 hectares per variety. The price samples permitted a theoretical duplicate, showing different distributions for each variety. From the NPV distribution and the analysis of its statistics it is observed that the estimated average is of \$446445,84 with a standard deviation of \$192304,19 and from the IRR distribution it is observed that its average is of 21,99% with a standard deviation of 7,15%. A tool to take decisions is obtained that shows good financial results on the inversion for this case.

INTRODUCCIÓN

La actividad cítrica en la provincia de Entre Ríos se desarrolla en la franja de suelos arenosos existentes en la margen occidental del Río Uruguay. De acuerdo a los datos del Informe Cítrica de la mencionada provincia, elaborado por la EEA INTA Concordia en el año 2003, la superficie plantada en el departamento Concordia es de 15.866 hectáreas y en el departamento Federación es de 30.656 hectáreas lo que representa el 33,5 % y el 64,9 % respectivamente de la superficie total de la provincia; convirtiéndose el citrus en el principal recurso productivo con el aporte del 37% de la producción cítrica total de Argentina y con posibilidad de exportación a la UE y el Mercosur. El mercado interno está ampliamente abastecido con frutas cítricas nacionales, consumiendo un 50 % de la producción total y destinando el resto a la exportación. La competencia que plantean firmas transnacionales, exige a los pequeños y medianos productores (PyMEs) tomar decisiones de inversión realizando previamente análisis de riesgos.

Actualmente los productores cítricos PyMEs toman decisiones estratégicas en forma empírica y no disponen de centros de apoyo que desarrollen modelos acordes al tamaño de su emprendimiento, la variedad de su producción y las variables económicas que permitan representar distintas situaciones de mercado. Es primordial la aplicación de tecnologías de gestión que aporten un análisis para la fundamentación y anticipación de resultados en la toma de decisiones, que permitan el diseño de estrategias, por ello se plantea:

- Simular un modelo económico de empresa cítrica, que apoye el proceso de toma de decisiones.

² PyME: Pequeña y Mediana Empresa (Small and Medium Company)

- Resolver el modelo mediante el complemento de software @Risk, desarrollando una herramienta de simulación.

Se toma una explotación modelo de 50 has, distribuida en 4 variedades de 12 has cada una, el resto de la superficie está destinada a la vivienda y galpones. Las variedades elegidas son: mandarinas Ellendale, Satsuma, y Común y naranja Valencia. Estas se determinaron de acuerdo al calendario de cosecha de la Federación del Citrus de Entre Ríos (Fecier). Considerando este calendario, las cosechas de estas variedades se distribuyen en el año, permitiendo a los productores tener ingresos escalonados. Ver .

Tabla 1: Calendario de Cosechas (consumo interno)

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Satsuma			■	■								
Común					■	■	■	■	■			
Ellendale							■	■	■	■	■	
Valencia	■	■	■					■	■	■	■	■

Fuente: FECIER (Federación del Citrus de Entre Ríos)

MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica de simulación de Montecarlo permite resolver problemas que dependen de una probabilidad [3], en donde la experimentación física es impracticable e imposible la creación de una fórmula exacta. Es una simulación con técnicas de muestreo, es decir, que a la vez de recolectar muestras de una población real, se obtiene un duplicado teórico de la misma. Este método comprende la determinación de la distribución de probabilidad para cada variable aleatoria de entrada, para luego obtener muestras de esa distribución mediante la generación de números aleatorios. En efecto, se utiliza una serie de números aleatorios para generar un grupo de valores que tengan las mismas características de distribución de la experiencia real que se va a simular.

Se aplica repetidamente el proceso de Montecarlo para obtener datos respecto a la variable de salida en estudio, luego se calculan las propiedades estadísticas de la misma y se determina su distribución de probabilidad.

2.1. Análisis económico-financiero

El análisis económico-financiero se basa en la planilla de cálculo utilizada por Cambio Rural del INTA EEA Concordia, con las correspondientes modificaciones necesarias para la adaptación del modelo al problema en estudio:

- Margen bruto por variedad = ingresos brutos por variedad - costos de producción por variedad.
- Margen bruto total = ingresos totales – costos de producción totales.

- Resultado operativo = Margen bruto total – gastos de estructura
- Ingreso neto = resultado operativo – amortizaciones
- Utilidad antes de impuestos = ingreso neto – remuneración al productor
- Utilidad después de impuestos = utilidad antes de impuestos – impuesto (ganancias 35%)
- Rentabilidad económica = utilidad después de impuestos + amortizaciones – inversiones

La evaluación económica-financiera de las actividades se realizan sobre la base del VAN y de la TIR. El cálculo del VAN y de la TIR se efectúa sobre el monto obtenido en la rentabilidad económica, tomando como tasa de actualización el 7 %.

Los ingresos se calculan como el producto entre el rendimiento y el precio de venta. Los rendimientos son los estimados por el INTA EEA Concordia, para plantaciones de 12 años de antigüedad y una densidad de 333 plantas por ha. Los mismos son los siguientes: Valencia: 45787 Kg./ha; Satsuma 33300 Kg./ha; Ellendale 37462 Kg./ha; Común 33.300 Kg./ha. Para el cálculo de los ingresos se toma como referencia los precios del Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) correspondientes a los años 2002, 2003 y 2004. Si bien el MCBA tiene cotizaciones de estas variedades antes y después de la fecha de cosecha para mercado interno, sólo se toman los precios de la temporada con el fin de no considerar valores distorsivos. Ver Tabla 2.

Tabla 2: Precios mínimos y máximos por variedades, años 2002, 2003 y 2004

Variedad	Precio mínimo	Precio máximo
Ellendale	\$ 0.28	\$ 0.37
Satsuma	\$ 0.16	\$ 0.51
Común	\$ 0.23	\$ 0.54
Valencia	\$ 0.14	\$ 1.48

Fuente: Mercado central de Buenos Aires

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se analiza la rentabilidad del productor, a los precios establecidos por el MCBA se le descuentan los gastos en los que se incurre hasta llegar al mismo con el fin de establecer el monto real que percibe el productor. Los gastos descontados son los siguientes: cosecha, flete a empaque, empaque, flete a MCBA, descarga, comisión (10 o 12 %) y envase; totalizando entre \$ 0,2 y \$ 0,3. Los costos de producción corresponden a los elaborados por la INTA EEA Concordia, para la temporada 2003-2004. Los mismos incluyen los siguientes ítems: costos de los productos insumidos (fertilizantes, herbicidas, productos sanitarios), costos de maquinaria (riego,

fertilización, herbicidas, pulverizaciones y prácticas culturales) y costos de mano de obra (riego, fertilización, herbicidas, pulverizaciones, control de hormigas y prácticas culturales, roedores y podas). Estos costos representan los siguientes valores por hectárea para las variedades establecidas: Valencia: \$1884,03; Satsuma: \$2776,84; Ellendale: \$2112,60; Criolla: \$2692,46. Los gastos de estructura considerados son los siguientes: administración; movilidad (seguro, patente, combustible); impuestos provinciales; mano de obra permanente (encargado e ingeniero agrónomo); conservación de mejoras. Estos gastos totalizan \$28.074 por año.

Las amortizaciones se calculan de la siguiente manera: $[\text{valor a nuevo} - (\text{valor a nuevo} * \% \text{ de valor residual pasivo}/100)] / \text{años de vida útil}$. Las inversiones están dadas por: la tierra, las mejoras ordinarias (alambrados, casa y galpón) y el capital de explotación (fertilizadora, desmalezadora, pulverizadora, dos acoplados, camioneta, tractor y tanque y barra para herbicida)..

El valor de la tierra plantada asciende a u\$s 3380 por ha. Para las mejoras ordinarias se considera un valor de \$ 45.968 y para el capital de explotación \$ 28.240. La inversión total es de \$ 560.358,40. Valores elaborados sobre la base de encuestas a informantes calificados del sector.

2.3. Distribución de Probabilidad de las Variables Aleatorias de Entrada

La prueba de bondad de ajuste utilizada para comprobar las hipótesis de la distribución de probabilidad asociada a los datos históricos de los precios de las cuatro variedades es Chi-Cuadrado, ya que se trata de una muestra grande y con parámetros exactos. Se selecciona la distribución de probabilidad que modela el comportamiento de las variables aleatorias de acuerdo al ranking propuesto por la aproximación mediante el software @Risk, tomando la que ocupa el primer lugar en el mismo.

2.4. Validación del Modelo [6]

Luego de realizados las experimentaciones de simulación, se presentaron los resultados de la misma a profesionales expertos pertenecientes al INTA EEA Concordia, responsables de evaluación y seguimiento de proyectos de inversiones citrícolas, quienes estudiaron los mismos y confirmaron la viabilidad de los resultados.

2.5. Tamaño de la Muestra

El número de iteraciones se basa en experimentaciones de simulación buscando la convergencia al valor medio del VAN y de la TIR (ver Figuras 1 y 3), con un error máximo del 5% entre cada una de ellas (ver Figuras 2 y 4).

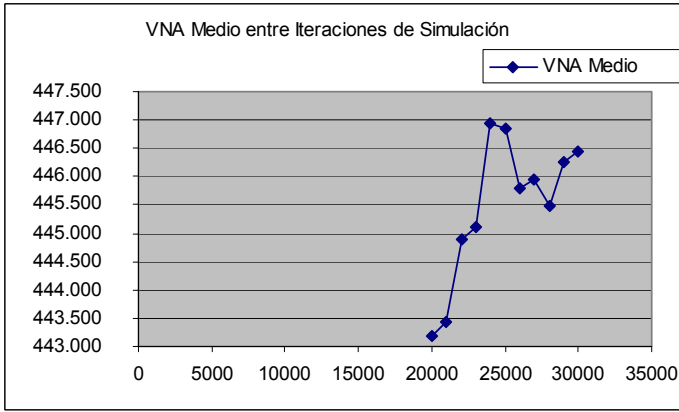


Figura 1

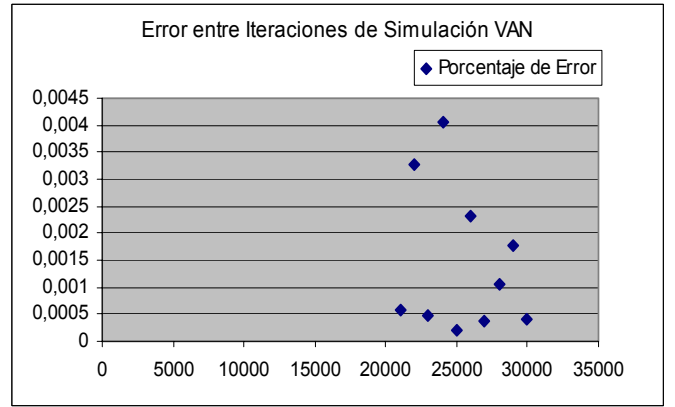


Figura 2

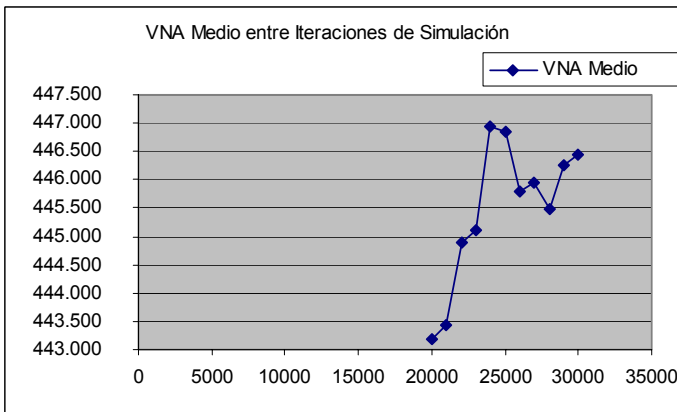


Figura 3

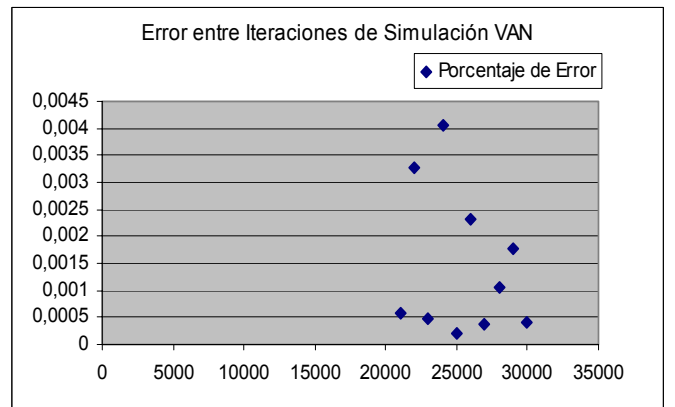


Figura 4

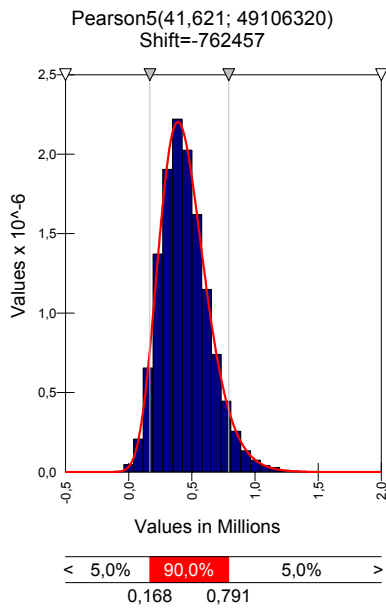


Figura 5 – Distribución VAN

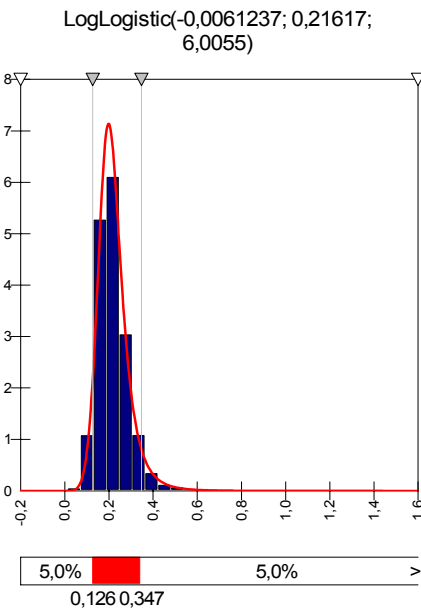


Figura 6 – Distribución TIR

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a las variables de entrada, se establecieron las siguientes distribuciones de probabilidad del precio de venta: Valencia: Lognorm(0,27023; 0,20896), Satsuma: Invgauss(0,10118; 0,061403), Ellendale: Triang(-0,0126; -0,0126; 0,17732) y Mandarina Común: Invgauss(0,27892; 4,67084) con tamaños de muestra de 269, 68, 265 y 265 respectivamente.

Estadística Descriptiva de la variable de salida VAN

Se observa que la media estimada del VAN es de \$ 446445,84 con una desviación estándar de \$ 192304,19. Analizando este indicador económico en su valor máximo y mínimo, vemos que el mejor resultado posible es \$ 1738231,5 y el peor resultado posible es \$ -116580,53.; determinando el siguiente rango de VAN: [\$ -119448,67; \$ 1564465,5]. El intervalo de confianza para el verdadero valor de la media es [\$ 445335,57, \$ 447556,112]. El error de estimación con un 95 % de confianza es \$ 1110,27.

Distribución de Probabilidad del VAN

La distribución de probabilidad del VAN es: Pearson5(41,621;49106320). Como se puede ver en la Figura 5, existe un 90% de probabilidad de obtener valores entre \$ 168000 y \$ 791000. Del histograma de frecuencias se observa que sólo el 0.11 % de los datos toman valores menores que cero.

Distribución de Probabilidad de la TIR

La distribución de probabilidad de la TIR es: LogLogistic(-0,0061327;0,21617;6,0055), como se puede ver en la Figura 6.

Estadística Descriptiva de la variable de salida TIR

Se observa que el porcentaje medio estimado de la TIR es de 21,99%, con una desviación estándar de 7,15%. Vemos que porcentaje mínimo de la TIR es de 1,63%, con un máximo de 141%. El intervalo de confianza para el verdadero valor de la media es [21.9%, 22%]. El error de estimación con un 95 % de confianza es 0.041%.

Respecto al trabajo desarrollado se discutieron los siguientes temas: expandir el modelo considerando los precios del mercado de exportación, continuar la evaluación del modelo actual mediante la comparación con datos reales de explotaciones cítricas a largo plazo; ampliar la cantidad de variedades de citrus consideradas, de modo que el productor pueda personalizar el modelo; dividir la obtención del VAN y de la TIR en cálculos por cada una de las variedades para así analizar la influencia de las mismas respecto al resultado final.

CONCLUSIONES

Se construye una solución informática que provee al productor local de una herramienta para la toma de decisiones en sus negocios. Esto se logra a través de la utilización de tecnologías de gestión por simulación. Lo que permite a los mismos hacer una evaluación de sus proyectos de inversión anticipando posibles resultados.

Bajo estos supuestos podemos concluir que la explotación modelada es rentable, con una baja probabilidad del VAN de obtener resultados negativos (0.11%) y una probabilidad del 0.16% de que la TIR esté por debajo de la Tasa de Actualización del VAN (7%).

BIBLIOGRAFÍA

Jackson, Mary - Staunton, Mike. *Advanced Modelling in Finance using Excel and VBA*. Edición John Wiley & Sons Ltd. England. 2001.

Jaeckel, Peter. *Monte Carlo Methods in Finance*. Edición John Wiley & Sons. England. April, 2002.

Corrar, Luiz João. *O Modelo Econômico da Empresa em Condições de Incerteza Aplicação do Método de Simulação de Monte Carlo*. Fipecafi. São Paulo. Abril. 1993.

Coates, Eyler R. Kuhl, Michael E. Using software to solve engineering economy problems. *Computer & Industrial Engineering*, 45. 285-294. 2003.

Van Groenendaal, Willem J. H. Kleijnen, Jack P. C. Deterministic versus stochastic sensitivity analysis in investment problems: An environmental case study. *European Journal of Operational Research*, 141. 8– 20. 2002.

Kleijnen, Jack P. C. Verification and validation of simulation models. *European Journal of Operational Research*, 82. 145– 162. 1995

Casey, Christopher. Corporate valuation, capital structure and risk management; A stochastic DCF approach. *European Journal of Operational Research*, 135. 311–325. 2001.

ANÁLISIS DE MERCADOS SELECCIONADOS DE PIMENTÓN. CEE, EEUU, JAPÓN Y BRASIL.

ARIZIO, Osvaldo P.⁽¹⁾ y CURIONI, Ana O.⁽²⁾

Universidad Nacional de Luján. ⁽¹⁾ Dto. de Ciencias Sociales. ⁽²⁾ Dto. de Tecnología.

Ruta 5 y 7 (6700), Luján.

E-mail: acurioni@mail.unlu.edu.ar/anaocurioni@speedy.com.ar

RESUMEN

Luego de la pimienta, el pimentón es la especia de mayor empleo y comercio mundial. Su sabor y coloración roja que brinda es base de su empleo en numerosas comidas. Por ser una producción de clima templado de gran nivel de comercio, interesa evaluar los mercados y detectar posibilidades comerciales para la Argentina. A partir de diferentes fuentes estadísticas de los principales mercados mundiales (Eurostat-Unión Europea; U.S.Census Bureau- USA y JETRO-Japón) y regional (Aliceweb-Brasil), los datos obtenidos fueron procesados obteniéndose los promedios quinquenales, la participación porcentual de los orígenes y las tasas anuales de crecimiento (TAC) por el método de regresión lineal. La Unión Europea es el primer megamercado importador del mundo, mientras que Estados Unidos es el principal país importador. Todos los mercados muestran una fuerte expansión de sus importaciones, superior al crecimiento de sus poblaciones, destacándose Brasil (TAC del 20% en términos de volumen). El análisis realizado muestra condiciones auspiciosas para la expansión de la producción de pimentón en Argentina.

Palabras claves: pimentón; mercados; importaciones; exportaciones.

ABSTRACT

After the pepper, the capsicum is the spice of greatest use and world trade. Its flavor and red coloration gives is the base of numerous foods. As it is a production of moderate climate of large level of trade, it is of great interest to evaluate the markets and detect trade possibilitys to Argentina. From different statistics sources of information of the world trades (Eurostat-Unión Europea; U.S.Census Bureau- USA y JETRO-Japón) and main regionals (Aliceweb-Brasil) markets, the obtained data was procesed obtaining the average quinquennial, the porcentual participation of the origins and the annuals rates of growth (TAC) by lineal regretion method. The European Union is the first megamarket

importer of the world; while USA is the main imports country. Every market shows a big expansion of importations, superior to the growing of populations standing Brazil itself out (TAC of the 20% in terms of volume). The analysis realized shows good conditions for the expansion of the capsicum production in Argentina.

Key words: capsicum; markets; importations; exportations.

INTRODUCCIÓN

El Código Alimentario Nacional establece en su Capítulo XVI que con la denominación genérica de pimentón o paprika, se entiende el producto de la molienda de frutos seleccionados y desecados de diversas variedades rojas del género *Capsicum*. La paprika es el polvo que se obtiene de frutos deshidratados de variedades semidulces; mientras que el pimentón es el polvo del pimiento rojo molido de variedades dulces o semipicantes. El cultivo de pimiento está presente en todas las zonas templadas y cálidas del mundo. Según FAO la superficie mundial sobrepasa el millón de has. ocupando el sexto lugar entre las hortalizas. De una u otra forma el pimiento está presente en la cocina de la mayoría de los países del mundo. A grandes rasgos su uso culinario es bien como condimento especia, colorante u hortaliza. En Argentina las variedades más empleadas para la producción de pimentón son el Trompa de Elefante, el Ñora de Murcia y Bolita Salteño (Galmarini, 1993).

La capsantina y capsorubina son los pigmentos responsables del color rojo, cuyos contenidos dependen de la variedad y fertilización aplicada. La combinación de su sabor y la posibilidad de otorgar coloración roja, es la base del empleo del pimentón en numerosos platos (Gil y Costa, 1996). También posee propiedades conservantes por lo cual se lo emplea en la cubierta de jamones y chacinados.

Dentro de las especias, es una de las de mayor empleo y nivel de comercio mundial por lo que es conveniente analizar las importaciones de los principales mercados mundiales a efectos de detectar posibles oportunidades comerciales para nuestro país que posibiliten la expansión de esta producción.

Materiales y métodos.

Partiendo de datos de diversas fuentes estadísticas (Eurostat-Unión Europea; U.S.Census Bureau-USA, JETRO-Japón) y (Aliceweb-Brasil), se obtuvo la evolución de las importaciones de pimentón para el último decenio disponible de los principales mercados mundiales y regional. Los datos obtenidos en su máximo grado de apertura (Nomenclatura-país) fueron procesados obteniéndose los promedios quinquenales, la

participación porcentual de los países de origen y las tasas anuales de crecimiento por el método de regresión lineal. En base a su análisis se extraen conclusiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La Unión Europea es el primer megamercado importador del mundo de los productos componentes del complejo Capsicum (pimiento en rama, triturado y pimentón), alcanzando sus importaciones para el quinquenio 97/01 un volumen de 61.000 toneladas por un valor superior a los 128 millones de Ecus. Sus importaciones se han expandido durante la década 1992/2001 a importantes ritmos, tal como lo indican sus tasas de crecimiento del 3.8% anual en términos de volumen y del 6.9% anual en términos de valor. Los precios promedios de importación, experimentaron un alza en términos corrientes pasando de 1.78 en el quinquenio 1992/96 a 2.10 Ecus/kg para el último quinquenio considerado (Cuadro 1).

Tabla 1 Unión Europea: Importaciones de Capsicum por destino. 1992-2001.
Volumen (t), Valor CIF (Mil Ecus) y Precio Medio (Ecus/kg)

	Prom. 92/96	Prom.97/01	Porc.	Tasa 92/01
España	19286	20956	34.0	0.0
Alemania	12801	14090	22.9	1.4
Países Bajos	4999	6707	10.9	5.8
Reino Unido	3894	5356	8.7	5.8
Francia	2763	3136	5.1	2.0
Austria	865	3081	5.0	s/d
Grecia	502	1996	3.2	18.6
Italia	1177	1465	2.4	4.6
Bélgica-Luxemburgo	1024	1435	2.3	7.2
Suecia	497	1329	2.2	s/d
Portugal	763	817	1.3	2.4
Dinamarca	483	621	1.0	5.9
Finlandia	174	451	0.7	s/d
Irlanda	103	216	0.4	11.8
Total volumen (t)	49333	61656	100.0	3.8
Total valor (mil Ecus)	87565	128893		6.9
Precio Medio (Ecus/kg)	1.78	2.10		

Fuente: Eurostat, Base Commex.

El principal país importador de Europa en términos de volumen en la actualidad es España, concentrando el 34% del total de las importaciones europeas de pimentón. Esta situación que puede resultar llamativa, por ser de conocimiento público que España es un tradicional productor y exportador de pimentón, se debe a que desde hace más de una

década este país es productor de oleoresina de pimentón, con una capacidad muy superior a la producción propia y con necesidad de abastecimiento durante todo el año. Continúan en orden de importancia como principales países importadores de Europa en términos de volumen promedio para el quinquenio 1997/01, Alemania (22.9%), Países Bajos (10.9%) y Reino Unido (8.7%).

El origen de las importaciones europeas de pimentón se encuentra muy diversificado, siendo los principales abastecedores en términos de volumen España, Zimbawe, Sudáfrica, India, Hungría y China, países que en conjunto representan el origen de casi el 56% del volumen promedio importado por la Unión Europea en el último quinquenio.

Los Estados Unidos es el principal importador mundial de pimentón, considerando los países individuales, alcanzando sus importaciones para el quinquenio 97/01 un volumen de 55.000 toneladas por un valor cercano a los 90 millones de dólares. Sus importaciones han crecido durante la década 1992/2001 a importantes ritmos, tal como lo indican sus tasas de crecimiento del 10.5% anual en términos de volumen y del 7.8% anual en términos de valor, implicando una caída de sus precios promedios corrientes de 1.87 a 1.64 u\$s/kg entre el primer y segundo quinquenio considerado (Cuadro 2).

Tabla 2 Estados Unidos: Importaciones de Capsicum. 1992-2001.
Volumen (t), Valor CIF (u\$s) y Precio Medio (u\$s/kg)

	Volumen kg	Valor CIF u\$s	Precio Medio u\$s/kg
1992	30885219	66684900	2.16
1993	28735160	51502451	1.79
1994	27839579	44448215	1.60
1995	28945686	54534880	1.88
1996	40618155	76797863	1.89
1997	37400369	74370999	1.99
1998	54251747	89229524	1.64
1999	57140495	89868495	1.57
2000	58767736	96309052	1.64
2001	66489221	99079352	1.49
Prom. 92/96	31404760	58793662	1.87
Prom. 97/01	54809914	89771484	1.64
Tasa 92/01	10.5	7.8	

Fuente: U.S. Census Bureau.

El aprovisionamiento de Capsicum de los Estados Unidos no se encuentra tan diversificado como el observado para la Unión Europea, ya que 5 países (México, India, China, España y Chile) concentran el 86% del total importado por este mercado.

Las importaciones japonesas de Capsicum llegaron en el año 2001 a casi 12.000 toneladas por un valor de 30 millones de dólares. Dichas importaciones se han expandido durante el último decenio a un ritmo del 3.4% anual en términos de volumen y del 4.1 % anual en términos de valor. Los precios corrientes promedios de importación han sufrido una pequeña baja, pasando de 2.76 u\$/kg en promedio para el quinquenio 1992/96 a 2.68 u\$/kg promedio para el último quinquenio considerado (Cuadro 3).

Tabla 3 Japón: Importaciones de Capsicum. 1992-2001.
Volumen (t), Valor CIF (u\$s) y Precio Medio (u\$/kg)

	ValorCIF u\$s	Volumen kg	Precio Medio u\$/kg
1990	14520614	8178732	1.78
1991	15624383	6949318	2.25
1992	21584579	7918347	2.73
1993	22917404	9167402	2.50
1994	20534635	10719430	1.92
1995	23551237	8078960	2.92
1996	34685228	9235730	3.76
1997	33598414	11296193	2.97
1998	23109423	9880737	2.34
1999	28422268	10335499	2.75
2000	30268913	10982542	2.76
2001	30884753	11965607	2.58
Prom. 92/96	24654617	9023974	2.76
Prom. 97/01	29256754	10892116	2.68
Tasa 92/01	4.1	3.4	

Fuente: JETRO.

El análisis por origen de estas importaciones muestra una alta concentración ya que casi el 77% del volumen total importado promedio del último quinquenio proviene de China. De mucha menor cuantía, los demás proveedores importantes son España, Corea del Sur y Chile.

Por su parte Brasil representa el primer importador del complejo Capsicum de América del Sur, alcanzando sus importaciones en términos promedios para el último quinquenio superar las 500 toneladas anuales por un valor cercano al millón de dólares, nivel semejante a las importaciones argentinas durante el período de la convertibilidad. (Cuadro 4).

Tabla 4 Brasil: Importaciones de Capsicum. 1990-2002.

Volumen (t), Valor CIF (u\$s) y Precio Medio (u\$/kg)

	Valor u\$s	Volumen kg	Precio Medio u\$/kg
1990	246601	117595	2.10
1991	216147	121037	1.79
1992	112516	35684	3.15
1993	205000	71684	2.86
1994	273,000	158815	1.72
1995	602,000	135030	4.46
1996	685,587	126746	5.41
1997	521,777	119232	4.38
1998	1082807	710684	1.52
1999	682473	297183	2.30
2000	563586	151434	3.72
2001	1833630	1104946	1.66
2002	698808	397072	1.76
Prom. 93/97	457473	122301	3.74
Prom. 98/02	972261	532264	1.83
Tasa 93/02	15.0	20.5	

Fuente: Base Alice

Las importaciones brasileñas de Capsicum se expandieron durante el último decenio a importantes ritmos, tal como se refleja en sus tasas de crecimiento anual del 20.5% en términos de volumen y del 15.0% en términos de valor, mostrando una alta variabilidad de un año a otro. Los precios promedios de importación han pasado de 3.74 a 1.83 u\$/kg en promedio del primer al segundo quinquenio considerado, observándose que las fuertes fluctuaciones en los volúmenes importados en general se corresponden con importantes fluctuaciones en los precios promedios de importación.

Entre los principales proveedores de Capsicum de Brasil se encuentran Estados Unidos, Sudáfrica, Chile, España, India y Argentina. De ellos Chile es el único que muestra una relativamente constante provisión, mientras que las importaciones desde Estados Unidos o Sudáfrica, que presentan los principales volúmenes, se corresponden con aquellos años de picos de importación. Las exportaciones de nuestro país se muestran erráticas y han disminuido considerablemente en los dos últimos años analizados. (Cuadro 5).

Tabla 5 Brasil: Importaciones de Capsicum según origen.
Volumen en kg 1997-2001.

	1997	1998	1999	2000	2001	Prom. 97/01	%
Estados Unidos	776	560825	75251	10058	470671	223516	46.9
Sudáfrica	0	0	0	0	473933	94787	19.9
Chile	46677	64912	46698	50536	69126	55590	11.7
España	1532	2176	87627	33120	1066	25104	5.3
India	22000	0	37500	22000	36750	23650	5.0
Argentina	30196	23579	43628	5363	12508	23055	4.8
Otros	18051	59192	6479	30357	40892	30994	6.5
Total	119232	710684	297183	151434	1104946	476696	100.0

Fuente: Base Alice.

CONCLUSIONES

La Unión Europea representa el primer megamercado del mundo importador de pimentón, aunque considerando los países individualmente, los Estados Unidos son el principal importador mundial.

Todos los mercados analizados muestran una importante expansión de la demanda de importaciones de los productos del complejo capsicum, tal como lo demuestran las tasas de crecimiento anual promedio durante el último decenio analizado en términos de volumen, siempre considerablemente superiores a sus respectivas tasas de crecimiento poblacional.

El mercado brasileño, importante mercado objetivo para nuestro país dado las ventajas competitivas existentes por los acuerdos del Mercosur y la cercanía a mercado, ha mostrado una sorprendente expansión del 20% anual en términos de volumen en sus importaciones de estos productos, sin embargo nuestro país aún no ha aprovechado esta oportunidad comercial, ya que las exportaciones de pimentón hacia este destino son de poca cuantía y han disminuido durante los 2 últimos años analizados.

Se concluye del análisis realizado que existen condiciones auspiciosas de mercado para la expansión de la producción de pimentón en Argentina.

BIBLIOGRAFÍA:

Alice-web, 1990-2002. Ministerio do Desenvolvimento, Industria e Comercio do Brasil. Brasília. Brasil.

Arizio O. 2002. Mercado Mundial de especias. Mercado Europeo de especias y aceites esenciales. Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina.

Eurostat, 1992-2001. Commex Data Base. Intra and Extra Statistics European Unión Trade. Bruselas. Bélgica.

Galmarini, C. 1993. Cultivo de pimiento para pimentón. Sus posibilidades en la región cuyana. Agro de Cuyo. INTA. Marzo 93 Año 3 ISSN 0327-7038.

JETRO, 1992-2001. Japan Tariff Association. Imports by commodities. Tokio. Japón.

Nuez Viñals, F.; Gil Ortega, R. y Costa García, J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ediciones Mundi Prensa, México.

U.S. Census Bureau. 1992-2001. U.S. Imports History. Washington. USA.

COMINO: PRODUCCIÓN NACIONAL, IMPORTACIONES Y EXPORTACIONES.

ARIZIO, Osvaldo P.⁽¹⁾ y CURIONI, Ana O.⁽²⁾

Universidad Nacional de Luján. ⁽¹⁾ Dto. de Ciencias Sociales. ⁽²⁾ Dto. de Tecnología.

RESUMEN

El comino (*Cuminum cyminum*) utilizado como condimento y aromatizante de comidas, componente importante del polvo curry y en la obtención de aceite esencial, es una producción tradicional de los Valles Calchaquíes en el NOA. El objetivo de este trabajo es analizar la evolución de la producción nacional, las importaciones y exportaciones de comino, en base a datos de SAGPyA, INDEC e informantes calificados, los cuales fueron procesados en sendas tablas y gráficos. En la década del 90 dada la apertura de importaciones y la paulatina sobrevaluación de nuestra moneda durante el período de la convertibilidad, la superficie y la producción bajaron un 48 y 52% respectivamente. El consumo nacional estimado en 600-700 toneladas anuales por empresarios del sector, fue cubierto en un 50-70% por la producción nacional según años y el resto vía importaciones, que alcanzaron un pico de 400 toneladas en 1997. Es esperable que las nuevas condiciones macroeconómicas den impulso nuevamente a esta producción.

Palabras claves: *Cuminum cyminum*; polvo curry; producción; Argentina.

ABSTRACT:

The cumin (*Cuminum cyminum*) used as food condiment and aromatic, important component of the curry powder and from the obtainment of essential oil, is a traditional production of the Calchaquies valleys in the NOA. The objective of this work is to analyze the evolution of the national production, imports and exports of cumin based on data of SAGPyA, INDEC and authorized informative. They have been processed in tables and graphics. In the 90's decade as the imports opening and the gradual sobrevaluation of our money during convertibility period, the surface and production decreased a 48 and 52% respectively. The national consumption was estimated in 600-700 annual ton by manager of the sector. It was covered in a 50-70% for the national production as years and the rest via imports, that overtook a top of 400ton in 1997. Is expectable that the new macroeconomics conditions gives a new impulse to this production.

Key words: *Cuminum cyminum*; curry powder; production; Argentina.

INTRODUCCIÓN

El comino, cumin en francés, cumnin black en inglés ó kreuz-kummel en alemán, cominhos en portugués, cuyo nombre científico es *Cuminum cyminum* es una especie

inverno-primaveral de importantes usos en la industria alimenticia, también en licorería y perfumería (Ratti, 1981).

Los frutos poseen un importante uso en especiería como condimento y aromatizante de comidas tales como hortalizas, carnes, embutidos, arroz, tipos especiales de quesos, salsas, pan, pickles, sazonamiento de sopas, etc (Farrel, 1985; Simonetti, 1990). Es componente importante del polvo curry (Argtander, 1960), en especial de los currys hindúes y aparece a menudo en la cocina de Oriente Medio y Marruecos, con corderos, pollos, yogurt y berenjenas. Es utilizado para preparar diversos licores de los llamados digestivos ó estomacales y para obtener esencia (Rubió, 1987). Se lo emplea en la industria panadera en la preparación de panes y galletas.

Su aceite esencial se utiliza en perfumería y licorería. Meena Syed (1986) estudiando la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de especies pertenecientes a la familia de las Umbelíferas reporta al aceite esencial de comino como muy activo, no sólo por las concentraciones necesarias para manifestar su actividad sino también por el amplio rango de patógenos sobre los que ejerce efecto entre los cuales se destaca *Staph aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella dysentery* cuyas densidades ópticas son nulas a partir de concentraciones superiores a los 800 ppm.; para el *Vibrio cholera* la concentración debe ser superior a 2000 ppm.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la evolución de la producción nacional, las importaciones y exportaciones de comino.

MATERIALES Y MÉTODOS

En base a datos recabados de SAGPyA e INDEC se analiza la evolución de la producción nacional de comino, las importaciones y exportaciones realizadas por nuestro país y los orígenes y destinos de las mismas. La información se completa en base a entrevistas no estructuradas a informantes calificados (acopiadores, productores y exportadores) y bibliografía existente. Los datos fueron procesados en cuadros y gráficos, obteniéndose los promedios quinquenales. En base a su análisis se extraen conclusiones sobre las necesidades de crecimiento de la producción argentina, así como destacar los principales problemas que limitan la expansión de este cultivo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Producción y consumo nacional

La principal zona de producción argentina corresponde a la Provincia de Salta, en los denominados Valles Calchaquíes (Deptos. Cafayate, San Carlos, Molinos, Cachi, La Poma y Candelaria). También se registran buenas producciones en las Pcias. de Catamarca (Deptos. Santa María, Andalgalá, Belén y Tinogasta) y La Rioja (Deptos. Arauco, Famatina y San Blas de Los Sauces).

El comino, junto con el anís, es de las primeras producciones aromáticas que se desarrollaron en la Argentina. Su cultivo fue creciendo hasta alcanzar superficies sembradas del orden de las 1000-1200 has hacia finales de la década del '70, mediados de los '80, con niveles de producción que rondaban los 600 kg/ha., lo que permitía el autoabastecimiento del consumo interno y la generación de pequeños saldos exportables con destino a los países limítrofes. Esta situación comienza a modificarse en los años de la hiperinflación y luego con la eliminación de las trabas a la importación y el establecimiento de la convertibilidad, donde la producción nacional fue cediendo paso a la importada en el abastecimiento de nuestro mercado local, observándose una caída del área sembrada durante toda la década del '90, situación que comienza a revertirse a partir de la campaña 1998/99.

La producción nacional de comino fue estimada en unas 465 toneladas durante la campaña 99/00 por la SAGPyA (Cuadro 1), producto de unas 700 has de superficie sembrada, correspondiendo a un rendimiento cercano a los 650 kg/ha.

El consumo nacional está estimado en alrededor de 600-700 toneladas anuales por los empresarios del sector, las cuales fueron cubiertas en la última década en un 50-70% por la producción nacional según años y el resto vía importaciones, lo que permite estimar un consumo aparente cercano a los 20 g/hab/año.

Cuadro 1.
Superficie, Producción y Rendimiento de comino. 1990-2000.

Campaña	Superficie (has)	Producción (ton)	Rinde (kg/ha)
89/90	1370	960	701
90/91	1150	778	677
91/92	1420	930	655
92/93	1100	730	664
93/94	930	680	731
94/95	1150	666	579
95/96	550	305	555
96/97	850	710	835
97/98	670	405	604
98/99	720	480	667
99/00	710	465	655

Fuente: Sagpya. Area de té, aromáticas y medicinales.

2. Importaciones Argentinas

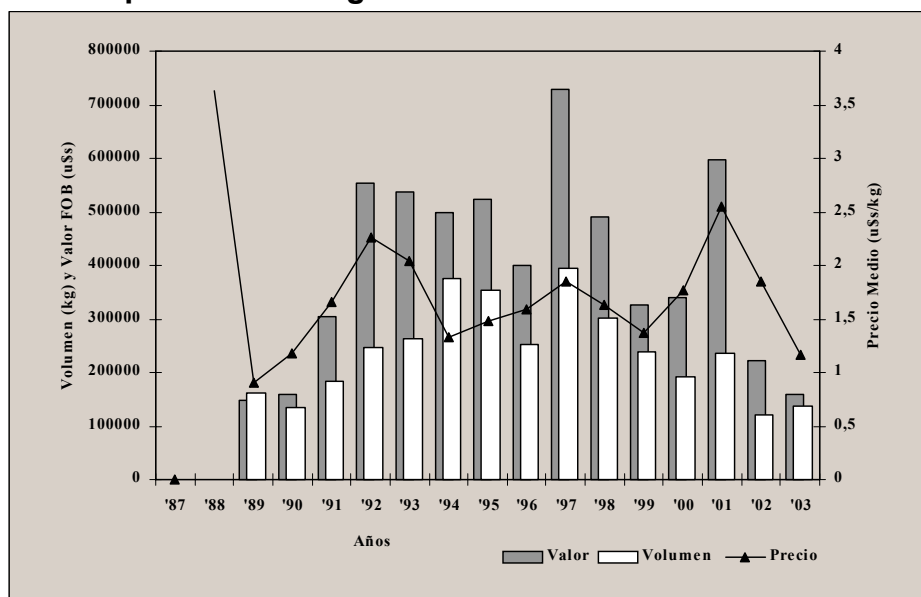
La apertura de importaciones a principios de los años 90 encontró una producción nacional de comino alejada de los estándares internacionales, tanto de rendimientos como de calidad. Esta situación trajo aparejado un fuerte incremento de las importaciones a partir de 1992 a la par que disminuía la superficie sembrada y la producción nacional.

En efecto, tal como se observa en el Gráfico 1, las importaciones promedio anuales de finales de los '80, previo al establecimiento de la apertura económica y el plan de convertibilidad rondaron las 100 t, siendo inexistentes o despreciables en los años previos a 1988 durante toda la década del '80. A partir de 1989 comienzan a desarrollarse importaciones crecientes, en especial a partir de 1991, que llevan a ubicar los niveles promedios del quinquenio 94/98 en mas de 300 t para disminuir a 200 t en el último quinquenio debido a la retracción de las importaciones que ocurre a partir de 1998 y se incrementa en el 2002. (Cuadro 2).

Las importaciones promedio anual del último quinquenio significaron una erogación cercana a los 200 mil dólares anuales. Los precios promedios de importación durante la última década han oscilado entre un mínimo de 1,2 y un máximo de 2,5 u\$s/kg, pero en general muestran valores cercanos a 1,6 u\$s/kg en la mayoría de los años. Los precios pagados a los productores nacionales oscilaron en los últimos años, antes de la devaluación, entre los 1,8 y 2,5 \$/kg, en consonancia con los precios promedios de importación a los que deben sumarse los gastos de desaduanización e impuestos internos. En la actualidad los precios pagados a los productores se ubican en el orden de los 4-5 \$/kg.

Gráfico 1.

Importaciones argentinas de comino 1987-2003.



Fuente: INDEC.

Cuadro 2.

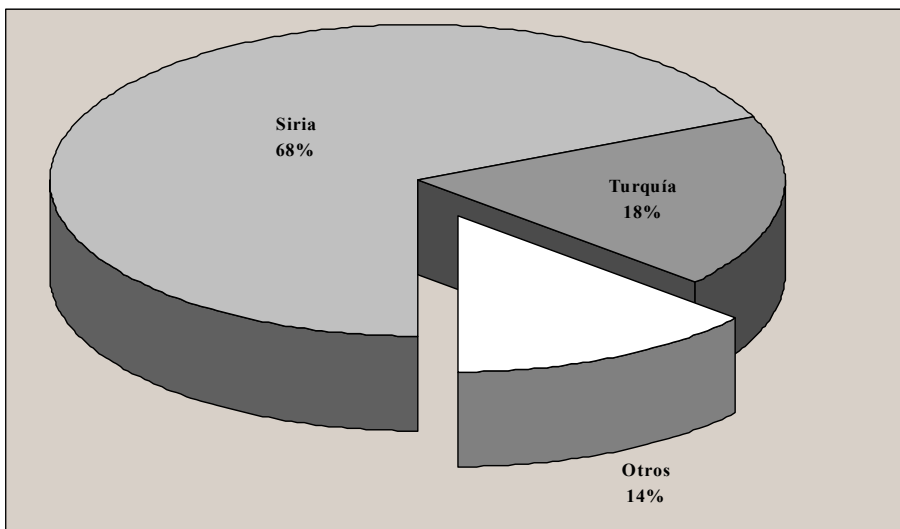
Importaciones argentinas de comino 1989-2003.

Quinquenio	Valor CIF u\$s	Volumen Kg	Precio Medio u\$s/kg
Prom. 89/93	340675	198219	1,7
Prom. 94/98	528130	335650	1,6
Prom. 99/03	328804	184278	1,8

Fuente: INDEC.

El origen de nuestras importaciones de comino en términos de volumen promedio para el último quinquenio (99/03) han correspondido en un 68 % a Siria y un 18 % a Turquía, tradicionales productores y exportadores de este producto. (Gráfico 2).

Gráfico 2.
Importaciones argentinas de comino según origen.
Volumen promedio 99/01.



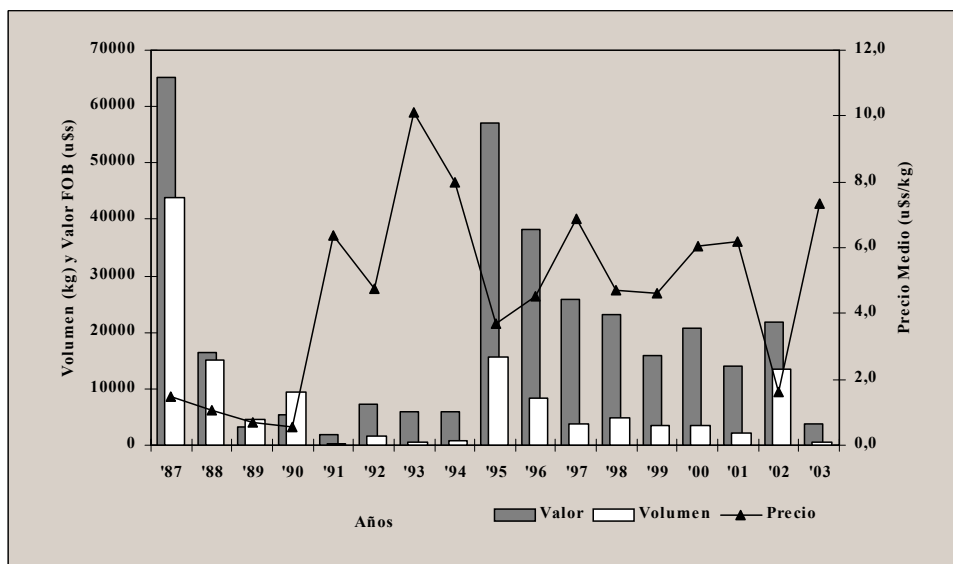
Fuente: INDEC.

3. Exportaciones Argentinas

Como puede observarse en el Gráfico 3, las exportaciones argentinas se han mantenido relativamente en términos de valor a pesar de disminuir a la mitad en términos de volumen, lo que sugiere que las exportaciones argentinas durante los años '90 no fueron a granel, sino envasadas para consumo final, hecho que se corrobora en el nivel de precios promedios alcanzados en los 2 últimos quinquenios. (Cuadro 3).

Los principales destinos de nuestras exportaciones en términos de volumen han sido los vecinos países de Uruguay y Paraguay.

Gráfico 3.
Exportaciones argentinas de comino 1987-2003.



Fuente: Indec.

Cuadro 3.
Exportaciones argentinas de comino. 1989-2003.

Quinquenio	Valor u\$s	Volumen kg	Precio Medio u\$s/kg
Prom. 89/93	4651	3297	2,0
Prom. 94/98	30092	6690	6,2
Prom. 99/03	15233	4609	5,7

Fuente: INDEC.

CONCLUSIONES:

La producción nacional de comino durante la década de los 90 no alcanzó para abastecer el mercado interno siendo necesario recurrir a las importaciones a pesar de las óptimas condiciones agroclimáticas para la producción de comino en Argentina.

La apertura de importaciones y la paulatina sobrevaluación de nuestra moneda acaecida durante el período de la convertibilidad afectaron negativamente a la producción nacional de comino que se desarrolla en los Valles Calchaquíes del NOA. Tal como se observa en la caída del área sembrada y la producción nacional de este condimento y en los crecientes niveles de importación que fueron necesarios para cubrir la demanda interna, que recién comienzan a revertirse a partir de 1998.

Es de esperar que las nuevas condiciones macroeconómicas generadas a partir de la devaluación de nuestra moneda tonifiquen nuevamente la producción de esta especia a través del armado y puesta en ejecución de un plan nacional que apunte a mejorar el paquete agrotecnológico, mejore la calidad del producto obtenido y favorezca vía apoyo técnico y económico a la reinserción de los pequeños productores desplazados en la anterior década y la ampliación de las superficies de producción que permita cubrir la demanda interna y generar saldos exportables.

BIBLIOGRAFÍA

Argtander, S. 1960. Perfume and flavor materials of natural origin. Ed. Elizabeth, N. J. USA

Farrell, K. 1985. Spices, condiments, and seasonings. Editorial: Van Nostrand Reinhold Co.N.Y. U.S.A.

INDEC. 1984-2003. Base estadística de importaciones y exportaciones Nomenclatura-País. Buenos Aires. Argentina.

Meena syed, M.; Hanif, M.; Chaudehary, F. M. and Bhatti, M. K. 1986. Antimicrobial activity of essential oils of the Umbelliferae Family. Part 1. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare* and *Bunium persicum* oils. Pakistan J. Sci. Ind. Res., Vol. 29, N° 3. Pag. 183-192.

Ratti, H. 1981. El cultivo de comino. E.E.A. INTA Catamarca.

Rubio, M.; Elechosa, M. y Lafourcade, H. 1987. Comino. Curso de Plantas Aromáticas y su utilización en el hogar. Dto. de Botánica. Unidad de Plantas Aromáticas. INTA Castelar.

SAGPyA, 1990-2000. Estadísticas del Area Yerba Mate, Té y Aromáticas. Buenos Aires, Argentina.

Simonetti, C. 1991. Guía de hierbas y especias. Ed. Grijalbo. Barcelona, España.

ANALISIS BIBLIOMETRICO DE LA PRODUCCION IBEROAMERICANA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CALVIÑO, Amalia M., TÈVEZ, Edyt y ALFARAZ, Pablo H.

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA, UBA-CONICET, Junín 956, (1113), Buenos Aires.. Tel: (05411)-4964-8280 Fax: (05411)-4508-3645. E-mail: acalvino@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Se cuantificó la producción en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CTA) desde 1992 a 2003 para cinco países iberoamericanos (IA): Argentina (A), Brasil (B), España (E), México (M) y Portugal (P). Se calculó el porcentaje que representan los trabajos de autores IA con respecto al total mundial para 92 revistas indizadas en Science Citation Index (PM) y el mayor número de revistas (31) mostró una PM de 5-10%. Las primeras diez revistas internacionales reúnen el 58,9% del total de trabajos IA. Las sub-áreas más productivas son --frutas, vegetales y frutos secos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas y productos de la pesca— que concentran el mayor número de trabajos de autores IA. Este panorama describe no sólo el aporte de cada país IA sino también las revistas preferidas como órganos de difusión de los trabajos de autores IA en el área de CTA.

Palabras Clave: Ciencia y Tecnología de Alimentos – bibliometría – Iberoamerica- Science Citation Index-

ABSTRACT

From 1992 to 2003 it was quantified the production in the Food Science and Technology (FST) area for five Iberian American countries (IA), Argentina (A), Brazil (B), Spain (S), Mexico (M) and Portugal (P). The percentage of articles published by IA authors in relation to the world total, was calculated for 92 international journals indexed by Science Citation Index (WP) and the biggest number of journals (31) showed an WP of 5-10%. The first top ten journals account for the 58,3% of the total number of IA articles. The more productive subjects are --fruits, vegetables and nuts; alcoholic and non-alcoholic beverages and fish and marine products—which join the biggest number of articles from IA authors. This view describes the production of each IA country as well the preferred publication sources of the IA authors in the FST area.

Key Words: Food Science and Technology- bibliometry- Iberian America-Science Citation index-

INTRODUCCION

La bibliometría es una herramienta útil para analizar la producción científica. Una concepción moderna de la ciencia como tarea del conocimiento humano, señala que esta es una labor tanto individual como de conjunto en la que se debe dar testimonio de las obras precedentes a través de la citación de referencias. Este proceso documental es pasible, entonces, de un estudio que permite desentrañar la conducta de los científicos como usuarios de información, a través de índices específicos.

Observando las referencias de un artículo reciente (Braun y Glänzel, 2000) se destaca la atención dispensada al análisis bibliométrico de disciplinas básicas tales como física, matemática y química. Sin embargo, los estudios para las ciencias aplicadas en general, y para la ciencia y tecnología de los alimentos (CTA) en particular, son escasos en la literatura.

Con las investigaciones bibliométricas se pueden estudiar una serie de indicadores tomados de una población de documentos. A pesar de la diversidad documental (artículos y notas de investigación, revisiones, conferencias, tesis, etc) en CTA al igual que en otras áreas de investigación prevalecen los artículos publicados en revistas de investigación (Alfaraz y Calviño, 2004). Los recuentos de publicaciones permiten, entre otros, identificar las revistas líderes, los principales campos de interés y el idioma predominante de publicación en un área determinada. Para realizar esta clase de estudios, la búsqueda puede ser llevada a cabo en una o varias bases de datos. Así, por ejemplo, un análisis de las publicaciones españolas sobre viticultura y enología se realizó mediante la exploración de una única base, Food Science and Technology Abstracts (FSTA) (Aleixandre y Andrés Ferrando, 1995). En cambio, un estudio reciente recoge datos de múltiples bases de datos y describe el crecimiento de la literatura en CTA (Geetha Seetharam y Ravichandra Rao, 1999).

Los objetivos del presente trabajo consisten en: a) cuantificar la producción en CTA desde 1992 a 2003 para cinco países iberoamericanos (IA), Argentina (A), Brasil (B), España (E), México (M) y Portugal (P) que aparece indizada en FSTA y b) caracterizar la producción IA por sub-áreas más productivas en las diez fuentes más frecuentes de publicación en CTA, en el período estudiado.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo una estrategia de búsqueda para recuperar, en el período 1992-2003, todos los registros indizados en el campo dirección de la base de datos FSTA para cada uno de los cinco países y 92 revistas de corriente principal. Las revistas de corriente principal son aquellas que reciben cobertura en Science Citation Index o Science Citation Index Expanded y que por ello tienen asignado un factor de impacto. Para cada una de las 92 revistas bajo análisis se comparó la producción IA sobre CTA en relación con la producción mundial en la respectiva revista (PM).

Se analizaron las diez fuentes con mayor número de registros IA. Para las publicaciones de cada país en cada una de estas diez primeras revistas se calculó el porcentaje de publicaciones en las tres áreas más frecuentes.

FSTA es la base de datos más adecuada para el área de alimentos, pero sólo registra la afiliación del primer autor por lo que ignora la colaboración entre grupos internacionales de investigación. Es probable, sin embargo, que este sesgo influya en forma similar en la producción de todos los países seleccionados y por lo tanto no afecte significativamente el análisis comparativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según el porcentaje de PM que presentan cada una de las 92 revistas se las clasificó en seis subgrupos: 20% o más de PM (4), 10-20% PM (22), 5-10% PM (31), 1-5% PM (22), 0-1% PM (8); 0% PM (5). Esto indica que en el grupo más numeroso de revistas (31), los trabajos de autores de estos cinco países reúnen del 5 al 10 % del total mundial.

Las diez revistas internacionales que tienen las mayores frecuencias de publicación de trabajos IA son, en orden decreciente, J. Agric. Food Chem.(1ª con 1305 trabajos), Food Chem. (2ª con 516), J. Sci. Food Agric.(3ª con 437), J. Food Sci.(4ª con 416), J. Food Protect.(5ª con 383), Eur. Food Res. Technol.(6ª con 264), Food Sci. Technol. Int.(7ª con 262), Meat Sci.(8ª con 260), J. Food Eng.(9ª con 259) e Int. J. Food Microbiol.(10ª con 236). Estas diez revistas en conjunto reúnen el 58,9% del total de trabajos IA.

La producción de cada país, en las diez revistas mencionadas, relativa a su propio total de publicaciones indizadas en FSTA es variable, desde un máximo para E con un 30,7% del total de sus publicaciones concentradas en estos 10 journals, siguiendo con valores intermedios, A (27,0%), P (25,0%) y M (18,8%) hasta un mínimo para B (9,9%) que muestra una mayor difusión de su producción en otras revistas. En la Figura 1 se presentan los perfiles de publicación en estas diez revistas detallado país por país. Se

observa la primacía de J. Agric. Food Chem. Para los cinco países, el predominio de Food Chem. para los autores brasileños y J. Food Eng. para los autores argentinos y la escasez de publicaciones americanas en Eur. Food Res. and Technol.

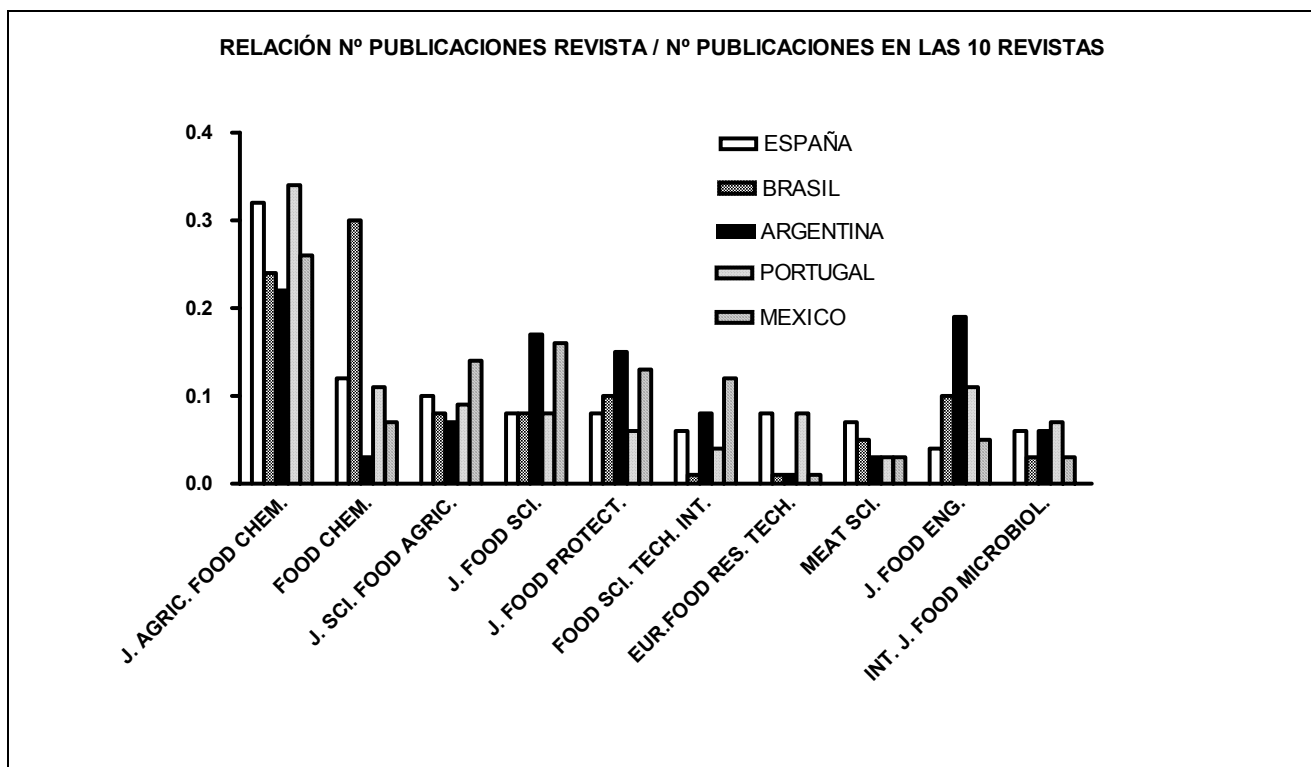


FIGURA 1 Para cada revista se grafica la relación entre la cantidad de artículos que publicaron los autores de cada país versus el número de artículos en las 10 revistas señaladas.

En FSTA, veinte códigos permiten la delimitación temática de los registros. Así, los códigos de área incluyen: (A) Ciencia Básica; (B) Microbiología y biotecnología; (C) Higiene y Toxicología; (D) Economía y estadística; (E) Ingeniería de alimentos (F) Embalaje; (G) Tecnología de materias primas; (H) Bebidas alcohólicas y no-alcohólicas; (J) Frutas, vegetales y frutos secos; (K) Cacao, chocolate y derivados; (L) Azúcares, jarabes, almidones y confituras; (M) Cereales y panificados; (N) Grasas y aceites; (P) Lácteos y derivados; (Q) Huevos y derivados; (R) Productos de la pesca; (S) Productos cárnicos; (T) Aditivos, especias y condimentos; (U) Estándares y regulaciones; (V) Patentes.

La Tabla I presenta, específicamente para cada país y revista, las tres sub-áreas más frecuentes que describen la temática de cada producción nacional.

TABLA I: Publicación en las áreas más frecuentes: porcentajes por país y revista

REVISTAS	AREA	ESPAÑA	BRASIL	ARGENTINA	PORTUGAL	MEXICO
J. AGRIC. FOOD CHEM.	J	26.8	43.4	20.0	19.4	40.0
	H	20.8	13.2	1.2	58.1	4.3
	N	8.5	5.3	1.2	2.2	2.9
FOOD CHEM.	J	19.7	26.9	7.7	3.2	38.9
	H	16.1	18.3	7.7	25.8	0.0
	P	15.0	7.5	38.5	35.5	0.0
J. SCI. FOOD AGRIC.	J	34.9	32.0	50.0	40.0	27.0
	R	14.2	4.0	3.8	8.0	5.4
	H	10.5	8.0	3.8	32.0	2.7
J. FOOD SCI.	J	28.5	36.0	16.4	23.8	25.6
	R	18.5	4.0	10.4	14.3	20.9
	P	10.0	12.0	23.9	14.3	4.7
J. FOOD PROTECT.	P	24.3	20.0	26.3	29.4	8.3
	S	16.9	23.3	17.5	11.8	30.6
	C	11.1	16.7	19.3	17.6	19.4
EUR. FOOD RES. TECHNOL.	J	27.0	66.7	25.0	9.1	50.0
	R	19.7	0.0	0.0	50.0	50.0
	H	15.0	33.3	0.0	9.1	0.0
FOOD SCI. TECHNOL. INT.	J	19.8	50.0	20.0	40.0	41.9
	H	14.4	25.0	6.7	20.0	6.5
	S	12.8	25.0	3.3	0.0	6.5
MEAT SCI. #	S	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0
J FOOD ENG	J	36.4	21.2	34.2	27.6	28.6
	E	10.9	9.1	12.3	20.7	7.1
	A	9.1	0.0	15.1	10.3	21.4
INT. J. FOOD MICROBIOL.	C	19.4	30.0	12.5	15.8	25.0
	H	13.7	10.0	20.8	26.3	0.0
	J	16.0	0.0	8.3	0.0	12.5

#presenta exclusivamente trabajos dedicados a productos cárnicos

En el presente análisis, los estudios en (J), (H) y (R) concentran el mayor número de trabajos de autores IA. En este sentido, J y H como sub-áreas más productivas coinciden con lo hallado previamente (Alfaraz y Calviño, 2004).

CONCLUSIONES

La bibliometría resulta una herramienta de utilidad para caracterizar las publicaciones científicas iberoamericanas en CTA. Profundizar este estudio, mediante indicadores

bibliométricos apropiados, permitirá evaluar la evolución cuantitativa y la visibilidad de la producción iberoamericana.

BIBLIOGRAFÍA

Aleixandre, R. y Andrés Ferrando, J.M. (1995). Análisis de la circulación internacional de las publicaciones españolas sobre viticultura y enología, *Alimentaria*, N°. 259, 79-87.

Alfaraz, P. y Calviño, A.M. (2004). Bibliometric study on Food Science and Technology: scientific production in Iberian-American countries (1991-2000). *Scientometrics*, 61, 89-102.

Braun, T y Glänzel, W. (2000) Chemistry research in Eastern Central Europe (1992-1997), *Scientometrics*, 49, 187-213.

Geetha Seetharam, I. y Ravichandra Rao, K. (1999). Growth of science and technology literature: a comparison of CFTRI, India and the world, *Scientometrics*, 44, 59-79.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se ha financiado con fondos del Proyecto B039 de la Programación UBACYT2004-2007.

UN DESPERTAR EN LA VIDA DE UNA EMPRESA FRIGORÍFICA

PASCUAL, Bernardo O., AMBRÚSTOLO, Mariela B.

Facultad de Ingeniería. UNMDP. J. B. Justo 4302, TE: (0223) 481 6600, FAX: (0223) 481 0046. E-mail: bpascual@copetel.com.ar; ambrus@fi.mdp.edu.ar

RESUMEN

El trabajo muestra los resultados obtenidos por el Programa Despertar basado en las técnicas internacionales 5s para gestionar el ambiente de trabajo. Los principales obstáculos hallados fueron: falta de técnicas de trabajo y estandarización, supervisión basada en la inspección y no en la participación. La aplicación del programa tiene como ventajas: fácil entendimiento, simple aplicación y bajo presupuesto. Además identifica los problemas de calidad, estimula el uso de los conceptos de eficiencia y autodisciplina. La aplicación del programa dio origen a un plan de capacitación.

Hubo diferencias en el compromiso e interés de los sectores involucrados debido a la falta de libertad de decisión, grado de incentivo de los supervisores y niveles de educación dispar.

Como resultado se observó que la metodología permite implementar las mencionadas técnicas con la participación activa de las personas, mediante pequeños proyectos y poca inversión. Los sectores más comprometidos demostraron que la herramienta mejora la productividad e induce a la mejora continua.

ABSTRACT

The following work shows the outcomes obtained from the Program Despertar based on international techniques 5's. These techniques manage the job environment. We met same impediments. Disorder, lack of job techniques and standardization, and supervision based on inspection rather than on participation. The program advantages are: easy comprehension, straightforward application and low budget. The program also identifies quality problems and encourages auto discipline and efficiency. The program included a training plan. As a result we observed that this methodology permits the implementation of the mentioned plans with contribution, small projects, ideas and little inversion. There were differences in the level of compromise and in the interest of sectors involved. Due to a lack of decision, freedom, incentive of supervision and dissimilar levels of education. The

evident results of more compromised sectors show that this tool improves the productivity and induces continuous improvement.

Palabras Claves: Ambiente de Trabajo, 5s, Calidad, Eficiencia, Productividad

INTRODUCCIÓN

El grupo de investigación y extensión de Gestión de la Calidad del Departamento de Ingeniería Industrial de UNMDP fue convocado por una empresa pesquera para realizar un relevamiento y análisis de su plan HACCP y medir su brecha a la implementación de la norma ISO 9000. Además incluyó la implementación del Programa Despertar en distintos sectores de la organización. En este trabajo nos referimos a dicha implementación.

MÉTODOS

Despertar consiste básicamente en centrar la estrategia de participación del personal en un tema fundamental: el compromiso para organizar el lugar de trabajo. Esto significa mantenerlo pulcro, limpio y bajo condiciones de normalización. Todo esto manteniendo la disciplina necesaria para hacer un buen trabajo. Si estos requisitos no se cumplen no se puede iniciar ningún proceso de mejora de la calidad.

Un lugar de trabajo *limpio*, logra alta *productividad*, tiene alta *calidad*, mantiene bajos *costos*, asegura *entregas* a tiempo, es *seguro* para la gente que opera y eleva la moral de los trabajadores. Este programa está basado en las técnicas internacionales conocidas como 5s.

Las 5s son herramientas de la calidad nacidas en Japón con el fin de descubrir mejores formas de hacer las cosas y facilitar el trabajo. El objetivo principal es eliminar desperdicios, hacer el trabajo más productivo y confortable, mejorar la calidad y los costos operativos. El nombre de 5S viene de las cinco palabras japonesas: Seiri, Seiton, Seiso. Seiketsu y Shitsuke que significan: Organización, Orden, Limpieza, Estandarización y Disciplina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar vamos a referirnos a los obstáculos encontrados al tomar contacto con la organización. El primero de ellos fue la cultura de la supervisión basada en la inspección y no en la participación. Esto origina dependencia en la tarea y falta de motivación para la generación de oportunidades de mejora del proceso y del trabajo. El segundo obstáculo tenía relación con el ambiente de trabajo. El desorden, la falta de técnicas de trabajo y

estandarización provocaban una falta de compromiso del personal con el proceso que estaban desarrollando y su control, desalentando sus iniciativas.

Antes de implementar un programa de 5S debe crearse un entorno adecuado para poder aplicar el método. Para ello se debe realizar un diagnóstico de la posibilidad de implementación, sistemas de gestión y disponibilidad de los recursos humanos.

A partir del diagnóstico se evidenció la necesidad de plantear un programa de sensibilización, concientización y capacitación que brindara las herramientas para poder implementar este programa.

El proceso de capacitación se llevó a cabo utilizando la modalidad taller y evitando las clases magistrales. Se eligió esta metodología debido a que algunos niveles de la empresa nunca habían tenido actividad de capacitación y los talleres de enseñanza al ser participativos facilitan el aprendizaje, evitan el cansancio que ocasiona el estar sentado escuchando una extensa clase oral y permiten la participación de personas con bajo nivel de instrucción.

Se plantearon los siguientes seminarios que permitieron conocer al personal, detectar problemas en el lugar de trabajo o en la tarea realizada, evaluar el tipo de supervisión y poder brindar elementos de planificación. Los mismos se muestran en la Tabla 1.

Finalizada la capacitación, se llevó a cabo un plan para la implementación de las herramientas 5s. Se eligieron los sectores donde aplicar sus herramientas.

En el caso de estudio por decisión de la empresa se pusieron en marcha varios sectores a la vez. Los mismos fueron: Almacenes, Administración, Taller de mantenimiento, Proceso de Fileteado y Cámaras. Sectores muy diversos en el tipo de trabajo y en el oficio del personal involucrado.

En cada sector se aplicó un Check List de evaluación para conocer la situación inicial del mismo, con el fin de detectar los puntos fuertes y débiles. Para ello se delimitaron las áreas de incumbencia, el alcance y los límites de su trabajo.

Luego de analizar los resultados del Check List, quedaron identificados los puntos fuertes y los puntos débiles sobre los cuales se debía trabajar.

No todos los sectores lograron una buena evaluación de la situación. Algunos hicieron un estudio detallado y amplio, otros se centraron sólo en puntos muy específicos. Un grupo hizo una evaluación muy superficial que le dificultó la aplicación del programa. Entre las causas de las diferencias podemos mencionar: falta de compromiso y dedicación al programa, falta de tiempo para emplear en el mismo, excesiva carga de trabajo y a veces desinterés.

Tabla 1

Seminario	Propósito	Destinatarios	Temario
INTRODUCCIÓN A LA CALIDAD	Desarrollar la concientización de la importancia del trabajo personal y grupal en el logro de los objetivos.	Supervisores y operarios	¿Qué es calidad? ¿cómo trabajar con calidad? Beneficios. Roles.
SUPERVISIÓN	Brindar a los supervisores un nivel de conocimientos que les permita comprender su verdadero rol y las herramientas básicas propias de su actividad de manera que les permitan aumentar su efectividad en el desarrollo de las actividades	Supervisores	Administración de las operaciones. Motivación. Liderazgo. Las comunicaciones. La delegación
INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE PROCESOS	Desarrollar en los supervisores y operarios el conocimiento y las habilidades necesarias para que puedan estudiar y organizar los procesos que tienen bajo su control.	Supervisores y operarios	El proceso. Las variables del proceso. Diagramas de proceso. Diagrama de flujo. El diagrama de proceso de la actividad. La utilidad del diagrama de proceso
DESPERTAR (5S)	Promover en cada uno de los destinatarios habilidades que le permitan mantener por medio de un método el orden y la limpieza de los puestos de trabajo, planificando actividades y efectuando ellos mismos su propio control.	Supervisores y operarios	Los problemas del proceso. Organización. Orden. Inspección. Normalización. Disciplina

En la figura 1 se muestran diagramas radar donde se puede observar la situación inicial de algunos sectores .

A partir de los puntos débiles detectados se realizó el plan de trabajo adecuado en cada sector aplicando los conceptos y herramientas adquiridas en el curso de capacitación. El plan incluyó asignación de responsabilidades y estimación de tiempos. Para buscar soluciones se aplicaron técnicas de mejora continua como Brainstorming, Diagrama de causa efecto, Diagrama de Pareto etc. Los resultados se muestran en la figura 2 a través de diagramas radar.

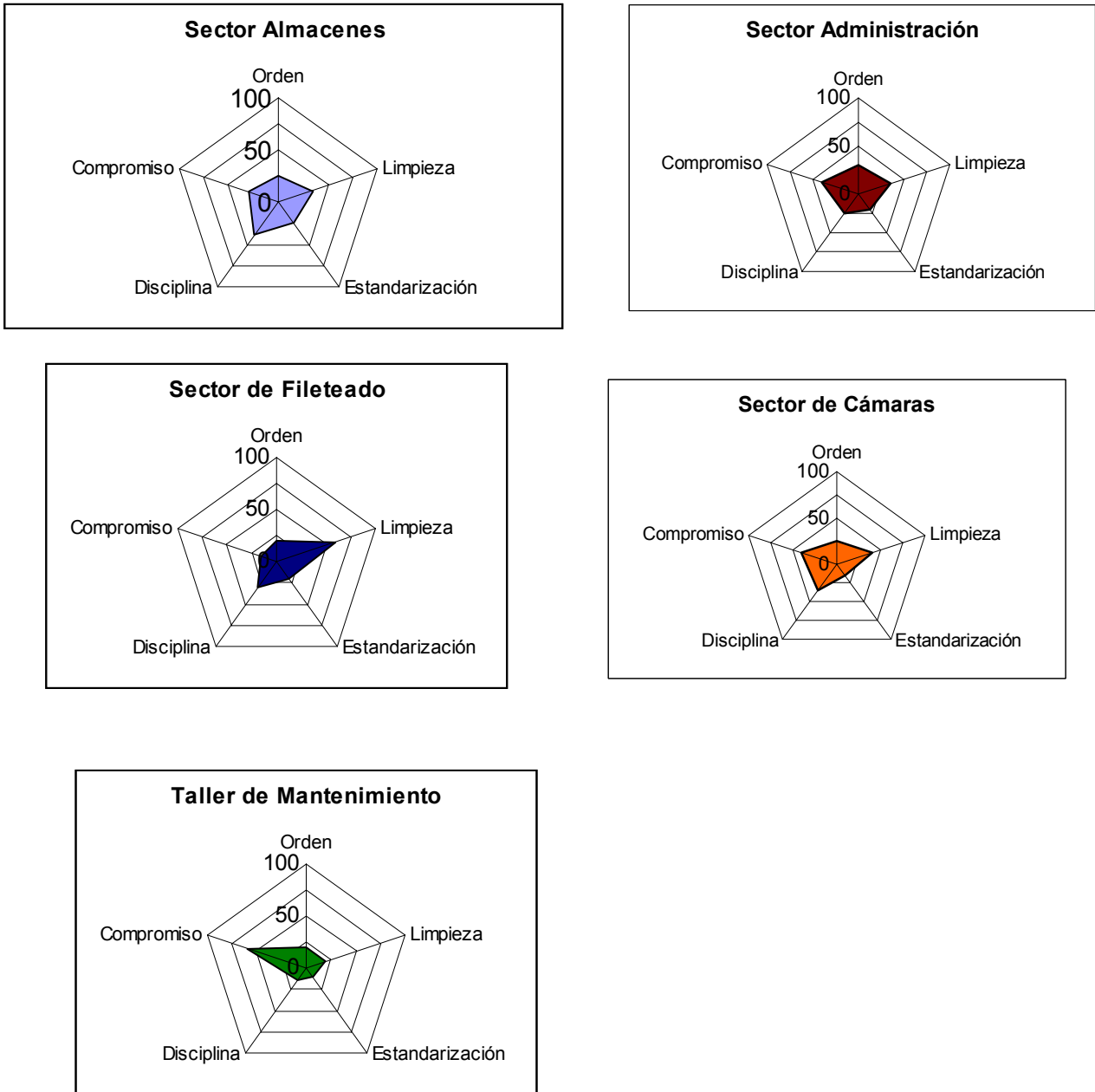


Figura 1

Para verificar el cumplimiento del plan de trabajo se realizó una auditoria, a todos los sectores donde se implementó el programa “Despertar”. Los resultados fueron satisfactorios, en algunos el resultado fue mejor que en otros.

Dentro de los sectores destacados se puede mencionar: taller de mantenimiento, administración y en menor medida Cámaras. En estos se evidenció compromiso, ganas de trabajar por una mejora y empuje suficiente para cumplir con los objetivos.

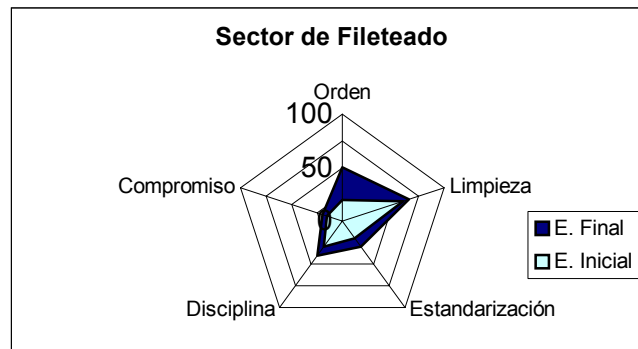
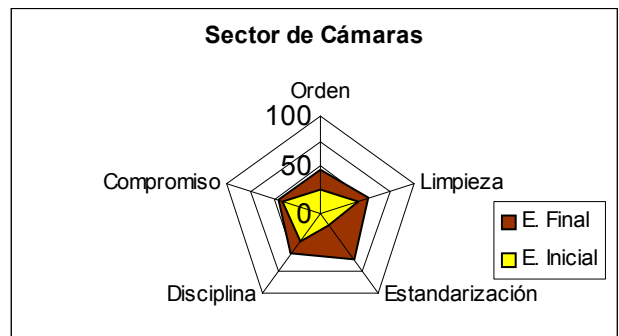
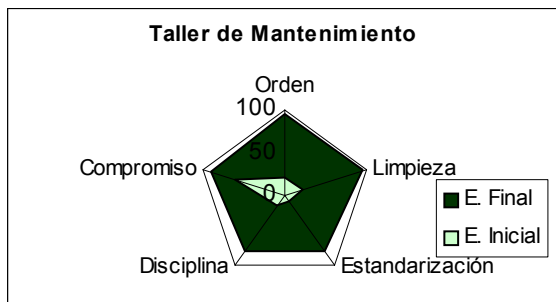
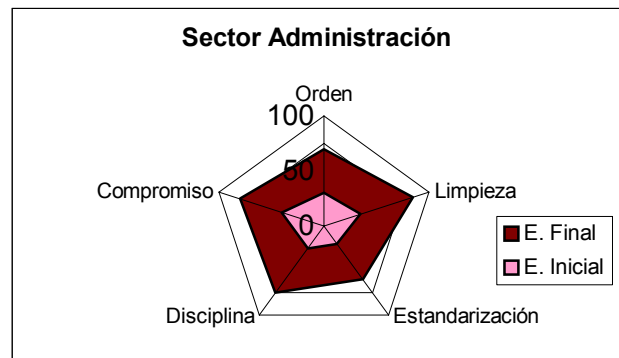
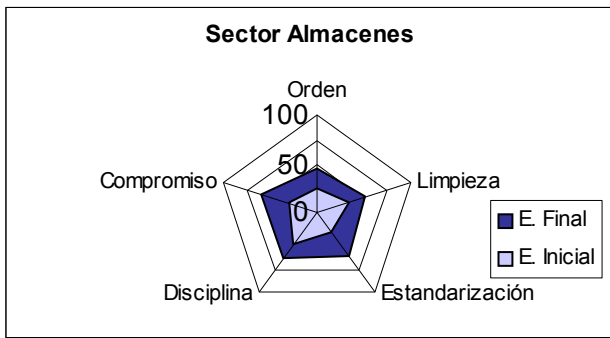


Figura 2

Sus integrantes demostraron una buena comprensión de las herramientas y lograron un plan creativo de bajo costo. Estudiaron los procesos y sugirieron mejoras y cambios. En Cámaras se encontraron con algunas falencias de origen edilicio y técnico que no pudieron resolver.

En los otros sectores donde se implementó (Almacenes, Proceso de Fileteado) se encontró apatía, desinterés en la tarea y falta de participación en el trabajo.

CONCLUSIONES

Entre las ventajas del programa podemos mencionar: es de fácil entendimiento simple aplicación y bajo presupuesto. Hace visibles los problemas de calidad y reduce los costos de operación. Además, influencia positivamente el comportamiento de las personas, estimula la autodisciplina y posibilita la mejora continua. Es una herramienta de prevención en el lugar de trabajo ya que ayuda a reducir accidentes y a trabajar con mayor eficiencia.

En los sectores donde se implementó exitosamente el programa Despertar se encontró:

- Fuerte compromiso de la dirección con el programa
- Trabajo en equipo y comunicación fluida
- Creatividad para generar proyectos de mejora a mínimo costo.
- Facilidad para introducir cambios importantes en el lugar de trabajo.
- Cambios profundos en la manera de ejecutar los trabajos con aumento de la productividad.
- Aplicación de los fundamentos de la mejora continua.

Los resultados demostraron que la esencia de Despertar está en el trabajo en equipo estandarizado, la planificación y en el compromiso todos los integrantes de la organización. Su aplicación facilita la implementación y operación de los sistemas GMP y HACCP.

BIBLIOGRAFIA

Imai, Masaaki. – “Cómo implementar el Kaisen en el sitio de trabajo (Gemba)”. – Mc Graw Hill, 1998.

ISO – “Sistemas de Gestión de la Calidad. ISO 9001/4:2000”, 2000.

Key Honda, Auro y Viveiro, Carlos Tadeu. – “Kaisen, El método japonés para la calidad total”. Ed. Métodos S.A, 1994.

Osada, Takashi. – “The 5’s”. – Ed. APO, 1991.