Av. Los Chasquis y Río Payamino.
Campus Academico Huachi
Telefonos: 2400 987 - 2400 989
Telefax: 593 03 2400 998
Email: fcial@uta.edu.ec
Casilla: 18-01-0334
Websites: www.uta.edu.ec
http://fcial.uta.edu.ec

CIBIA VI. Memorias

ALIMENTOS, CIENCIA E INGENIERIA Vol. 16(2). 2007

ALIMENTOS CIENCIA E INGENIERIA

Vol. 16(2). 2007

Trabajos aceptados
para su presentación en:

CIBIA VI

VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos (Mesas Redondas - Ciencia)

La revista ALIMENTOS, CIENCIA E INGENIERÍA es una publicación semestral de Artículos Técnicos y Trabajos de Investigación realizados en la FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS de la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, así como Publicaciones Científicas de otras Universidades e Instituciones, con las cuales la Facultad mantiene convenios de cooperación mediante el intercambio científico y cultural.

Las contribuciones de la presente publicación son responsabilidad absoluta de los autores.

Universidad Técnica de Ambato
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Rector	Ing. M. Sc. Luis Amoroso Mora
Vicerrector Académico	Dr. M. Sc. Galo Naranjo Lopez
Vicerrector Administrativo	Dr. M. Sc. Remigio Medina Guerra
Decano	Ing. MBA. Danilo Morales Carrasco
Subdecana	Ing. Mg. Gladys Navas Miño
Calificación de trabajos	Ing. M. Sc. Ph. D. Milton Ramos Moya
Organización de Contenidos y Revisión	Ing. M.Sc. Juan de Dios Alvarado
ISSN	1390 - 2180

Feria Alimentaria

ORGANIZA

CRINAL

noviembre
5 - 8 2007

Ambato, Ecuador

Universidad Técnica de Ambato
Av. Los Chasquis y Payamino
Campus AcadémicoHuachi

CIBIA VI
VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos

Contenido

Editorial. Luis Amoroso Mora..... 1
Presentación. Juan de Dios Alvarado..... 3

MESAS REDONDAS

GENERACIÓN DE VALOR AGREGADO DE FRUTAS TROPICALS SUBUTILIZADAS (PRODUCING ADDING VALUE FROM UNDER UTILIZED TROPICAL FRUIT CROPS).

Evaluación del efecto del refino y de la centrifugación en compuestos bioactivos del açaí. Ana Paula G. Gruz, Denise N. M. Palácio, Lourdes M.C. Cabral, Carmen Donangelo, Virgínia M. Matta. 5

Bioactive Substances in Tropical Fruits – An Evaluation with TOSC and "Activity Guided" RP-HPLC-Fractionation. Friedhelm Marx, Roberta Burger-Rodrigues, André Gordon, Menelaos Papagiannopoulos. 8

Cashew Apple Fruit (*Anacardium Occidentale L.*) Juice Concentration By Reverse Osmosis. Katia Terrine; Poliana Gurak; Lourdes Cabral; Virginia Matta; Max Reynes; Manuel Dornier; Fernando Abreu. 11

Caracterización fitoquímica y efecto hipoglucemiante e hipoclesterolémico del Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). A. Guzmán - Tovar; R. Topete - Viniegra; D. Hernández - López; F. Vaillant; F. Camacho - Reynosos; R. Ramos - Gómez; S. H. Guzmán - Maldonado. 13

Modelización del flujo de permeación en micro -filtración de jugos de banano mediante el uso de la turbidez. Vaillant, Fabrice; Pérez, Ana; Viquez, Floribeth. 16

Uso de la micro y ultrafiltración para la separación de polifenoles del tomate de árbol (*Solanum betaceum cav*). Beltrán, Elena; Vera, Edwin y Ruales, Jenny. 19

Impact of sensory experiences on the acceptance of tropical fruit juices. Sabbe, S; Verbeke, W. and Van Damme, P. 22

TECNOLOGÍAS PARA EL DISEÑO DE DERIVADOS LÁCTEOS FUNCIONALES.

Hidrólisis enzimática de proteínas lácteas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos. Lourdes Amigo. 25

El caseinmacropéptido un promisorio ingrediente funcional: propiedades fisicoquímicas y bioactivas. Javier Fontecha y Ana Belen Martín-Diana. 25

Colloidal protein nano and microparticles from whey by high-intensity ultrasounds. Ana M.R.Pilosof. 26

FRITURA DE ALIMENTOS.

Aplication of edible coatings in fried foods. Noemí Zaritzky. 27

La fritura al vacío. Juan Bravo. 33

C1. PROPIEDADES FÍSICAS Y COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA

Calor de respiración de bananos. Alvarado, Juan de Dios.; Coba, Orlando y Guanoluisa, Miguel Ángel. (AlvaradoC1Ecuador). 35

Análisis multivariante de propiedades físicas y químicas de aceites y grasas vegetales de Ecuador. Rojas, Cristian; Alvarado, Juan de Dios; Ballabio, Davide; Todeschini, Roberto y Tripaldi, Piero. (RojasC1Ecuador-Italia). 38

Estandarización de un método de evaluación de propiedades mecánicas en pasta cocida. Zambrano-Zaragoza. M. L., Meléndez Pérez R. Pérez Pazca, R. y Arjona Román. J. L. (MeléndezC1México). 41

Propiedades físicas del jigacho (*Vasconcellea stipulata*) y del babaco (*Vasconcellea pentagona*). Castillo T., Marco; Carrión, Flor. Vargas, Mariela y Alvarado, Juan de Dios. (CastilloC1Ecuador). 44

Propiedades reológicas de algunos cremogenados de mango (*Mangifera indica L*). Salamanca Grosso, Guillermo; Díaz Crismat, Carolina y Salazar Mendoza Boris Eduardo. (SalamancaC1Colombia). 47

Propiedades físicas del fruto, pulpa y jugo de la naranjilla iniap-palora (*Solanum quitoense x Solanum sessiliflorum*).Alvarado, Jaime; Muñoz, Sonia; Medina, Soraya y Alvarado, Juan de Dios. (AlvaradoC1Ecuador). 50

Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno durante la producción de goma xantana, por el método dinámico por variación de presión. Carbajal De Nova, Rosa Isela; Tecante-Coronel, Alberto. (CarbajalC1México). 53

Estudio de las propiedades fisicoquímicas del almidón nativo y modificado de la raiz del chayote (*Sechium edule*). Cruz, Ezri; Villanueva, Mauro; Antonio, Ma.del Carmen; Jiménez, Maribel y Beristain, Cesar Ignacio. (CruzC1México). 55

Modificación de un equipo experimental para la medición del equilibrio líquido-vapor a alta presión, a ser empleado para sistemas multicomponentes que incluyen CO_2 + etanol + (boldina, catequina). Gutiérrez Jorge E., del Valle José M., de la Fuente Juan C. (DelaFuenteC1Chile). 58

Coeficientes de actividad a dilución infinita en compuestos bioactivos: Boldina, catequina, capsaicina, β-caroteno, naringenin y quercetina. Gutiérrez Jorge E., Ulloa Jorge A., de la Fuente Juan C. (DelaFuenteC1Chile). 60

Influencia de la humedad sobre la textura y las propiedades acústicas de papas fritas. Barrero Carvajal, Maria Claudia, Casas Forero, Nidia, Cáez Ramírez, Gabriela. (GabrielaC1Colombia). 62

Densidad de zumo concentrado de naranja. Efecto de la temperatura y de la concentración. Garza, S.; Guitart, E.; Garvín, A.; Ibarz, A. (GarzaC1España). 65

Efecto de la deshidratación osmótica sobre las propiedades físicas: textura y microestructura de frutos de uchuva *Physalis peruviana*. Gómez Ana M; Pinzón, Magda I.; López, Anna F.; Rojas Andrés M. (GómezC1Colombia). 68

Influencia de modificaciones de b-ciclodextrina sobre su interacción con el agua y ligandos de distinta estructura. Ferreira Dos Santos, Mazzobre Cristina, Florencia María, Elizalde Beatriz y Buera María del Pilar. (MazzobreC1Argentina). 71

Determinación experimental de conductividad térmica de pan tipo hallulla. Negrete, Catalina; Santander, Roberto; Salinas, Catherine. (NegreteC1Chile). 74

Conductividad eléctrica de la carne de res, cerdo y pavo. Ochoa Oscar, Diosa Carlos, Puerta Juan, Gómez Hader. (OchoaC1Colombia). 77

Influência da incorporação de gordura low trans na cristalização da manteiga de cacau. Quast, L.B.; Luccas, V.; Malavazzi, M.; Kieckbusch, T.G.(QuastC1Brazil). 80

Contribución al desarrollo de productos a través de diseño de mezclas y caracterización de un cremogenado lácteo de maracuyá (*Passiflora edulis var. flavicarpa Degener*). Salamanca Grosso Guillermo; Rodríguez Arias Nelson; Pérez Figueredo Carmen Rosa. Sánchez Romero Diana Marcela. (SalamancaC1Colombia). 83

Obtenção e caracterização da farinha, amido e proteína de duas espécies de amaranto: *amaranthus caudatus* e *amaranthus cruentus*. Tapia-Blácido, Delia; Sobral, Paulo y Menegalli, Florencia. (TapiaC1Brazil). 87

Propiedades de textura y estabilidad congelación/descongelación de geles de mezclas de almidones de origen andino. Vásconez, Miguel; Ruales, Jenny; Álvarez, Yamila, Ortega-Ojeda, Fernando y Flores, Nelly. (VásconezC1Ecuador). 90

Propiedades reológicas y fisicoquímicas de natillas de leche. Elizondo Rosales G.A., Sosa Morales M.E. y Vélez-Ruiz J.F. (VélezC1México). 93

Efeito do pre-tratamento osmótico no equilíbrio higroscópico da acerola (*Malpighia emarginata* DC). Silva V. A. Alsina O. L. S. Araújo S. W. C. (AlsinaC1Brazil). 96

H nmr studies of molecular mobility in potato starch. Acevedo Nuria Cristina; Schebor Carolina and Buera María del Pilar. (AcevedoC1Argentina). 99

Permeabilidad al vapor de agua de películas biodegradables de quitosano obtenidas de caparazones de camarón. Vásconez, María Belén; Campos, Carmen; Flores, Silvia, Juan de Dios Alvarado y Gerschenson, Lía. (VásconezC1Ecuador). 101

Effect of milk composition and manufacturing parameters on rheology of mexican añejo cheese. Hernández-Morales, C., Aguirre-Mandujano, E., Hernández-Montes, A. and Villegas-de Gante, A. (AguirreC1México) 104

C2. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

La relación teobromina /cafeína asociada a la calidad del cacao ecuatoriano. Espín, Susana; Samaniego, Iván; Wakao, Harue; Jiménez, Juan Carlos. (EspínC2Ecuador). 107

Aplicación de antioxidantes naturales al aceite de maíz y sus emulsiones en agua. Maureira Gómez Yael, Janczuk Lidia, Della Rocca Patricia. (DellaRocaC2Argentina). 110

Evaluation of multivariate classification and variable selection for the distinction of cachaça and rum samples. Todeschini, Roberto; Ballabio, Davide; Rojas, Cristian; Manganaro, Alberto; Mauri, Andrea; Consonni, Viviana and Tripaldi, Piero. (TodeschiniC2Italia-Ecuador). 113

Contenido de betalaínas y caracterización fisicoquímica de dos especies del fruto de pitaya (*Stenocereus griseus H.* y *Stenocereus stellatus P.*) Ayala, Karla Cristal; Oliva, Gabriela; Beltrán, María del Carmen. (AyalaC2 México). 116

Fotoestabilidad de pigmentos pardos provenientes de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Interacción con colorante Rosa de Bengala. Matiacevich, Silvia Beatriz; Borsarelli, Claudio Darío y Buera, María del Pilar. (MatiacevichC2Argentina). 119

Estado fisicoquímico y microbiológico del pescado seco distribuido en periodos de temporada. Salamanca Grosso Guillermo; Osorio Tangarife Mónica Patricia y Machado Arguelles Indira Natalli. (SalamancaC2Colombia). 122

Efecto del tiempo de cosecha en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante de hojas de murta (*ugni molinae turcz*). Ihl Mónica, Motomura Yoshie, Wigand Mitzy, Bifani Valerio. (BifaniC2Chile). 125

Evolución del color y la actividad enzimática (peroxidasa y polifenoloxidasa) en rodajas de carambolo (*averrhoa carambola l.*) Fresco cortado durante su almacenamiento en atmósfera modificada. Blach, Diana; Donado, Johanna y Pinzón, Magda I. (BlachC2Colombia). 127

Relationships between zein pattern and wet and dry milling characteristics of corn. Farroni Abel, Robutti José, Percibaldi Nora and Borrás Francisco. (FarroniC2Argentina). 130

Propiedades térmicas y mecánicas en copos de maíz. Relación con el contenido y movilidad del agua. Farroni, Abel., Matiacevich, Silvia, Guerrero, Sandra, Alzamora, Stella, y Buera Pilar. (FarroniC2Argentina). 133

Proteólisis y características sensoriales del queso de oveja fabricado con cuajo de ternera y con distintas concentraciones de coagulante vegetal. Galán, Elena; Pino, Antonio; Prados, Francisco y Fernández-Salguero, José. (FernándezSalgueroC2España). 136

Evolución de la actividad enzimática polifenoloxidasa (ppo) y peroxidas (pod) de lulola selva *Solanum quitoense Lam.* Deshidratado osmoticamente, empacado em atmósfera modificada y almacenado bajo temperatura de congelación. López, Anna F.; Pinzón, Magda I.; Gómez Ana M.; Rojas Andrés M. (LópezC2Colombia). 139

Caracterización física y química de frutos de kumquat (Fortunella Margarita [Lour.] Swing) y su composición fenólica. Razeto P., Claudia y Núñez K., Hugo. (NuñezC2Chile). 141

Propiedades fisicoquímicas y de rehidratación de leche en polvo y su relación con su microestructura. Perea, Maria de Jesús; Chanona, José Jorge; Alamilla, Liliana; Jiménez, Judith; Gutiérrez, Gustavo Fidel. (PereaC2México). 144

Caracterización de un producto lácteo fermentado "suero costeño" obtenido a partir de fermentación inducida con bacterias ácido lácticas. Simanca, Mónica María; Arteaga, Margarita Rosa; Pérez, Yulieth del Carmen; Soto, María Eugenia y Salcedo, Jairo Guadalupe. (SimancaC2Colombia). 147

Efecto del tratamiento con ultrasonido sobre las proteínas sarcoplasmicas y su relación con la capacidad de retención de agua y la textura del músculo de cajaro (*Phractocephalus hemiliopterus*). Belalcazar Velasco Felipe; Romero Nempeque Paola.; Rodríguez Peña Jenny; González Martínez Gerardo; Sotelo Díaz Indira. (SoteloC2Colombia). 150

Antioxidantes en aceite de chía (*Salvia hispanica L.*) obtenido mediante prensado. Ixtaina, Vanesa Y.; Martínez, Marcela; Maestri Damián; Spotorno, Viviana; Mateo, Carmen; Nolasco, Susana M.; Tomás Mabel C. (TomásC2Argentina). 153

Caracterización polínica y fisicoquímica de las mieles del estado de tabasco. Pascual González Josué; Pérez Flores Virginia; Alor Chávez Maricela; Kuri Víctor; Payro Emeterio y Juan Manuel Zaldívar Cruz. (ZaldivarC2México). 156

Efecto del solvente sobre los azúcares xilosa, glucosa y xilitol. Martínez Ernesto, Canhila Larisa, Alves Lourdes, Almeida e Silva, Joao B, Giulietti Marco.(AlmeidaC2Barzil). 158

Contenido de polifenoles y actividad antioxidante en bebidas e infusiones elaboradas en argentina. Álvarez Alejandro, Manfredi Paola, Jorrat Sergio y Genta María. (AlvarezC2Argentina). 161

Cuantificación de la actividad diastásica de malta y de jora sobre el almidón de morocho (*Zea mays*, variedad Morochón). Navas Miño, Gladys; Del Pozo, Freddy. Valencia, Alex. y Alvarado, Juan de Dios. (NavasC2Ecuador). 163

Propiedades físico-químicas de cinco frutas de la zona sur del ecuador para su industrialización. Salazar, Rómulo; Piedra, Diana y Escarabay, Patricia. (SalazarC2Ecuador). 166

Extracción de ficina del higo (*Ficus carica L*) y evaluación de la actividad enzimática. Alvarado Ruiz, Susana; Rojas Vélez, Vannesa; Toledo Vargas, Juan José. (ToledoC2Ecuador). 170

Caracterización físico-química del fruto de tuna. Aguirre, Andrea; Godoy, Maria Elena; Torres, María Paulina; Reyes, Jorge Felipe. (TorresC2Ecuador). 173

Estudio de las interacciones químicas entre una matriz gelificante de alginato de sodio y aceite esencial de orégano para la formación de una película biodegradable. Arias-Cruzado E.Y., Torres-Bojórquez A.E., Villaseñor-Ortega, F., Luna-Barcenas G. y Pérez-Pérez C. (AriasC2México). 176

Determinación de la relación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en extractos de orégano mexicano (*Lippia spp.*) seco y fresco. Arroyo, Izlia Jazheel; Hernandez, Haydee Yazmín; Cruz, Maria Teresa. (ArroyoC2México). 179

Caracterización de almidón acetilado de plátano con alto grado de sustitución. Guerra-Della Valle Denisse, Rivas-González Mayra, González-Soto Rosalía A, Solorza-Feria Javier, Bello-Pérez Luís A. (BelloC2México). 180

Caracterización molecular de amilosas obtenidas de diferentes fuentes botánicas. Rodríguez-Ambriz Sandra L, Sánchez-Rivera Mirna M., Méndez-Montealvo Guadalupe y Bello-Pérez Luis A. (BelloC2México). 184

Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas de sub-productos del procesamiento de salmón. Almonacid Sergio M., Castillo Caludia, Abakarov Alik, Carevic Erica y Simpson Ricardo. (AlmonacidC2Chile). 186

C3. PROPIEDADES FUNCIONALES Y SENSORIALES

Determinación de compuestos bioactivos del aguaymanto (*Physalis peruviana, Linnaeus,* 1753) y de su conserva en almíbar maximizando la retención de ácido ascórbico. Encina Zelada, Christian Rene; Ureña Peralta, Milber y Repo de Carrasco, Ritva. (EncinaC3Perú). 188

Efeito da kapa-carragena na estrutura e qualidade de sorvetes adicionados de cálcio. Costa, Fabiano Freire; de Resende, Jaime Vilela; de Abreu, Luiz Ronaldo; Goff, H. Douglas; Silva, Paulo Henrique da Fonseca. (ResendeC3Brasil). 191

Efeito da adicao do calcio na estrutura e qualidade de sorvetes. Costa, Fabiano Freire; de Resende, Jaime Vilela; de Abreu, Luiz Ronaldo; Goff, H. Douglas; Silva, Paulo Henrique da Fonseca. (ResendeC3Brasil). 193

Síntesis del almidón octenilsuccinado de Phaseolus lunatus: efecto de la modificación sobre la composición química y propiedades funcionales. Segura-Campos, Maira; Chel-Guerrero, Luis; Betancur-Ancona, David. (BetancurC3México). 195

Efecto del pH en el tamaño de gota y carga superficial en nanoemulsiones de hidroxipropilmetilcelulosa preparadas con ultrasonido de alta intensidad. Camino Nerina A. y Ana M. R. Pilosof. (CaminoC3Argentina). 198

Influencia de hidroxipropilmetilcelulosas de diferente viscosidad en las propiedades reológicas y de textura de sistemas cárnicos. Carp, Dina J, Perez, Oscar E. y Pilosof, Ana M. R. (CarpC3Argentina). 201

Rheological properties of wheat flour dough with inulin. Laborde, L., Couri, S., Nogueira, I. R., Germani, R. (CouriC3Brazil). 204

Elaboración de un aderezo tipo salsa con goma de algarrobo (*Prosopis chilensis (Mol) Stuntz*). Escobar, Berta, Estévez, ana María, Vega, Susana y Sáenz, Carmen. (EscobarC3Chile). 206

Desarrollo de una bebida de soya adicionada de prebióticos. Chamorro Daniel, Figuerola Fernando, Estévez Ana Maria, Valladares Luis y Prieto Carmen. (FiguerolaC3Chile). 209

Efecto del calcio sobre la reología de emulsiones w/o/w preparadas a base de leche de soja. Márquez, Andrés L.; Wagner, Jorge R. (MárquezWagnerC3Argentina). 212

Relación entre la actividad interfacial y la distribución de tamaño de partículas del caseinoglicomacropéptido (gmp). Martínez, M. Julia; Pilosof, Ana M. R. (MartínezC3Argentina). 215

Relationship between interfacial and foaming properties of soy protein isolate and their hydrolysates with polysaccharides. Martínez, Karina D., Carrera Sánchez Cecilio Rodríguez Patino, Juan M and Pilosof, Ana M.R. (MartínezC3Argentina). 218

Viscoelasticidad de emulsiones aceite-agua elaboradas con mezclas de caseinato de sodio-gelana y su relación con la fracción volumen de aceite. Sosa- Herrera, María Guadalupe; Barrientos-García, María Mercedes; Rocandio-Pineda, Maritza y Martínez-Padilla, Laura Patricia. (MartínezC3México). 222

Bioactive substances in tropical fruits – an evaluation with tose and "activity guided" rp-hplc-fractionation. Marx Friedhelm, Burger-Rodrigues Roberta, Gordon André, Menelaos Papagiannopoulos. (MarxC3Alemania). 225

Whey proteins-hydroxypropylmethylcellulose systems: gelation and microstructure. Jara, Federico L.; Pérez, Oscar E.; Pilosof, Ana M. R. (PerezC3Argentina). 228

Efecto del tipo y concentración de proteína sobre el tamaño de partícula y grado de floculación en emulsiones aceite en agua. Palazolo, Gonzalo G.; Wagner, Jorge R. (WagnerC3Argentina). 231

Formulacao de néctar misto de acerola, goiaba e manga. Couto, Camila Nair Batista, Ramos Afonso Mora, Furuya Lilian Boson, Faraoni Aurélia Santos, Sousa Henrique Machado. (RamosC3Brazil). 234

Efeito dos tratamentos sobre as proteínas de concentrados protéicos de amaranto. Bejarano Luján, Motta E. M. P. Netto F. M. (BejaranoC3Brazil). 237

Proteína aislada de soya como sustituto de grasa de yogur bajo en grasa y su efecto en sus propiedades reológicas. Pérez-Lucio A., Aguirre-Mandujano, E. y Mejenes-Quijano A. (AguirreC3México). 240

Características fisicoquímicas del almidón de plátano modificado químicamente. Guerra-DellaValle D., Sánchez-Rivera M. M., Méndez-Montealvo G. y Bello-Pérez L. A. (BelloC3México). 243

Caracterización parcial de almidón de plátano oxidado. Sánchez-Rivera Mirna María; Méndez-Montealvo María Guadalupe; Núñez-Santiago, María del Carmen; Bello-Pérez, Luis Arturo. (BelloC3México). 246

C4. BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y MICROESTRUCTURA.

Microbial air-processing in a brazilian produce plant. Cruz, A.G.da; Cenci, S.A. and Maia, M.C.A. (CruzC4Brasil). 249

Efecto del recubrimiento con quitosano sobre el desarrollo de mohos y levaduras en naranjillas almacenadas. Almeida, Alba V.; Arancibia, Mirari Y. y Alvarado, Juan de Dios. (ArancibiaC4Ecuador). 251

Determinação da resistência térmica de Byssochlamys fulva produtor de patulina em suco clarificado de maçã. Sant´Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguer, P.R. (SantanaC4Brasil). 254

Uso de la técnica de PCR para confirmar la presencia de una levadura contaminante de vino. Martínez Fernández, Claudio. Ganga, Angélica y Contreras Castro, Ángela. (ContrerasC4Chile). 257

Radiação gama no controle de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em caupi. Freitas-Silva, O., Cunha, F.Q., Godoy, R.L.O., Alvarenga, S.R., Vaz, S.G, Lima, K.S.C. e Lima, A.L.S. (FreitasC4Brazil). 259

Aislamiento e identificación de bacterias patogénicas de productos cárnicos y marinos. Ramos Moya Milton Rubén. (RamosC4Ecuador). 261

Estudio del efecto de la reducción de la actividad de agua, pH y adición de ácidos orgánicos en el crecimiento de *Escherichia coli* en filetes de res almacenados a temperatura ambiente. Vásquez Grace Ing., Cornejo Zúñiga Fabiola M.Sc. (VásquezC4Ecuador). 264

Efecto del ácido láctico, bajas temperaturas y películas de diferente permeabilidad al oxígeno sobre la flora microbiana de carnes. Aplicación de modelos matemáticos. Coll Cárdenas, Fernanda; Giannuzzi, Leda; Zaritzky, Noemi. (ZaritzkyC4Argentina). 268

Evaluación de las principales características de los hongos filamentosos contaminantes de productos cárnicos fermentados. Galvalisi, U., S.Lupo y L.Bettucci. (GalvalisiC4Uruguay) 271

Aislamiento y cuantificación de Staphylococcus aureus coagulasa positivo en pulpa de cangrejo (*Ucides occidentalis*) ofertada en la localidad de tumbe. Guzmán Tripul, Víctor y Saly Rosas Solano, José Luis. (GuzmánC4Perú). 275

Studies the inhibition of the growth of *Escherichia coli* by lactic acid bacteria: Qourum sensing singnals involved. Aguliar Catalina, Klotz Bernadette. (AguilarC4Colombia). 277

Estudios cuantitativos extendidos de la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* por bacterias ácido lácticas. Aguliar Catalina, Vanegas Consuelo, Klotz Bernadette. (AguilarC4Colombia). 279

C5. NUTRICIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

Producción de sustancias blis (bacteriocin-like inhibitory substances) por bacterias ácido lácticas: una alternativa de biocontrol en la industria alimentaria. Aguliar Catalina, Klotz Bernadette. (AguilarC5Colombia). 282

Análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) en una línea de bebida en polvo tipo merengada. Mieres-Pitre, Alberto y Beatriz Ramos. (MieresC5Venezuela). 285

Proposición de un método para determinar la proteína de leche de vaca por medida de la gravedad específica. Alvarado, Juan de Dios y Pujos Al., Maritza Isabel. (PujosC5Ecuador). 288

Elaboración de una mermelada de mora azul (*Vaccinium corymbosum*) con chia (*Salvia hispanica*) rica en antioxidantes y fibra. Ramírez Martínez María de Lourdes; Beltrán Orozco María del Carmen; Teodoro Pineda Santiago, Ayala Camarillo Karla Cristal. (BeltránC5México). 291

Contenido de metales en infusiones de hierbas por absorción atómica. Jiménez-Vieyra, M. E., Zambrano-Zaragoza M. L., Naranjo-Martínez, A, Cabrera-Sierra R. (JiménezC5 México). 293

Extrudidos de harinas de maíz de alta calidad proteínica (*Zea mays L.*) y fríjol endurecido (*Phaseolus vulgaris L.*): Evaluación física y caracterización nutrimental. Ruiz-Ruiz, J.; Martínez-Ayala, A., González, R.; Betancur-Ancona, D.; Chel-Guerrero, L. (RuizC5México). 296

Potencial nutricional de tres accesiones de fríjol zaragoza (*Phaseolus lunatus*) y estimación de la digestibilidad proteica "in vitro". Duran Lengua Marlene, Montero Castillo Piedad, Vargas Zapata Carmiña, Coneo Rodríguez Rusbel, Marrugo Ligardo Yesid, Torregroza Fuentes Edilbert. (DuránC5Colombia). 299

Incorporación de pulido de arroz como fuente de compuestos bioactivos en el desarrollo de galletas. Samalvides, Helberth, Estévez, Ana Maria, Figuerola, Fernando Masson, Lilia y Núñez, Hugo. (EstévezC5Chile). 302

Aplicación del análisis quimiométrico acoplado a espectroscopia infrarroja ftir-hatr para la detección y cuantificación de adulteración de miel de abeja. Zúñiga De Loa Marlene, Gallardo Velázquez Tzayhrí, Osorio Revilla Guillermo. (GallardoC5México). 305

Características físicas y químicas de una pasta tipo noodle adicionada con almidón de plátano (*Musa paradisiaca L*). González-Soto Rosalía América, Espinosa-Solís Vicente, Berrios José De Jesús, y Bello-Pérez Luis Arturo. (GonzálezC5México). 308

Biodisponibilidad de hierro hemo en cerdos en crecimiento. González Guillermina, Sánchez Jonathan, Puga Rubén, Reyes Gybrán y Quintero Adrián. (GonzálezC5México). 311

Perfil nutricional de semillas de *Jatropha* curcas L. provenientes de Michoacán. Martínez Herrera Jorge, Lozano Silvia Evangelista y. Martínez Ayala Alma L. (MartínezC5México). 313

Valor nutricional de un pan dulce elaborado con harinas compuestas, enriquecido y fortificado según requerimientos de ingesta diaria venezolana, para grupo etario escolar. Ortiz, Maribel; Baragaño–Mosqueda, Mercedes y Pérez Elevina. (OrtizC5Venezuela). 315

Avaliação de agentes desinfetantes frente a Alicyclobacillus acidoterrestris DSM 2498. Pacheco Sanchez Cristiana de Paula, Tamega Júnior Wilson Pedro, Ferreira José Orlando, de Freitas Barbosa Marcos e Rodríguez de Massaguer Pilar. (PachecoC5Brazil). 318

Caracterización microbiológica y determinación de 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF) en leches comerciales colombianas. Rada-Mendoza, Maite del Pilar y Rojas Fernández, Sandra Patricia. (RadaC5Colombia). 321

Influência de taninos, fitatos e fibras na biodisponibilidade de ferro e zinco e no valor funcional de feijões (*Phaseolus vulgaris, L.*). Ramírez-Cárdenas, L., Leonel, A.J., Costa, N.M.B., Reis, F.P. (RamírezC5Brazil – Ecuador). 324

Incidencia de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en chuletas crudas de cerdo vendidas al detal en Venezuela. Ramos Ana; Hernández Andreína y Hurtado Ernesto. (RamosC5Venezuela). 327

Actividad antioxidante en néctar mixto de frutas tropicales. Sousa, Paulo Henrique Machado de; Ramos, Afonso Mota; Brito, Edy Sousa de; Maia, Geraldo Arraes; Pinheiro, Anália Maria; Abreu, Cyntia Rafaelle Amaral de. (RamosC5Brazil). 330

Estado fisicoquímico y microbiológico del pescado seco distribuido en periodos de temporada. Salamanca Grosso Guillermo; Osorio Tangarife. Mónica Patrícia; Machado Arguelles Indira Natalli. (SalamancaC5Colombia). 332

Valoración bromatológica, organoléptica, tecnológica y nutricional del gel de Ogpuntia subulata para incorporar en alimentos humanos. López Jesús, Zambrano John, Játiva Cumandá, Monserrath Mejía, Sofía Carrillo. (López5ecuador). 335

Evaluación del contenido de arsénico y cadmio en leguminosas, cereales y derivados utilizado en alimentación escolar región del maule, chile. Bastías, José Miguel; Carrasco, Teresa; Rice, Maria; Muñoz, Ociel. (BastiasC5Chile). 338

C6. EDUCACIÓN

Microbial air-processing in a brazilian produce plant. Cruz, A.G.da; Cenci, S.A. and Maia, M.C.A. (CruzC6Brazil). 340

Análisis de "sistema-alimento": Una visión sistémica en el diseño de procesos innovadores. Sotelo, I.; León, M.; González-Mariño, G. (SoletoC6Colombia). 342

Análisis de competitividad de banano, mango y piña ecuatorianos. Vanegas, David; Schwartz, Marco; Kern, Werther; Núñez, Hugo. (VanegasC6Chile). 344

Propuesta de una practica integrada de reología de alimentos. Tripaldi, Piercosimo; Velín, Tanya; Chialvo, Luís y Rojas, Cristian. (TripaldiC6Ecuador). 347

Contribución didáctica en el uso de herramientas de diseño experimental en la optimización de procesos mediante superficies de respuesta. Álvarez Laverde Héctor René, Salamanca Grosso Guillermo. (AlvarezSalamancaC6España). 350

Determination of β-lactam antibiotics in water using diffuse reflectance spectroscopy. Rodriguez Maecker Roman Nicolay and Kuss Heinz-Martin. (RodriguezC6Ecuador). 353

Utilización de Aplicaciones Informáticas en el Proceso de Interaprendizaje de Fundamentos de Ingeniería de Alimentos Amaluisa, M.; Salazar, J. (AmaluisaC6Ecuador) 356

EDITORIAL

Hemos empezado a vivir los inicios del Tercer Milenio y constituye por lo tanto un gran reto, ser parte de la *sociedad del conocimiento,* por que exige estar preparados para avanzar en los grandes cambios que ha significado el desarrollo de la información, la globalización en todas sus instancias y el avance continuo y sin retorno de la investigación científica y tecnológica.

Ante el avance arrollador de estos factores la Universidad definitivamente será el vínculo preponderante que con una nueva visión de futuro sea dinámica, investigadora, creadora y que sea capaz de producir transformaciones fundamentales para el desarrollo

Las Universidades y todos quienes hacen investigación no pueden quedar fuera del impacto social que significa una nueva sociedad globalizada con un reacomodo acelerado de los movimientos políticos, económicos y culturales y que por supuesto afecta a las organizaciones en su ámbito de formación educativa.

Por lo señalado la Universidad Ecuatoriana y su futuro dependerá de la capacidad de transformación, innovación y aporte a una sociedad tan cambiante y que debemos estar preparados para dar respuesta a los grandes desafíos de una época exigente como la que nos ha tocado vivir.

Por otro lado nuestro compromiso debe consistir en la vinculación estrecha y permanente con la colectividad, que permita impulsar procesos de desarrollo con la intervención protagónica de los sectores sociales, productivos, económicos e instituciones publicas y privadas, y que trabajando juntos impulsemos la construcción de un mundo diferente, con una visión compartida y con un liderazgo moral que pueda garantizar su accionar en todos los niveles.

Ante estos acontecimientos Iberoamérica debe tener propuestas claras para avanzar en los diversos campos del conocimiento y que alentador resulta para la humanidad la investigación y aplicación de nuevos conceptos para la tecnificación y desarrollo de innovadores procesos en el campo de la Ingeniería de Alimentos en todas sus especialidades y que empieza desde el mejoramiento de los suelos, y avanzan con la producción de alimentos y nuevas tecnologías para imprimir calidad al servicio del hombre.

En el Ecuador, la formación profesional para el procesamiento y producción de alimentos fue llevada al campo de la ingeniería por iniciativa de la Universidad Técnica de Ambato. Esta labor académica permitió hacer que la ciencia y la tecnología, como fundamentos de la ingeniería, contribuyan al mejoramiento de la producción industrial y la comercialización de alimentos en nuestro país.

La ingeniería en alimentos debe responder fundamentalmente a dos problemas de especial importancia. Por un lado realizar una producción en volúmenes suficientemente altos y con costos que permitan atender la demanda de la población en sus diferentes estratos diferenciados por distinta capacidad adquisitiva. En el caso de Ecuador la población crece con tasas relativamente elevadas; a esta realidad debe agregarse la desnutrición que al igual que otros países sub-desarrollados se mantienen en niveles altos.

El segundo problema es satisfacer las exigencias de un mercado dinámico caracterizado por la innovación. Continuamente aparecen nuevos productos, nuevas presentaciones, nuevos envases, etc. a lo que debe agregarse las innovaciones tecnológicas que se incorporan los procesos productivos y que no son percibidos por el consumidor. Esto constituye un reto para la industria alimentaría expuesta a la competencia de otros países en un mundo globalizado.

Este VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, por su Convocatoria y participación de diferentes personalidades de tantos países amigos incrementará a no dudarlo los vínculos suficientemente fuertes entre la sociedad y los procesos de investigación científica, análisis tecnológico y difusión del pensamiento creador.

Desde nuestra Universidad Técnica de Ambato pionera de la Ingeniería en Alimentos en el Ecuador se difundirá a no dudarlo a todos los confines del planeta el pensamiento creador de gente que considera que a través del conocimiento tendremos siempre un mundo mejor.

M. Sc. Ing. Luis Amoroso Mora
RECTOR UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

PRESENTACIÓN DE LAS PUBLICACIONES DE LOS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN ACEPTADOS EN EL SEXTO CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS.

Iberoamérica se destaca como una de las regiones o posiblemente como la región de mayor biodiversidad en el planeta y con numerosos casos de megadiversidad. Los alimentos son una parte extremadamente importante de esta megadiversidad y son un pilar para la generación de nuevas variedades y para la seguridad alimentaria futura. En otras palabras las posibilidades de producir nuevos y mejores alimentos es prácticamente infinita, pues siempre aparecerán o se desarrollarán nuevas variedades y genes con características propias. La Ingeniería de Alimentos está llamada para aceptar el reto de transformar, conservar, producir nuevos y mejores alimentos utilizando adecuadamente estos vastos recursos, no es posible pensar en cambios beneficiosos, tampoco en la industrialización de productos alimenticios, sin el aporte directo de los conocimientos y de las personas directamente relacionadas con esta actividad.

Sin duda una de las áreas del conocimiento de mayor desarrollo en el momento actual en el mundo, es la relacionada con los Alimentos. Políticas de Estado de muchos países y regiones, como es la Seguridad Alimentaria, son motivo de permanente preocupación y apoyo. En este marco la Ingeniería de Alimentos desempeña un rol protagónico.

Varios son los intentos realizados para definir lo que es la Ingeniería de Alimentos, sin embargo ninguna de ellas ha podido satisfacer a plenitud todo su ámbito de acción y proyecciones. Lo que si está claro es que conforme avanza el tiempo, las definiciones también se amplían y abarcan nuevos y más amplios sectores en los cuales su participación es extremadamente importante.

Al intentar relacionar lo indicado con una cadena alimentaria básica que incluya: la producción, la transformación, la comercialización y el consumo de alimentos; fácilmente se establece que la Ingeniería de Alimentos está vinculada con las cuatro fases indicadas de la cadena alimentaria. Hace relativamente pocos años se asociaba a esta profesión únicamente con la segunda fase, transformación de alimentos, especialmente con el cálculo, diseño, construcción e instalación de empresas y plantas industriales, en el momento actual todo cambia y la incidencia de la profesión es cada vez mayor.

En CIBIA VI se expresa este desarrollo y cambio constante a través de cuatro engranajes o ruedas dentadas, pensemos que siempre están girando y que al final se unen, pues los resultados que se obtengan al final en el consumo, retroalimentan a las investigaciones sobre producción y así sucesivamente.

En el primero de los engranajes está representada la fase de producción mediante varias frutas, es fácil reconocer que varios de los temas seleccionados para este Congreso en la parte de Ciencia de Alimentos, están directamente relacionados con la producción, así: Propiedades físicas y coeficientes de transferencia. Propiedades químicas y bioquímicas. Biología, Microbiología predictiva y microestructura. Modelado y simulación. Sin embargo se debe señalar que estos temas también son indispensables en toda la cadena alimentaria, pues proporcionan la información fundamental para la caracterización y mejor conocimiento de todos los alimentos, estén éstos en su estado original o procesados. Se destaca también la importancia que tienen las Ciencias Naturales: Física, Química y Biología en el estudio de los alimentos, por ello no es extraño que un elevado número de las contribuciones científicas traten estos temas, manteniendo como base a las Matemáticas con el sorprendente avance de las herramientas de computación.

La segunda rueda dentada simboliza la transformación en una planta procesadora. Es el sector de mayor incidencia actual de la Ingeniería de Alimentos y varios de los temas de CIBIA VI, en especial los de Tecnología y Procesos están estrechamente relacionados, así: Procesos para el diseño de alimentos. Procesos de separación mecánica, reología y transporte. Procesos con transferencia de calor, masa y combinados. Equipos y plantas industriales. Biotecnología de alimentos. Tecnologías emergentes y ambientales. Procesamiento de alimentos y de subproductos.

La tercera rueda dentada representa la siguiente fase de la cadena alimentaria, la comercialización, aparecen entonces las figuras de las frutas procesadas y envasadas. Nuevamente se pueden asociar varios temas de CIBIA VI que están directamente relacionados con esta fase, entre ellos: Tiempos de vida útil y procesos de deterioro. Películas biodegradables, envases y empaques. Almacenamiento y poscosecha.

El cuarto engranaje simboliza posiblemente la fase más importante de la cadena alimentaria, el consumo de manera primordial por los humanos, todos los esfuerzos que se realizan en Ingeniería de Alimentos deberán estar orientados hacia la conservación y mejor utilización de los alimentos con criterios de calidad, inocuidad y protección del medio ambiente. Que importantes son los trabajos relacionados con: Inovación tecnológica. Propiedades funcionales y sensoriales. Nutrición y control de calidad.

Se establece entonces la gran importancia que tiene la Ingeniería de Alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta su utilización final, es un hecho que en varias de las fases se constituye en un elemento esencial y con gran futuro. A manera de ejemplo no está lejano el día en que se conozca, modele y simule mediante computadoras, la transferencia de masa de las moléculas de hierro o de otros nutrientes a través de la membrana intestinal, como un aporte para entender y mejorar la utilización nutricional de los alimentos; estos resultados retroalimentan las fases anteriores para seleccionar productos, procesarlos disminuyendo pérdidas, comercializarlos en forma adecuada y aprovecharlos de la mejor manera. El ciclo se repetirá y continuará.

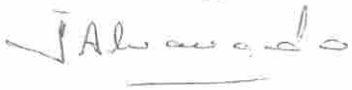
Más allá del enfoque de la cadena alimentaria, es para la Universidad Técnica de Ambato de primordial relevancia el tema de la Educación. Según la Misión Institucional de nuestra Universidad se intenta: Satisfacer las demandas científico-tecnológicas de la sociedad ecuatoriana en interacción dinámica con sus autores, formar profesionales líderes con pensamiento crítico, reflexivo, creativo, con conciencia social que contribuya al desarrollo científico, técnico, cultural y axiológico del país; desarrollar la investigación científica y tecnológica como un aporte en la solución de los problemas; producir bienes y prestar servicios, para contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de los ecuatorianos e impulsar el desarrollo sustentable del país. CIBIA VI cumple con los propósitos de la Universidad en lo relacionado con los Alimentos.

En este amplio marco se presenta el esfuerzo de la publicación de los trabajos de investigación aceptados para su presentación en el Sexto Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, oportunidad única para Ecuador y Ambato de participar en el avance de esta rama del conocimiento con los más destacados científicos de Iberoamérica, Estados Unidos de América y de otros países del mundo. La Revista de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos: ALIMENTOS: CIENCIA E INGENIERÍA, Volumen 16 correspondiente al año 2007, sirve como medio adecuado para la difusión de los trabajos como una Memoria del esfuerzo investigativo realizado en México que es el país con el mayor número de artículos de investigación presentados, seguido de Colombia y Ecuador. Otros países que enviaron sus contribuciones fueron: Brasil, Argentina, Chile, Perú, Venezuela, España, Uruguay, Costa Rica, USA, Alemania, Italia y Suecia; a todos muchas gracias por el esfuerzo y la confianza depositada en el Comité Organizador de CIBIA VI, en la ciudad de Ambato y en general en Ecuador.

Por la elevada cantidad de contribuciones, trescientos cincuenta, fue necesario ordenarlas y distribuirlas en distintos Números de la Revista, destinados de manera específica a trabajos que según el Temario corresponden a Procesos, Ciencia y Tecnología.

Quienes hacemos la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato-Ecuador, creemos firmemente que además de los medios electrónicos de comunicación, los documentos escritos constituyen un mejor testimonio de la historia de acontecimientos relevantes. Por ello es grato someter a consideración de Iberoamérica y del mundo el estado del conocimiento y esfuerzo investigativo que se realiza especialmente en nuestros países en el campo de la Ingeniería de Alimentos, sus bases científicas y aplicaciones tecnológicas.

Ecuador. Ambato. Noviembre del 2007.



Presidente CIBIA VI

GENERACIÓN DE VALOR AGREGADO DE FRUTAS TROPICALES SUBUTILIZADAS (PRODUCING ADDING VALUE FROM UNDER UTILIZED TROPICAL FRUITS CROPS)

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL REFINO Y DE LA CENTRIFUGACIÓN EN COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL *AÇAÍ*

Ana Paula G. Gruz[1], Denise N. M. Palácio[2], Lourdes M.C. Cabral[3], Carmen Donangelo[1], Virgínia M. Matta[3]

[1]Instituto de Química/UFRJ – Cidade Universitária, Bl. A, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, [2]Escola de Química/UFRJ - Cidade Universitária, Bl. E, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, [3]Embrapa Agroindústria de Alimentos – Av. das Américas, 29501, 23020-470 Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

Palabras-clave: *Euterpe oleracea*, procesamiento, frutas de Amazonia, capacidad antioxidante

RESUMEN

El *açaí*, la bebida púrpura oscura con textura de crema, aspecto grasoso y sabor característico, obtenida por extracción de los frutos del *açaizeiro*, es muy consumida en todas las regiones de Brasil, a pesar de tener mercados consumidores y finalidades de uso muy distintos en función de la región. La pulpa integral de *açaí* presenta elevados tenores de compuestos fenólicos totales (529 mg equivalente ác. gálico/100g), antocianinas totales (96 mg cianidina 3-glucosideo/100g) y, por consecuencia, elevada capacidad antioxidante (36 µmol Trolox/g). En este estudio, se evaluaron los procesos de refino en despulpadora y centrifugación como pré-tratamientos para una posterior clarificación del producto en membranas de microfiltración y el efecto de los mismos sobre los compuestos bioactivos del *açaí*. El refino redujo en 1% los sólidos totales, mientras que la centrifugación los disminuyó en 73%. Las pérdidas de los compuestos bioactivos fueron siempre mayores con la centrifugación que con el refino. Los valores promédio de compuestos fenólicos totales en la pulpa despulpada fueron de 488 mg ác. gálico/100g mientras que los de la centrifugada fueron de 347 mg ác. gálico/100g. En la capacidad antioxidante se verificó la misma tendencia, ocurriendo una reducción de 7% y de 38% para las pulpas despulpada y centrifugada, respectivamente.

INTRODUCCION

Euterpe oleracea Mart., el *açaizeiro*, es una palmera nativa de Amazonia con ocurrencia principal en el estuario del río Amazonas en el estado de Pará (Brasil). De esta palmera se utiliza el tallo para extracción del palmito y el fruto, el *açaí*, para obtención de la pulpa. Los frutos son bayas púrpura oscuras que se presentan en racimo y la pulpa comestible corresponde solo a 15% del peso total. Para el consumo del *açaí*, los frutos sufren un ablandamiento en agua y una extracción obteniéndose una bebida púrpura oscura con textura de crema, aspecto grasoso y sabor característico. La bebida es conocida en Brasil como vino de *açaí* o *açaí*. Es un producto muy consumido por la población local y desde la década de 1990 viene ganando nuevos mercados, incluso en el exterior, sobretodo por su valor energético (Rogez, 2000). El *açaí* aún contiene elevados tenores de antocianinas y de compuestos fenólicos.

Diversos estudios han mostrado el efecto protector contra los procesos oxidativos por parte de algunos compuestos con capacidad antioxidante presentes en frutas, vegetales y bebidas a base de estos (Pellegrini *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2005) y una correlación inversa entre la ingestión de estos alimentos y la ocurrencia de enfermedades crónico-degenerativas asociadas al estrés oxidativo (Beal, 1995; Huang *et al.*, 2005; Sobobrattee, 2005).

Los compuestos fenólicos o polifenoles son los más numerosos y omnipresentes metabolitos secundarios en las plantas pudiendo presentarse como moléculas sencillas o complejas, siendo los flavonoides el subgrupo más común y más abundante (Shahidi & Nazck, 1995; Shahidi & Nazck, 2004).

Pozo-Insfran (2004), en su trabajo con pulpa congelada comercial, identificó como las principales antocianinas del *açaí*, la cianidina 3-glucosídeo y la perlagonidina 3-glucosídeo.

Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos tienen gran capacidad de captar los radicales libres responsables por los daños causados por el estrés oxidativo, atribuyéndoseles los efectos biológicos en la prevención de enfermedades. Incluyense en las propriedades biológicas de los fenoles las acciones antimicrobiana, anticancerígena, antitrombótica, antinflamatória, antialérgica y vasodilatadora (Soobrattee, 2005; Ishige *et al.*, 2001).

Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tratamientos como la centrifugación y el refino sobre las principales características del *açaí*, con particular atención en sus compuestos bioactivos, visando su posterior utilización para obtención de jugo microfiltrado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

La materia-prima utilizada fue la pulpa de *açaí* grueso (Brasil, 2000), adquirida directamente de una agroindustria, localizada en Belém, Brasil.

Metodología

El procedimiento experimental consistió en someter la pulpa de *açaí* a dos diferentes procesos como pré-tratamientos para la clarificación en membranas de microfiltración. El refino fue realizado en una despulpadora de cepillo y poros de 0,6 mm, de ITAMETAL, modelo Bonina 0,25 df. Para la centrifugación se utilizó una centrifuga de cestos Internacional Equipment Company, modelo SIZE 2, a una rotación de 406g. En los dos tratamientos los procesos fueron conducidos en lotes de 19 kg. Fueron sacadas muestra de las pulpas antes y después de los tratamientos para evaluación de los parámetros de pH, acidez, sólidos solubles, sólidos totales (AOAC, 2000), sólidos en suspensión (contenido de pulpa) y de los compuestos bioactivos, antocianinas totales y fenólicos totales, así como de la capacidad antioxidante.

Los compuestos fenólicos totales fueron determinados por el método colorimétrico propuesto por Singleton & Rossi (1965) y modificado por Georgé *et al.* (2005), que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteau, compuesto de una mezcla de ácidos

fosfotúngstico y fosfomolíbdico. En medio alcalino estos se reducen al oxidar los compuestos fenólicos originando óxidos que tienen coloración azul y son posibles de mensuración por lectura en espectrofotómetro a 765nm. Por medio de una curva de calibración de ácido gálico es posible cuantificar los compuestos fenólicos totales que son expresados en equivalentes de ácido gálico.

Las antocianinas totales fueron cuantificadas utilizándose el método propuesto por Fuleki & Francis (1968), que se basa en la extracción de los pigmentos y cuantificación de los mismos por espectrofotometria. La solución de extracción utilizada fue una mezcla de alcohol etílico 95% y ácido clorídrico 1,5N en la proporción 85:15. Los extractos tuvieron la absorbancia medida a 535nm y los resultados fueron calculados de acuerdo con la ecuación 1. Los valores se expresan en equivalentes de cianidina 3-glicosídeo.

$$\text{Antocianinas Totales} = \text{Abs} \times \text{FD} \times \text{PM} \times \varepsilon_{\text{cianidina 3-gluc}} \quad (1)$$

Para la determinación de la capacidad antioxidante, las muestras fueron previamente sometidas a una dupla extracción con metanol 50% y acetona 70% seguido de una centrifugación (Rufino *et al.*, 2007). La metodología para determinación de la capacidad antioxidante se basó en la pérdida de absorbancia de la solución del radical $ABTS^{\cdot}$ en presencia de compuestos con habilidad de transferir electrones para el sustrato volviéndole a la forma no radicalar que no absorbe luz en la longitud de onda de 734 nm (Pellegrini *et al.*, 1999). Los valores fueron expresos en equivalentes de Trolox (análogo de la Vitamina E) por g de pulpa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rendimientos en pulpa de los pre-tratamientos utilizados fueron de 84% para el refino y de 68% para la centrifugación.

Los parámetros físico-químicos evaluados en la pulpa integral, la despulpada y la centrifugada son presentados en la Tabla 1.

Se puede observar que, de forma general, la centrifugación provocó variaciones más relevantes en esos parámetros que el refino, exactamente por el hecho de remover una mayor cantidad de sólidos insolubles.

En el despulpamiento, 8% de los sólidos totales presentes en la pulpa integral fueron removidos. En la centrifugación esta remoción fue de 73%.

El contenido de pulpa se alteró poco con el despulpamiento, diminuyendo apenas en 15%, mientras que con la centrifugación este parámetro disminuyó 89%.

Los sólidos solubles, la acidez titulável y el pH, por su vez, prácticamente no fueron alterados con ninguno de los procesos.

Tabla 1. Características físico-químicas del *açaí* integral, despulpado y centrifugado

Parâmetro / *Açaí*	Integral	Despulpado	Centrifugado
Sólidos totales (%)	14,6 ± 1,0	13,4 ± 0,4	3,9 ± 0,1
Contenido en pulpa (%)	52,3 ± 1,0	48,0 ± 0,7	5,3 ± 1,0
Sólidos solubles (°Brix)	3,0 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,5 ± 0,1
Acidez (g/100g)[1]	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
pH	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0

[1]expreso en acido málico equivalente. Los valores representan el promedio de análisis en triplicado.

Los valores promedios de las concentraciones de compuestos bioactivos analizados de las muestras de *açaí* integral, despulpado y centrifugado están presentados en la Tabla 2. Entre los compuestos bioactivos presentes en el *açaí* se destacan los compuestos fenólicos y, en especial, los pigmentos antocianicos, motivo por lo cual estos fueron los compuestos analizados.

Tabla 2. Compuestos bioactivos del *açaí* integral, despulpado y centrifugado

Compuesto/*Açaí*	Integral	Despulpado	Centrifugado
Fenólicos totales (mg/100g)[1]	523,8 ± 9,5	488,2 ± 23,9	347,6 ± 11,9
Antocianinas totales (mg/100g)[2]	96,2 ± 1,5	82,4 ± 2,9	45,7 ± 0,7

[1,2]expresos em ácido gálico; cianidina-3-glucosídeo equivalente. Los valores representan el promédio de análisis en triplicado.

En el *açaí* despulpado no se verificó una gran pérdida de los compuestos bioactivos, polifenoles y antocianinas, entretanto la centrifugación tuvo fuerte influencia en la disminución de esos compuestos, lo que se puede atribuir a la reducción de los sólidos insolubles.

La disminución de las antocianinas en el *açaí* despulpado fue de 14%, pero en la centrifugación se observó una reducción de 53% en los pigmentos antocianicos.

A pesar de esta reducción, el contenido de antocianinas totales de la pulpa centrifugada, 45 mg/100g, es del mismo orden de magnitud que el determinado por Rogez (2000), 44 mg/100g para la pulpa de *açaí* medio, que es la que contiene entre 11 y 14% de sólidos totales (Brasil, 2000).

Pozo-Insfran (2004), en su trabajo con pulpa congelada comercial cuantificó las antocianinas, teniendo la cianidina 3-glucosídeo un tenor de 1040 mg/L pulpa y la perlagonidina 3-glucosídeo 74,4 mg/L pulpa.

Kuskoski *et al.* (2006) evaluaron diversas pulpas comerciales y verificaron que la pulpa de *açaí* contenía 23 mg/100g de antocianinas, también expresa en equivalente de cianidina 3-glucosídeo

Tanto para el centrifugado como para el despulpado, las pérdidas fueron mucho más acentuadas en los pigmentos antocianicos que en los compuestos fenólicos totales, posiblemente por los primeros estar más adheridos a la fracción insoluble del fruto.

En el refino, la reducción de los polifenoles fue de apenas 7% y en la centrifugación fue de 33%.

El principal polifenol identificado por Pozo-Insfran *et al.* (2004) en el *açaí* fue la epicatequina, además de los ácidos fenólicos: ferrúlico, *p*-hidroxi benzóico, gálico y protocateoquínico.

En el estudio de Kuskoski *et al.* (2006), que analizaron las pulpas comerciales de distintos frutos tropicales, fue determinado 137 mg/100g de fenólicos totales, expresados en ácido gálico.

En la Figura 1 encuentranse los resultados de la capacidad antioxidante, en equivalentes de Trolox, de las tres muestras estudiadas, el *açaí* integral, despulpado y centrifugado.

Es posible observar que la pulpa integral y la despulpada presentaron valores similares mientras que la pulpa centrifugada presentó una menor capacidad antioxidante, lo que es esperado, considerándose que los compuestos bioactivos, que confieren la capacidad antioxidante también fueron reducidos con la centrifugación.

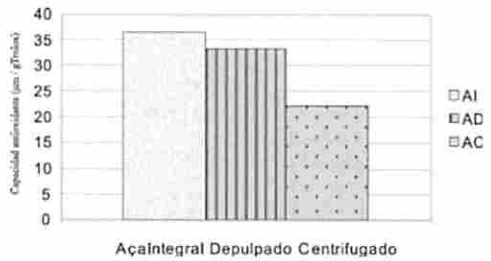


Figura 1. Capacidad antioxidante determinada pela metodología del ABTS, expresada en equivalentes de Trolox por g de pulpa. AI – *açaí* integral; AD – *açaí* despulpado; AC – *açaí* centrifugado

La capacidad antioxidante fue medida por el método que utiliza el $ABTS^{+}$ como radical y los resultados obtenidos fueron 36; 33, y 22 µmol equivalente de Trolox/g de la muestra para el *açaí* integral, despulpado y centrifugado, respectivamente.
Estos valores están en acuerdo con lo esperado, pues la capacidad antioxidante está relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos (Wong *et al.*, 2006). Las pérdidas de capacidad antioxidante de los productos despulpado y centrifugado estuvieron en el mismo rango que las pérdidas de los compuestos fenólicos totales, siendo de 7% y 38%, respectivamente. Wada *et al.* (2006) estudiaron colorantes naturales comerciales cuanto a su capacidad antioxidante y verificaron que la cianidina fue más potente que la quercetina. Otro factor que influencia la capacidad antioxidante es el tipo de compuesto bioactivo pues la estrutura química puede facilitar el secuestro y limpieza de los radicales libres.

CONCLUSIONES

En las condiciones estudiadas, el proceso de despulpamiento fue el mejor para la preservación de los compuestos bioactivos del *açaí* pues las pérdidas fueron de 7% para los compuestos fenólicos totales y 14% para las antocianinas. Por otro lado, el centrifugado se mostró potencialmente el más adecuado para la obtención de jugo clarificado a través de membranas de microfiltración, una vez que la reducción de los sólidos totales con este proceso fue de 73%.

AGRADECIMIENTO

Proyecto PAVUC FP6-2003-Inco-Dev2

REFERENCIAS

Association of Official Analytical Chemists. 2000. "Official Methods of Analysis of the AOAC International". 17th Ed. Washington: AOAC.

Beal, M. F. Aging, Energy and Oxidative Stress In Neurodegenerative Diseases. Ann. Neurol., v.38, p. 357 – 366, 1995.

Brasil, Ministério da Agricultura e Pecuária. "Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000". Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

Fuleki, T.; Francis, F. J. 1968. "Quantitative Methods for Anthocyanins. 1. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries". Journal of Food Science, 33, 72-77.

Georgé, S., Brat, P., Amiot, M. J. 2005. "Rapid Determination Of Poliphenols And Vitamain C In Plant-Derived Products." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1370-1373

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. 2005 "The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assay: Review." J. Agric. Food Chem., v.53, p.1841-1856.

Ishige ,K. Schubert, D., Sagara, Y. 2001. "Flavonoids protect neuronal cells fron oxidative stress by thre distinct mechanisms." Free Rad. Biol. Med. v. 30, p.433 – 446.

Kuskoski, E. M., Ausero, A. G. Morales, M. T. 2006. "Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas". Ciência Rural, v. 36, n. 4, p. 1283 – 1287.

Moreira, D. P.; Monteiro, M. C.; Ribeiro-Alves, M.; Donangelo, C. M. e Trugo, L. C.2005. "Contribution of Chlorogenic Acids to the Iron-Reducin Activity of Coffee Beverages." J. Agric. Food Chem.,v.53, p.1399-1402.

Nogueira, O. L.; Figueirêdo, F. J. C.; Müller, A. A. 2005 (Ed.) "Açaí". Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 137 p. (Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção, 4).

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999 "Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay." Free Radical Biology & Medicine, vol. 26, n.9/10, p. 1231–1237.

Pozo-Insfran, D.; Brenes, C. H. e Talcott, S. T. 2004 "Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)." Journal of Food Chem. , v. 52, p. 1539-1545.

Rogez, H. 2000 "Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação"., Belém: EDUFPA, 288p.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. 2007. "Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total mm Frutas pela Captura do Radical $Abts^{+}$. Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical)."

Shahidi, F. E.; Naczk, M. 1995 "Food Phenolics Sources, Chemistry, Effects.", Applications. Lancaster, Pensylvania. Technomic Publishing Company Co., 331 p.

Shahidi, F. E.; Nazck, M. 2004 "Extraction and Analysis of Phenolics. Food Review." Journal of Chromatography, v.1054, p.95-111.

Singleton, V. L. e Rossi, J. A. 1965 "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." Am. J. Enol. Vitic., v.16, p.144-168.

Soobrattee, M. A.; Neergheheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O. I., Bahorun, T. 2005. "Phenolics as potencial antioxidant theraputic agents: Mechanism and actions." Mutation Resarch, v. 579, p. 200-213.

Wada, M. Kido, H., Ohyama, K., Ichibangase, T., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, M. N., Kuroda, N. and Nakashima, K. 2007 "Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxyigen species: Evaluation of grape seeds, monascus, gardenia and red radish extracts as multifunctional food aditivies." Food Chemistry, v. 100, p. 885 – 894.

Wong, S. P.; Leong, L. P.; Koh, J. H. W. 2006 "Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants" Food Chemistry v.99, p. 775–783.

BIOACTIVE SUBSTANCES IN TROPICAL FRUITS – AN EVALUATION WITH TOSC AND "ACTIVITY GUIDED" RP-HPLC-FRACTIONATION

Friedhelm Marx[1], Roberta Burger-Rodrigues, André Gordon, Menelaos Papagiannopoulos
Institute of Nutrition and Food Sciences – University of Bonn – Germany
[1]To whom correspondence should be addressed, E-mail: f.marx@uni-bonn.de

Key words: Functional properties of fruits, bioactive substances, TOSC, antioxidant capacity

SUMMARY

In order to develop products with added value out of underutilized tropical fruits açaí, blackberry, camu-camu, cashew apple and tree tomato have been investigated. Firstly, the overall antioxidant capacity of each fruit was determined with the TOSC assay. Furthermore some particular responsible secondary plant compounds could be identified by "activity guided" HPLC separation and HPLC-MS^n analyses. By far, camu-camu turned out to be the fruit with the highest antioxidant potential. This could be explained to a certain extend by the extremely high ascorbic acid content of up to 3000 mg / 100 g fresh weight and small amounts of anthocyanins. But also blackberries and açai with low ascorbic acid content showed very respectable results mainly due to anthocyanins and probably other yet unidentified substances.

INTRODUCTION

A project aided by the European Union centres the development of products with added values for the human health out of so far underutilized fruits from Latin America. In a cooperation of several European and Latin American research institutions, in total nine promising topical fruits have been investigated on their nutritional and functional potential. On the other hand economic aspects were taken into account for this project as well by developing good agricultural practices and a sustainable and innovative processing infrastructure close to the production site of these fruits which up to now all have been cultivated in rural regions with low incomes. Chosen fruits were blackberries (*Rubus ssp.*), tree tomato (*Cyphomandra betacea*), red pitahaya (*Hylocereus purpusii*), berrycactus (*Myrtillocactus schenkii*), açaí (*Euterpe oleracea*), cashew apple (*Anacardium occidentale*), narranjilla (*Solanum quitoense*), palm peach fruits (*Bactris gasipaes*) and camu-camu (*Myrciaria dubia*) of which five have been investigated by us in detail.

In recent years, fruits have received particular attention because they contain high amounts of antioxidants such as polyphenols, vitamin C, vitamin E, β-carotene and lycopene [1]. These kinds of natural antioxidants are potential scavengers of reactive oxygen species (ROS) that are continuously formed in several metabolic pathways of human metabolism [2]. ROS can cause oxidative damage to macromolecules as DNA, proteins, and lipids. Beside body's own ROS scavenging antioxidants, protective actions may be assisted by antioxidants from food especially when the body's equilibrium between oxidants and antioxidants is disturbed. Since the possible role of food antioxidants in those metabolic reactions is far from being understood completely, in vitro studies on the individual contributions of food ingredients to the overall antioxidant capacity are performed. Following in vivo studies may be helpful to reveal the rate of absorption and the influence of food antioxidants on prevention of oxidative damages.

The total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay is an in vitro method to measure the antioxidant capacity. Originally it was introduced for environmental related studies on marine organisms [3] but meanwhile the TOSC assay can also be applied to assess the antioxidant power of water soluble food compounds. It is based on the inhibition of radical-depending formation of ethylene from α-keto-γ-methiol butyric acid (KMBA) by antioxidants and permits to study the antioxidant capacity of samples against three different ROS with physiological relevance – peroxyl radicals, hydroxyl radicals and peroxynitrite.

For fruits containing high amounts of antioxidant micronutrients, an appropriate in vitro antioxidant activity could have been shown [4]. Following the measuring of the in vitro antioxidant capacity of a fruit, an oral application of a corresponding fruit juice on healthy subjects might be useful in order to show whether or not this potential can be exerted in vivo. The so called comet assay based on the method of Singh et al [5] enables to ascertain the bioavailability of plant compounds by assessing endogenous oxidative damage in lymphocyte DNA.

MATERIALS AND METHODS

TOSC Assay

TOSC assay conditions are described in detail in [6]. Briefly, samples and buffered solutions of KMBA are mixed and one of the ROS is formed. Peroxyl radicals are generated by the thermal homolysis of 2, 2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dichloride. Hydroxyl radicals are formed during the iron plus ascorbate driven Fenton reaction. Peroxynitrite is produced by the decomposition of 3-morpholinosyndnonimine-N-ethyl-carbamide. Due to the presence of the ROS, the KMBA molecules are decomposed by liberation of ethylene gas. Presence of antioxidants in the samples decreases the ethylene formation. The time course of ethylene formation is monitored during one hour by repeated gas chromatographic analyses of 100 µL aliquots from the headspace in the sample vials and compared to the ethylene formation in control vials filled with the same amount of water instead of the sample.

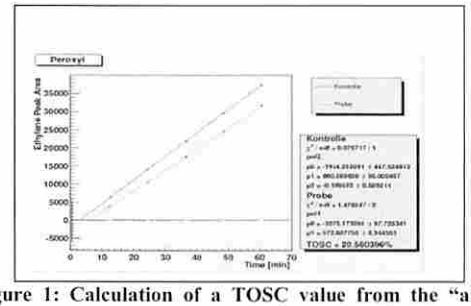


Figure 1: Calculation of a TOSC value from the "areas under the curve" resulting in a TOSC value of 21 %.

For the estimation of the TOSC values the kinetic curves that best fit the experimental GC data over a period of 60 min have to be calculated. Then the corresponding areas under the time curves (AUC) for samples and controls are determined. TOSC values result from the relation between the area of the uninhibited control and the area of the sample.

A TOSC value of 0 % characterizes a sample without any antioxidant property. A solution that suppresses the ethylene formation completely achieves a TOSC value of 100 %. An example for TOSC value calculation is shown in Fig. 1.

"Activity guided" RP-HPLC-Fractionation

In order to clarify the question which substances of a sample do have an antioxidant potential, the water soluble sample compounds are separated with reversed phase HPLC by

collecting the eluent in several fractions. A gradient separation permits the detection of substances with different polarities.
The liquid chromatographic system consisted of a pump model 2250 and a central processor model 1152 (Bischoff, Leonberg, Germany), a Degasys 1310 degasser (Uniflows, Tokyo, Japan), a detector LC-55 B (Perkin-Elmer, Waltham, USA) and a column Synergi 4u MAX-RP 80-A (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The system was controlled by EZChrom Elite v2.8 (Scientific Software, Pleasonton, USA). Solvents for the gradient elution program were 2 % formic acid in high-purity water (mobile phase A) and 2 % formic acid in acetonitrile (ACN) (mobile phase B). The gradient separation was conducted with a linear program starting either with 0 % B to 40% B after 25 min (Fractionation 1) or starting with 0 % B to 25 % B after 40 min (Fractionation 2) depending on the amount of detected substances. Before starting the program the column was equilibrated with A for 15 min to initial conditions. After separation the column was flushed for 20 min with B. The flow rate was 0.8 mL / min. The chromatogram was recorded at a wave length of 260 nm. The injection slope had a volume of 20 µL.
Following the fractionation the antioxidant capacity of the respective fraction was verified. An example is given in Fig. 2.

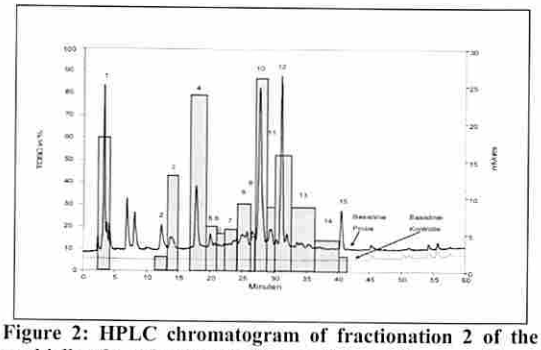


Figure 2: HPLC chromatogram of fractionation 2 of the seed jelly of a red tree tomato recorded at 260 nm combined with particular experimental TOSC values against peroxyl radicals.

Identification of the antioxidant compounds
Identification of polyphenolic antioxidant compounds is performed by HPLC/DAD-MS^n. The liquid chromatograph was a summit system consisting of a Degasys DG-1310 degasser (Uniflow), a P-580A HPG pump, an ASI-100 T automated sample injector, a STH-585 column oven, and an UVD-340S UV-vis detector equipped with a capillary cell (Dionex, Germering, Germany). The system was controlled using the Chromeleon software package v6.7 SP2 (Dionex). The analytical column (Aqua 3 µm C 18, 150 mm, 2 mm i.d., Phenomenex) was kept at 25°C. 5 % acetonitrile and 0.2 % trifluoracetic acid (TFA) in high purity water (mobile Phase C) and 45 % ACN with 0.2 % TFA in high purity water (mobile Phase D) were used as solvents with a flow rate of 0.2 mL / min. A gradient elution program was used starting at 5 % C with a linear gradient of 0.5 % D/ min. up to 30 % D after 60 min. The column was washed with 100 % D for 10 min and reequilibrated for 15 min with the initial conditions. 10 µL of each sample was injected for analysis and the chromatogram was monitored at 200 – 595 nm with a wavelength of 520 nm for quantification.
An LCQ classic ion-trap mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray interface (ESI) and metal needle kit was coupled to the HPLC and controlled with Xcalibur software v1.2 (Thermo Finnigan, Egelsbach, Germany). A flow of 100 µL / min methanol delivered by a System Gold programmable solvent module 116 (Beckmann, Unterschleissheim, Germany) was added through a T-union before the HPLC eluent entered the ion source to enhance ionization of very polar compounds. The settings for the MS were as follows: source voltage, 4.5 kV (negative mode); sheath gas flow, 60; auxiliary gas flow, 0; capillary voltage, -45 V; capillary temperature, 200 °C; first octapole offset, +3.0 V; interoctapole lens voltage, +22.0 V; second octapole offset, +7.0 V; ion trap DC offset, +10.2 V. [7].

RESULTS

Açaí
Açaí is one of most common naturally occurring palm species in the eastern Amazonian estuary floodplains. Their spherical grape-sized fruits usually ripen to a dark purple colour due to a high content of anthocyanins [8]. TOSC assays with the açaí fruit pulp approve the assumption of a high antioxidant capacity at least against peroxyl radicals and peroxynitrite. As the TOSC assay covers only water soluble antioxidants, mainly vitamin C and polyphenols are to be considered responsible for the antioxidant capacity of the sample. Because of the negligible vitamin C content in açai the main attention has to be drawn on the polyphenols. The HPLC-MS analysis proves the presence of two different anthocyanins in appreciable amounts and some others in minor concentrations. The two main anthocyanins were identified as cyanidine-3-glycoside and cyanidine-3-rutinoside. The sample with the highest anthocyanin content also had the highest TOSC values. However, an estimation of the contributions of the two main anthocyanins to the overall antioxidant capacity showed a far higher antioxidant capacity against peroxyl radicals and peroxynitrite for the naturally açaí samples in comparison with the pure anthocyanin standard solution.

Camu-camu
Camu-camu grows naturally in the Amazonian basin and has the highest content of natural vitamin C known in a fruit (up to 3000 mg/100g). TOSC assays against peroxyl and hydroxyl radicals as well as peroxynitrite indicate outstanding antioxidant features of the camu-camu fruit as can be seen in Fig. 3-5. To evaluate the contribution of ascorbic acid to the overall antioxidant capacity of camu-camu the juice was diluted to achieve the same ascorbic acid concentration that was used for a standard ascorbic acid solution (1.66 mg/100mL) [4]. The resulting TOSC of the camu-camu juice was 68 % compared to 49 % of the ascorbic acid standard. Consequently, ascorbic acid contributes to a major part to the antioxidant capacity. Due to a relatively low overall anthocyanin content of about 54 mg/100 g [9], the difference in the TOSC values indicates that other compounds or synergistic effects must be involved.

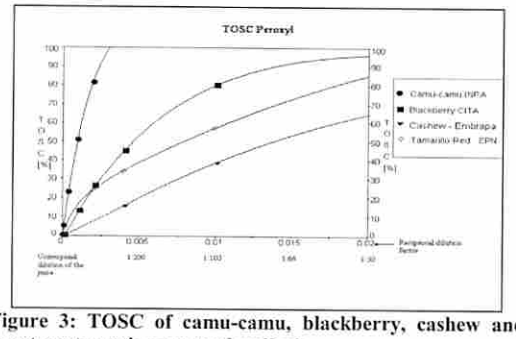


Figure 3: TOSC of camu-camu, blackberry, cashew and tree tomato against peroxyl radicals.

Blackberry
In Latin America blackberries are commercially cultivated from the southern highlands of Mexico to the northern Andes and contain reasonable amounts of antioxidants like ascorbic acid and polyphenols among others anthocyanins [10]. Mentionable TOSC values were found against all determined ROS. Noteworthy is the antioxidant potential against hydroxyl radicals (Fig. 5). Fruits from different origins in Latin America and Germany were studied and showed a similar behaviour whereas TOSC values for samples from Latin America were somewhat higher than that from Germany.

The cashew tree originates from the north east of Brazil, a tropic region with pronounced droughts. It is cultivated on a big scale for the production of cashew nuts that are located within the bean-shaped fruit. The peduncle is thickened to a juicy and due to high amounts of glucose and fructose relatively sweet yellow to reddish pseudo fruit, representing about 90% of the complete "apple". Up to now only 2 % of these pseudo fruits are further processed although they are rich in vitamin C (ca. 200 mg/ 100 mL juice) and have an exotic aroma [11]. A juice of the cashew apple shows its highest antioxidant capacity against peroxyl radicals, followed by peroxynitrite and hydroxyl radicals. However, compared to juices rich in anthocyanins TOSC values are lower (Fig. 3-5). The half of its antioxidant capacity against peroxyl radicals can be attributed to ascorbic acid. Moreover, the glucose and fructose content contributes to the antioxidant potential particularly against hydroxyl radicals. Phenolic anacardic acid could also be identified in cashew apple juice but showed no antioxidant activity.

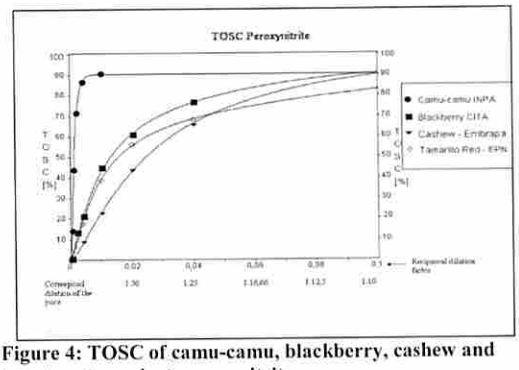


Figure 4: TOSC of camu-camu, blackberry, cashew and tree tomato against peroxynitrite.

Tree tomato

Tree tomatoes were originally domesticated by Indians from the tropical Andes in South America. In the meantime they are cultivated in tropical and subtropical areas all over the world. Especially in New Zealand tree tomatoes are grown with commercial success [12]. These fruits have an ascorbic acid content of 21.9 – 30 mg /100 g fresh weight [13]. Additionally relatively high amounts of carotinoids with provitamin A activity as means β-carotene and cryptoxanthine were found [14].

In opposite to yellow varities in red tree tomatoes anthocyanins are present which were mainly identified as rutinosides of pelargonidine, cyanidine and delphinidine.

Overall, red tree tomatoes have shown intermediate TOSC values against peroxyl radicals and peroxynitrite (Fig 3-4). Probably due to the anthocyanins concentrated in the seed jelly this part performs better against these ROS than the pulp. Against hydroxyl radicals only a moderate activity was observed (Fig. 5).

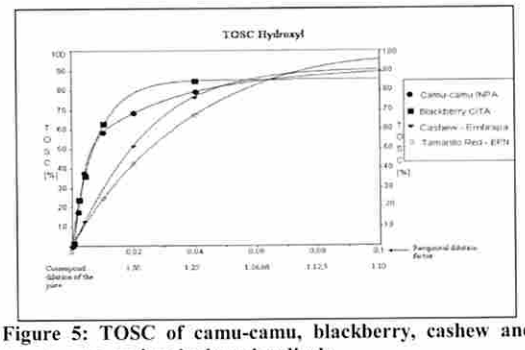


Figure 5: TOSC of camu-camu, blackberry, cashew and tree tomato against hydroxyl radicals.

CONCLUSION

TOSC assays on five tropical fruits resulted in a ranking as follows regarding to their effectiveness to scavenge different ROS:

Peroxyl radicals:

Camu-camu > Açaí > Blackberry > Cashew apple > Tree tomato red

Peroxynitrite:

Camu-camu > Blackberry > Açaí > Cashew apple > Tree tomato red

Hydroxyl radicals:

Blackberry > Camu-camu > Cashew apple > Tree tomato red > Açaí

It turned out that camu-camu is a fruit with outstanding properties against peroxyl radicals and peroxynitrite. Also the potential to scavenge hydroxyl radicals is worth to mention.

These characteristics would make camu-camu a favourable candidate for bioavailability studies with the comet assay. But given the recommendation of the German Nutrition's Association for vitamin C of 100 mg / d a juice of camu-camu could only be administered highly diluted or in small quantities. This suggests mixing up camu-camu with some other investigated fruits of high antioxidant activity that is not only attributed to ascorbic acid. Beside camu-camu two other fruits can be favoured. Açaí and blackberries are relatively poor sources for ascorbic acid but both have respectable antioxidant potential. Indeed, TOSC analyses of a mixture of these fruits in proportion of 12, 44 and 44 % for camu-camu, açaí and blackberry respectively showed that high TOSC values could be maintained. Despite the low addition of camu-camu the antioxidant power against peroxyl radicals and peroxynitrite remained outstandingly high and was kept above levels of blackberry or açaí. Only against hydroxyl radicals TOSC values were halved possibly in consequence of the weak scavenging activity of açai.

If our juice mixture can give rise to a positive result in vivo after oral application by healthy subjects remains to be seen. In a study accomplished by Weisel et al [15] reduced oxidative DNA damages after drinking of an anthocyanin / polyphenolic-rich fruit juice could have been shown already.

REFERENCES

[1] Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) „Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging". Proc Natl Acad Sci USA 90, 7915-7922

[2] Diplock, A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi, G. Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J. (1998) "Functional food science and defense against reactive oxidative species." Brit J Nutr 80 (Suppl 1), 77-112

[3] Regoli, F., Winston, W. (1999) "Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxyl radicals, and hydroxyl radicals". Toxicol Appl Pharmacol 156, 96-105

[4] Rodrigues, R.B., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., Marx, F. "Camu camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh]: A potential functional food from Amazonia". Ernaehrung (Vienna, Austria) in evaluation process

[5] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) "A simple technique for quantification of levels of DNA damage in individual cells". Exp Cell Res 175, 184-191

[6] Lichtenthäler, R., Marx, F., Kind, O.M. (2003) "Determination of antioxidative capacities using an enhanced oxidant scavenging capacity (TOSC) assay". Eur Food Res Technol 216, 166-173

[7] Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R. (2004) "Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS^{n}". J Agr Food Chem 52, 3784-3791

[8] Rogez, H. (2000) "Açaí, prepare, composição e melhoramento da conservação" Belém, Brazil: EDUFPA, p. 313

[9] Zanatta, C.F., Cuevas, E., Bobbio, F.O., Winterhalter, P., Mercadante, A.Z. (2005) "Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR". J Agr Food Chem 53, 9531-9535

[10] Jakobek, L., Seruga, M., Medvidovic-Kosanovic, M., Novak, I. (2007) "Anthocyanin content and ascorbic acid of various red fruit juices". Deutsche Lebensmittel-Rundschau 103, 58-64

[11] Akinwale, T.O. (2000) "Cashew apple juice: Its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits". Eur Food Res Technol 211, 205-207

[12] Bohs, L. (1988) "Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae)". Economic Botany 43, 143-163

[13] Romero-Rodriguez, M.A., Vazquez-Oderiz, M.L., Lopez-Hernandez, J., Simal-Lonzano, J. (1992) "Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC". Journal of Chromatographic Science 30, 433-437

[14] Rodriguez-Amaya, D.B., Bobbio, P.A., Bobbio, F.O., (1983) "Carotinoid composition and vitamin A value of the Brasilian fruit". Food Chemistry 12, 61-65

[15] Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.P., Kulling, S., Rüfer, C., Johannes, C., Janzowski, C. (2006) „An anthocyanin / polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands". Biotechnology Journal 1, 388-397

CASHEW APPLE FRUIT (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.) JUICE CONCENTRATION BY REVERSE OSMOSIS.

Katia Terrine[1]; Poliana Gurak[2]; Lourdes Cabral[3*]; Virgínia Matta[3]; Max Reynes[4]; Manuel Dornier[1,4]; Fernando Abreu[5].

[1]École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Montpellier, France.
[2]Instituo de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.
[3]Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, 23020-470, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, lcabral@ctaa.embrapa.br.
[4]Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement., Montpellier, France
[5]Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil.

Key words: **juice processing, cold concentration, vitamin C.**

ABSTRACT

Cashew apple is a Brazilian pseudo fruit known by its very high vitamin C content. In this work single strength cashew apple juice was concentrated by reverse osmosis in a plate and frame pilot plant with 0.64 m^2 of filtration area. A factorial design (2^2) was used to evaluate the effects of the independent variables, temperature and transmembrane pressure on vitamin C loss and permeate flux. After analyses of its results it was decided to fix the concentration operation condition on 25°C and 60 bar transmembrane pressure. The juice concentrated by reverse osmosis presented 26°Brix, acidity and vitamin C contents proportional to the volumetric concentration factor, 2.9.

INTRODUCTION

Cashew apple is a tropical fruit in which the real fruit is a nut. The edible portion, representing 90% of the fruit, is a pseudo fruit rich in vitamin C. Fresh pseudo fruit consumption is still limited to the regions close to the production, but the juice is widely accepted by the Brazilian population, due to its less astringent taste and pleasant aroma and flavour (Campos et al., 2002; Paiva et al., 2000).

Fruit juices are concentrated to allow economy in storage, transportation, distribution and commercial operations, as well as conservation due to water activity reduction. Concentration is traditionally carried out through the use of high temperatures, promoting significant sensory and nutritional changes of the fruit juice quality since these characteristics are conferred by volatile components and vitamins, which are thermosensible compounds.

Reverse osmosis is a pressure driven membrane process that can be an alternative for juice concentration, as it does not involve phase change or the use of high temperatures (Mulder, 1991). The main advantages of reverse osmosis concentration are the attainment of high quality products due to low temperature operation, resulting in the maintenance of nutritional, aroma and flavour compounds, the lower energy consumption and the use of compact installations, of easy operation (Alvares et al., 2000; Rodrigues et al.; 2004, Sa et al., 2003; Jesus et al., 2007).

Cianci et al (2005) studied the concentration of clarified cashew apple juice by reverse osmosis. Clarified juice with 12.1 °Brix was concentrated up to 28,6 Brix and vitamin C content increased from 162mg/100g in clarified juice to 372mg/100g in the concentrate. The flux was 11.3L/hm^2.

The aim of the present work was to evaluate the quality of single strength cashew apple juice concentrated by reverse osmosis, taking into account the concentration factor, soluble solids content and vitamin C concentration.

MATERIAL AND METHODS

The raw material was the commercial red peel cashew apple pseudo fruit from the northeast of Brazil. The juice was extracted by pressing the fruits, centrifuged and stored at -18°C until use.

The reverse osmosis experiments were carried out in a plate and frame module of 0.64 m^2 membrane surface with polysulphone/polyamide composite membranes (95% NaCl rejection). The pump flow rate was kept at 650 L/h. The reverse osmosis trials were carried out in two different operating modes: steady sate and concentration.

The steady state mode was characterized by the re-circulation of both streams, retentate and permeate, without juice concentration. These experiments were accomplished with two hours of duration. An experimental design was carried out including seven experiments: four conditions in the bounds of the domain and three repetitions at the central point. The independent variables were temperature and transmembrane pressure. The minimum and maximum levels were: temperature (20°C - 40°C) and pressure (40bar- 60bar) as shown in Table 1.

Table 1: Factorial design of the steady state experiments.

Trial	Temperature (°C)	Transmembrane pressure (bar)
1	20	40
2	40	40
3	20	60
4	40	60
5	30	50
6	30	50
7	30	50

By analysing the results it was decided that the concentration operation conditions should be at 25°C and 60 bar transmembrane pressure. In these concentration mode, the permeate was continuously removed and the retentate re-circulated.

Juice samples (single strength, centrifuged and concentrated juices) were analyzed for total soluble solids content (Bellingham + Stanley Limited refractometer), acidity (titration with NaOH solution) and pH (Metronal E120 potentiometer), according to standard AOAC methods (AOAC, 1995). Vitamin C was analyzed by oxide-reduction reaction using 2,6-dichlorophenol indophenol (AOAC, 1995). The juice colour was evaluated by a Suga SM-4-CH colorimeter using the Hunter system.

The data were treated with aid of Statistica 5.5 software

RESULTS

To define the best condition for the concentration process, it was evaluated the effect of the transmembrane pressure and temperature on the vitamin C loss and in the permeate flux (Table 2).

Transmembrane pressure is the driving force of reverse osmosis .It correlates positively with the permeate flux.
In this work it was verified that at 20°C and 40 bar, the stabilized permeate flux was 15.2 L/hm^2 and by increasing the pressure up to 60 bar the permeate flux reaches 20.0 L/hm^2.
Nevertheless, transmembrane pressure enhancement results in low alteration of the vitamin C content. It can be observed a slight change in vitamin C degradation by the increase of transmembrane pressure (from 8.6% at 40 bar to 8.9% at 60 bar, Table 2).
Temperature is involved in several phenomena during reverse osmosis. It decreases the juice viscosity and influences the diffusion coefficient behaviour. When the temperature increase from 20°C to 40°C the permeate flux increased from 20.0 L/hm^2 to 31.8 L/hm^2 at 60 bar (Table 2).
It can be also noticed a synergetic effect of temperature and pressure on permeate flux.
Notwithstanding, temperature beyond 35°C can lead to degradation and/or alteration of nutritional and aromatic compounds. Cashew juice vitamin C can undergo two types of degradation reactions during reverse osmosis process: oxidation and *Maillard* reaction. High temperature enables both of these types of degradation.
The transmembrane pressure increase has no relevant consequence at 20°C, but at 40°C the same modification in pressure lead to a very significative enhancement of the permeate flux, from 22.0 L/hm^2 to 31.8 L/hm^2 (Table 2).
Consequently, in order to conserve vitamin C while maintaining an important flux, the process of concentration of cashew juice should be carried out at high pressure and low temperature.

Table 2: Influence of process conditions on vitamin C and permeate flux (steady state processes).

Process conditions	Vitamina C loss (%)	Permeate flux (L/h.m^2)
20°C; 40bar	8.6	15.2
40°C; 40 bar	15.2	22.0
20°C; 60 bar	8.9	20.0
40°C; 60 bar	24.3	31.8
30°C; 50 bar	10.35	19.6

The surface response was obtained for vitamin C (Figure 1).

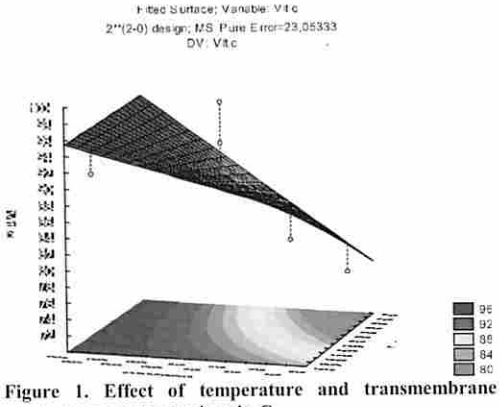


Figure 1. Effect of temperature and transmembrane pressure on permeate vitamin C.

The best process conditions were defined at temperature of 25°C and transmembrane pressure of 60 bar.
In these conditions, cashew juice was concentrated up to 2.5 times (from 9.2 to 26.0°Brix). The process characterization is shown on Table 3.
It was verified an increase in total acidity due to the retention of the juice components, but the pH of the concentrated juices remained the same as the single strength juice due to the high buffer power of the solution.
When compared to the single strength cashew juice, the juice concentrated by reverse osmosis presented higher acidity and vitamin C content. The batch process carried out at 60 bar and 25°C presented a volumetric concentration factor of 2.9 and resulted in a 26°Brix final product.
Through the colour parameters L and b, it was observed that the concentrated juice maintained its colour characteristics. No colour or haze were detected in the permeate streams.

Table 3: Physical and chemical characteristics of feed juice and concentrated juice from reverse osmosis at 25°C and 60 bar .

	Feed Juice	Concentrated Juice
pH	4.32	4.14
Acidity (meq./100g)	112.5	221.6
Total soluble solids (°Brix)	9.2	26
Vitamin C (mg/100g)	185	475
Colour		
L	8.8	14.1
a	1.88	1.25
b	5.9	7.91
Haze	97.9	98.4

L – luminosity (0 = black and 100 = white); a - (-80 to zero = green, from zero to +100 = red); b - (-100 to zero = blue, from zero to +70 = yellow).

CONCLUSIONS.

Cashew apple juice concentration using plate and frame polyamide membranes was carried out with high retention of sugar and vitamin C. When compared to the single strength cashew juice, the juice concentrated by reverse osmosis presented higher acidity and vitamin C content. The batch process resulted in a 26°Brix final product.

ACKNOWLEDGEMENTS

K Terrine was funded by a scholarship at Embrapa Food Technology by the French Ministry of Science and Technology. The authors thank to PAVUC Project FP6-2003-Inco-Dev 2 for financial support.

REFERENCES

Alvarez, S.; Riera, F.A.; Coca, J.; Cuperus, F.P; Bouwer, S.T.H.; Boswinkel, G.; Van Gemert, R.W.; Todisco, S.; Drioli, E.; Olsson, J.; Tragardh, G.; Gaeta, S.N.; Panyor, L. A new integrated membrane process for producing clarified apple juice and apple juice aroma concentrate. **Journal of Food Engineering**, v.46, p.109-125, 2000.

AOAC - Association of Official Analytical Chemist.. **Official Methods of Analysis: Food Composition**; Additives; Natural Contaminants. Ed. Helrich, K, Washington D.C.,16th ed., 1995.

Campos, D C P; Santos, A S; Wolkoff, D B; Matta, V M; Modesta, R C D; Cabral, L M C; Couri, S. Clarificación de jugo de anacardo utilizando tratamiento enzimatico y microfiltración. **Alimentaria**, v. 2, n. 34, p. 121-124, 2002.

Cianci, F.C.; Menezes, L.F.S.; Cabral, L.M.C. Matta, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, n. 3, p. 579-583, 2005.

Jesus, D.F.; Leite, M.; Silva, L.F.M., Modesta, R.C.D.; Matta, V.M.; Cabral, L.M.C. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p.287-297, 2007.

Mulder, M. **Basic principles of membrane technology.** S.l.: Kluwer Academic Publishers, 1987. 363p.

Paiva, E.E.A. ; Garruti, D.S.; Silva Neto, R.M. Aproveitamento Industrial do Caju. **Embrapa Cnpat/Sebrae**, Ce, Fortaleza (Embrapa-Cnpat 38), 2000, p. 85.

Rodrigues, R.B., Menezes, H. C., Cabral, L. M. C., Dornier, M., Rios, G. M.; Reynes, M. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu–camu juice (*Myrciaria dubia*) **Journal of Food Engineering**, v.63, n.(1, p.97-102, 2004.

Sa, I.S.; Matta, V.M.; Cabral, L.M.C. Concentration of Pineapple Juice by Membrane Separation Processes. **Brazilian J. Food Technology**, v.6, p.53-62, 2003.

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EFECTO HIPOGLUCEMIANTE E HIPOCOLESTEROLEMICO DEL GARAMBULLO (Myrtillocactus geometrizans)

[1]Guzmán-Tovar, A., [2]Topete-Viniegra, R.; [3]Hernández-López, D.; [4]Vaillant, F. [2]Camacho-Reynoso, R. [2]Ramos-Gómez M. y [5]Guzmán-Maldonado, S. H.*
[1]Escuela de Nutrición, Universidad Autónoma de Querétaro. [2]PROPAC, Universidad Autónoma de Querétaro. [3]Instituto Tecnológico de Celaya. [4]CITA, Universidad de Costa Rica. [5]Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío (INIFAP), Celaya, México. guzman.horacio@inifap.gob.mx

Palabras clave: alimentos nutracéuticos, antidiabéticos, cultivos novedosos, garambullo.

RESUMEN

Se determinó el perfil fitoquímico del garambullo y se evaluó su efecto sobre el nivel de glucosa y el perfil lipídico en sangre de ratas sanas y diabéticas. Se colectó fruto en los estados de mayor producción en México . El fruto maduro se almacenó a -70°C hasta su uso. Con base en la composición fotoquímica el garambullo puede ser considerado un fruto funcional o nutracéutico. Lo anterior fue demostrado por su capacidad para disminuir el nivel de glucosa y varios tipos de colesterol en sangre de ratas sanas y diabéticas.

INTRODUCCIÓN

México posé gran diversidad de especies endémicas adaptadas a sus condiciones de clima. Un ejemplo de lo anterior es la cactacea conocida como garambullo (*Myrtillocactus* sp) (Figura 1).

Figura 1. A) árbol y B) fruta de *Myrtillocactus*.

El garambullo crece en zonas áridas y semiáridas de México (Figura 2). Estas regiones son consideradas malas para la producción agrícola por lo que no han sido perturbadas por el hombre. Lo que hace de esta especie idónea para ser un cultivo orgánico.

Figura 2. Principales estados productores de garambullo en México.

La caracterización química del garambullo se har enfocado en las betalainas; su contenido es de 2.3 mg/100 g (1 similar al encontrado en tunas (*opuntia* sp) (2). Nuestro grupo caracterizó recientemente (HPLC-ESI-MS) a las betalaínas de garambullo demostrando que contienen indicaxantina betanina, isobetanina, filocactina, filocactina II e isofilocactina.

El potencial fitoquímico del garambullo se basa precisamente en su contenido de betalainas y en el efecto reportado para betalainas de otras especies de cactaceas. Por ejemplo, las betalainas de tuna y pitaya presentan alta capacidad antioxidante (2, 3), previenen la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (2) e incrementan la concentración del glutatión reducido (GSH) factor que activa la enzima glutation-*S*-transferasea (GST) requerida en los procesos antioxidantes *in vivo* (4).

Por otro lado, la fibra presente en frutos de varias cactaceas se ha relacionado con la disminución de glucosa en la sangre (5). La presencia de estos y otros compuestos no identificados en el garambullo pudieran presentar actividades biológicas similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización fitoquímica. La fruta fue colectada en San Luís Potosí, Guanajuato, Hidalgo y Querétaro (Figura 2). La composición química se determinó con métodos de la AOAC (6). Los fenóles totales y la vitamina C fueron determinados de acuerdo con George *et al.* (7). Los taninos por el método de Desphande y Cheryan (8). Los minerales fueron analizados con el método de Jones y Case (9). Los ácidos fenólicos fueron cuantificados por HPLC. La capacidad antioxidante fue determinada con el método reportado por Mariken *et al.* (10). La fibra total fue determinada con un kit (SIGMA, TDF-100A).

Inducción a la diabetes. Se indujo ratas machos Wistar con 45 mg/kg peso de estreptozotocina (STZ).

Experimento hipoglucemiante. Se formaron varios grupos (n=5) de ratas diabéticas y no diabéticas. Después de 12 h de ayuno se determinó la glucosa en sangre. Inmediatamente después, se suministró garambullo (0.5, 1.0 g and 2 g/kg peso) a través de una sonda gástrica y la glucosa se midió a los 60, 120, 180 y 240 min.

Experimento crónico. Se formaron tres grupos de ratas no diabéticas y diabéticas (n=5) y se les administró a través de agua: a) 0.0; b) 2 g, and c) 4 g/Kg de garambullo. Antes de la administración del garambullo, las ratas se sometieron a un ayuno de 12 h y se les determinó la glucosa en sangre. Después se tomaron muestras de sangre cada 7 días durante las 4 semanas del experimento. Al final, las ratas fueron sacrificadas y los riñones y el hígado se lavaron y almacenaron (-80 °C) hasta su análisis.

Bioquímica de sangre. El nivel de glucosa, triglicéridos totales (TG), colesterol total (TCH), lipoproteínas de baja (LDL) y alta (HDL) densidad se determinaron con kits comerciales. La actividad de la GST y el nivel del GSH se determinó con (11) y (12), respectivamente.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron con una ANOVA y las diferencias entre tratamientos se determinaron por comparación de medias (Tukey, $p<0.05$).

RESULTADOS

Caracterización fitoquímica

El contenido de proteína (4.4-5.3%), extracto etereo (3.8-4.3%, ceniza (3.2-3.8%), fibra (21.6-24.5 %) y carbohidratos (63.0-65.9%) (BS) fue similar al de muchas especies cultivadas. Dada la naturaleza silvestre del garambullo, se esperaba que la variación química entre las localidades fuera mayor. Estos resultados pueden ser explicados en parte porque las plantas de esta especie han co-evolucionado por más de 100 años bajo las mismas condiciones ambientales. Otra hipótesis es que todas las plantas tienen un ancestro común y por lo tanto, desde un punto de vista genético, sus rutas biosintéticas expresan composiciones muy similares.

Por otro lado, el contenido de fibra (21.66-24.5%) fue mayor comparado con el de la tuna (3-5%).

Este contenido de fibra es el resultado de la presencia de las semillas y una red de fibras de celulosa presente en toda la pulpa del fruto.

Taninos y fenóles totales. Las muestras de Guanajuato y Querétaro presentaron mayor contenido de taninos (105-130 mg/100g) en comparación con la de las otras dos localidades (40-55 mg/100g 3). Este resultado concuerda con la literatura (13) que señala que los taninos son afectados por el medio ambiente. El contenido de fenoles totales no varió entre localidades (4.1-4.2 mg/100g).

Minerales y ácidos fenólicos. El garambullo no es una buena fuente de Fe y Zn; 100 g contribuyen con 15% y 0.05% del requerimiento diario (15 mg). Por otro lado, esta fruta contiene 12 ácidos fenólicos, catequina y vanillina (Cuadro 1). Se observaron variaciones de entre un 6% para el ácido caféico y el 4-hidroxibenzóico hasta un 52 % para el ácido gálico. La presencia de catequina y ácido gálico es de particular importancia porque se ha reportado que un miembro de esta familia, el epigalocatequingalato incrementa la fosforilación de la tirosina del receptor de la insulina y del sustrato-1 del receptor de la insulina en ratas diabéticas (14)

Cuadro 1. Contenido de ácidos fenólicos, catequina y vainillina en frutos de garambullo.

Compuesto	Contenido (mg/100 g, bs)	Variación (%)
Benzóico	13.4-17.9	25
Caféico	3.6- 3.8	6
Clorogénic	13.2-23.6	44
Cumárico	2.2- 4.6	52
Ferúlico	11.9-16.7	28
Gálico	5.3-10.4	49
4-hidroxibenzóico	25.3-26.8	6
3,4-dihidroxibenzóico	2.1- 3.7	43
Protocatecuico	20.6-27.8	26
Salicílico	19.6-29.6	34
Siringico	0.8- 1.4	44
Vanillico	17.2-19.2	10
Catequina	23.9-38.7	36
Vanillina	1.3- 2.7	51

Efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico

Experimento hipoglicémico. Las ratas no diabéticas que recibieron 2 g/Kg de garambullo presentaron menor contenido ($p<0.05$) de glucosa en sangre a los 120 min. Sin embargo, al final de periodo de 4 h, el nivel de glucosa de todos los grupos fue similar (Figura 3A).

Las ratas diabéticas que recibieron 0.5 y 2 g/kg de garambullo mostraron un menor nivel ($p<0.05$) de glucosa a los 60 min (Figura 3B). Al final del experimento, las ratas que recibieron el garambullo presentaron menor contenido de glucosa comparado con el control.

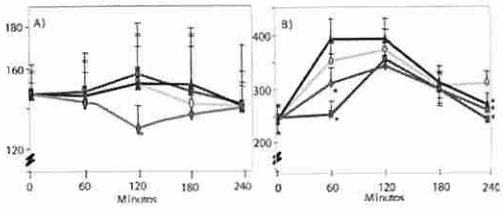


Figura 3. Concentración de glucosa (mg/dl) en sangre de ratas A) no diabéticas e B) inducidas con STZ y administradas con garambullo. Los datos representan el promedio de cinco ratas por tratamiento. *Diferencias estadísticas con el grupo control ($p < 0.05$), Tukey. Recibieron: agua; 0.5 g; 1 g; y 2 g de garambullo.

Experimento crónico. El garambullo no incrementó la glucosa en ratas no diabéticas (Figura 4A). Mientras que las ratas diabéticas que recibieron 2 y 4 g/kg, mostraron menor contenido de glucosa; sin embargo, únicamente las ratas que recibieron 4 g/Kg de garambullo mostraron menor concentración de glucosa ($p<0.05$) al final del experimento (Figura 4B).

Este efecto hipoglicémico del garambullo puede ser atribuido a las betalainas y a los compuestos fenólicos. Sin embargo, no se ha reportado un efecto de las betalainas sobre la diabetes, pero se sabe que los compuestos fenólicos reducen la actividad de la α-glucosidasa (15) y activan el factor χ del receptor de la peroxisoma proliferativa involucrada en el metabolismo que disminuye los ácidos grasos y la glucosa e incrementa la sensibilidad a la insulina (16).

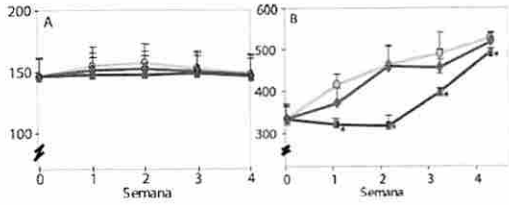


Figura 4. Contenido de glucosa en sangre de ratas A) no diabeticas e B) inducidas con STZ y alimentadas con garambullo. Los resultados son la media de cinco ratas en cada experimento. *Diferencias estadísticas comparando con el grupo control ($p < 0.05$), Tukey. Recibieron: agua; 2 g y ; 4 g de garambullo.

Bioquímica de sangre. Las ratas no diabéticas que recibieron 4 g/Kg de garambullo redujeron 33%, 38% y 47% los niveles de triglicéridos, colesterol y LDL, respectivamente (Cuadro 2). Mientras que las ratas diabéticas redujeron 50 % los triglicéridos, 33 % el cholesterol y 40 % LDL. El HDL se incrementé significativamente en ratas no diabéticas y diabéticas que recibieron 4 g/Kg de garambullo. Este efecto puede atribuirse en parte al contenido de fibra del garambullo.

GSH y GST. La concentración de GSH y la actividad GST en riñón e hígado se incrementó en las ratas no diabéticas y diabéticas que recibieron 2 y 4 g/Kg de garambullo al final del experimento (Cuadro 3). En ratas diabéticas que recibieron 4 g/Kg de garambullo el GSH se incrementó a 37% en riñón y 73% en hígado; mientras que GST se incrementó a 27 % en riñon y 46% en hígado.

Estos resultados demuestran que el garambullo presenta actividad antioxidante *in vivo* debido probablemente a la presencia de los compuestos fenólicos, vitamina C y betalainas (17). La inducción del garambullo a GSH y GST es de gran importancia desde un punto de vista clínico dado que el estrés oxidativo es uno de los principales factores en las complicaciones propias de la enfermedad.

Cuadro 2. Contenido de triglicéridos (TAG), colesterol (TCH), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (mg/dL) en sangre de ratas no diabéticas y diabéticas suministradas con garambullo.

Grupo	TAG	TCH	HDL	LDL
No diabéticas				
Agua	150 ± 15d	334 ± 4c	30 ± 3c	270 ± 4b
2 g	120 ± 7e	223 ± 30e	36 ± 2c	158 ± 13d
4 g	100 ± 6f	207 ± 8f	42 ± 1b	143 ± 6e
Diabéticas				
Agua	315 ± 10a	427 ± 12a	43 ± 2b	318 ± 6a
2 g	170 ± 35c	305 ± 10d	47 ± 1ab	215 ± 15c
4 g	157 ± 6d	286 ± 9d	60 ± 2a	189 ± 10c

Los valores son la media ± DS de cinco animales por tratamiento. Medias en columnas con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) Tukey.

Cuadro 2. Concentración del glutation reducido (GSH) (nmol/mg proteína) y actividad de la glutation-*S*-transferasa (GST) (nmol/min/mg proteína) en hígado y riñón de ratas no diabéticas y diabéticas suministradas con garambullo.

Grupo	Higado		Riñón	
	GSH	GST	GSH	GST
No diabéticas				
Agua	127 ± 10d	691 ± 32b	86 ± 5d	350 ± 35b
2 g	160 ± 12c	864 ± 86a	102 ± 10b	445 ± 99 ab
4 g	205 ± 30ab	928 ± 69a	124 ± 9a	499 ± 63a
Diabéticas				
Agua	125 ± 17d	605 ± 43c	94 ± 3c	355 ± 23b
2 g	180 ± 20bc	832 ± 108a	119 ± 13ab	436 ± 27a
4 g	220 ± 15a	85 ± 97a	129 ± 15a	486 ± 46a

Los valores son la media ± DS de cinco animales por tratamiento. Medias en columnas con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) Tukey.

Capacidad antioxidante. Interesantemente, el extracto de garambullo presenta 3.5 veces más la capacidad antioxidante (824-850 µmol/Eq Trolox/100 mg muesta) comparada con el del BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) (240 µmol/Eq Trolox/100 mg muestra).

BIBLIOGRAFÍA

1. Reynoso, R., Garcia, F. A., Morales, D. and Gonzalez de Mejia, E. 1997. Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. J. Agric. Food Chem. 45: 2884-2889.

2 Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D. and Livrea, M. A. 2004. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. Am J Clin Nutr. 80:941-5.

3 Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., Dornier, M. and Reynes, M. 2004. Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (Hylocereus sp). Fruits 60:3-12.

4. Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., and Livrea, M. A. 2004b. Supplementation with cactus pear (Opuntia ficus-indica) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. Am. J. Clin. Nutr. 80:391-395.

5. Hannan, J. M., Ali, L., Rokeya, B., Khaleque, J., Akhter, M., Flatt, P. R. and Abdel-Wahab, Y. H. 2007. Soluble dietary fibre fraction of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. Br J Nutr. 97:514-21.8. George et al., (2005)

6. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995: total dietary fiber, Official methods of Analysis, 16th ed.; Official method 994.13, AOAC: Gaithersbourg, MD,

7. George, S., Brat, P., Alter, P. and Amiot, M. J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. J Agic Food Chem 53:1370-1373.

8. Desphande, S. S., y M. Cheryan. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. J. Food Sci. 50: 905-916.6. Jones, J. B. y V. W. Case. 1990. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In soil Testing and Plant Analysis (3 rd Ed.). Westerman, R. L. Ed. Soil Science Society of America, pp 389-427, Madison WI.7. Phenolic acids

9. Jones and Case

10. Mariken, TJ., Guido, RMM., Voss, HP., and Bast, A. 2004. Antioxidant capacity of reactin products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay. Food Chem Toxicol 42:45-49.

11. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jabkoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzimatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130-7139.

12. Sedlak J., and Lindsay, R.H.1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 25:192-205

13. De Mejía, E., Guzmán-Maldonado, S. H. Acosta-Gallegos, J. A., Reynoso-Camacho, R., Ramírez-Rodríguez, E., González-Chavira, M. M., Castellanos, J. Z. y Kelly, J. 2003. Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common bean (Phaseolus vulgaris L.) grown in the semiarid highlands of México. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:5962-5966.

14. Walter-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K., Nawano, M., & Granner, D. K. (2005). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 34933-34940.

15. Apostolidis, E., Kwon, Y. I. and Shetty, K. 2006. Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. Asia Pac J Clin Nutr. 15:433-41

16. Rau, O., Wurglics, M., Paulke, A., Zitzkowski, J., Meindl, N., Bock, A., Dingermann, T., Abdel-Tawab, M. and Schubert-Zsilavecz, M. 2006. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. 72:881-7.

17. Galati *et al.*, 2003

MODELIZACION DEL FLUJO DE PERMEACION EN MICRO -FILTRACION DE JUGOS DE BANANO MEDIANTE EL USO DE LA TURBIDEZ

VAILLANT[1], Fabrice, PEREZ[2], Ana, VIQUEZ, Floribeth[2]

(1) Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR QUALISUD, avenue Agropolis, TA50/PS4, 34398 Montpellier Cedex 5, France.
***: corresponding author, Fax. +33/4-67-61-44-33, E-Mail: fabrice.vaillant@cirad.fr**
(2) Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Palabras claves: modelización flujo permeado, microfiltración tangencial, jugo de banano

RESUMEN

La microfiltración tangencial tiene mucho potencial para ser aplicada a la transformación de los jugos pulposos tropicales. Uno de los principales obstáculos para lograr una mayor difusión de esta técnica a escala industrial es la falta de modelos predictivos que tomen en cuenta la variabilidad de la materia prima. Para los jugos pulposos, la dificultad es cómo medir los factores de variación que puedan influir sobre el proceso de la microfiltración tangencial. La medición de la turbidez ha sido aplicada en el presente caso para la clarificación del jugo de banano, y los resultados demuestran que efectivamente, se puede modelar el flujo de permeado mediante el modelo de polarización, con una curva de decaimiento logarítmico en función de la turbidez inicial multiplicada por el factor de reducción volumétrico (FRV). En las condiciones hidrodinámicas seleccionadas, se obtiene un modelo que es válido para jugos de banano de diferentes valores de turbidez inicial.

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías de membranas en la industria de frutas tropicales tienen un gran potencial para la elaboración de nuevos productos de alto valor agregado (VAILLANT and others, 1999). La filtración por membranas es un paso previo a numerosas operaciones unitarias tales como, por ejemplo, la purificación, el fraccionamiento y la concentración. Adicionalmente, la micro y ultra filtración son técnicas que permiten remover los microorganismos sin empleo de calor obteniendo así, fracciones aromáticas comercialmente estériles. Sin embargo, a pesar de este potencial, la adopción de las tecnologías de membranas en las industrias de frutas tropicales es lenta. El principal freno es la necesidad de realizar numerosos ensayos a nivel piloto para poder evaluar la factibilidad técnica y económica de dicha operación. Adicionalmente, la falta de modelos predictivos que puedan validarse a escala piloto y permitir el escalonamiento a nivel industrial, representa un importante obstáculo.

La variabilidad en las características de los jugos de frutas es muy alta, y muchos investigadores optan por utilizar para sus ensayos un lote homogéneo, a menudo congelado para realizar ensayos sucesivos y comparar tratamientos. Sin embargo, en la realidad industrial la variabilidad de las materias primas agrícolas es un hecho y de allí, la dificultad que existe para proponer modelos predictivos.

El modelo teórico más usado (Cheryan, 1998) en filtración tangencial ha sido el modelo de polarización basado sobre la teoría de la capa delgada, el cual estipula que el flujo crítico de permeado (V_p en m.s^{-1}) decrece logarítmicamente con el aumento de la concentración de la fracción volumétrica de las partículas retenidas (C_t) (fórmula 1).

$$V_p = K \ln\left(\frac{C_m}{C_t}\right) \qquad [1]$$

Donde K es la constante de transferencia de masas y C_m, la concentración límite en la superficie de la membrana. Este modelo ha sido criticado ampliamente, aunque parece correlacionar bastante bien ciertos resultados experimentales obtenidos con fluidos biológicos homogéneos. Otro modelo más reciente (Song, 1998) y uno de los más aceptados en la actualidad, toma en cuenta otros fenómenos de transporte y la formación de un capa densa entre la capa de polarización y la membrana. Sin embargo, este modelo admite que para rangos de concentración intermedia, como corresponde en la mayoría de los ensayos de filtración, el flujo de permeado es dependiente casi linealmente respecto al logaritmo de la concentración de la fracción volumétrica de las partículas retenidas. Para fluidos biológicos homogéneos, se analiza la concentración del producto retenido y se puede intentar correlacionar con el flujo, en cambio en el caso de los jugos de frutas, se trata de una dispersión coloidal muy heterogénea de partículas solubles e insolubles, de tamaños y morfologías muy irregulares. Cómo relacionar la fracción volumétrica de las partículas retenidas con una medición instrumental.

La turbidez que mide la propiedad óptica de una solución aparece como una posibilidad. La turbidez revela la intensidad de la dispersión o absorción de los rayos de luz y la compara con una solución estándar. La eficiencia de la luz dispersada por partículas irregulares depende principalmente de la concentración de las partículas, de la distribución de tamaño en solución (solvatación) y de su geometría (CLIFFORD and others, 1995) (LOZANO, 2006), factores que precisamente aparecen relacionarse con la fracción volumétrica de las partículas retenidas. En el caso de un jugo pulposo de manzana (BENITEZ and others, 2007), se encontró que la turbidez por nefelometría (t) es directamente proporcional a la concentración en partículas (C_0).

$$\tau_0 = \tau C_0 \qquad [2]$$

donde, τ es la turbidez específica.

Durante la filtración, la concentración (C_t) de las partículas retenidas aumenta proporcionalmente con el factor de concentración volumétrica (FRV) y se puede escribir a un tiempo t después del inicio de la filtración:

$$C_t = VCR_t . C_0 \qquad [3]$$

donde C_0 es la concentración de las partículas susceptibles de ser retenidas, en el jugo inicial que alimenta la unidad de filtración.

A partir de [2] y [3], podemos escribir

$$C_t = \frac{1}{\tau}(VCR_t.\tau_0) \qquad [4]$$

y remplazando en la ecuación [1] y arreglando:

$$V_p(ms^{-1}) = K\ln(C_m.\tau) - K\ln(FRV.\tau_0) \qquad [5]$$

O sea

$$J_{p_t}(l.h^{-1}.m^{-2}) = F_1 - F_2\ln(VCR_t.\tau_0) \qquad [6]$$

Donde F_1 y F_2 son las dos constantes de la función de decrecimiento logarítmico. El objetivo de este artículo es validar este modelo mediante la aplicación a resultados de investigación sobre jugos pulposos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Jugo de banano: Fue suministrado por la planta procesadora Florida Products S.A. (Costa Rica) a partir de frutos con grado de madurez 6/7 desechados del mercado de exportación. Las frutas fueron sometidas a un tratamiento enzimático con pectinasas y amilasas, y el líquido resultante fue admitido en un decantador-centrífugo antes de alimentar el equipo de microfiltración.

Equipo de microfiltración: La unidad de microfiltración tangencial fue equipada con membranas cerámicas (Membralox IP 19-40, PALL-EXEKIA, Bazet, France), de 0.2µm de diámetro de poro y una superficie total filtrante de 0,2 m^2. La temperatura fue controlada con un intercambiador de calor y la velocidad tangencial se mantuvo fija a 5 $m.s^{-1}$. La presión transmembranaria podía ser modificada gracias a una bomba positiva regulada por un integrador de frecuencia. El factor de concentración volumétrica (FRV) se calculó en función del volumen muerto del circuito (Vd=3.94 L)

$$VCR_t = \frac{V_d + V_t}{V_d} \qquad [7]$$

El flujo de permeado (Jp) fue registrado a intervalos fijos de tiempo gracias a un medidor de flujo magnético (Krohne, Duisbourg, Germany) conectado a una computadora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede apreciar en la **figura 1** que los ensayos de microfiltración tangencial realizados con jugo de banano con diferente valor de turbidez inicial arrojan diferentes comportamientos de filtración. Por el contrario, si se controla la turbidez del jugo, se obtiene buena repetabilidad. La turbidez del jugo de alimentación aparece como un factor importante necesario de tomar en cuenta. Una mayor turbidez del jugo implica mayor concentración de partículas susceptibles de ser retenidas y por consecuente flujos de permeado más bajos. Por otro lado, una menor turbidez inicial, arroja mayores flujos.

Para jugos extraídos de una misma especie, el valor de la turbidez del jugo varía a causa de muchos factores difíciles de identificar tales como la estación, las condiciones edafo-climáticas, la falta de homogeneidad del material genético, etc... Igualmente, cambios imperceptibles en las condiciones de extracción pueden afectar la turbidez del jugo (FAVA, 2006) .

En la **figura 2**, se presentan los mismos ensayos pero reportados en función del factor de reducción volumétrica (FRV) corregido por la turbidez inicial del jugo τ_0. Se puede observar que la repetabilidad entre ensayos es excelente después del periodo de estabilización de las condiciones hidrodinámicas (aproximadamente 10 minutos después del inicio de la filtración).

En la **figura 3**, se presentan los flujos de permeado obtenidos después del periodo de estabilización en función del logaritmo del FRV multiplicado por τ_0. Como está previsto por el modelo de polarización, se puede constatar que efectivamente el flujo de permeado se reduce en forma logarítmica con el FRV corregido por la turbidez inicial. Todos los ensayos realizados en las mismas condiciones hidrodinámicas pueden ser modelados sobre la misma línea recta.

Este resultado permite prever el comportamiento de un jugo de banano conociendo su turbidez inicial, e incluso permite determinar hasta cuál valor de FRV se puede llegar si se fija un flujo mínimo de microfiltración. Por ejemplo, al procesar un jugo con una turbidez inicial de 1000 NTU, se podrá alcanzar un FRV de 20 (equivalente a 95% de rendimiento de jugo clarificado), manteniendo un flujo por encima de 100 $l.h^{-1}.m^{-2}$, mientras que con un jugo de 5000 NTU, se podrá solamente alcanzar un FRV de 4 (80 % de rendimiento). El modelo desarrollado permite evaluar la necesidad de implementar etapas previas a la microfiltración para disminuir la turbidez inicial, mediante la aplicación de pretratamientos físicos y enzimáticos.

BIBLIOGRAFÍA

BENITEZ EI, GENOVESE DB & LOZANO JE. 2007. Scattering efficiency of a cloudy apple juice: Effect of particles characteristics and serum composition. Food Research International, *in press*.

CHERYAN M. 1998. Performance and engineering models. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Lancaster, Pa (USA): Technomic Publishing Co.

CLIFFORD NJ, RICHARDS KS, BROWN RA & LANE SN. 1995. Laboratory and Field Assessment of an Infrared Turbidity Probe and Its Response to Particle Size and Variation in Suspended Sediment Concentration. Hydrological Sciences 40(6):771-791.

FAVA J. 2006. Structure and Nanostructure of the Outer Tangential Epidermal Cell Wall in *Vaccinium corymbosum* L. (Blueberry) Fruits by Blanching, Freezing-Thawing and Ultrasound. Food Science and Technology International 12(3):241-251.

LOZANO JE. 2006. Color, turbidity, and other sensorial and structural properties of fruits and fruit products. Fruit Manufacturing - Scientific Basis, Engineering Properties, and
Deteriorative Reactions of Technological Importance. Springer. p. 230 p.

SONG L. 1998. A new model for the calculation of the limiting flux in ultrafiltration. Journal of Membrane Science 144:173-185.

VAILLANT F, MILLAN P, O'BRIEN G, DORNIER M & DECLOUX M. 1999. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. Journal of Food Engineering 42(4):215-224.

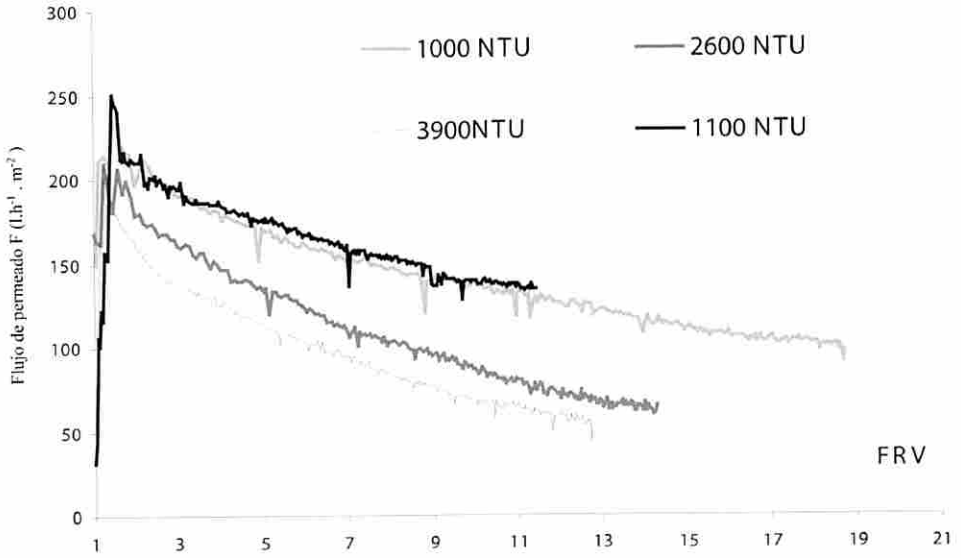


Figura 1: Microfiltración del jugo de banano a diferentes valores de turbidez inicial

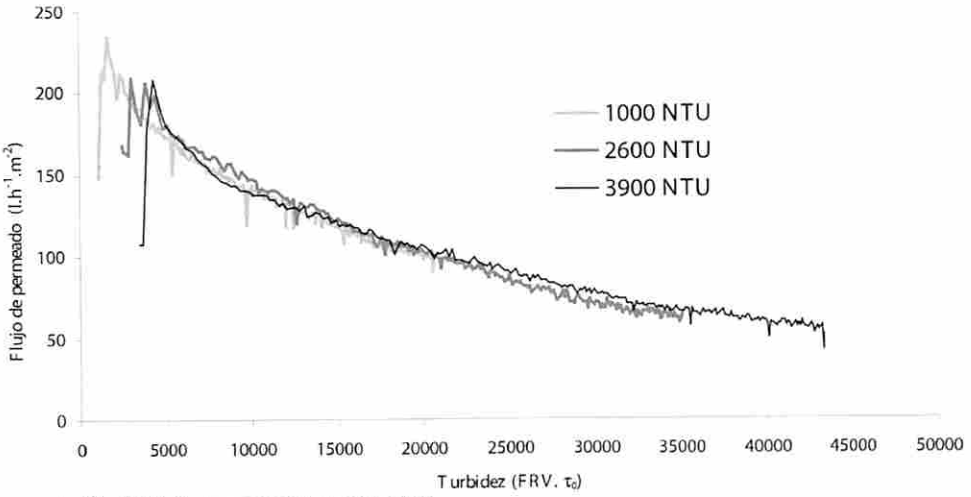


Figura 2: Representación del flujo de permeado versus FRV.

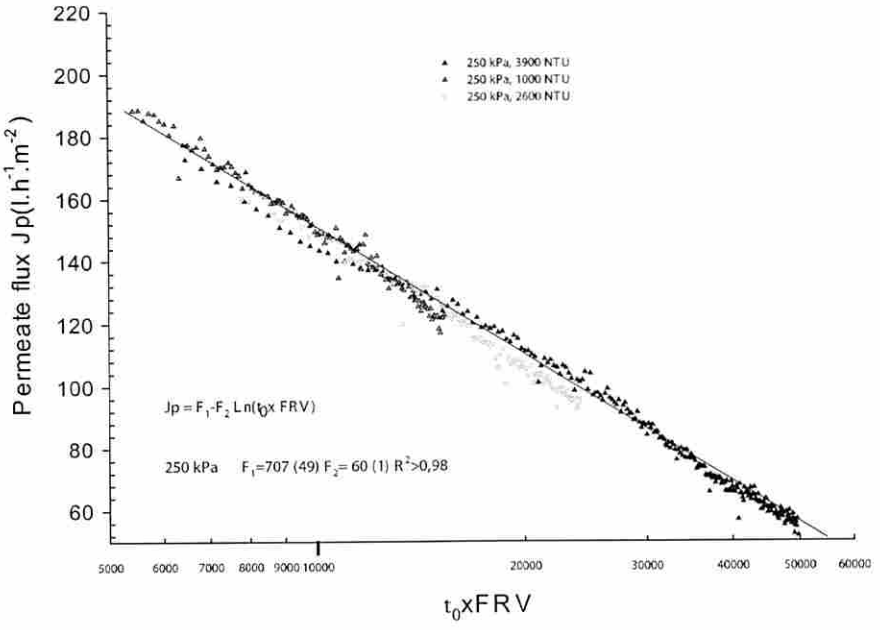


Figura 3: Curva logarítmica de decaimiento del flujo de filtración en función de FRV.t_0

USO DE LA MICRO Y ULTRAFILTRACIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE POLIFENOLES DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum Cav)*

Beltrán, Elena; Vera, Edwin y Ruales, Jenny
ESCUELA POLITECNICA NACIONAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
Pasaje Andalucía E 12A y Veintimilla
Casilla 17-01-2759. E. mail. veraedwi@mail.epn.edu.ec
QUITO - ECUADOR

Palabras clave: procesamiento de alimentos, microfiltración, ultrafiltración., polifenoles, *solanum betaceum*

INTRODUCCIÓN

La presencia de antioxidantes en los alimentos es de gran interés debido al efecto beneficioso que tienen para la salud. Numerosos estudios se han realizado para la identificación y caracterización de diferentes compuestos antioxidantes debido a la importancia de estos en la prevención de enfermedades y el retardo del envejecimiento (Lichtenthäler y Marx, 1998).

Los vegetales y frutas han recibido una atención particular debido a su alta concentración de antioxidantes. En este tipo de alimentos, los compuestos antioxidantes más abundantes son por lo general los polifenoles (Bravo, 1998). Para la purificación de estos compuestos a nivel de laboratorio, se ha probado principalmente el uso de cromatografía de fase reversa con Sephadex (Mazza y Velioglu, 1992) o cromatografía iónica (Gil et *al.*, 2000). No existe sin embargo, ningún estudio para la separación de polifenoles utilizando tecnología de membranas. Mediante esta tecnología se podría separar selectivamente, de acuerdo al tamaño de la molécula, polifenoles de diferente peso molecular (Scout, 1995). Además esta tecnología puede fácilmente aplicarse a nivel industrial para la obtención de diferentes tipos de polifenoles.

El objetivo de este trabajo es entonces evaluar el uso de la ultrafiltración para la separación de polifenoles del tomate de árbol, y cuantificar la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas en el proceso. La separación se realizó en la fracción comestible como en las cáscaras del tomate de árbol, ya que según Vasco (2005) la mayor parte de polifenoles se encuentran en la cáscara de la fruta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

La materia prima usada fue toma de árbol morado gigante, procedente de Baños –Ecuador. Las frutas fueron procesadas de acuerdo a las siguientes operaciones: lavado, pelado, corte y separación de la cáscara (exocarpio), el mesocarpio y la placenta que contiene las semillas. Con el mesocarpio y la placenta se realizaron pulpas sin añadir agua, mediante un licuado manual. Las tres fracciones separadas se guardaron a –21 °C.

Hidrólisis enzimática

Para facilitar la filtración de la muestras y disminuir el colmataje de las membranas, se realizó un pretratamiento de la muestras mediante hidrólisis enzimática.

Para el tratamiento con enzimas las muestras se prepararon de la siguiente manera: las pulpas del mesocarpio y la placenta se descongelaron y calentaron hasta llegar a 20 o 30 °C. Las cáscaras se trituraron y se añadió agua en una proporción agua:cáscara 3:1. Para mejorar la extracción de los polifenoles de las cáscaras se realizaron además tratamientos añadiendo luego de la hidrólisis enzimática etanol para obtener la relación etanol:agua:cáscara 3:3:1.

Posteriormente, la hidrólisis enzimática en todos los casos se realizó por 30 minutos con el coctel enzimático Rapidaza Vegetable Juice con las siguientes condiciones de trabajo: (a) pulpa del mesocarpio 30 °C, (b) pulpa de la placenta 20 °C, (c) cáscara 20 °C; en todos los casos se añadió 1 ml de enzima/kg de muestra.

Micro y ultrafiltración

La separación de polifenoles contenidos en el tomate de árbol se realizó usando los siguientes equipos:

- una unidad piloto de microfiltración tangencial de la sociedad TIA, equipado con una membrana cerámica Membralox de 0,2 µm de diámetro de poro, y una membrana de Rhodia de 10 µm de diámetro de poro, ambas con una superficie de 0,2 m^2.
- un modulo de laboratorio de fabricación local, equipado con membranas de Rhodia de 80 cm^2 de superficie y diámetros de poro entre 0.45 µm y 15 kDa.

Los jugos enzimados fueron procesados en la unidad piloto para microfiltración, y el clarificado obtenido se usó como alimentación para la micro y ultrafiltración en el módulo de laboratorio.

Las pruebas preliminares se realizaron usando membranas cerámicas con los siguientes tamaños de poro: 10 µm, 0.45 µm, 0.2 µm, 0.1 µm, 300 kDa, 150 kDa, 50 kDa y 15 kDa. En base de estos resultados se realizaron pruebas para la separación de polifenoles del mesocarpio, placenta y cáscara usando las siguientes membranas: 0.2 µm, 0.1 µm, 150 kDa, y 15 kDa.

En la micro y ultrafiltración se fijaron las siguientes condiciones de operación: presión de 2.5-3.0 bar, temperatura de 25-30 °C, flujo de recirculación para la unidad piloto de 1000 $l.h^{-1}$, y para el módulo de laboratorio de 1 $l.h^{-1}$.

Métodos de análisis

La medición de pH se realizó utilizando un pHmetro Orion modelo 210A, según la norma ISO 1842 (1991). Para la determinación de acidez titulable se tomó una alícuota de 5 ml de la muestra, se diluyó hasta aproximadamente 50 ml con agua destilada, se añadió 0.3 ml de fenoftaleína y se tituló con una solución de NaOH 0.1N hasta persistencia del color rosa por 30 segundos (norma AOAC 942.15 37.1.37, 2000). Los sólidos solubles totales se determinaron midiendo con un refractómetro de acuerdo a la norma AOAC 932.12 37.1.15 (2000).

Para determinar el contenido de polifenoles solubles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu's (Georgé et *al.*, 2005) con un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-160A. La cuantificación de vitamina C ser realizó utilizando el método descrito por Macrae (1988) modificado y validado en los laboratorios del DECAB de la Escuela Politécnica Nacional (Quito). La cuantificación de carotenos se realizó de acuerdo al método descrito por Pettersson y Jonsson (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Micro y ultrafiltración

Los resultados de la micro y ultrafiltración de las muestras del mesocarpio se presenta en las figuras 1 y 2. En todas la pruebas se utilizó la membrana del fabricante Rhodia. Como se puede observar no existe una influencia importante del diámetro de poro de la membrana en el flujo de permeado, debido probablemente a que las muestras utilizadas en el piloto de laboratorio son todas muestras clarificadas, y por lo tanto el colmataje de la membrana sería mínimo.

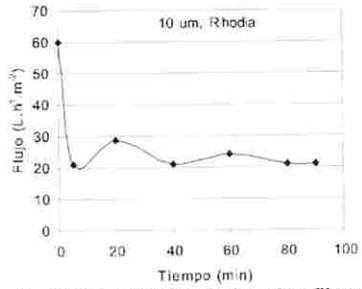


Figura 1. Evolución del flujo en la microfiltración de la pulpa del mesocarpio (2,5 bar, 32 °C, equipo piloto)

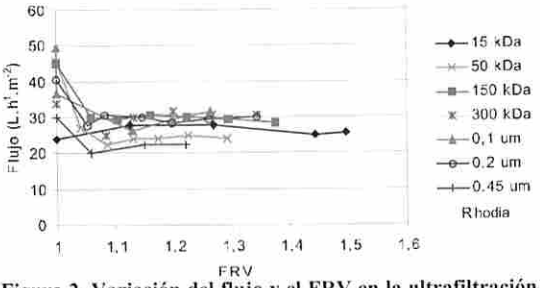


Figura 2. Variación del flujo y el FRV en la ultrafiltración del clarificado del mesocarpio (3 bar, 20°C, equipo de laboratorio)

En las figuras 3 y 4 se encuentran los resultados de la filtración tangencial de las muestras obtenidas de la placenta del tomate de árbol. Con la pulpa se realizó también una prueba con la membrana Membralox (figura 3). Esta membrana tiene un mejor rendimiento que la membrana de Rhodia, como se puede ver por el flujo de permeado. En el equipo de laboratorio (figura 4) se observa que los flujos de permeado incrementan con el tamaño de poro de la membrana, y esto indica que debe existir retención de ciertos compuestos en las membranas de 15 kDa y 150 kDa, ya que los flujos obtenidos con estas membranas son los mas bajos.

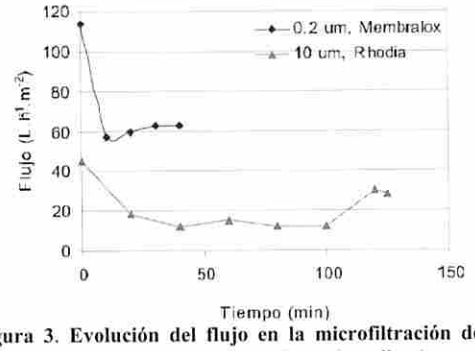


Figura 3. Evolución del flujo en la microfiltración de la pulpa de la placenta (2,5 bar, 35 °C, equipo piloto)

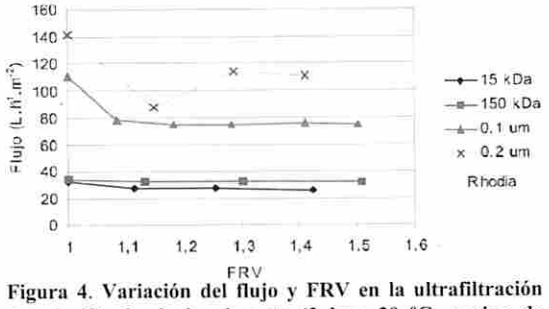


Figura 4. Variación del flujo y FRV en la ultrafiltración del clarificado de la placenta (3 bar, 20 °C, equipo de laboratorio)

En cuanto al uso de la filtración con membranas para la separación de los polifenoles de la cáscara del tomate de árbol, se encontró ciertos problemas debido a la formación de espuma. Sin embargo, luego de realizar la primera filtración con la membrana de 0.2 µm, el clarificado obtenido es fácil de manejar. En efecto, se pudo observar que el flujo obtenidos al tratar el clarificado con las membranas de Rhodia y con tamaño de poro inferior a 0.2 µm, era igual o superior (figuras 5 y 6).

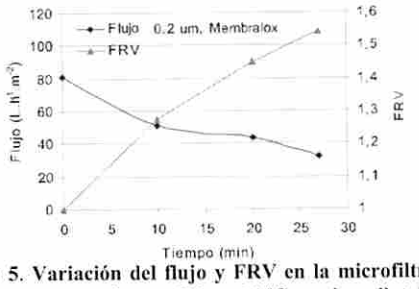


Figura 5. Variación del flujo y FRV en la microfiltración del extracto de la cáscara (3 bar, 34 °C, equipo piloto)

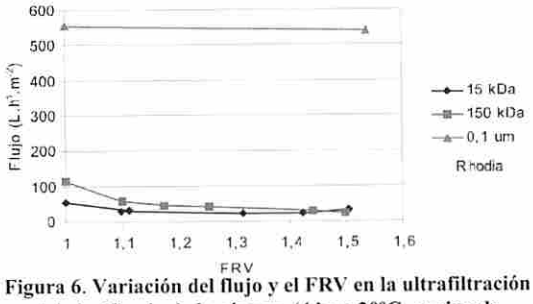


Figura 6. Variación del flujo y el FRV en la ultrafiltración del clarificado de la cáscara (4 bar, 20°C, equipo de laboratorio)

El uso de etanol en la cáscara para mejorar la extracción de los polifenoles, presentó también ventajas en el proceso de filtración como se puede observar en la figura 7. El flujo de permeado medido en el equipo piloto, fue varias veces superior al tratamiento del extracto que contiene solamente agua. Sin embargo, con las membranas de Rhodia se observó mas bien una disminución del flujo respecto al extracto acuoso de la cáscara (figura 8).

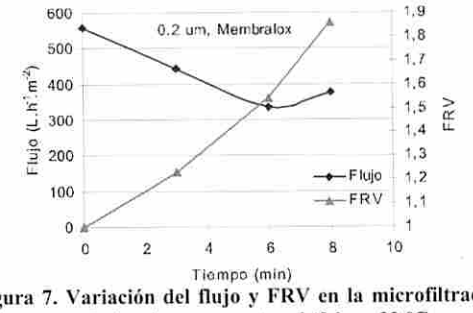


Figura 7. Variación del flujo y FRV en la microfiltración del extracto de la cáscara con etanol (3 bar, 32 °C, equipo-piloto)

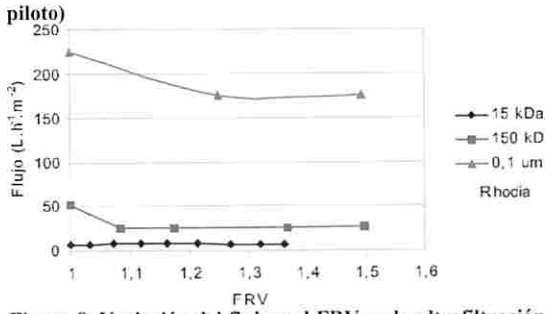


Figura 8. Variación del flujo y el FRV en la ultrafiltración del clarificado de la cáscara con etanol (4 bar, 20°C, equipo de laboratorio)

Propiedades de las fracciones obtenidas en la filtración

En las tablas 1 a la 3 se presenta los resultados de las propiedades de la alimentación, el retenido y el permeado obtenido durante la micro y ultrafiltración de las muestras de tomate de árbol.

Como podría esperarse, se observa que el pH, los grados Brix y la acidez titulable permanecen constantes en todas las fracciones y en todos los tratamientos. Esto se debe a que las moléculas de los azúcares y ácidos orgánicos, compuestos responsables de dichas propiedades, tienen un tamaño inferior al tamaño del poro de las membranas utilizadas. En efecto se conoce que estas moléculas son solo retenidas por nanofiltración o en ósmosis reversa (Scott, 1995).

En cuanto a la concentración de polifenoles, se puede observar que las membranas de 10 µm a 0.2 µm no producen ningún cambio en la concentración del permeado y retenido. Esto indica que estas membranas no logran retener estos compuestos. Sin embargo en las membranas de 0.1 µm hasta la de 15 kDa se observa una disminución de la concentración en el permeado.

Tabla 1. Propiedades de las fracciones obtenidas en la ultrafiltración de la pulpa del mesocarpio (piloto de laboratorio).

		Alimentación	Retenido	Permeado
10 um	pH	3,55	3,53	3,55
	°Brix	8,20	8,60	6,80
	Acidez (%)	2,2	2,2	2,1
	Polifenoles*	0,38	0,35	0,32
0.45 um	pH	3,56	3,55	3,18
	°Brix	6,2	7,2	5,0
	Acidez (%)	2,0	1,8	1,3
	Polifenoles*	0,33	0,31	0,19
0.2 um	pH	3,56	3,54	3,54
	°Brix	7,0	7,8	7,8
	Acidez (%)	2,0	1,9	2,0
	Polifenoles*	0,34	0,31	0,32
0.1 um	pH	4,17	4,14	4,10
	°Brix	8,4	7,8	7,2
	Acidez (%)	2,1	2,1	1,8
	Polifenoles*	0,35	0,34	0,31
300 kDa	pH	4,05	4,04	4,04
	°Brix	8,40	8,20	6,00
	Acidez (%)	2,1	2,0	1,5
	Polifenoles*	0,35	0,31	0,24
150 kDa	pH	4,04	4,02	4,01
	°Brix	8,4	8,0	6,0
	Acidez (%)	2,1	2,0	1,5
	Polifenoles*	0,34	0,35	0,24
50 kDa	pH	4,02	3,99	3,98
	°Brix	8,4	7,8	5,8
	Acidez (%)	2,1	2,1	1,5
	Polifenoles*	0,35	0,35	0,23
15 kDa	pH	3,98	3,95	3,99
	°Brix	8,2	8,0	5,4
	Acidez (%)	2,1	2,1	1,4
	Polifenoles*	0,34	0,35	0,22

*: En mg/ml equivalente de ácido gálico

Tabla 2. Propiedades de las fracciones obtenidas en la ultrafiltración de la pulpa de la placenta (piloto de laboratorio).

		Alimentación	Retenido	Permeado
0.2 um	pH	3,68	3,73	3,75
	°Brix	7,0	5,2	6,9
	Acidez (%)	0,99	1,24	1,02
0.1 um	pH	3,72	3,72	3,71
	°Brix	6,4	3,9	6,2
	Acidez (%)	1,24	1,21	0,93
150 kDa	pH	3,70	3,71	3,74
	°Brix	7,4	6,0	6,2
	Acidez (%)	1,24	1,21	0,99
15 kDa	pH	3,71	3,73	3,73
	°Brix	6,1	4,3	6,2
	Acidez (%)	1,15	1,24	1,24

Estos primeros resultados parecen indicar por lo tanto que usando membranas de tamaño de poro inferior a 0.1 µm, se podría separar diferentes polifenoles. Sin embargo, esta hipótesis debería verificarse con análisis más precisos para la identificación de polifenoles. Luego de la separación, se podría pensar en concentrarlos usando otra tecnología de membranas, la ósmosis inversa por ejemplo (Scott, 1995).

Tabla 3. Propiedades de las fracciones obtenidas en la ultrafiltración del extracto acuoso de la cáscara.

		Alimentación	Retenido	Permeado
0.2 um	PH	3,98	3,98	4,03
	°Brix	2,0	2,0	1,8
	Acidez (%)	0,39	0,45	0,39
0.1 um	PH	3,87	3,90	3,93
	°Brix	1,6	1,6	1,6
	Acidez (%)	0,39	0,37	0,35
150 kDa	pH	3,89	3,96	3,93
	°Brix	1,6	1,8	1,8
	Acidez (%)	0,32	0,35	0,35
15 kDa	pH	4,08	4,08	4,04
	°Brix	1,8	1,8	1,8
	Acidez (%)	0,42	0,37	0,39

CONCLUSIONES

En este primer estudio se demuestra que utilizando la ultrafiltración tangencial, se puede modificar la distribución de polifenoles en el permeado y retenido, tecnología que puede tener interés si se identifican compuestos de actividad antioxidante importante en las fracciones. En este caso, la tecnología de membranas podría utilizarse para la purificación de compuestos antioxidantes de interés, ya que su aplicación a nivel industrial es fácil y tiene ventajas económicas. Un estudio más detallado es necesario para confirmar estos resultados.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto PAVUC por el financiamiento para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutritions Reviews*. 56(11), 317-333.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derivated products. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1370-1373.
- Gil, M., Tomás-Berberán, F., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. y Kader, A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4581-4589.
- Lichtenthäler, R. y Marx, F. 2005. Total oxidant scavenging capacities of common european fruit and vegetables juices. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 103-110.
- Macrae, R. 1988. "HPLC in food analysis". Academic Press, 2 ed., Gran Bretaña.
- Mazza G. y Velioglu, Y.S. 1992. Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-flesh apples, 43, 113-117
- Petterson, A., Jonsson, L. 1990. Separation of cis-trans isomers of alpha- and beta-carotene by adsorption HPLC and identificación with diode array, *J. Micronutr.*, 8, 23-41
- Scott, K. 1995. "Handbook of industrial membranas". Elsevier Advanced Technology, Oxford, Angleterre, pp. 163-270.
- Vasco, C. 2005. "Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds with antioxidant capacity in a selection of fruits and vegetables cultivated in Ecuador", Escuela Politécnica Nacional (Ecuador) y Universidad de Chalmers (Suecia).

IMPACT OF SENSORY EXPERIENCES ON THE ACCEPTANCE OF TROPICAL FRUIT JUICES

Sabbe, S.[1], Verbeke, W.[2] and Van Damme, P.[1]

[1] Department of Plant Production, Laboratory of Tropical and Subtropical Agronomy and Ethnobotany, Ghent University, Coupure links 653, 9000 Gent, Belgium
[2] Department of Agricultural Economics, Ghent University, Coupure links 653, 9000 Gent, Belgium
e-mail: sara.sabbe@UGent.be

Keywords: sensory, tropical, fruit juice, acceptance, consumer, Belgium

SUMMARY

The introduction of new tropical fruits and their products into the market will only be successful if consumers' expectations are satisfied. Sensory characteristics, particularly taste, and health considerations play a predominant role in consumers' satisfaction and hence subsequent consumption and purchase behaviour. In this respect, we conducted exploratory research which consisted of two parts: (1) motives and barriers with regard to the purchase of tropical fruit juices were assessed through two focus group discussions (n=15) and (2) impact of sensory experiences on the purchase intention of three tropical fruit juices (i.e. açaí juice, baobab juice and cashew apple juice) was evaluated by a descriptive survey combined with sensory testing (n=175). Important findings are that tropical fruit juices are consumed for their sensory sensation. Unfamiliarity with respect to taste forms a barrier to the purchase intention of tropical fruit juices. Furthermore, tasting cashew apple juice confirmed consumers' expectations whereas taste expectations were not confirmed after the consumption of açaí juice and baobab juice. Repeat purchase intention and subsequent consumption are determined more strongly by confirmation of taste expectations, rather than by perceived health and nutritional benefits and search attributes such as 'attractiveness'.

INTRODUCTION

In Europe, consumers' demand for tropical fruit products is expanding due to increased health consciousness, population growth of ethnic minorities in Europe and through international travel and global communication (FAO, 2003; Centeno, 2005). The food industry is also making greater use of tropical fruits as ingredients for a wide assortment of food products in order to respond to consumers' growing interest in innovative products with new and exotic flavours and tastes (Kortbech-Olesen, 1996). Nonetheless, numerous processed tropical fruit products are quite unknown to many consumers. In order to achieve product acceptance followed by successful market introduction, it is of prime importance to gain insight in the factors determining consumers' food choice and consumption behaviour.

Numerous studies mention sensory characteristics - particularly taste -, followed by health considerations, as prominent motivations for fruit consumption and subsequent purchase intention (Verbeke *et al.*, 2006; Enneking *et al.*, 2007; Poole *et al.*, 2007). Tuorila and Cardello (2002) assessed consumer responses to an off-flavour in fruit juices and revealed that consumption may not be repeated if the first impression of taste is poor. Also Deliza *et al.* (2003) cited that foods are unlikely to be accepted if consumers do not like the flavour. Apart from sensory and health properties, consumers also rely on various product attributes, such as product image, brand, packaging, price and convenience, which are traded-off against each other during their decision-making process (Brunsø *et al.*, 2002; Enneking *et al.*, 2007). Deliza *et al.* (2003) found that, besides taste and nutritional information, also convenience and cost are important factors influencing the purchase intention of pineapple juice. Furthermore, individual socio-demographic characteristics (e.g. gender, age, social class and place of living) and situational factors (e.g. time and place of purchase) influence consumers' food choice behaviour (Kamphuis *et al.*, 2006).

The complex interaction between different factors influencing consumers' decisions to eat fruit and their products has been widely described in literature. Little research has been done on this topic with respect to tropical fruit products, though. Nonetheless, when launching tropical fruit products it is important to understand how consumers perceive these products and how they build up purchasing and consumption intentions.

This paper presents results that are part of broader research which investigates the different factors influencing the purchase of new and relatively unknown tropical fruits and their products (Sabbe *et al.*, 2007a). The present study focuses on tropical fruit juices and its objective is twofold. Firstly, it explores consumers' motivations and barriers to purchase tropical fruit juices and secondly, it assesses the impact of sensory experiences on the purchase intention and hence product acceptance of three tropical fruit juices.

MATERIALS AND METHODS

In order to gain insight in consumers' motivations and barriers towards the purchase of tropical fruit juices, two focus group discussions (n=15) were carried out in Ghent (Belgium) (Sabbe *et al.*, 2007b). A first group consisted of seven women aged between 25 and 40 years, whereas the second group included eight women between 50 and 65 years. All respondents were open-minded to tropical fruits, had some knowledge about this fruit category and were consumers of tropical fruit juices.

Prior to the focus group discussions, a guide was developed. The guide consisted of instructions for the discussion procedure and described the topics that had to be discussed. A professional research agency assisted in conducting the focus group discussions: they recruited the participants and facilitated the group discussions. The sessions were videotaped – with participants' permission – and transcribed. A qualitative analysis of the transcripts was subsequently performed.

To assess the impact of sensory experiences on the acceptance of tropical fruit juices, a questionnaire, combined with sensory tests was used (Sabbe *et al.*, 2007c). Before tasting, consumers' general expectations about processed tropical fruit products and their purchase intention were measured by evaluating the multiple product attributes 'good quality', 'special', 'attractive', 'good

taste', 'nutritious', 'safe' and 'health'. After tasting, the same attributes were used to evaluate the tested product, and the subsequent purchase intention was again assessed. In this way, acceptance of the tropical fruit juice could be determined by the match or mismatch between expectations before and experiences after tasting.

The questionnaire and sensory tests were carried out during an exhibition (Agriflanders) in Ghent (Belgium). Respondents were selected by convenience and by their willingness to participate. In total, 175 questionnaires integrating sensory tests of three tropical fruit juices i.e. açaí juice (n= 60), baobab juice (n=56) and cashew apple juice (n=59) were analysed by means of SPSS12.0.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The focus group discussions revealed that pleasure-seeking or hedonism appears to be a major stimulus for the purchase of tropical fruit juices. In fact, the most important purchasing motivations are consumers' need for indulgence, the festive character of the juices and their perceived special taste. Different exotic fruit combinations and their convenience in usage and consumption also form important drivers for the purchase and subsequent consumption of tropical fruit juices. In line with consumers' growing demand and search for natural and healthy products (von der Linden, 2004), it was not surprising to find that freshly squeezed tropical fruit juices are preferred to concentrates and nectars. Their naturalness, perceived healthiness and convenience in use are convincing factors for purchasing these fruit juices.

On the other hand, unfamiliarity with the tropical fruits processed in the juices mainly influences consumers' purchase decision. Most respondents buy tropical fruits containing a mixture of known and unknown (tropical) fruits but tend to reject juices containing mainly unknown tropical fruits. Lack of knowledge with respect to taste combined with high price are mentioned to form the main barriers to purchase tropical fruit juices.

In a second study, the impact of sensory experiences on the acceptance of tropical fruit juices and repeat purchase intention was measured by evaluating multiple product attributes before and after tasting açaí juice (Figure 1), baobab juice (Figure 2) and cashew apple juice (Figure 3), respectively.

Consumers' general expectations are confirmed after tasting cashew apple juice (Figure 3). However, this expectation confirmation is not reflected in a subsequent purchase intention. With respect to açaí juice and baobab juice, consumers' general expectations before tasting are not confirmed after tasting the juices (Figure 1 and Figure 2, respectively). After tasting these tropical fruit juices, the attributes 'good taste', 'attractive', 'healthy' and 'nutritious' received lower scores. Unfamiliarity with new and exotic flavours seems to lead to expectation disconfirmation with respect to the attribute 'taste' as respondents could not refer to already known and established flavours and tastes. Together with the disconfirmation of taste expectation, a simultaneous decrease in the rating of some other non-sensory attributes is observed. The respondents considered açaí juice and baobab juice after their consumption less 'attractive', less 'nutritious' and less 'healthy'. Furthermore, expectation disconfirmation with respect to the attribute 'taste' is also reflected in a lower rating of the purchase intention. Apparently, consumers deduce other (non-sensory) quality attribute expectations from sensory experiences.

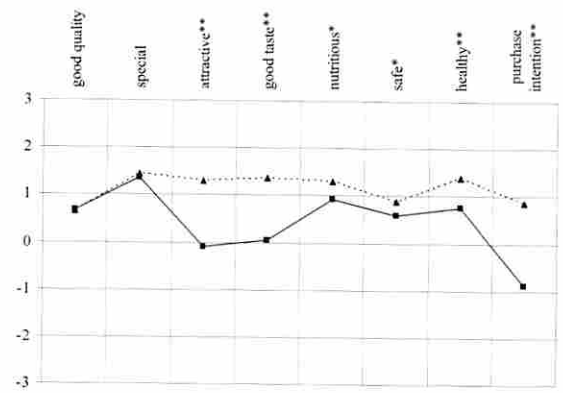


Figure 1 Evaluation of product attributes before and after tasting açaí juice
(Legend: - ▲ - = before tasting; —■— = after tasting; **p < 0.01; *p < 0.05)

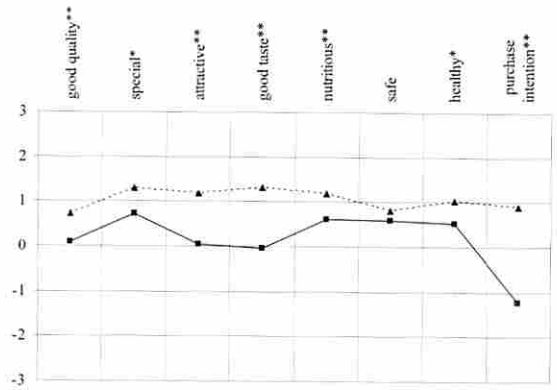


Figure 2 Evaluation of product attributes before and after tasting baobab juice
(Legend: - ▲ - = before tasting; —■— = after tasting; **p < 0.01; *p < 0.05)

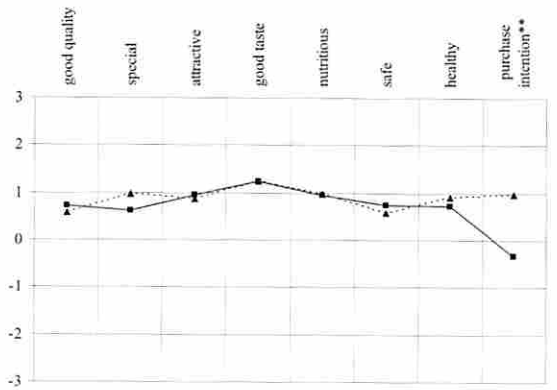


Figure 3 Evaluation of product attributes before and after tasting cashew apple juice
(Legend: - ▲ - = before tasting; —■— = after tasting; **p < 0.01; *p < 0.05)

Sensory experience is shown to greatly influence the acceptance of tropical fruit juices, but also seems to affect consumers' perceptions about health and nutritional benefits. Although the tested tropical fruit juices have outstanding nutritional values (PAVUC, 2007), a decrease in beliefs about their health and nutritional benefits is observed when disconfirmation of taste expectation occurs. Subsequent purchase intention and hence consumption is thus dominated by taste confirmation, rather than by perceived health and nutritional benefits. These findings are in line with several studies evaluating the trade-off between taste and health considerations by product acceptance (Tuorila and Cardello, 2002; Luckow and Delahunty, 2004; Verbeke, 2006). However, disconfirmation of expectation with respect to the attribute 'taste' can not completely explain the observed decrease in the purchase intention of cashew apple juice (Figure 3). Apart from taste and the evaluated attributes, numerous other variables seem to influence consumers' satisfaction and subsequent purchase intention. This is in accordance with several studies (Pollard *et al.*, 2002; Baker and Wardle, 2003) which stated that besides taste and health concerns, also cost, perceived availability and convenience are to be considered as important purchasing determinants.

CONCLUSION

Respondents consume tropical fruit juices for the sensory sensation. However, unfamiliarity with respect to taste forms a barrier to purchase tropical fruit juices. In summary, sensory experiences play a predominant role in consumers' satisfaction and hence the acceptance of tropical fruit juices. Repeat purchase intention and consumption is determined more strongly by confirmation of taste expectations, rather than by perceived health and nutritional benefits and search attributes such as 'attractiveness'.

Interesting as the results might be, this research has some limitations. The main limitations are linked to the used research method and more specifically, their qualitative nature. A first limitation results from the selection of respondents. Therefore, findings are preliminary and can neither be extrapolated to the overall Belgian population, nor to populations in other European countries. A second limitation is that no specific elicitation techniques in an exploratory research phase were applied. As a result, important attributes determining consumers' expectations about tropical fruit juices may have been neglected in this study.

Despite the aforementioned limitations, the present study reveals some important issues dealing with the relationship between taste and product acceptance. The food industry must thus manage to respond with good-tasting products in order to achieve successful market integration of tropical fruit juices. This conclusion encloses important challenges for food product designers, food technologists and sensory scientists dealing with tropical fruit products that are expected to boom in the next couple of years.

ACKNOWLEDGEMENTS

This exploratory research was performed within the European Sixth Framework program and fits into the PAVUC project (Producing added value from under-utilised fruit crops with high commercial potential), under contract number FP-2003-INCO-DEV-2-015279. The funding by the European Union and more specifically by Chiquita fresh BVBA for the focus group discussions is gratefully acknowledged. More information about the project can be found on www.pavuc.soton.ac.uk.

REFERENCES

Baker, A.H. and Wardle, J. (2003) Sex differences in fruit and vegetable intake in older adults. *Appetite* 40, p. 269-275.

Brunsø, K., Fjord, T.A. and Grunert, K.G. (2002) Consumers' food choice and quality perception. MAPP, No. 77: working paper. Aarhus School of Business, Aarhus, Denmark, p. 60

Centeno, G. (2005) *El Mercado de las frutas tropicales exóticas en la Unión Europea*. CIMS, Costa Rica, p. 39.

Deliza, R., Rosenthal, A. and Silva, A.L.S. (2003) Consumer attitude towards information on non conventional technology. *Trends in Food Science and Technology* 14, p. 43-49.

Enneking, U., Neumann, C. and Henneberg, S. (2007) How important intrinsic and extrinsic product attributes affect purchase decision. *Food Quality and Preference* 18(1), p. 133-138.

FAO (2003) Tropical fruits – their nutrient values, biodiversity and contribution to health and nutrition. Intergovernmental group on bananas and on tropical fruits, third session, ftp.fao.org/unfao/bodies/ccp/ba-tf/04/j0715e.pdf (accessed 27 April 2007)

Kamphuis, C.B.M., Giskes, K., de Bruijn, G.J., Wendel-Vos, W., Brug, J. and van Lenthe, F.J. (2006) Environmental determinants of fruit and vegetable consumption among adults: A systematic review. *British Journal of Nutrition* 96(4), p. 620-635.

Kortbech-Olesen, R. (1996) Tropical fruit products: A well established market. *International Trade Forum* 3, p. 10-18.

Luckow, T. and Delahunty, C. (2004) Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference* 15(7-8), p. 751-759.

PAVUC (2007) Bibliographic review on chemical and biochemical composition of fruits. Technical report. PAVUC, Costa Rica, p. 50.

Pollard, J., Kirk, S.F.L. and Cade, J.E. (2002) Factors affecting food choice in relation to fruit and vegetable intake: A review. *Nutrition Research Reviews* 15, p. 373-387.

Poole, N.D., Martinez, L.M.-C. and Jiménez, F.V. (2007) Quality perceptions under evolving information conditions: Implications for diet, health and consumer satisfaction. *Food Policy* 32, p. 175-188.

Sabbe, S., Verbeke, W. and Van Damme, P. (2007a) Factors influencing the purchase of fresh and processed tropical fruit products: Exploratory research findings from Belgium. Paper presented at the 5th International Symposium on new crops and uses: their role in a rapidly changing world. CUC, Southampton, United Kingdom, p.24.

Sabbe, S., Verbeke, W. and Van Damme, P. (2007b) Confirmation/disconfirmation of consumers' expectations about fresh and processed tropical fruits. Working paper. Ghent University, Department of Plant Production, Ghent, Belgium, p. 37

Sabbe, S., Verbeke, W. and Van Damme, P. (2007c) Motives and barriers for tropical fruit consumption in Belgium: Exploratory findings. Working paper. Ghent University, Department of Plant Production, Ghent, Belgium, p.26.

Tuorila, H. and Cardello, A.V. (2002) Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference* 13, p. 561-569.

Verbeke, W. (2006) Functional foods: consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference* 17(1-2), p. 126-131.

von der Linden, U.M. (2004) Tropical Europeans. In: Murray, N. (ed.) *Foodnews Europe*, Agra Informa Ltd., United Kingdom, p. 4-10.

TECNOLOGÍAS PARA EL DISEÑO DE DERIVADOS LÁCTEOS FUNCIONALES

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS LÁCTEAS PARA LA OBTENCIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Dra Lourdes Amigo
Instituto de Fermentaciones Industriales-Csic- Madrid, España

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios sobre los péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas. Los péptidos biológicamente activos o péptidos bioactivos son fragmentos proteicos que, si bien se encuentran en estado inactivo dentro de la proteína precursora, una vez liberados mediante hidrólisis pueden ejercer distintas funciones biológicas en el organismo. De entre las actividades biológicas descritas en péptidos bioactivos, caben destacar la actividad antihipertensiva y la actividad antioxidante debido a la elevada incidencia de la hipertensión en la población de los paises desarrollados. Los péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas pueden obtenerse a escala industrial, principalmente mediante hidrólisis con enzimas digestivas, de origen microbiano o vegetal y por fermentación con cultivos lácteos iniciadores proteolíticos. En algunos estudios se ha visto que la combinación de estos procesos puede ser efectiva para la obtención de péptidos funcionales de pequeño tamaño.

Existen numerosos estudios en la bibliografía en los que se han llevado a cabo hidrólisis in vitro de leche y de preparaciones de caseínas totales, caseínas individuales, proteínas de suero, incluyendo, concentrados y aislados de proteínas de suero (WPCs y WPIs, respectivamente) y proteínas de suero individuales o fracciones enriquecidas de las mismas para la obtención de péptidos bioactivos. Con el objeto de emplear los peptidos bioactivos como ingredientes de alimentos funcionales encaminados a la prevención y tratamiento de la hipertensión hemos abordado la identificación de nuevos péptidos bioactivos obtenidos mediante hidrólisis enzimática de la caseína bovina y de las proteínas de suero lácteo.

La hidrólisis de la caseína bovina con pepsina durante 3 horas y la ultrafiltración del hidrolizado a través de membranas de 3000 Da ha permitido la obtención de péptidos con actividad IECA y antioxidante. Los fragmentos 90-94 y 143-149 de αs1-caseína y el fragmento 89-95 de la αs2-caseína mostraron una potente actividad IECA in vitro, siendo el primero de ellos, uno de los péptidos más activos descritos derivados de proteínas lácteas.

Por otro lado, las proteínas séricas como β-lactoglobulina y α-lactalbúmina presentan una estructura rígida que las hace menos susceptibles a la hidrólisis. Sin embargo, se han utilizado con éxito proteinasas de origen microbiano, como termolisina y proteinasa K, que han mostrado alta especificidad para la liberación de péptidos inhibidores de la ECA derivados de estas proteínas. Se han identificado los fragmentos 46-53, 58-61, 103-105 y 122-126 (LKPTPEGN, LQKW, LLF y LVRT, respectivamente) derivados de β-Lg caprina que exhiben valores de IC50 entre 34,7 y 2470 μM. Posteriormente, se ha observado, que se pueden favorecer la hidrólisis de la proteína β-Lg bovina por termolisina y la obtención de péptidos inhibidores de la ECA si se somete a altas temperaturas, entre 60 y 80ºC. De tal forma, que pueden quedar expuestos nuevos dominios de la proteína a la acción de la enzima. Además, han identificado el péptido LQKW en los hidrolizados de 20 y 30 min. cuando la proteína se incubó con termolisina a estas temperaturas.

Las potenciales aplicaciones de estos hidrolizados o de sus péptidos derivados como suplementos dietéticos, preparaciones farmacéuticas o ingredientes funcionales son de gran interés para la industria farmaceútica y alimentaria.

EL CASEINMACROPÉPTIDO UN PROMISORIO INGREDIENTE FUNCIONAL: PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y BIOACTIVAS.

Dr. Javier Fontecha y Ana Belén Martín-Diana
Instituto del Frío- Csic. Madrid, España

El caseinmacropéptido (CMP), es un péptido derivado de la hidrólisis de la κ-caseína (Phe105-Met106) por acción del cuajo, que tiene lugar durante la coagulación de la leche. El CMP (fragmento 106-169) difunde por la fase acuosa pudiendo llegar a constituir hasta el 15-25 % de la proteína total del suero. Se ha descrito como un péptido bioactivo que presenta un gran número de propiedades nutricionales y biológicas, entre las que destacan la ausencia de aminoácidos aromáticos en su composición (de importancia en enfermedades como la fenilcetonuria), su actividad antitrombótica, antihipertensiva, bifidogénica, etc.

Aprovechando las características de termoestabilidad del CMP y la modificación de su conformación estructural dependiente de pH, se ha desarrollado un procedimiento a escala piloto que permite obtener el CMP con un elevado rendimiento (69-76 %) y grado de pureza (75-90 %) a partir tanto de suero líquido de quesería como de concentrado de suero en polvo. La sencillez del proceso, con un único paso de ultrafiltración, y la ausencia de sustancias tóxicas, permitiría su aislamiento a gran escala para su aplicación industrial. Estas fracciones ricas en CMP, aisladas de suero de leche vaca, oveja y cabra, se han caracterizado a nivel físico-químico y cromatográfico y presentan características muy similares en cuanto al contenido en lactosa (7.1-11.2 %), proteína (75.7-78.9 %), y minerales (2%). Se han encontrado únicamente diferencias importantes en cuanto al porcentaje de grupos glicosilados (relacionados con algunas de las actividades biológicas), siendo el más alto en oveja (5.7%) seguido de vaca (3.3 %) y cabra (1.5%).

Por otra parte, se han determinado las propiedades funcionales de interés tecnológico de los diferentes aislados de CMP de vaca, oveja y cabra, con el fin de conocer sus características y aptitudes para su utilización industrial como aditivo. En comparación con el concentrado de proteínas de suero en polvo (WPC), ampliamente utilizado en la industria alimentaria, las fracciones ricas en CMP muestran una solubilidad similar (95%) pero mucho mas estable a distintas condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de proteína.

También se ha observado que poseen una excelente capacidad espumante pero una baja capacidad emulsionante aunque muy estable. La termoestabilidad de los aislados de CMP permite aumentar de forma importante la temperatura de estas soluciones sin modificar su solubilidad y viscosidad. Ha sido posible lograr la formación de estructuras gelatinosas consistentes utilizando solo la fracción de CMP aislado aunque para ello fueron necesarias elevadas concentraciones (aprox. 12 %).

Los estudios de viabilidad realizados con bacterias lácticas y bifidobacterias mostraron un aumento del crecimiento de estos microorganismos en aproximadamente una unidad logarítmica cuando se suplementaba la leche desnatada en polvo, utilizada como medio de cultivo, con un 2 % de la fracción aislada de CMP, principalmente si era obtenido a partir de suero de leche de oveja y cabra. Por otra parte, se ha confirmado la capacidad del CMP aislado de inhibir la formación de la placa dentaria, mediante la evaluación del grado de adhesión de Streptococcus mutans a superficies de plástico duro, encontrándose que la capacidad inhibitoria de adhesión también fue mayor en los CMP de oveja y cabra.

Los resultados obtenidos hacen pensar que las fracciones aisladas ricas en CMP, se podrían constituir como un posible aditivo, muy idóneo para formulaciones alimentarias y farmacológicas.

COLLOIDAL PROTEIN NANO AND MICROPARTICLES FROM WHEY BY HIGH-INTENSITY ULTRASOUNDS

Dra. Ana M. R. Pilosof

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

The knowledge of colloidal properties of biopolymers at the submicron scale allows the control and design of new food materials, to improve product functionality and delivery efficiency.

Two strategies may be used for the generation of colloidal submicron-particles: the top-down and the bottom-up strategies. The first way is to start with a bulk material and then break it into smaller pieces using mechanical, chemical or other form of energy (top-down). The bottom-up strategy involves the creation of particles by the spontaneous self-assembly of elementary units. Ultimately we are interested to control: particle size, particle shape, size distribution, particle composition and degree of particle agglomeration.

In this work we report the use of high-intensity ultrasounds (HIUS) as a novel top-down way to create whey proteins (WPI) particles at the submicron or micron scale. Mean particle size and polydispersity were evaluated by light scattering techniques. Confocal microscopy was also used as a complementary technique to assess size, shape and the tendency to flocculate.

Because of cavitation, the application of HIUS at room temperature, causes the decrease in the size of WPI particles and an increase of their roundness. By heating at temperatures close to the denaturation temperature of WPI while applying HIUS, it was possible to control the size and polydispersity of particles at the micron scale. Moreover, a similar result may be obtained by submitting a pre-gelled WPI to HIUS. However confocal microscopy images revealed a strong tendency to flocculate.

In conclusion, HIUS is a potential technique for the control of particle size, polidispersity and shape of protein particles at the micron or submicron level.

FRITURA DE ALIMENTOS

APPLICATION OF EDIBLE COATINGS IN FRIED FOODS

Bertolini Suárez, R.[1] , Campañone, L.A. [1,2], García, M. A.[1] and Zaritzky N.E.[1,2,*]
[1] Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos,CONICET, 47 y 116, La Plata (1900), Argentina.[2] Departamento Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional La Plata, Argentina.

ABSTRACT.

The great volume of production of fried foods enhances the study of frying process because of its strong economic and nutritional impact. An alternative to reduce oil uptake in fried foods is the use of edible films or coatings. In the present work, the effect of an edible methylcellulose coating to reduce oil uptake during frying was analyzed on a dough system. The oil uptake reduction was 30% for coated dough discs compared to uncoated ones. The coating did not modify the water content of the samples, due to the hydrophilic characteristics of the coating that led to poor water vapor barrier properties. Thermal histories and water contents of coated and uncoated samples were similar.

With reference to the quality attributes (color and texture) of the fried dough discs, firmness increased as a function of frying time due to the formation of a dehydrated zone. Values of Chroma parameters and color differences (ΔE) also increased during this period. In all cases, the panellists could not distinguish between control and coated samples.A mathematical model of the frying process for uncoated and coated samples, based on the numerical solution of the heat and mass transfer partial differential equations under unsteady state conditions was solved using measured physical and thermal properties. The model allowed to simulate satisfactorily the experimental data of temperature and water content during the different frying stages and to predict both the position of the vaporization front and the thickness of the dehydrated zone as a function of frying time. Water content correlated linearly with the vaporization front position which corresponds to the thickness of the humidity core. Oil uptake (OU) that occurs when the sample is removed from the frying medium was correlated with the thickness of the dehydrated zone. Microstructural changes during frying were analyzed by SEM (scanning electron microscopy).The coating reduced oil uptake becoming a mechanical barrier to lipids.

INTRODUCTION

An alternative to reduce oil uptake in fried foods is the use of edible films or coatings. The application of hydrocolloid coatings allows to reduce oil content of deep-fat fried products due to its lipid barrier properties (Williams & Mittal, 1999 a and b; Mellema, 2003). Cellulose derivatives, including methylcellulose (MC) and hydroxypropyl-methylcellulose (HPMC) exhibit thermogelation; when suspensions are heated they form a gel that reverts below the gelation temperature, and the original suspension viscosity is recovered. Mallikarjunan et al. (1997) and Huse et al. (1998) demonstrated the effectiveness of various edible coatings in reducing oil absorption in starchy products.

Frying phenomena occur during the immersion of the product in oil at a temperature of 150-200 ºC, where a simultaneous heat and mass transfer take place (Singh, 1995; Aguilera & Hernández, 2000). The mechanism of oil penetration is a subject of controversy (Pinthus & Saguy, 1994; Ufheil & Escher, 1996; Kassama, 2003; Mellema, 2003). Many researchers have suggested that oil absorption on the surface of the fried product occurs when samples are removed from the frying medium (Moreira & Barrufet, 1998; Yamsaengsung & Moreira, 2002 a and b; William & Mittal, 1999; Perkins & Erickson, 1996; Bouchon et al., 2003; Bouchon & Pyle, 2005 a and b). Conditions at which products are removed from the frying oil seem decisive for the uptake of oil; this would be related to the adhesion of oil to the surface and draining phenomena.

Several models have been developed for heat, moisture and fat transfer during frying of foods (Ni & Datta, 1999; Yamsaengsung & Moreira, 2002 a and b). Ateba and Mittal (1994) developed a model for heat, moisture and fat transfer in deep-fat frying of beef meatballs. Farkas, Singh and Rumsey (1996 a and b) developed a model for frying considering heat and moisture transfer and Singh (2000) treated the crust as a moving boundary.

The objectives of the present work were:

1. To analyze the performance of applying an edible coating based on methylcellulose (MC) on a food model dough system by measuring moisture content and oil uptake in deep-frying process.
2. To compare the quality attributes of the fried coated and uncoated products evaluating texture and color and to observe by Scanning Electron Microscopy the surface microstructure of coated and uncoated fried products at different processing times to assess the effect of the MC coating.
3. To model heat and moisture transfer during the deep-fat frying process of food systems (with and without MC coating), solving numerically the partial differential equations that allow to predict temperature profiles and water concentrations, as a function of operating conditions.
4. To validate experimentally the mathematical model evaluating the temperature profiles and the water losses.
5. To relate oil uptake measurements after the frying process with the effect of frying time on sample microstructural changes and the growth of the dehydrated zone.

MATERIALS AND METHODS

The model dough system used was prepared with 200 g refined wheat flour (Molinos Río de La Plata, Argentina) and 110 ml distilled water, approximately. From the obtained dough, discs of 60 mm in diameter and 7 mm thick were cut and immediately used. For each experiment, 6 control and 6 coated discs were fried. The edible coating was formulated with Methylcellulose, MC, (A4M, Methocel) provided by COLORCON S.A. (Argentina). A 1% (w/w) MC aqueous solution was used and 0.75 % (w/w) sorbitol (Merck, USA) was added as plasticizer. MC and sorbitol concentrations were selected in a previous work (Garcia et al., 2002).Dough samples were dipped in the coating suspensions for 30 s and immediately fried. Uncoated (control) and coated samples were fried in a controlled temperature deep-fat fryer (Yelmo, Argentina) filled with 1.5 L of commercial sunflower oil (AGD, Córdoba, Argentina). Oil composition was 99.93% lipids, with 25.71% mono-unsaturated and 64.29% poly-unsaturated fatty acids. Used oil was replaced by fresh oil after four frying batches; in each batch up to four dough discs were fried, maintaining in all experiments the same product-oil volume ratio. Different constant frying temperatures were tested to select the working frying conditions according to sample characteristics. These temperatures ranged between 150±0.5°C and 170±0.5°C; frying times ranged between 5 and 15 min. Sample temperatures of coated and uncoated samples as a function of frying time were measured using copper-constantan thermocouples. Temperature measurements in the center of the dough were performed by introducing the thermocouple carefully through the disc from the border towards the center; besides, the temperature of an internal sample point and the temperature of the frying medium were also recorded. Temperatures were measured and recorded each 5 seconds using type T thermocouples linked to a data acquisition and control system Keithley KDAC Series 500 (Orlando FL, USA).

Optimum time-temperature frying conditions were determined by a non-trained sensory panel of 6 members; panelists judged color, flavor, texture and overall appearance of the samples as described in a previous work (García et al., 2002). Scanning electron microscopy (SEM) of coated and uncoated samples was performed with a JEOL JSMP 100 scanning electron microscope (Japan). Coated pieces were mounted on bronze stubs using double-sided tape and then coated with a layer of gold (40-50 nm). All samples were examined using an accelerating voltage of 5 kV. The microstructure of the fried samples was also analyzed using an environmental electronic microscope Electroscan ESEM 2010 (ESEM, Environmental Scanning Electron Microscopy). The effects of frying time and coating application on the structure were studied.

Systat-software (SYSTAT, Inc., Evanston , IL, USA, 2001) version 10.0 was used for all statistical analysis. Analysis of variance (ANOVA), non linear regression analysis and Fisher LSD mean comparison test were applied. The significance levels used were 0.05 and 0.01.

Quality attributes of coated and uncoated dough

To evaluate whether MC coating application affected the quality attributes, color and texture parameters of coated and uncoated fried dough samples, were analyzed.Colorimetric assays were carried out with a Minolta colorimeter CR 300 Series (Japan) .The CIELab scale was used, lightness (L^*) and chromaticity parameters a* and b* were measured. L^*, C^* (chroma), H^o (Hue) and color differences (ΔE) were also calculated.

To analyze the effect of frying on texture, breaking force of samples was measured using puncture test with a texture analyzer TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Haslemere, Surrey, UK) with a 5 kg cell. Samples were punctured with a cylindrical plunger (2 mm diameter) at 0.5 mm/s. Maximum force at rupture was determined from the force-deformation curves. At least 10 samples were measured for each assay. Samples were allowed to reach room temperature before performing the tests.

Water content and Oil uptake determinations

Water content (WC) was determined measuring weight loss of fried products, upon drying in an oven at 110°C until constant weight (García et al., 2002). At different frying times the relative variation of water retention % (WR) in the coated product relative to the uncoated one was calculated as follows:

$$WR = \left(\frac{WC_{coated}}{WC_{uncoated}} - 1 \right) \times 100 \qquad (1)$$

For each frying time condition, results were obtained using all the samples from at least two different batches. The equilibrium water content was defined as the humidity reached at long frying times (1080 s).

Oil uptake (OU) of fried products was determined measuring the lipid content of dried samples using a combined technique of successive batch and semi-continuous Soxhlet extractions. The first batch extraction was performed with petroleum ether: ethylic ether (1:1) followed by a Soxhlet extraction with the same mixture and another with n-hexane. Oil uptake relative variation % (OUR) in the coated product relative to the uncoated one was calculated as follows:

$$OUR = \left(1 - \frac{OU_{coated}}{OU_{uncoated}} \right) \times 100 \qquad (2)$$

For each frying time condition, results were obtained using all the samples from at least two different batches.

Mathematical model of heat and moisture transfer during frying process of a dough system

Deep-fat frying is a complex process that involves simultaneous heat and mass transfer. The process induces a variety of physicochemical changes in both the food and the frying medium. A mathematical model of the frying process was proposed based on the numerical solution of heat and mass transfer partial differential equations under unsteady state conditions. The frying process was modeled in dough discs with and without coating. Discs were considered as infinite slabs and unidirectional, heat and mass transfer equations were solved for $0 \leq x \leq L$. In the proposed model, different stages were considered.

Stage 1: represents the initial heating of the product in which energy and mass transfer between the product and the frying oil occurs. The model considered an initial uniform temperature distribution in the sample (T_{ini}). The microscopic energy balance was solved to obtain the temperature profiles:

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) \qquad (3)$$

Thermal properties corresponded initially to the raw dough however they changed with temperature and moisture content because an internal core and a dehydrated zone are formed during frying. (Table 1).

Table 1: Core, dehydrated zone, and oil properties used in the model.

Property	Core zone	Dehydrated zone	Sunflower oil
Initial water content	0.42	-	-
Density, (kg / m^3)	623 [d]	579 [a]	876 [e]
Thermal Conductivity, (W/(m K))	0.6 [d]	0.05 [a]	0.6 [e]
Specific heat, (J/kg °C)	2800 [d]	2310 [a]	2033 [e]
Porosity	-	0.42 [b]	-
Tortuosity	-	8.8 [b]	-
Diffusion coefficient of vapor in air (dehydrated zone), (m^2/s)		$\frac{5.68\,10^{-5}(T+273.16)^{1.5}}{1.789-2.1310^{-3}(T+273.16)}$	
Moisture diffusion coefficient in dough (core zone), (m^2/s)		$2\,10^{-9\,f}$	

[a]Rask C (1989); [b]. this work; [e]. Moreira R et al. (1999); [d]. Zanoni et al. (1995); [e]. Bird, Stewart and Lightfoot (1976); [f] Tong et al. (1990).

The initial and boundary conditions were:

$$t = 0 \qquad T = T_{ini} \qquad 0 \leq x \leq L \qquad (4)$$

$$x = 0 \qquad \frac{\partial T}{\partial x} = 0 \qquad t > 0 \qquad (5)$$

$$x = L \qquad -k \frac{\partial T}{\partial x} = h_1 (T - T_{oil}) + L_{vap}\, m_{vap,1} \qquad t > 0 \qquad (6)$$

where $m_{vap,1}$ is the water flux from the product and h_1 is the convective heat transfer coefficient. The heat transfer mechanism in the oil was considered governed by natural convection (h_1 = 50 W/m^{2}K).

In order to evaluate water profiles the microscopic mass balance was solved:

$$\frac{\partial C_w}{\partial t} = \nabla(D_w \nabla C_w) \qquad (7)$$

The following initial and boundary conditions were considered:

$$t = 0 \qquad C_w = C_{w,ini} \qquad 0 \le x \le L \qquad (8)$$

$$x = 0 \qquad \frac{\partial C_w}{\partial x} = 0 \qquad t > 0 \qquad (9)$$

$$x = L \qquad -D_w \frac{\partial C_w}{\partial x} = m_{vap,1} \qquad t > 0 \qquad (10)$$

$m_{vap,1}$ is calculated from eq. (10) with C_w =0 at the sample/oil interface , because it was considered that water evaporates and immediately leaves the frying medium. For each time interval the model calculated the average values of moisture content

Stage 2: Water boiling is produced on the surface and a dehydrated layer is formed in the external zone of the product, having different thermo-physical and transport properties from those of the wet core (Table 1). Several authors (Farkas et al., 1996 a b; Ni & Datta, 1999; Bouchon et al., 2003; Bouchon & Pyle, 2005 a and b) used the denomination of crust for the dehydrated zone. In the present work we considered that crust is only the portion of the dehydrated zone containing oil. When water on the surface is no longer available, vaporization occurs in a front that moves towards the inner zone of the product. During this phase of the frying process, the vapor being released from the product surface impedes oil penetration into the product (Singh, 1995; Aguilera & Hernández, 2000; Kassama, 2003). Microscopic energy balances given by Eq. (3) were solved for both (core and dehydrated) zones to obtain temperature profiles, considering the corresponding thermal properties (Table1).

The initial temperature profile in this stage was given by the final profile obtained at the end of Stage 1. The following boundary conditions were applied:

$$x = 0 \qquad \frac{\partial T}{\partial x} = 0 \qquad t > 0 \qquad (11)$$

$$x = x_1 \qquad T = T_{vap} \qquad t > 0 \qquad (12)$$

$$x = L \qquad -k_d \frac{\partial T}{\partial x} = h_2 (T - T_{oil}) \qquad t > 0 \qquad (13)$$

where x_1 is the position of the vaporization front (measured from the center of the slab).Besides the thickness of the dehydrated zone (d_T), measured from the sample/oil interface can be calculated as $d_T = L - x_1$.Values of the heat transfer coefficient (h_2) higher than 250 W/m^{2}K were found in literature for the whole frying process (Costa et al., 1998; Dagerskog & Sorenfors, 1978; Moreira et al., 1995). These high heat transfer coefficients allowed us to assume a constant temperature at the product oil interface.

Moisture content decreased due to water vaporization; vapor diffused through the dehydrated zone which was considered as a porous medium.

The following mass balance was solved in the dehydrated zone:

$$m_{vap,2} = -D_v \frac{\partial C_v}{\partial x} \qquad (14)$$

where the effective diffusion coefficient is

$$D_v = D_{va} \frac{\varepsilon}{\tau}$$

The following conditions were considered:

$$x = x_1 \qquad C_v = C_{v,equi} \qquad (15)$$

$$x = L \qquad C_v = 0 \qquad (16)$$

where $C_{v,equi}$ is the equilibrium vapor concentration at T_{vap}, it was calculated using Clausius Clapeyron equation assuming ideal gas behavior for the water vapor. To calculate the position of the vaporization front as a function of time, the following equation was proposed:

$$-C_{w,ave} \frac{dx_1}{dt} = -D_v \frac{\partial C_v}{\partial x} \qquad (17)$$

When the vaporization front reaches the center of the fried product, the dehydrated food increases its temperature until the process is completed. Water transfer is absent and the moisture content corresponds to the bound water.

Stage 3: The final step corresponds to the cooling of the fried product when it is removed from the hot oil medium. The energy balance (Eq. 3) was solved with the boundary condition (Eq. 5) and considering a natural convection heat transfer coefficient (h_3= 10 W/m^{2}K) at the food-air interface, as follows:

$$x = L \qquad -k_d \frac{\partial T}{\partial x} = h_3 (T - T_a) \qquad t > 0 \qquad (18)$$

In this step the oil uptake is produced.Previous works (Garcia et al., 2002 and 2004) showed that the average coating thickness determined by SEM was approximately 10 µm. Then, the same heat transfer equations were applied for coated and uncoated products. Besides, since methylcellulose coating is a hydrophilic polymer, poor water vapor barrier properties were expected. Considering this assumption, water transfer was described using the same equations as for uncoated systems. The mathematical model was solved for the different stages. The microscopic energy and mass balances led to a system of coupled non-linear partial differential equations. The system was solved by an Implicit Finite-Differences Method (Crank-Nicolson centered method).. The complete solution was codified in a Fortran 90 program.

RESULTS AND DISCUSSION

Frying conditions determine sensory characteristics and consumer acceptability of fried products. Sensory characterization was performed to select time-temperature conditions. In all cases, panelists could not distinguish between the coated and the uncoated samples. Sensory analysis (color, flavor, texture and overall appearance) determined that 12 min at 160±0.5°C were the best frying conditions for dough discs. Besides this was the time required to complete starch gelatinization in dough discs (confirmed by microscopy observation) and consequently fried samples could be considered cooked.

Comparison of the experimental moisture content and oil uptake of coated and uncoated fried products

MC coatings reduced the lipid content of dough discs significantly ($P<0.05$); the oil uptake was 30% lower than that corresponding to uncoated samples (Table 2).. This result was attributed to the presence of hydrocolloid films acting as lipid barriers, particularly MC due to its thermal gelation properties. The oil uptake of coated and uncoated dough discs at each frying time are shown in Table 2. The final lipid content values, at long frying times, were 0.0894 g oil/ g dry solid for uncoated samples and 0.0626 g oil / g dry solid for coated ones. Results showed that the ratio between the lipid content (dry basis) of uncoated and coated samples was 1.4 at 1080 s., verifying that the MC coating acted as an effective oil barrier.

Table 2: Lipid and water contents of uncoated and coated dough discs as a function of frying time

Time (s)	OU of uncoated samples (g oil/g dry solid)	OU of coated samples (g oil/g dry solid)	WC of uncoated samples (g water/g dry solid)	WC of coated samples (g water/g dry solid)	WR,water retention relative variation (%)	OUR (%)
0	0.00	0.00	0.721±0.043	0.786±0.059	9.09	---
180	0.053±0.010	0.045±0.010	0.492±0.017	0.477±0.013	-3.06	14.07
360	0.058±0.016	0.049±0.001	0.356±0.013	0.352±0.012	-1.05	15.36
540	0.073±0.008	0.054±0.001	0.300±0.013	0.296±0.007	-1.34	26.36
720	0.074±0.016	0.053±0.006	0.253±0.037	0.200±0.006	-21.12	29.07
900	0.082±0.017	0.062±0.013	0.142±0.016	0.159±0.016	11.43	24.62
1080	0.089±0.005	0.063±0.005	0.157±0.005	0.170±0.004	8.03	29.91

With regard to water content, non significant differences ($P>0.05$) were detected between coated and uncoated discs (Table 2); this could be attributed to the poor water vapor barrier of MC films. The equilibrium water content values, which correspond to bound water, were 0.157 g water / g dry solid and 0.1695 g water / g dry solid for uncoated and coated samples, respectively.

Quality attributes of fried coated and uncoated samples

During the cooking process (for $t < 720$ s) similar values of maximum force were obtained for coated and uncoated fried samples. In all cases, the maximum force to puncture the samples increased as a function of frying time, due to the formation of a dehydrated zone. Non significant ($P>0.05$) differences were observed in the analyzed color parameters of coated and uncoated dough discs. Chromaticity parameter b*increased significantly ($P<0.05$) with frying time, while lightness (L^*) and chromaticity parameter a* were independent of frying time. Besides, Chroma parameter and color differences (ΔE) increased and Hue decreased significantly ($P<0.05$) as a function of frying time for $t< 720$ s.

Microstructure analysis of the coated and uncoated fried products

Scanning electron microscopy techniques (SEM and ESEM) were used to observe the structure of the fried dough. The micrographs demonstrated that MC coating was getting dehydrated during the frying process and remained attached to the surface of the product, explaining the lower lipid content of the coated product. The thickness of the coating was measured on the micrographs obtaining values ranging between 9 and 24 μm after 12 min. of frying. The addition of plasticizer (sorbitol) to MC coatings was necessary to achieve coating integrity (García et al., 2002). Formation of a uniform coating on the surface of the sample is essential to limit mass transfer during frying. The coating did not prevent the formation of a dehydrated zone on the surface of the dough. The release of water vapor led to the formation of blisters at the outer surface of the crust being smaller in size and number in the coated doughs than in uncoated ones. In the first period of frying, the MC coating loses its water, the dough keeps its humidity and the starch gelatinizes with a higher water content than in uncoated doughs, leading to a more compact network. During frying in both coated and uncoated systems, the core was progressively dehydrated and starch gelatinization was completed at 12 minutes.

Comparison of the experimental and simulated thermal histories and moisture content during frying:

Experimental thermal histories of coated and uncoated samples did not differ significantly ($P>0.05$). Fig. 1a shows the measured values (symbols) at the center and in an inner point (1.6 mm from the center). After 120 s a constant temperature of 100.5 °C was reached at the core. The core temperature remained constant due to water evaporation while the temperature in the dehydrated zone increased up to the end of the process (15minutes). A cooling period could be observed when the product was removed from the fryer. In the same Fig. 1a, simulated temperatures using the proposed model are shown (lines), and a good agreement with the experimental thermal histories is observed.

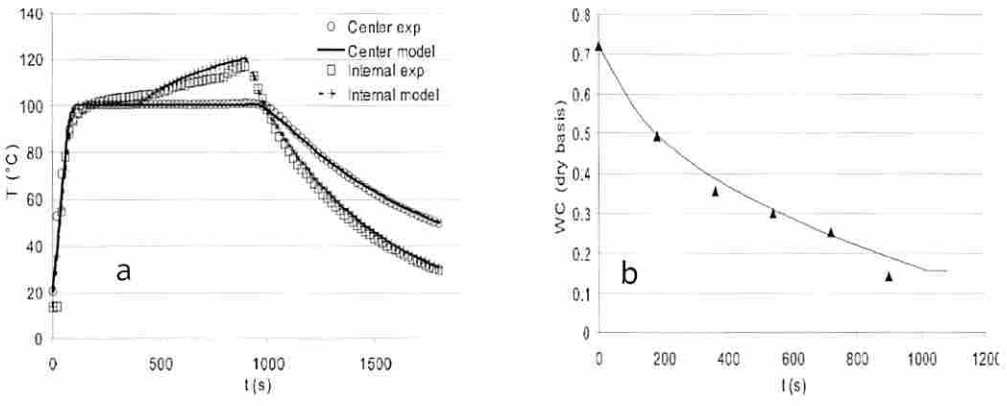


Figure 1. a) Thermal histories of the fried product at the center and in an internal point (1.6 mm from the border) along the frying stages; b) Water content along the different frying stages. Experimental data (symbols) and numerical simulations (lines), L= 3.57mm, T_{ini}= 20 °C.

The presence of the coating did not change the moisture content of the samples during frying. Simulated and experimental water concentrations vs. frying times are shown in Fig. 1b and a good agreement was achieved. The assumption of a negligible barrier effect of the hydrophilic MC coating on water transfer was verified.It must be emphasized that the mathematical model was only fed with properties obtained from the literature and that the tortuosity factor was the unique adjusted parameter in the water vapor effective diffusion coefficient.

The mathematical model was also validated on dough discs of 60 mm diameter and 5 mm thickness using the tortuosity value previously obtained; temperature profiles and water contents were satisfactorily predicted.

Fig. 2 a) shows the predicted position of the vaporization front as a function of frying time. At 15 minutes of process, the vaporization front reached the center of the product, and the humidity corresponded to the bound water. Water content correlated linearly with the position of the vaporization front x_I that corresponds to the thickness of the humidity core.

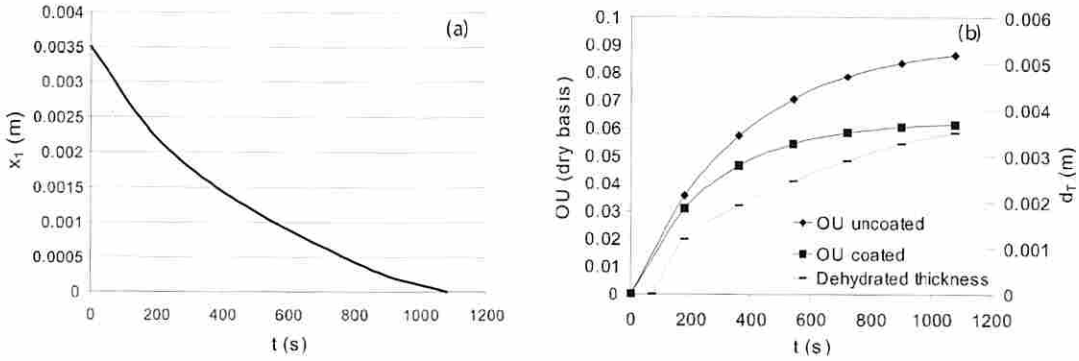


Figure 2. a) Position of the vaporization front as a function of frying time measured from de center of the product (x=0); b) Oil uptake of uncoated and coated samples and dehydrated zone thickness ($d_T = L-x_I$) as a function of frying time; d_T curve is the same for coated and uncoated samples.

Relationship between oil uptake and microstructure changes during the frying process

Oil uptake depends on structural changes during the frying process; differences in the starting food microstructure can be expected to be important determinants in the evolution of the characteristics of the end product. Microstructural changes were produced during frying time; the dehydrated zone increased allowing the oil retained by the surface to penetrate into the pores formed by water evaporation.The mathematical model solved in the present work, allowed to estimate the thickness of the dehydrated zone ($d_T = L - x_I$). Fig. 2b) shows oil uptake vs. frying time curves for both coated and uncoated samples and also the growth of the dehydrated zone with frying time. The predicted d_T (dehydrated zone thickness) curve as a function of time is the same for coated and uncoated samples, according to the proposed mathematical model.

Results of Fig.2b) allowed to correlate oil uptake (OU) with the thickness of the dehydrated zone (d_T). A linear relationship between the oil uptake and the dehydrated zone thickness was maintained up to OU values of 0.031 (g/ g dry solid) and 0.071 (g/ g dry solid) for both coated and uncoated samples respectively.Values of OU for coated samples were lower than those of uncoated ones. For low d_T values, the oil retained by the surface could be incorporated into the dehydrated zone, when the sample was removed from the frying medium. When the dehydrated zone was large, a deviation from the linear behavior was observed. This could be attributed to the fact that the amount of oil retained at the sample surface is limited, being the oil surface wetting the property related to the interfacial tension, governing these phenomena (Kassama, 2003).The presence of MC coating with thermal gelation properties, modified the surface wetting and also became a mechanical barrier leading to a decrease in the OU of the coated samples.

CONCLUSIONS

The application of MC coatings reduced significantly ($P<0.05$) the oil content of dough discs with regard to control ones, reaching a decrease of 30 %. However, the coating did not modify the water content of the samples; this was attributed to the hydrophilic characteristics of the films that led to poor water vapor barrier properties. Besides thermal histories of coated and uncoated samples were similar. During the frying process, (for $t <$ 720 s) differences between the color parameters and firmeness values of coated and uncoated samples were not significant and the panellists could not distinguish between control and coated samples. Scanning electron microscopy techniques showed the integrity of the MC coating and good adhesion to the fried dough after its dehydration during deep oil frying process. A mathematical model of the frying process for uncoated and coated samples based on the numerical solution of the heat and mass transfer differential equations under unsteady state conditions was proposed and solved using measured physical and thermal properties. It allowed to simulate satisfactorily the experimental data of temperature and water content during the different frying stages.The model allowed to predict the position of the vaporization front and the thickness of the dehydrated zone as a function of frying time. Water content correlated linearly with the vaporization front position that is equivalent to the thickness of the humidity core.Oil uptake (OU) that occurs when the sample is removed from the frying medium was correlated with the thickness of the dehydrated zone; a linear behavior was held for the initial frying period. However, deviations were observed when the thickness of the dehydrated zone increased. This could be attributed to the fact that the amount of oil retained at the sample surface is determined by the surface tension property. OU was also linearly correlated with water loss at the initial frying stage. The presence of MC coating reduced the oil uptake due to the thermal gelation behavior, modifying the wetting properties and also becoming a mechanical barrier to the oil.

REFERENCES

Aguilera, J.M., & Hernández, H. G. 2000. Oil absorption during frying of frozen parfried potatoes. Journal of Food Science, **65** (3): 476-479.

Ateba, P., & Mittal, G.S. 1994. Modelling the deep-fat frying of beef meatballs. *International Journal of Food Science and Technology* **29**: 429-440.

Bird, R.B., Stewart, W.E., & Lightfoot, E.N. 1976. *Transport phenomena.* John Wiley and Sons, New York

Bouchon, P., Aguilera, J.M., & Pyle, D.L. 2003. Structure oil-absorption relationships during deep-fat frying. *Journal of Food Science.* **68**(9): 2711-2716.

Bouchon, P., & Pyle, D.L. 2005 a. Modelling oil absorption during post-frying cooling, I: Model development. *Trans IChemE, Part C, Food and Bioproducts Processing*, **83**(C4): 1-9.

Bouchon, P., & Pyle, D.L. 2005 b. Modelling oil absorption during post-frying cooling, II: Solution of the mathematical model, model testing and simulations. *Trans IChem, Part C, Food and Bioproducts Processing*, **83**(C4): 1-12.

Costa, R.M., Oliveira, F.A.R., Delaney, O. & Gekas, V. 1998. Analysis of heat transfer coefficient during potato frying. *Journal of Food Engineering*, **39**: 293-299.

Dagerskog, M., & Sorenfors, P. 1978. A comparison between four different methods of frying meat patties: Heat transfer, yield, and crust formation. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **11**: 306-311.

Farkas, B.E., Singh, R.P., & Rumsey, T.R. 1996 a. Modeling heat and mass transfer in immersion frying. I. Model development. *Journal of Food Engineering*, **29**: 211-226.

Farkas, B.E., Singh, R.P., & Rumsey, T.R. 1996 b. Modeling heat and mass transfer in immersion frying. II. Model solution and verification. *Journal of Food Engineering*, **29**: 227-248.

García, M.A., Ferrero, C., Bértola, N, Martino, M., & Zaritzky, N. 2002. Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **3**: 391-397.

García, M.A., Ferrero, C., Bértola, N, Martino, M., & Zaritzky, N. 2004. Methylcellulose coatings reduce oil uptake in fried products. *Food Science and Technology International*, **10** (5): 339-346.

Huse, H.L., Mallikarjunan, P., Chinnan, M.S., Hung, Y.C., & Phillips, R.D. 1998. Edible coatings for reducing oil uptake in production of akara (deep-fat frying of cowpea paste). *Journal of Food Processing and Preservation*, **22**: 155-165.

Kassama, L.S. 2003. *Pore development in food during deep-fat frying*. Department of Bioresource Engineering, Macdonald Campus of McGill University, Quebec, Canada.

Mallikarjunan, P., Chinnan, M.S., Balasubramaniam, V.M., & Phillips, R.D. 1997. Edible coatings for deep-fat frying of starchy products. *Lebensmittel.-Wissenschaft und Technologie*, **30**: 709-714.

Mellema, M. 2003. Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends in Food Science and Technology*,. **14**: 364-373.

Moldrup, P., Olesen, T., Komatsu, T., Schjonning, P., & Rolston, D.E. 2001. Tortuosity, diffusivity and permeability in the soil liquid and gaseous phases. *Soil Science Society American Journal:* 613-623.

Moreira, R.G., Palau, J., Sweat, V.E., & Sun, X. 1995. Thermal and physical properties of tortilla chips as a function of frying time. *Journal of Food Processing and Preservation*, **19**: 175-189.

Moreira, R.G., & Barrufet, M.A. 1998. A new approach to describe oil absorption in fried foods: a simulation study. *Journal of Food Engineering*, **31**: 485-498.

Moreira, R.G., Castell-Perez M.E., & Barrufet, M.A. 1999. *Deep fat frying: fundamentals and applications*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.

Ni, H., & Datta, A.K. 1999. Moisture, oil and energy transport during deep-fat frying of food materials. *Trans IChemE, Part C, Food Bioprod Proc.*, **77**: 194-204.

Perkins, E.G., & Erikson, M.D. 1996. *Deep Frying: Chemistry, Nutrition, and Practical Applications*. Champaign, Il: AOCS press.

Pinthus, E.J., & Saguy, I.S. 1994. Initial interfacial tension and oil uptake by deep-fat fried foods. *Journal of Food Science*, **59**(4): 804-807.

Rask C. 1989. Thermal properties of dough and bakery products: a review of published data. *Journal of Food Engineering:* 167-193.

Singh, R. P. 1995. Heat and mass transfer in foods during frying. *Food Technology*, **49** (4): 134-137.

Singh, R. P. 2000. Moving boundaries in food engineering. *Food Technology*, **54** (2): 44-53.

Tong, C.H., & Lund, D.B. 1990. Effective moisture diffusivity in porous materials as a function of temperature and moisture content. *Biotechnology Progress*, **6**: 67-75.

Ufheil, G., & Escher, F. 1996. Dynamics of oil uptake during deep-fat frying of potato slices. *Lebensmittel-Wissenshaft und Techonolgie*, **29**(7): 640-644.

Williams, R., & Mittal, G.S. 1999 a. Water and fat transfer properties of polysaccharide films on fried pastry mix. . *Lebensmitte.-Wissenschaft und Technologie*, **32**: 440-445.

Williams, R., & Mittal, G.S. 1999 b. Low-fat fried foods with edible coatings: modeling and simulation. *Journal of Food Science*, **64**(2): 317-322.

Yamsaengsung, R., & Moreira, R.G 2002 a. Modeling the transport phenomena and structural changes during deep-fat frying. Part I Model development. *Journal of Food Engineering*, **53**: 1-10.

Yamsaengsung, R., & Moreira, R.G 2002 b. Modeling the transport phenomena and structural changes during deep-fat frying. Part II Model solution and validation. *Journal of Food Engineering*, **53**: 11-25.

Zanoni, B., Peri, C., & Gianotti, R. 1995. Determination of the thermal diffusivity of bread as a function of porosity. *Journal of Food Engineering*, **26**: 497-510.

LA FRITURA AL VACÍO

J. Bravo[1], J. Ruales[1], G. Clemente[2] y N. Sanjuán[2]
[1]Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología, Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador
[2]Grupo ASPA. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
jebravo@tal.upv.es; jbravo@pi.pro.ec.

INTRODUCCIÓN.

La gran expansión de la utilización de la fritura se debe principalmente a que los alimentos, tras este proceso, adquieren unas características únicas de aroma y textura que no es posible conseguir con otras técnicas de procesado de alimentos (Saguy y Dana, 2003). Un efecto adicional es la preservación de los mismos, como resultado de la destrucción de los microorganismos y enzimas por efecto del calor y de la reducción de la actividad de agua, sea en la superficie o dentro del alimento, cuando éste se procesa en finas rodajas (Fellows, 1998).

La fritura con aceite a alta temperatura determina una considerable absorción de éste y una pérdida de vitaminas, por lo que puede resultar que el producto sea mas difícil de digerir y menos nutritivo. Además, en los últimos años la tendencia de los consumidores hacia alimentos bien con bajo contenido o bien libres de grasa ha forzado a la industria de los aperitivos (*snacks*) a producir alimentos con estas cualidades, pero que a la vez mantengan su sabor y textura característicos (Garayo y Moreira, 2002). De ahí que las investigaciones encaminadas a reducir los niveles de contenido de grasa en los alimentos fritos hayan recobrado fuerza, ya sea modificando las condiciones de proceso, modificando el medio de fritura o aplicando ciertos pretratamientos al alimento como escaldado, inmersión en soluciones azucaradas o coberturas comestibles (García *et al.*, 2002; Mellema, 2003; Rimac *et al.*, 2004; Pedreschi y Moyano, 2005; Pedreschi *et al.*, 2005).

La fritura al vacío destaca entre los procesos estudiados para conseguir dichos objetivos de mejora de la calidad. En esta operación el alimento se procesa a presión subatmosférica en un sistema cerrado, lo que permite disminuir la temperatura de ebullición del agua y por tanto la temperatura del aceite. De esta forma, el agua contenida en el alimento se elimina rápidamente cuando el aceite alcanza la temperatura de ebullición del agua (Shyu *et al.*, 2005). Otra ventaja de la fritura al vacío es que conserva mejor el color y sabor naturales de los alimentos por la baja temperatura y el bajo contenido de oxígeno, lo cual beneficia también a la conservación del aceite, al prolongarse su vida útil (Liu-Ping *et al.*, 2005b).

La fritura a vacío, por utilizar una tecnología que todavía no está ampliamente extendida en el mercado, se dirige a obtener productos tipo *snacks* de alimentos cuya calidad puede verse afectada por las altas temperaturas, como son frutas y vegetales.

PROCESO

El proceso de fritura al vacío es básicamente el mismo que el de la fritura convencional pero en este caso se efectúa en un sistema cerrado, lo que permite reducir la presión hasta niveles considerablemente inferiores a la presión atmosférica. Además, hay que tener en cuenta los tratamientos previos y posteriores que se aplican al alimento.

En la figura 1 se presenta un esquema general del proceso de fritura al vacío adaptado de otros trabajos publicados (Shyu y Hwang, 2001; Garayo y Moreira, 2002; Shyu *et al.*, 2005). que evidentemente puede ser diferente en algunos casos, principalmente en lo que respecta al pretratamiento.

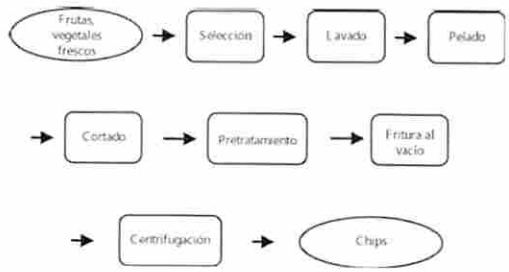


Figura 1. Esquema del proceso de fritura al vacío.

Transferencia de agua.

En la fritura al vacío se observa que este período ocurre de forma semejante al período de velocidad decreciente de secado por aire caliente, tal como se observa en la Figura 2.

Cuando el nivel de agua en la superficie del alimento es bajo, empieza el periodo de velocidad decreciente del secado. Durante este periodo la velocidad de secado es controlada por un mecanismo de transferencia de la humedad dentro del alimento, descrito frecuentemente como difusión a partir de la ley de Fick. El agua durante este periodo se mantiene en el material por la adsorción multimolecular y condensación capilar (Toledo, 1991).

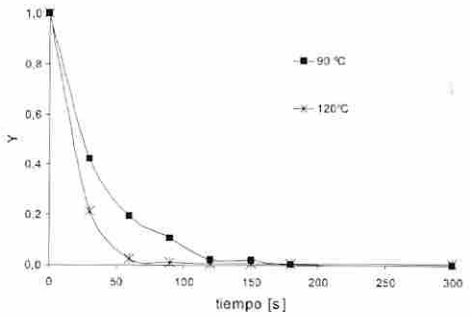


Figura 2. Curvas de pérdida de humedad de rodajas de manzana durante la fritura a la presión de 8 kPa.

En cuanto a la influencia de las condiciones del proceso sobre la humedad del producto, los resultados de los estudios revisados coinciden (Shyu y Hwang, 2001; Garayo y Moreira, 2002; Liu-Ping *et al.*, 2005b; Shyu *et al.*, 2005). Así, a una determinada temperatura cuanto mayor es el grado de vacío la velocidad de evaporación aumenta y, por tanto, mayor es la velocidad de secado. Respecto al efecto de la temperatura, a una determinada presión, cuando la temperatura aumenta, aumenta la velocidad de secado y por tanto disminuye el tiempo de fritura.

Transferencia de aceite.

Para describir los mecanismos de transferencia de aceite en la fritura al vacío Garayo y Moreira (2002) dividen el proceso en tres etapas: fritura, presurización y enfriamiento. Al inicio del periodo de la fritura la temperatura de ebullición del agua está muy por debajo de los 100°C, por ejemplo a una presión de vacío de 8 kPa el agua tiene una temperatura de ebullición de 41.5°C, por eso el agua se evaporará más fácilmente; la salida del vapor de agua y la diferencia de presión entre el interior de

los poros del alimento y el aceite no permite que éste penetre en el mismo. Una vez terminada la fritura el alimento se retira del aceite caliente y empieza a introducirse aire en el equipo (que permanece aun cerrado) para recuperar la presión atmosférica. En esta etapa, conocida como presurización, la presión en los poros se incrementa rápidamente hasta los niveles de presión atmosférica, a medida que el aire y el aceite de la superficie del alimento van llenando los espacios vacíos de los poros hasta que la presión se recupera. Sin embargo, a baja presión el aire se introduce más rápidamente que el aceite dentro del espacio del poro y éste obstruye el paso del aceite hacia el interior del producto. La tercera etapa empieza cuando el alimento es retirado del equipo de fritura y se conoce como enfriamiento. En ésta, parte del aceite que se encuentra en la superficie continúa penetrando en los poros del alimento, del mismo modo que en la fritura a presión atmosférica. Puesto que con este proceso se adhiere menos aceite a la superficie del producto, existe menos aceite disponible para penetrar durante esta etapa.

CALIDAD

La mayoría de los trabajos de investigación desarrollados en el campo de la fritura al vacío pretenden establecer las condiciones óptimas para desarrollar un producto final con buenas características organolépticas tales como textura, color y sabor (Shyu y Hwang, 2001; Garayo y Moreira, 2002; Liu-Ping *et al.*, 2005a; Liu-Ping *et al.*, 2005b; Shyu *et al.*, 2005) y reducir la formación de archilamida (Granda *et al.*, 2004).

Para conseguir estos objetivos se ha estudiado como afecta la variación de los parámetros del proceso de fritura al vacío y la aplicación de distintos pretratamientos y post tratamientos, a la calidad organoléptica del alimento. Los parámetros más importantes en el proceso de fritura son: temperatura del aceite, nivel de presión de vacío y el tiempo de fritura.

En cuanto a los pretratamientos aplicados destacan el escaldado o blanqueo, la congelación y la inmersión en soluciones azucaradas, que pueden ser aplicados independientemente (Kitson *et al.*, 1997) o combinados entre sí (Shyu y Hwang, 2001; Liu-Ping *et al.*, 2005b). El objetivo principal de éstos es mejorar la textura del alimento, evitando que se produzca una excesiva contracción y disminuir el contenido final de aceite en el producto.

La finalidad del tratamiento posterior es disminuir el contenido de aceite en la superficie del producto frito. El tratamiento utilizado generalmente es la centrifugación para retirar el aceite superficial (Shyu y Hwang, 2001; Liu-Ping *et al.*, 2005b; Shyu *et al.*, 2005), por cuanto la mayor cantidad de aceite que puede ingresar al alimento se produce en el momento del enfriamiento del mismo tras la fritura y al restablecer la presión atmosférica (Garayo y Moreira, 2002).

Entre los alimentos comúnmente utilizados para este proceso se encuentran: manzana (Kitson *et al.*, 1997; Shyu y Hwang, 2001), zanahoria (Liu-Ping *et al.*, 2005b; Shyu *et al.*, 2005), patata (Sijbring, 1969; Garayo y Moreira, 2002), cebolla, calabaza (Kawamura, 1987). Además se tiene constancia de estudios realizados con productos de la pesca en países asiáticos.

CONCLUSIONES

La fritura a vacío actualmente se encuentra en un periodo de expansión y difusión, impulsada por utilizar unas condiciones de temperatura menos rigurosas que en la fritura tradicional. Esto permite que el alimento sufra menos daño térmico y el color y sabor de las frutas y vegetales procesadas se conserven mejor.

El comportamiento de la eliminación de agua y de ganancia de aceite por parte del alimento, presenta unas características semejantes al que se produce en la fritura tradicional; y está en función de los parámetros de temperatura, tiempo de fritura y nivel de vacío.

La combinación del tratamiento previo y el posterior que se le aplique al alimento tiene una gran influencia en la calidad del producto final, color, textura y en parte ayuda a que disminuya el contenido de aceite al final del proceso. Además por la interacción de las variables propias de la fritura, temperatura y vacío, con el pretratamiento que se utilice se debe encontrar las condiciones adecuadas que permitan conseguir la calidad óptima.

Con las condiciones que se utilizan en la fritura al vacío es posible disminuir el contenido de acrilamida en los alimentos que potencialmente pueden generar este tipo de compuesto.

La fritura al vacío se presenta como una alternativa frente a la fritura tradicional en la elaboración de alimentos fritos, y es muy importante que se continúe con los estudios pertinentes para ampliar los conocimientos de este proceso y, en consecuencia, aportar datos científicos que permitan comprender y mejorar la situación tecnológica actual en este campo.

REFERENCIAS

Fellows PJ. 1998. Frying. In: Fellows PJ, editor. Food processing technology. Principles and practice. Second ed. New York: Woodhead. p 355-62.

Garayo J, Moreira, R. 2002. Vacuum frying of potato chips. J. Food Eng 55(2):181-91.

García MA, Ferrero, C, Bértola, N, Martino, M, Zaritzky, N. 2002. Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. Innovative Foods Science and Emerging Technologies. 3:391-7.

Granda C, Moreira, RG, Tichy, SE. 2004. Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. J. Food Sci. 69(8):E405-E11.

Kawamura T, inventor 1987. Method of manufacturing dried food and plant products. EU.

Kitson JA, Lackey, CL, Wright, HT. 1997. New fruit flavor snack. Food Eng. 44(11):50-1.

Liu-Ping F, Min-Zhang, Gong-Nian, X, Jin-Cai, S, Qian-Tao. 2005a. The optimization of vacuum frying to dhydrate carrot chips. Int. J. Food Sci. Technol. 40:911 - 9.

Liu-Ping F, Min-Zhang, Mujumdar, AS. 2005b. Vacuum Frying of Carrot Chips. Drying Technol. 23:645-56.

Mellema M. 2003. Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. Trends in Food Science & Technology. 14:364-73.

Pedreschi F, Moyano, P. 2005. Oil uptake and texture development in fried potato slices. J. Food Eng 70(4):557-63.

Pedreschi F, Moyano, P, Kaach, K, Granby, K. 2005. Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. Food Res.Int. 38:1-9.

Rimac S, Lelas, V, Rade, D, Simundić, B. 2004. Decreasing of oil absorption in potato strips during deep-fat frying. J. Food Eng 64:237-41.

Saguy IS, Dana, D. 2003. Integrated approach to deep fata frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. J. Food Eng 56:143-52.

Shyu S-L, Hau, L-B, Hwang, LS. 2005. Effects of processing conditions on the quality of vacuum-fried carrot chips. Journal of the Science of the Food and Agriculture 85:1903-8.

Shyu S-L, Hwang, LS. 2001. Effects of processing conditions on the quality of vacuum fried apple chips. Food Res.Int. 34:133-42.

Sijbring PH. 1969. Principles and practical results of vacuum frying chips. Conserva 18(4):99-101.

Toledo R. 1991. Fundamentals of food process engineering. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold Company, Inc.

CALOR DE RESPIRACIÓN DE BANANOS

Alvarado, Juan de Dios; Coba, Orlando y Guanoluisa, Miguel Angel
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE INVESTIGACIONES
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Casilla 18-01-0334. E. mail. fcial@uta.edu.ec
AMBATO - ECUADOR

Palabras clave: propiedades físicas, calor de respiración, climatéricas, bananos, almacenamiento.

RESUMEN

El propósito del trabajo fue determinar el calor de respiración de dos variedades de bananos, Cavendish y Gross Michel, a distintos tiempos luego de la cosecha, para establecer los cambios debidos al comportamiento climatérico observado en esta fruta durante la maduración. Se utilizaron muestras cosechadas de color verde, almacenadas a 20°, 25° y 30°C, en las cuales se siguió el proceso de maduración mediante registro de la tasa de respiración.

Para las tres temperaturas se establecieron los factores de cálculo del calor de respiración según la cantidad de anhídrido carbónico generado diariamente por una masa conocida de producto y se presentan los datos a distintos tiempos, desde el período preclimatérico hasta el período climatérico e inicio del envejecimiento.

Con los valores máximos, correspondientes a la cúspide del pico climatérico, se establece mediante análisis de regresión exponencial, las ecuaciones que posibilitan el cálculo del calor de respiración en [mW/kg] a temperaturas que son comunes para el almacenamiento y transporte de estas frutas, las cuales son:

$C^* = 268\ e^{0,0148\ T}$ para banano Cavendish, Variedad o Catalán y

$C^* = 268\ e^{0,0115\ T}$ para banano Gross Michel o Seda.

Los datos son útiles para el cálculo, simulación y diseño de cámaras o sistemas de enfriamiento, almacenamiento y transporte de bananos.

INTRODUCCIÓN

La respiración es un proceso bioquímico muy complejo que ocurre en todos los seres vivos, fundamentalmente involucra la conversión exotérmica de la energía potencial en energía cinética, pues en presencia de oxígeno los carbohidratos son completamente oxidados hasta anhídrido carbónico y agua con la producción de trifosfato de adenosina, que es la forma como las células almacenan la energía.

Coba y Guanoluisa (1988) realizaron un trabajo relacionado con la maduración natural y utilizando diferentes fuentes de etileno para conocer los principales cambios que ocurren en los bananos.

Comprobaron el comportamiento climatérico de esta fruta e identificaron dos etapas durante la maduración. En la primera la fruta desarrolla lentamente sus características típicas hasta llegar a su madurez fisiológica. En la segunda, que corresponde al período final de maduración, la fruta desarrolla rápidamente el sabor, la textura y el aroma que contribuyen a su calidad comestible; también se aprecia un notable incremento en la producción de CO_2 por el acelerado proceso respiratorio. Esto es de especial importancia para la determinación del calor de respiración, que no es constante, pues cambia con el desarrollo de la maduración ya que está asociado con las condiciones y tiempo de almacenamiento.

El calor generado por la fruta, que básicamente corresponde al calor de respiración, puede ser determinado de manera directa utilizando la ecuación de Poisson. Pitts y Sisson (1979) presentaron una forma de aplicar la Primera Ley de la Termodinámica al control de volumen para llegar a la siguiente ecuación general de conducción de calor.

$$(\partial/\partial x)\,(k\,(\partial T/\partial x)) + (\partial/\partial y)\,(k\,(\partial T/\partial y)) + (\partial/\partial z)\,(k\,(\partial T/\partial z)) + q^* = \rho\, C_p\,(\partial T/\partial t)$$

Para la temperatura (T) como función de (x, y, z, t), siendo k la conductividad térmica, ρ la densidad, C_p el calor específico por unidad de masa, t es el tiempo y q* es la razón de conversión de la energía interna o "generación de calor".

En la mayoría de los problemas de Ingeniería de Alimentos, k puede tomarse como constante y la ecuación anterior se reduce a:

$$(\partial^2 T/\partial x^2) + (\partial^2 T/\partial y^2) + (\partial^2 T/\partial z^2) + (q^*/k) = (1/\alpha)\,(\partial T/\partial t)$$

Siendo α la difusividad térmica definida por $\alpha = k/\rho C_p$

En estado estacionario $(\partial T/\partial t)$ es 0, y si la transferencia de calor ocurre en una sola dirección, se obtiene:

$$(\partial^2 T/\partial x^2) + (q^*/k) = 0$$

Que es la ecuación de Poisson, esta ecuación diferencial de segundo orden puede ser resuelta para el caso de un cilindro con generación de energía interna uniforme y dos condiciones de contorno:

$$T = T_s \text{ a } r = r_s \text{ y } (\partial T/\partial r) = 0 \text{ a } r = 0$$

Para obtener:

$$T - T_s = (q^*\, r_s^2/4k)\,(1 - (r/r_s)^2)$$

De donde:

$$q^* = 4k\,(T - T_s)/\,(1 - (r/r_s)^2)\, r_s^2$$

En la cual está definido el calor de respiración, q*, asumiendo que el calor generado por la fruta corresponde en su totalidad a los procesos metabólicos de respiración, T es la temperatura a una distancia radial r, T_s, es la temperatura de superficie en r_s.

Para utilizar esta ecuación se debe incluir a la densidad del producto con el propósito de mantener la consistencia de las unidades; sin embargo el tamaño de la fruta con valores de r, del orden de 0,02 m hacen que la diferencia de temperaturas sea mínima y difícil de ser registrada.

Otro método indirecto para determinar el calor de respiración de frutas es con los datos químicos de la tasa de respiración, el cual se utiliza en el presente trabajo.

En adición Toledo (1999) indicó que el calor de respiración de frutas y vegetales es función de la temperatura y puede ser calculado con ecuaciones exponenciales de la forma:

$$q^* = a\,(e)^{bT}$$

Presentó una tabla con los valores de los términos (a) y (b) para varios alimentos, en los que no están incluidos bananos.

Los datos del calor de respiración son útiles para el cálculo de las cargas de calor en sistemas de almacenamiento. Heldman y Singh (1981) indicaron que para diseñar un sistema de refrigeración desde el punto de vista de la ingeniería, se requiere conocer los cambios de entalpía que ocurren durante la congelación del producto y la velocidad a la cual progresa la congelación, lo cual está estrechamente relacionado con las propiedades del producto. Hall y Davis (1979) señalaron que el cálculo de la carga de enfriamiento para sistemas de almacenamiento refrigerado de alimentos, debe ser hecho incluyendo varias categorías de fuentes de calor: calor ganado a través de las paredes de la cámara de almacenamiento, calor propio del producto y calor generado por su respiración, además de calores varios generados en el interior de la cámara, como luz, apertura de puertas, ingreso de personal. Presentaron

una tabla de datos del calor de respiración para varios alimentos.
Para el cálculo de las cargas de calor debidas al proceso respiratorio, Toledo (1999) indicó que durante el enfriamiento el calor de respiración puede variar con el tiempo. Un calor de respiración promedio puede ser calculado entre dos temperaturas T_1 y T_2, conociendo el tiempo t_f requerido y asumiendo que el cambio de temperatura durante este período es lineal, con la siguiente ecuación:

$$q^* = ((a\, e^{b T_1}) / ((T_1 - T_2)\, b))\, (1 - e^{-b (T_1 - T_2)})$$

La carga de calor, Q, se calcula por:

$$Q = q^*\, t_f$$

El propósito del trabajo es presentar datos del calor de respiración para bananos y casos de aplicación, los cuales son útiles para el diseño de cámaras o sistemas de transporte y almacenamiento de ésta y otras frutas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Se utilizaron frutos sanos de racimos cortados en estado conocido como "jecho" con color completamente verde, de dos variedades de banano: Cavendish (*Musa cavendishii*, Variedad o Catalán), proveniente de la Provincia de Los Ríos y Gross Michell (*Musa sapientum*, Seda), proveniente de la Provincia de Esmeraldas.

Métodos.

Curvas de respiración

La intensidad respiratoria se registró de acuerdo con el método indicado por Akamine y Goo (1971). Luego de 24 horas desde el corte del racimo para el embarque y transporte hasta Ambato, aproximadamente 1 kg. de fruta se colocó en los recipientes de medida de la actividad respiratoria en el interior de cámaras estabilizadas a tres temperaturas, 20, 25 y 30±1°C. Para realizar las medidas, el flujo de aire pasa a través de una solución 0,2N de NaOH contenida en un primer recipiente en la que se retiene al CO_2 del aire, continúa hasta el segundo recipiente que contiene la fruta, luego de lo cual pasa a un tercer recipiente que contiene una solución 0,2N de NaOH titrisol en la cual el CO_2 producido diariamente por la fruta forma Na_2CO_3, que se titula con una solución estandarizada 0,2N de HCl.

Cálculo del calor de respiración

Con los datos del CO_2 producido por una masa conocida de bananos y por día, se calculan los correspondientes valores del calor de respiración, para lo cual se requiere establecer factores de conversión a las tres temperaturas de trabajo.
De acuerdo con lo desarrollado por Charm (1981), la ecuación de oxidación de glucosa a 25°C y 1 atmósfera de presión corresponde a:

$C_6H_{12}O_6$ (sólido) + 6 O_2 (gas) $\longrightarrow$ 6 CO_2 (gas) + 6 H_2O (líquido)

$\Delta H_{(25°C)} = -2\,815\,832$ [J/g mol de glucosa]

El signo negativo del cambio de entalpía (ΔH) indica pérdida de energía. Cada mol de glucosa produce 6 moles de anhídrido carbónico, cuyo peso molecular es 44 000 [mg/mol], en consecuencia el factor de conversión para calcular el calor de respiración es:

$f_{(25°C)} = 2\,815\,832 / 6 * 44\,000 = 10{,}66$ [J/mg de CO_2]

Con el propósito de calcular a otras temperaturas, así $\Delta H_{(20°C)}$ se requiere definir dos vías de reacción, lo que conduce al cálculo del cambio de entalpía entre los reaccionantes a 25°C y los productos a 20°C. Estas vías pueden ser ficticias o arbitrarias pues el cambio de entalpía depende únicamente de los estados inicial y final.
Según la Figura 1, las vías son: $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$ y $1 \rightarrow 4 \rightarrow 3$.

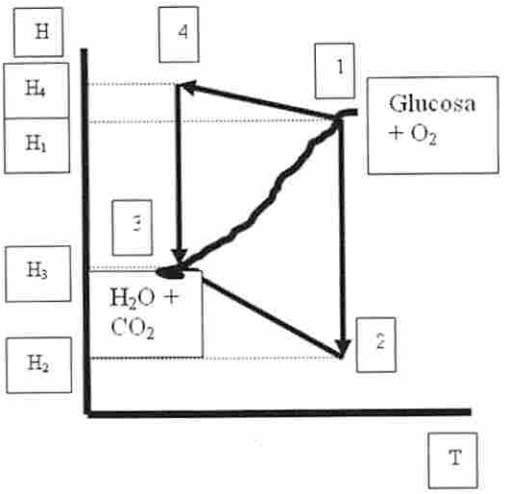


Figura 1. Diagrama entalpía - temperatura utilizado para determinar los factores de cálculo de calores de respiración.

Como $(H_3 - H_1)$ es igual por las dos vías, mediante balance de energía se tiene:
$(H_2 - H_1) + (H_3 - H_2) = (H_4 - H_1) + (H_3 - H_4)$
Los términos se calculan por:
$(H_2 - H_1) = -2\,815\,832$ [J/g. mol]
$(H_3 - H_2) = M\, C_{p\,(20°C)\,agua}\, (\Delta T) + M\, C_{p\,(20°C)\,anh.\,carbónico}\, (\Delta T)$
$M\, C_{p\,(20°C)\,agua} = 33{,}1$ [J/g. mol K]
$M\, C_{p\,(20°C)\,anh.\,carbónico} = 36{,}8$ [J/g. mol K]
$(H_3 - H_2) = 6 * 33{,}1 * 5 + 6 * 36{,}8 * 5 = 2\,097$ [J/g. mol]
$(H_4 - H_1) = M\, C_{p\,(25°C)\,glucosa}\, (\Delta T) + M\, C_{p\,(25°C)\,oxígeno}\, (\Delta T)$
$M\, C_{p\,(25°C)\,glucosa} = 1{,}4$ [J/g. mol K]
$M\, C_{p\,(25°C)\,oxígeno} = 29{,}3$ [J/g. mol K]
$(H_4 - H_1) = 1 * 1{,}4 * 5 + 6 * 29{,}3 * 5 = 886$ [J/g. mol]
Reemplazando valores en la ecuación de balance de energía.
$-2\,815\,832 - 2\,097 = -886 + (H_3 - H_4)$
$(H_3 - H_4) = -2\,817\,043$ [J/g. mol] = ΔH de la reacción a 20°C.
$f_{(20°C)} = 2\,817\,043 / 6 * 44\,000 = 10{,}67$ [J/mg de CO_2]
Por igual procedimiento para 30°C se establece que:
$f_{(30°C)} = 10{,}65$ [J/mg de CO_2]

Estos factores multiplicados por la generación de anhídrido carbónico registrada durante los procesos de respiración, llevaron a la determinación de los calores de respiración.

RESULTADOS

En la Figura 2 se presentan los cambios en el calor de respiración, registrados durante la maduración de dos variedades de bananos: Cavendish, conocido también como guineo Variedad o Catalán y Gross Michel, conocido también como guineo Seda a 20°, 25° y 30°C.
En las dos variedades se observa que el tiempo para alcanzar la madurez total aumenta conforme disminuye la temperatura, así a 20°C la aparición del pico climatérico, de máxima actividad respiratoria, ocurre entre 26 a 27 días, luego del corte del racimo de la planta; a 20°C el tiempo disminuye a 19 días; por último a 30°C la maduración ocurre apenas entre 13 a 14 días. Los bananos Variedad presentaron valores de calor de respiración ligeramente mayores que los Seda.
Durante el período preclimatérico los valores del calor de respiración permanecen aproximadamente constantes, entre 40 a 60 [mW/kg] en los bananos Variedad y entre 50 a 70 [mW/kg] en los bananos Seda. Hall y Davis (1979) reportaron un valor de 9720 [J/kg.dia] para bananos verdes a 20°C que corresponde a 113 [mW/kg].
La aplicación de la ecuación de Poisson conduce al cálculo de la mínima diferencia de temperaturas entre el centro y la superficie de un banano que alcanza un estado estacionario de transferencia de calor, durante el período preclimatérico, en la forma siguiente:

$$T - T_s = (q^* r_s^2/4k) (1 - (r/r_s)^2)$$
$$T - T_s = (0{,}04 \text{ W/kg } (0{,}02)^2 \text{ m}^2 / 4 (0{,}44 \text{ W/m °C})) (1 - 0)$$
$$T - T_s = 0{,}0000091 \text{ m}^3 \text{ °C/kg } (981 \text{ kg/m}^3)$$
$$T - T_s = 0{,}009 \text{ °C.}$$

En la cúspide del pico climatérico, los valores obtenidos son: Banano Variedad 422, 378 y 364 [mW/kg] a 30°, 25° y 20°C, respectivamente; para banano Seda los datos correspondientes son 378, 359 y 337 [mW/kg].

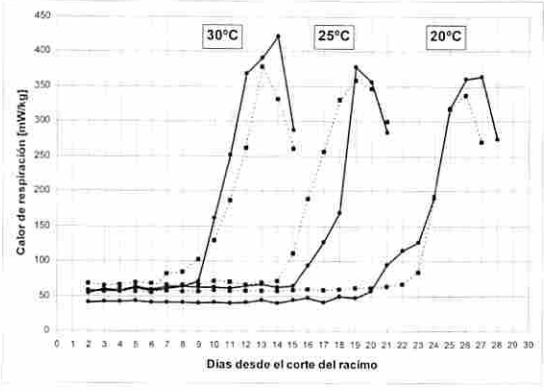


Figura 2. Cambios del calor de respiración durante la maduración de bananos Cavendish o Variedad (_____) y Gross Michel o Seda (--------) a tres temperaturas.

Con el propósito de disponer de ecuaciones para el cálculo del calor de respiración en el intervalo de temperaturas utilizadas para el almacenamiento y transporte de esta fruta, con los valores máximos registrados a cada temperatura expresados en [mW/kg] se aplicó un modelo exponencial, según lo indicado por Toledo (1999). Las ecuaciones empíricas son:
Banano de exportación Cavendish, Variedad o Catalán.

$$C^* = 268\, e^{0{,}0148\ T}$$

Banano Gross Michel o Seda.

$$C^* = 268\, e^{0{,}0115\ T}$$

Los valores del coeficiente de correlación son 0,962 y 0,998, C* es el calor de respiración [mW/kg] y T es la temperatura [°C].

Al comparar los valores calculados con estas ecuaciones con los publicados por ASHRAE (1974), se establece que existe concordancia, los valores calculados del calor de respiración son similares a los reportados para otras frutas climatéricas. En general es difícil conseguir información técnica sobre las propiedades de estas variedades, en consecuencia no es posible realizar comparaciones directas, datos sobre otras propiedades térmicas utilizadas en los cálculos fueron publicados por Alvarado (1996).

El cálculo de la carga de calor debida al proceso respiratorio de bananos Variedad colocados en cámaras a 18°C, puede ser hecho de la manera siguiente:

$$C^* = 268\, e^{0{,}0148\ T}$$
$$C^* = 268\, e^{0{,}0148\ (18)}$$
$$C^* = 350 \text{ [mW/kg]}$$

Si se desea calcular el calor de respiración durante el enfriamiento de bananos desde 32° a 18°C, asumiendo un cambio lineal de temperaturas y que el enfriamiento ocurre en 12 horas, se obtiene:

$$q^* = ((a\, e^{b\ T_1}) / ((T_1 - T_2)\ b)) (1 - e^{-b\ (T_1 - T_2)})$$
$$q^* = ((268\, e^{0{,}0148\ (32)}) / ((32 - 18)\ 0{,}0148)) (1 - e^{-\ 0{,}0148\ (32\ -\ 18)})$$
$$q^* = 389 \text{ [mW/kg]} = 0{,}389 \text{ [W/kg]}$$

$$Q = q^*\ t_f$$
$$Q = 0{,}389 \text{ (J/s kg) } (12 * 3600) \text{ s}$$
$$Q = 16\,805 \text{ [J/kg]}$$

CONCLUSIONES

El calor de respiración de las dos variedades de banano Variedad y Seda, cambia durante la maduración, se mantiene aproximadamente constante durante el período preclimatérico alcanza los valores máximos en la madurez total y disminuye con el envejecimiento del producto.
La información presentada es útil para propósitos de ingeniería y tecnología de alimentos, como en trabajos de simulación previa a la construcción de cámaras para conservación y almacenamiento de la fruta, torres de enfriamiento o en general para sistemas de refrigeración.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato (UTA), Centro de Investigaciones (CENI) y Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL) por financiar el trabajo a través de proyectos internos.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

-Akamine, E.K. and Goo, T. 1971. Respiration of gamma irradiated fresh fruits. J. Food Sci., 36:1074-1079.
-Alvarado, J. de D. 1996. "Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos". OEA-PRCTD. Quito, Ecuador. Radio Comunicaciones, División Artes Gráficas. 524 p.
-ASHRAE. 1974. "Handbook and Product Directory". New York. Amer. Soc. Heating and Refrig. Engineering.
-Coba, O. y Guanoluisa, M. 1988. "Maduración Artificial de Bananos Cavendish y Gross Michel Utilizando Compuestos de Etileno". Tesis de Ingeniero en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. FCIAL. 204p.
-Charm, S.E. 1981. "The Fundamentals of Food Engineering" 3th. Ed. Westport, Connecticut. The AVI Pub. Co. Inc. p:52-53.
-Hall, C.W. and Davis, D.C. 1979. "Processing Equipment for Agricultural Products". 2nd. Ed. Westport, Connecticut. The AVI Pub. Co. Inc. p:208-243.
- Heldman, D.R. and Singh, R.P. 1981. "Food Process Engineering". 2 nd. Ed. Westport, Connecticut. The AVI Pub Co. Inc. p:158.
-Pitts, D. R. y Sissom. L. E. 1979. "Transferencia de Calor" Bogotá, Colombia. Editorial McGraw Hill Latinoamericana pp:14-47.
-Toledo, R. T. 1999. "Fundamentals of Food Process Engineering". 2nd. Edition. USA. Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp:419-422.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES DEL ECUADOR

Rojas, Cristian[1*]; Alvarado, Juan de Dios[2]; Ballabio, Davide[3]; Todeschini, Roberto[3] y Tripaldi, Piero[1]

[1] Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador

[2] Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

[3] Milano Chemometrics and QSAR Research Group, Università degli Studi di Milano Bicocca, Milano, Italia

http://www.disat.unimib.it/chm/

[*] Autor Correspondiente: crojasvilla@hotmail.com

Palabras clave: propiedades físicas, PCA, cluster, aceites, grasas

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de realizar un screening para estudiar las propiedades físicas, entre ellas las térmicas de aceites y grasas trámite análisis multivariante. Las muestras corresponden a 3 grupos: aceites crudos, aceites refinados y grasas fundidas. Con el dataset se aplicó un análisis en componentes principales (PCA) para explorar el comportamiento, tanto de los objetos, como de las variables.

Del análisis de los scores se establece el comportamiento de los aceites y grasas, donde se observa que el aceite crudo de higuerilla se encuentra alejado respecto a su grupo, considerado como un outlier y caracterizado principalmente por valores altos de las variables densidad y viscosidad. Este comportamiento extraño se debe a su composición diferente de ácidos grasos que explica su acción laxante. Del gráfico de los loadings se define las relaciones entre variables, definiéndose en la primera componente las variables que permiten diferenciar los aceites de las grasas; mientras que la segunda evidencia las que discriminan los aceites crudos de los aceites refinados. Además, se observa que existen variables correlatas entre si.

El posterior análisis de clusterización permitió visualizar las agrupaciones existentes entre las diferentes muestras. De este gráfico el particular se encuentra en el aceite crudo de higuerilla que no se establece en su grupo, lo cual viene visto en la PCA, además del cluster se puede visualizar que los aceites en general se pueden agrupar y ser bien diferenciados de las grasas fundidas.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las propiedades físicas de aceites y grasas es de especial importancia práctica en el sector alimentario por varias razones técnicas y nutricionales. Entre ellas, por su capacidad de formar películas lubricantes, actividad superficial, solubilidad y características de fusión que son propias de las moléculas de cadena larga; además cuando se aplican tratamientos térmicos están asociadas con los cambios químicos que ocurren. Por ello existen numerosas publicaciones relacionadas con estos temas, entre ellas Alvarado (1995) presentó datos de las principales propiedades mecánicas de varios aceites y grasas vegetales.

La naturaleza de las características intrínsecas de los aceites y grasas es diverso, en los cuales el análisis multivariante, permite tener una estrategia simple para afrontar estudios simultáneos de variables y objetos para así obtener la mayor información posible de las mismas. Además, permite visualizar la relación existente entre los objetos y entre las variables, y analizar como estas caracterizan los objetos. El análisis multivariante es una herramienta útil para reducir y comprender la información contenida en un dataset complejo. Existen varios trabajos aplicativos a estudios de caracterización de propiedades físico-químicas de aceites vegetales e identificación de la autenticidad de los mismos, combinando respuestas de carácter químico y físico con análisis multivariante (Zhang y colaboradores, 2006. Lanteri y colaboradores, 2002). Otras aplicaciones son concernientes a estudios netamente de naturaleza química evaluados a partir de sensores artificiales (nariz electrónica), obteniendo señales electrónicas referente a la termo-oxidación para posteriormente ser analizados quimiométricamente con el propósito de evaluar el grado de oxidación de los aceites de oliva extra vírgenes y establecer las diferencias de las condiciones de almacenamiento (Cosio y colaboradores, 2007. Gómez-Ariza y colaboradores, 2006). Finalmente, nuevas propuestas de métodos de clasificación se utilizan para identificar alimentos geográficamente propios de una región o país y proteger la denominación de origen, permitiendo tipificar, autentificar y caracterizarlos, lo cual incrementa el interés por la calidad de los alimentos (Todeschini y colaboradores, 2007. Ballabio y colaboradores, 2006).

Por tanto, en este contexto el análisis multivariante se ha aplicado como técnica de análisis explorativo en la matriz de los datos (es decir, considerando todas las variables en conjunto), en orden de obtener el máximo contenido de la información relacionado con las propiedades físicas y térmicas de los aceites y grasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las muestras se obtuvieron en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato-Ecuador por extracción en equipos soxhlet, utilizando hexano como solvente, previa deshidratación de la materia prima. Se trabajó con nueve aceites vegetales (Tabla 1) provenientes de: Aguacate variedad Guatemalteco (*Persea americana*). Ajonjoli (*Sesamun indicum*). Algodón (*Gossypium hirsutum*). Chocho (*Lupinus mutabilis*). Higuerilla o Ricino (*Ricinus communis*). Linaza (*Linum usitatissimum*). Maní (*Arachis hypogaea*). Maracuyá, semillas de la variedad Amarilla (*Passiflora edulis*). Soja (*Glycine max*). Cuatro grasas vegetales provenientes de: Cacao, (*Theobroma cacao*). Coco (*Coco nucifera*). Palma, proveniente de la pulpa (*Elaeis guineensis*). Palmisto, proveniente de la almendra (*Elaeis guineensis*). Además se trabajó con cinco aceites refinados comerciales de: Girasol (*Elianthus annuus*). Maíz, gérmen (*Zea mays*). Maní (*Arachis hypogaea*). Oliva (*Olea europea*). Soja (*Glycine max*).

Tabla 1. Detalle de los aceites y grasas

MUESTRA	ETIQUETA	GRUPO
Aceite crudo Aguacate	1	1
Aceite crudo Ajonjoli	2	1
Aceite crudo Algodón	3	1
Aceite crudo Chocho	4	1
Aceite crudo Higuerilla	5	1
Aceite crudo Linaza	6	1
Aceite crudo Maní	7	1
Aceite crudo Maracayá	8	1
Aceite crudo Soja	9	1
Aceite refinado Girasol	10	2
Aceite refinado Maíz	11	2
Aceite refinado Mani	12	2
Aceite refinado Oliva	13	2
Aceite refinado Soja	14	2
Grasa fundida Cacao	15	3
Grasa fundida Coco	16	3
Grasa fundida Palma (pulpa)	17	3
Grasa fundida Palma (almendra)	18	3

Métodos

Determinación de propiedades físicas y químicas

De cada muestra se han determinado diferentes propiedades mecánicas, térmicas y químicas muy utilizadas en ingeniería, según se detalla en la Tabla 2. Los puntos de humo, ignición, inflamación, fusión inicial, fusión final, fusión medio; así como los índices de refracción, yodo y saponificación, se registraron según lo indicado por Rodríguez y Martín (1980). Densidad, viscosidad, tensión superficial, calor específico, difusividad térmica y conductividad térmica de acuerdo a los procedimientos descritos en Alvarado y Aguilera (2001). Porcentaje de ácidos saturados, porcentaje de ácidos insaturados por cromatografía de gases y peso formular promedio según lo indicado en Alvarado (1996).

Se observa que la matriz de datos esta constituida por 18 muestras separadas en 3 grupos y 18 variables físicas y químicas.

Tabla 2. Detalle de las variables físicas y químicas

VARIABLE	UNIDAD
Conductividad térmica	[W/m °K]
Punto de humo	[°C]
Punto de ignición	[°C]
Punto de inflamación	[°C]
Densidad	[Kg/m3]
Viscosidad	[mPa*seg]
Tensión superficial	[mN/m]
Calor específico	[kJ/kg K]
Difusividad térmica	[m^2/seg]
Indice de refracción	[n]
Peso formular medio	[g/mol]
Porcentaje de ácidos saturados	[%]
Porcentaje de ácidos insaturados	[%]
Indice de yodo	[cg/g]
Indice de saponificación	[mg/g]
Punto de fusión inicial	[°C]
Punto de fusión final	[°C]
Punto de fusión medio	[°C]

Análisis multivariante

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica quimiométrica bien conocida de uso general que permite analizar y comprimir la estructura de los datos multivariante proyectándolos en un hiper-espacio reducido, definido por las primeras componentes principales significativas. Estas corresponden a nuevas variables que resultan de combinaciones lineales de las variables originales, donde la primera componente principal contiene la máxima varianza, la segunda componente contendrá la segunda máxima varianza, y así sucesivamente. Generalmente, los resultados obtenidos de la PCA se muestran con dos gráficas; la proyección de las muestras en el hiper-espacio reducido se representa por medio del gráfico de los scores, mientras que los coeficientes lineales de las combinaciones de cada variable original se demuestran en el gráfico de los loadings. Los loadings representan la influencia de cada variable en cada componente principal (Wold y colaboradores, 1987. Massart y colaboradores, 1997).

El análisis de cluster permite evaluar la similitud entre muestras, es decir dividir los datos en grupos útiles denominados "cluster". El objetivo es detectar agrupaciones homogéneas de objetos significativos, así entonces los clusters resultantes deben contener la estructura natural de los datos (Steinbach y colaboradores, 2003). Se fundamenta sobre el concepto de similitud, este concepto es relativo así como su complemento de disimilaridad. El punto de partida para evaluar la similitud entre dos objetos es la determinación de la distancia que existe entre ellos, por ejemplo la eulidea; dos objetos que están a una distancia más corta entre sí que todas las distancias entre ellos y de los demás objetos se consideran mas similares. El cluster no es un método de clasificación, pues los grupos formados deben ser estudiados para poder dar una interpretación que permita sugerir la existencia de eventuales categorías para posteriores estudios de clasificación (Vandeginste y colaboradores, 1998).

En el desarrollo de este trabajo se ha utilizado las comodidades de los Softwares MatLab 6.5 (mathworks), PLS_Toolbox 3.5 y Scan 6.0 (Minitab).

RESULTADOS

La matriz de datos ha sido estudiada mediante análisis en componentes principales. El gráfico de los scores entre la primera y la segunda componente principal se presenta en la Figura 1. La relación entre muestras y grupos puede ser estudiada a partir de los loadings (Figura 2).

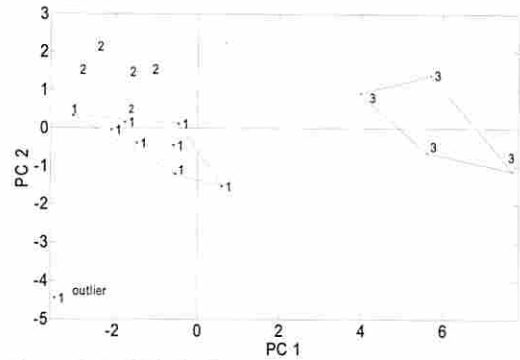


Figura 1. Análisis de Componentes Principales: scores de la primera y segunda componente principal

Los resultados obtenidos en la PCA permite retener en las 2 primeras componentes el 76.3% de la información total. En la Figura 1 se presentan los resultados de los scores; se observa que los objetos se encuentran agrupados y diferenciados entre sí. Por otro lado, en la primera componente principal, se diferencian 2 grupos: aceites y grasas fundidas, donde las primeras son caracterizadas por valores de scores negativos, mientras que las segundas por valores de scores positivos; sin embargo, la muestra del aceite crudo de higuerilla se encuentra lejano de su grupo, y caracterizado por scores negativos en la primera y segunda componente principal. Analizando los scores de la segunda componente principal, se logra diferenciar en esta los grupos de aceites crudos, definidos por valores de scores entre cero y negativos; y el grupo de aceites refinados, que presentan valores de scores positivos.

Para interpretar de mejor manera el comportamiento de cada grupo, y del outlier (aceite de higuerilla), se procedió a realizar un análisis del gráfico de loadings, Figura 2.

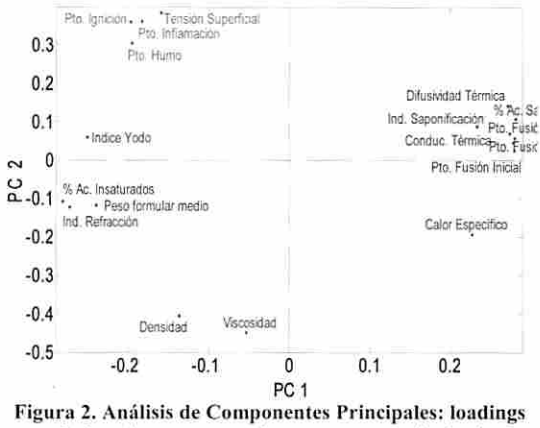


Figura 2. Análisis de Componentes Principales: loadings de la primera y segunda componente principal

La primera componente principal presenta 2 agrupaciones de variables, las que permiten diferenciar los grupos: aceites y grasas fundidas. Los aceites se encuentra definidos por variables con valores negativos de loadings en la primera componente principal, tales como el índice de yodo, % de ácidos grasos insaturados, índice de refracción y peso formular medio; por otro lado las variables con valores de loadings positivos, que caracterizan a las grasas fundidas, corresponden a la difusividad térmica, porcentaje de ácidos grasos saturados, índice de saponificación, puntos de fusión inicial, final y medio, conductividad térmica y calor específico.

con valores de loadings negativos definen el grupo de aceites crudos y corresponden a la densidad y viscosidad, mientras que variables con valores de loadings positivos caracterizan el grupo de aceites refinados, siendo tensión superficial, punto de ignición, punto de inflamación y punto de humo.

El aceite de higuerilla que es caracterizado por valores altos pero negativos de loadings en la segunda componente principal, aparece como un outlier y se encuentra ligado a la viscosidad y densidad. Este aceite contiene en su estructura quimica al ácido ricinoleico, el cual forma con facilidad puentes de hidrógeno intermoleculares y explican los valores más altos de viscosidad y densidad (Alvarado, 1996).

Además, del gráfico de loadings se puede establecer que existen variables correlatas de la siguiente manera.

(1) Difusividad térmica, % de ácidos grasos saturados, índice de saponificación, puntos de fusión inicial, final y medio y la conductividad térmica. La difusividad térmica y la conductividad térmica son propiedades estrechamente relacionadas, la primera indica la capacidad que tiene el cuerpo de trasmitir calor dividida para la capacidad de almacenar calor, la segunda indica la capacidad con que se trasmite el calor en un cuerpo.

(2) Indice de refracción, peso formular medio y porcentaje de ácidos grasos insaturados

(3) Punto de humo, punto de inflamación, punto de ignición y tensión superficial.

(4) Densidad y viscosidad, las cuales están relacionadas pues para la cuantificación de la viscosidad interviene el valor de la densidad.

Posteriormente se ha utilizado una clusterización de tipo jerárquico, auto-escalando las variables y utilizando un linkage completo con una distancia euclidea. Los clusters permiten evaluar las agrupaciones entre muestras, conservando la información contenida en las 18 variables de entrada, obteniéndose el dendograma de la Figura 3.

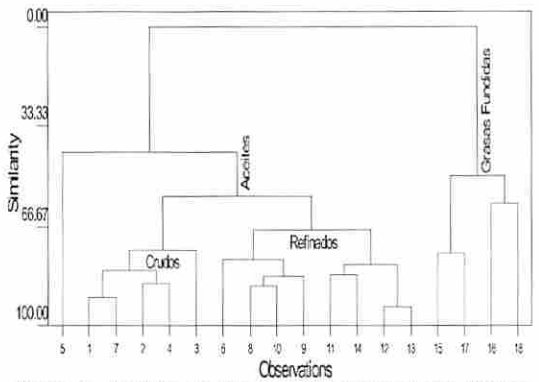


Figura 3. Análisis de Cluster: dendograma con linkage completo, distancia euclidea y auto-escalado de variables

Se observa claramente que existen 5 cluster (similaridad del 59%), y que corresponden en orden de izquierda a derecha de la siguiente manera. Primer cluster, constituido por el singleton del aceite de higuerilla (5); segundo cluster, establecido por los aceites crudos de: aguacate (1), maní (7), ajonjolí (2), chocho (4) y algodón (3); en el tercer cluster se agrupan los aceites: crudo de linaza (6), crudo de maracayá (8), refinado de girasol (10), crudo de soja (9), refinado de maíz (11), refinado de soja (14), refinado de maíz (11), refinado de oliva (13); el cuarto cluster es constituido de las grasas fundidas de cacao (15) y de pulpa de palma (17); finalmente las grasas fundidas de coco (16) y almendra de palma (18) se agrupan en el quinto cluster.

Estas agrupaciones son símiles a las obtenidas con los scores en la PCA, Figura 1. No obstante, 3 aceites crudos (linaza, maracuyá y soja) terminan agrupados con los aceites refinados, posiblemente por ser aceites con altos contenidos de ácidos grasos insaturados que requieren procesos de refinación menos drásticos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha determinado medidas de carácter físico y químico en aceites y grasas, combinándolos con análisis multivariante, lo que ha permitido tener una estrategia de exploración de datos correcta.

Como resultado, la PCA permite describir los grupos y variables mediante la extracción de la máxima información retenida en 2 componentes principales, proporcionando el 76.3% de la información total.

El análisis de clusterización, permite visualizar las agrupaciones que existen entre las diferentes muestras.

Finalmente, de los análisis multivariantes efectuados se puede concluir que, desde un punto de vista físico y térmico los aceites crudos y refinados pueden agruparse y ser bien diferenciados de las grasas fundidas. No obstante, si se quiere realizar una discriminación desde un punto de vista nutricional, los aceites crudos y refinados deben ser claramente diferenciados entre sí, lo cual estaría en función de variables de naturaleza diversa.

El aceite crudo de higuerilla debido a la presencia del ácido ricinoleico, es el único que presente diferencias notorias del grupo de los aceites.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Alvarado, J. de D. Aguilera, J.M. 2001. "Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos", Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España. 410p.
- Alvarado, J. de D. 1996. "Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos", OEA-PRCTD. Radio Comunicaciones. División Artes Gráficas. Quito, Ecuador. 524p.
- Alvarado, J. de D. 1995. Propiedades mecánicas de aceites y grasas vegetales. *Grasas y Aceites*, 46: 264-269.
- Ballabio, D., Mauri, A., Todeschini, R and Buratti, S. 2006. Geographical classification of wine and olive oil by means of classification and influence matrix analysis (CAIMAN), *Analytica Chimica Acta*, 570: 249-258.
- Cosio, M.S., Ballabio, D., Benedetti, S. and Gigliotti, C. 2007. Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue, *Food Chemistry*, 101: 485-491.
- Gómez-Ariza, J.L., Arias-Borrego, A., García-Barrera, T. and Beltrana R. 2006. Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication, *Talanta*, 70: 859-869.
- Lanteri, S., Armanino, C., Perri, E. and Palopoli, A. 2002. Study of oils from Calabrian olive cultivars by chemometric methods, *Food Chemistry*, 76: 501-507.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M. and Buydens, L.M.C. 1997. "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A", Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 519-538.
- Rodríguez de, B. y Martín G., E. 1980. "Análisis de Alimentos". T.I. Universidad Central de Venezuela. Imprenta Universitaria. Caracas. pp:35-85.
- Steinbach, M., Ertöz, L. and Kumar, V. 2003. The Challenges of clustering in high dimensional data, University of Minnesota Supercomputing Institute Research Report vol. 213.
- Todeschini, R., Ballabio, D., Consonni, V., Mauri, A. and Pavan, M. 2007. CAIMAN (Classification And Influence Matrix Analysis): A new approach to the classification based on leverage-scaled functions, *Chemometr. Intel. Lab. Syst.* 87: 3-17.
- Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L., Buydens, L.M.C. Jong, S., Lewi, P.J. and Smeyers-Verbeke, J. 1998. "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B", Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 57-85.
- Wold, S., Esbensen, K.H. and Geladi, P. 1987. Principal component analysis. *Chemometr. Intel. Lab. Syst.*, 2: 37-52.
- Zhang, G., Ni, Y., Churchill, J. and Kokot, S. 2006. Authentication of vegetable oils on the basis of their physico-chemical properties with the aid of chemometrics, *Talanta*, 70: 293-300.

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EVALUACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS EN PASTA COCIDA

[1]Zambrano-Zaragoza. M. L., [2]Meléndez Pérez R*. Pérez Pazca, R., y [4]Arjona Román. J. L.

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Departamento de Ingeniería y Tecnología, Cátedra de Ingeniería Alimentaria, Av. 1ro. de Mayo s/n, Col. Atlanta, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54740.
[1]luz.zambrano@correo.unam.mx, [2] melendez@servidor.unam.mx*, [4]arjona@servidor.unam.mx

Palabras clave: propiedades físicas, pasta, carga de ruptura, energía de ruptura

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método para evaluar propiedades mecánicas en pasta cocida que permita obtener resultados que sean repetibles, precisos y robustos. Se utilizó un equipo INSTRON 4411 con celda de carga de 5 kN y software series IX, considerando un diseño factorial 2^4, con tres replicas y sin puntos centrales; los factores considerados fueron, la velocidad inicial de ensayo de 180 y 300 mm/min, fuerza aplicada de 5 y 15 kN/min, peso de pasta 15 y 20g y dispositivo Kramer o Ottawa. Del análisis de variabilidad realizado, se estableció que el factor de mayor influencia para la fuerza de cizalla y energía en el área borde fue el tipo de dispositivo empleado (p=0.000 y 0.006), mientras que para el modulo de cizalla fue la velocidad de la cruceta. El valor mínimo de fuerza fue de 2.5 kN/g y el máximo de 27.78 N/g, la energía vario entre 0.025 y 3.86 N/mm y el modulo entre 0.239 y 0.895 MPa. Después de realizado el análisis de los efectos se llevó a cabo la optimización de la respuesta, considerando la de mayor importancia la fuerza de cizalla (10.83 N/g), seguida del modulo (0.57 MPa) y la firmeza (2.88 N/mm), obteniéndose las mejores condiciones de ensayo a 180 mm/min, fuerza aplicada de 5 kN/min, peso de muestra de 15 g y la celda Kramer como dispositivo de ensayo. Este trabajo resalta la importancia de considerar la variación estadística de resultados por efecto de los factores.

INTRODUCCIÓN

Las pastas en sus diversas presentaciones, son de los alimentos más populares de consumo en México, la pasta es de origen italiano, sin embargo su utilización como producto de fácil y rápido consumo se ha extendido prácticamente en todo el mundo, hoy en día existen pastas pre-cocinadas, secas, pre-cocidas e instantáneas.

Uno de los parámetros de calidad considerados en una pasta es su textura, influenciada por el contenido y distribución de humedad, por las condiciones de cocción, la cantidad de agua absorbida y el tipo y cantidad de sustancias adicionadas. Para evaluar los cambios en propiedades mecánicas se han empleado distintos métodos y dispositivos de prueba (González y col., 2000; Smewing 1997), que toman en cuenta las características del producto y no las condiciones de prueba a las que se lleva a cabo el ensayo.
En relación a la pasta seca y sus características de cocción existen condiciones de prueba que llevan a determinar la firmeza de la misma, pero que se han realizado para una sola hebra de pasta sin el estudio del comportamiento a la adhesión por efecto del peso, el efecto del contenido de agua y/o el efecto de las condiciones de almacenamiento, que son determinantes para este tipo de ensayos. (Gianibelli y col., 2005; Irie y col, 2004).

En cuanto a la pasta cocida existen algunos estudios que consideran las condiciones de cocción en función a la temperatura y la cantidad de agua absorbida, determinando como propiedad mecánica la fuerza aparente requerida para cizallar cinco hebras con una cuchilla y, controlado la humedad relativa y la temperatura (Cuq, 2003).

Aunque existen métodos estandarizados para la determinación de firmeza en pasta cocida (AACC, 1995), éste estudio tuvo como objetivo estandarizar un método de prueba para la evaluación de propiedades mecánicas en pasta cocida, tomando en cuenta los factores metodológicos de mayor influencia sobre la determinación de carga de ruptura y energía utilizando una cantidad de muestra (g) que reflejara mejor el comportamiento del producto.

METODOLOGÍA

Materia prima

La pasta deshidratada fue del mismo lote de producción de una microempresa del Estado de México, elaborada a partir de sémola de trigo duro marca Cordón Azul-Postinera, con un contenido de humedad de 14.33%, cenizas de 0.8 % y gluten húmedo de 24.5 %. Los tallarines de huevo (5.5 mm de ancho y espesor de 0.95 mm) se elaboraron en una laminadora 2002 marca LB Italia S. R. L. de Lazate, Milano Italia, modelo D600 #603-02 y deshidratados en un secador estático de charolas.

Cocción de la pasta

El tiempo de cocción fue de 9 min y la relación pasta-agua fue de 100 g de pasta por 1000 cm^3 de agua, después de transcurrido el tiempo se escurrió durante 3 minutos.

Pruebas mecánicas

Las pruebas se realizaron en un equipo estático INSTRON 4411, con celda de carga de 5 kN, precarga de 0.0164 kN, peso de muestra de entre 15 y 20 g, velocidad inicial de la cruceta de 180 a 300 mm/min, según lo establecido en el diseño experimental. Los dispositivos de ensayo utilizados fueron la celda Ottawa y la Kramer, y se registró la fuerza de cizalla (N) modulo de cizalla y energía en el área borde (N/mm). Al momento de inicial el contacto con la muestra se modifico la velocidad en función a la carga aplicada.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial 2^4, con tres repeticiones, que fue generado en MINITAB versión 14 con licencia No. FPAEM14WC; para el diseño no se consideraron puntos centrales y se llevó a cabo en forma aleatoria, con el fin de disminuir el efecto del error experimental. Los factores y niveles considerados son mostrados en la tabla 1 y las variables de respuesta analizadas fueron la fuerza de cizalla (kN), firmeza (N/mm) y el modulo de cizalla (MPa),

Tabla 1. Variables y niveles de variación utilizados para la estandarización del método de ensayo.

Variables	Nivel 1	Nivel 2
1.- Velocidad de cruceta	180 mm/min	300 mm/min
2.- Fuerza aplicada	15 kN	5 kN
3.- Peso de la muestra	15 g	20 g
4.- Dispositivo	Otawa	Kramer

Análisis estadístico

Para realizar la comparación entre los resultados obtenidos, se realizó un análisis de variabilidad y ajuste al modelo lineal general, utilizando para el tratamiento de los datos las herramientas de diseño experimental de MINITAB 14, se consideró un nivel de significancia (p =0.05) para todos los casos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La variabilidad de los resultados obtenidos fue determinada en función a las repeticiones realizadas, considerando un modelo de máximo ajuste. En la figura 1 se muestra la dependencia de la fuerza de cizalla, donde el factor con mayor efecto sobre variabilidad es el tipo de dispositivo empleado (p = 0.000) seguido de interacción entre la fuerza aplicada con respecto al peso de muestra y dispositivo (p = 0.039). El resto de los factores y sus interacciones no presentaron efecto significativo.

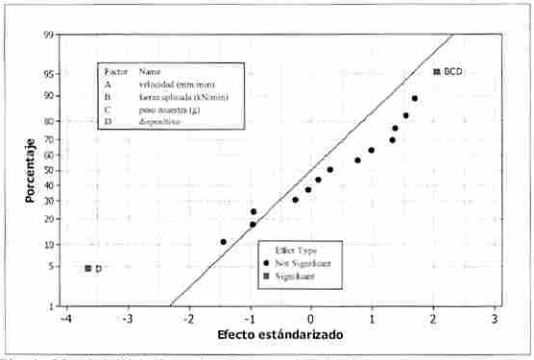


Fig.1. Variabilidad en la fuerza de cizalla

En la figura 2, se muestra la variabilidad en la firmeza, donde, el factor de mayor efecto fue el tipo de dispositivo empleado (p = 0.001), seguido de la interacción entre la velocidad, fuerza aplicada y peso de muestra (p = 0.00); la velocidad de cruceta y el dispositivo (p = 0.032) y la fuerza aplicada y peso de muestra (p = 0.012).

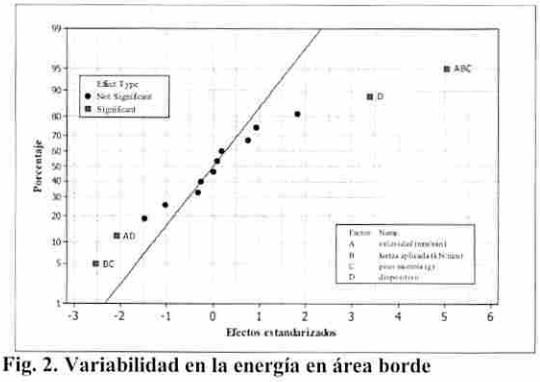


Fig. 2. Variabilidad en la energía en área borde

Con respecto al modulo de cizalla, se muestra en la figura 3 el comportamiento de los efectos estudiados, encontrándose que la mayor influencia la presenta la velocidad de la cruceta (p = 0.006).

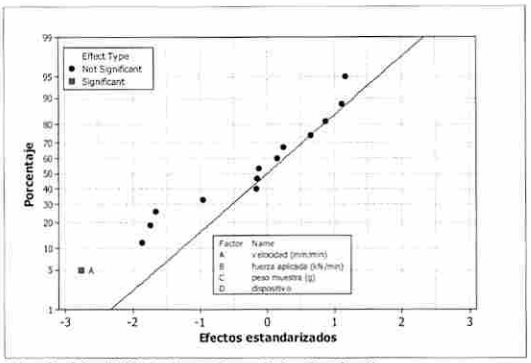


Fig. 3. Varibilidad en el modulo de cizalla

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis de varianza con respecto a las desviaciones estándar obtenidas en el análisis de variabilidad, donde se observa que existe un efecto significativo de las variables involucradas, sobre la fuerza de cizalla y la firmeza que representan en el mismo orden, a la dureza y a la resistencia que opone la pasta a la ruptura.

Tabla 2. Análisis de varianza para respuestas seleccionadas

Fuente	Fuerza de cizalla		Energía área borde	
	F	p	F	p
Efectos principales	35.58	0.000	79.43	0.000
2-interacciones	18.49	0.000	5.75	0.000
3-interacciones	13.58	0.000	14.30	0.000

En la figura 4 se observa que la variación en la fuerza de cizalla depende mayoritariamente del tipo de dispositivo empleado, y que el menor efecto se presenta cuando se utiliza la celda Kramer, donde a mayor fuerza aplicada, mayor peso de muestra y menor velocidad de cruceta, se tiene una dureza 5.4 N/g evaluada como fuerza de cizalla. No existe diferencia significativa en la velocidad empleada entre 180 ó 300 mm/min, si el peso de la muestra es de 15 g y el dispositivo es la misma celda con valor promedio de fuerza aplicada de 10.27 N/g. En este sentido, los resultados son similares a los reportados por Tudorica y col. (2002) quienes utilizaron las mismas velocidades de prueba en una sola hebra de espagueti, encontraron valores de fuerza de cizalla de 3.61 hasta 4.93 N/g; y Limroongreungrat y Huang (2007) en espagueti adicionado con papa, reportaron valores de dureza de 1.8 N, manejando nuevamente una tira de la pasta, utilizando un equipo INSTRON y velocidad del ensayo de 300 mm/min. Cuq y col., (2003), al realizar un estudio sobre el efecto del contenido de agua en espagueti, reportaron valores entre 2 y 75 N, concluyendo que al incrementarse el contenido de agua disminuye la fuerza de ruptura, utilizando una hoja de corte y colocando 5 tiras de espagueti durante el ensayo. Consideramos que los tamaños de muestra utilizado por los autores antes citados, no representan el comportamiento de la pasta que pueda ser percibido por el consumidor, y que en una sola hebra no se puede distinguir el efecto de tratamientos como el almacenamiento en refrigeración, por lo que en este estudio se considera de importancia el efecto de la cantidad pasta a analizar.

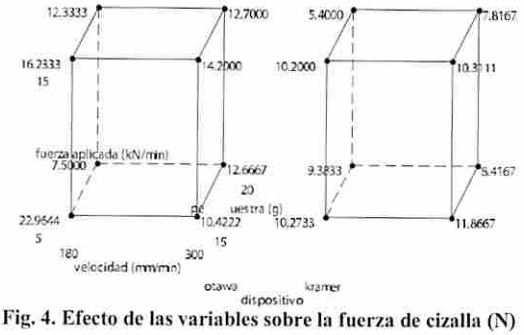


Fig. 4. Efecto de las variables sobre la fuerza de cizalla (N)

En cuanto al empleo de la celda Ottawa, en la Figura 4, se observa que a 15 kN/min y 20 g de muestra, la respuesta es independiente de la velocidad con valores promedio de 13.86 N/g; sin embargo hay que considerar que la fuerza de extrusión debe considerar el diámetro de los orificios en la celda Ottawa, ya que al comparar los resultados de las dos celdas, existió un incremento de aproximadamente 45 %.

En la figura 5 se muestra el comportamiento del ensayo en relación a la firmeza que representa la resistencia opuesta por el material a la deformación, la mayor variabilidad en los resultados, se presenta en la celda Ottawa, con energía mínima de 0.0015 N/mm y máxima de 3.44 N/mm, para una fuerza aplicada de 15kN/min y 20 g de muestra. En la celda Kramer se observó una menor variación a las mismas condiciones de ensayo, siendo independientes de la velocidad utilizada.

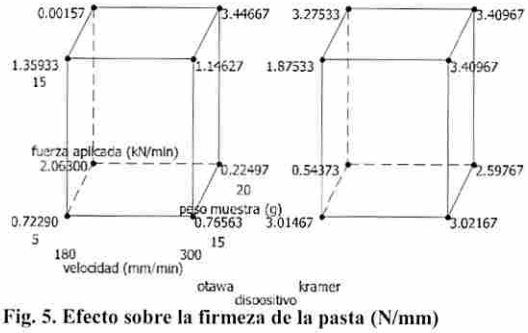


Fig. 5. Efecto sobre la firmeza de la pasta (N/mm)

En el caso de los límites inferiores para la celda Kramer, existe menor variación de 14.23 % cuando el ensayo se realiza a 300 mm/min. En relación a la magnitud de los resultados obtenidos en este trabajo, Limroongreungrat y Huang en 2007, reportaron valores de firmeza desde 1.5 a 4.5 N/min. El modulo de cizalla, mostrado en la figura 6, muestra una mayor influencia de los efectos estudiados, lo que se ve reflejado en la variabilidad de los mismos, considerando además que el modulo es menor cuando se utiliza la celda Kramer.

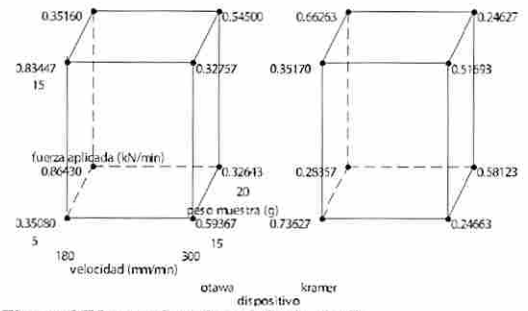


Figura 6 Efecto sobre el modulo de cizalla

Optimización de la respuesta

El establecimiento de las mejores condiciones de evaluación de propiedades de cizalla de la pasta, se realizó tomando en consideración diferentes aspectos, entre los que se encuentran el comportamiento de las variables de respuesta y los reportes científicos existentes en relación a la determinación de dureza, energía y desplazamiento (Raina y col., 2005; Khouryieh y col., 2006).

En este sentido, se debe seguir el siguiente orden de análisis: fuerza > modulo > firmeza, considerando que para valores máximos de fuerza de cizalla de 10.8402 N/g; máxima energía en el área borde de 2.9625 N/mm y máximo Módulo de cizalla de0.5581 MPa, se recomienda:

- Velocidad = 180 (mm/min)
- Fuerza = 5 (kN)
- Peso = 15 (g)
- Dispositivo = Kramer

CONCLUSIONES

El diseño factorial realizado y considerando la variabilidad de las replicas, es un herramienta muy útil en el establecimiento de un método de ensayo con disminución de la desviación estándar.

La variable que mayor efecto tuvo en las variables de respuesta, fuerza de cizalla y energía fue el tipo de dispositivo empleado, mientras que como es de esperarse en el modulo fue la velocidad de cruceta.

REFERENCIAS

- AACC. (1995). "Approved method of the American association of Cereal Chemists". Minesota: American Association of cereal Chemists, Inc. AOAC. (1997). Official methods of analysis (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Cuq B., Gonçalves F., Mas J. F., Vareille L., & Abecassis J., (2003) "Effects of moisture content and temperature of spaghetti on their mechanical properties" J. Food Engineering 59: 51-60.
- Gianibelli M. C., Sissons M. J. and Batey L. (2005) "Effect of Source Proportion of Waxy Starches on Pasta Cooking Quality" Cereal Chemistry 82: (3) 321-327.
- Gonzalez J. J., McCarthy K. L. and McCarthy M. J. (2000) Textural and structural changes in lasagna cooking. J. Texture Studies 31:93-108.
- Irie K., Horigane K. A., Naito S., Motoi H., & Yoshida M., (2004) "Moisture distribution and texture of various tipes of cooked spaghetti", Cereal Chemistry 81:3 350-355.
- Khouryieh H., Herald T. y Aramouni F. (2006). "Quality and Sensory Properties of Fresh Egg Noodles Formulated with Either Total or Partial Replacement of Egg Substitutes" J. Food Science 71: (6) S433-S448.
- Limroongreungrat K., Huang Y.-W. (2007) "Pasta products made from sweetpotato fortified with soy protein", LWT 40:200-2006.
- Raina C. S., Singh S., Bawa A. S. y Saxena D. C. (2005) "Textural Characteristics of pasta made from rice flour supplemented with proteins and hydrocolloids" J. Texture Studies 36:402-420.
- Smewing J. (1997) Analyzing the texture of pasta for quality control. Cereal Food World 42: 8-12.
- Tudorica C. M., Kuri V., Brennan C. S. 2002. "Nutritional and Physicochemical Characteristics Of Dietary Fiber Enriched Pasta. Journal Agricultural". Food Chemistry 50: 347-356.

PROPIEDADES FÍSICAS DEL JIGACHO (*Vasconcellea stipulata*) Y DEL BABACO (*Vasconcellea pentagona*)

Castillo T., Marco[2]; Carrión, Flor[1]. Vargas, Mariela[1]. y Alvarado, Juan de Dios[1]
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE INVESTIGACIONES
[1]FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
[2]FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Casilla 18-01-0334. E. mail. fcial@uta.edu.ec
AMBATO - ECUADOR

Palabras clave: propiedades físicas, frutas, Vasconcelleas, maduración, starfruit.

RESUMEN

El trabajo se realizó con el propósito de conocer los datos de las propiedades físicas principales de jigacho (*Vasconcellea stipulata*) y babaco (*Vasconcellea pentagona*), frutas poco conocidas y de las cuales hay muy poca información, en especial de sus propiedades térmicas.
Se utilizó un diseño factorial AxB. Los factores de estudio fueron: factor A, tipo de fruta (a_0 jigacho y a_1 babaco) y factor B, estado de maduración (b_0 verde, b_1 pintón y b_2 maduro).
En las numerosas muestras de las dos especies con diferente estado de maduración se realizaron las determinaciones siguientes. En la fruta entera: largo, diámetro, volumen, peso, porcentaje de cáscara, porcentaje de semilla(jigacho), porcentaje de pulpa, densidad, gravedad especifica, difusividad térmica, conductividad térmica. En la pulpa: densidad, calor específico, difusividad térmica, conductividad térmica, sólidos totales, sólidos solubles, pH y humedad. En el jugo: densidad, coeficiente volumétrico de expansión térmica, gravedad específica, tensión superficial, viscosidad, coeficiente térmico para flujo, calor específico, pH, sólidos solubles y sólidos en suspensión. Se presentan los resultados experimentales promedios para cada determinación, que caracterizan a cada fruta y se establecen los cambios físicos y químicos que se producen durante la maduración. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores determinados en estas dos vasconcelleas.

INTRODUCCIÓN

El babaco es una fruta originaria de las zonas altas del Ecuador y Colombia, en forma natural se encuentra desde hace varios decenios en los valles abrigados del callejón interandino y lugares secos de la costa. Es un híbrido natural proveniente de las especies *Vasconcellea stipulata* (Siglalón) y *Vasconcellea pubescens* (Chamburo). (NRC, 1989).
El jigacho, conocido también como siglalón, paronchi, toronche; es nativo de las provincias de Azuay y Loja en la parte sur del Ecuador. Esta especie fue distinguida taxonómicamente recién en 1966 como *Vasconcellea stipulata* Badillo (NRC, 1989).
Tanto el babaco como el jigacho son frutas de características similares y aunque existen algunos estudios acerca del primero (starfruit), el segundo producto es prácticamente desconocido. Esto sucede porque en el mercado local el consumidor esta acostumbrado a adquirir la fruta de tamaño grande. En este caso, el babaco es mucho más atractivo para el consumo en fresco, ya que el jigacho apenas alcanza de 500 a 700 gramos de peso (El Comercio, 2002).
El jigacho o baby babaco puede ser una buena opción para la exportación. Es una planta con características similares al babaco y que se puede adaptar fácilmente a varios tipos de suelos, y entre 1800 y 2800 msnm. Actualmente, el jigacho se produce en las poblaciones de Salcedo, Píllaro y Patate, en la Provincia de Tungurahua. Su comercialización es aún informal. El jigacho es más compacto en su espacio hueco interior, es pequeño, aromático, dulce y de color amarillo intenso.
También estas frutas pueden ser consumidas en fresco, como jugos, mermeladas o dulces y en la actualidad han despertado gran interés para el sector de exportadores debido a la demanda en mercados internacionales, principalmente en el caso del jigacho que se asocia con la moda de consumir productos de "babies" adecuados para las familias de reducido número de miembros (Izurieta, B. citado por Guerrero, 1999).
El trabajo tuvo como propósito determinar varias propiedades físicas y químicas de los dos productos, las cuales permitirán la aplicación de tecnologías adecuadas para su industrialización, generando una mayor difusión del cultivo y por tanto un mejor nivel vida para quienes se hallan vinculados directamente con el qué hacer agroindustrial del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizó jigacho y babaco, cosechadas en la provincia de Tungurahua en los cantones Cevallos y Patate. En la Figura 1 se presenta una fotografía de frutos de jigacho y de babaco.

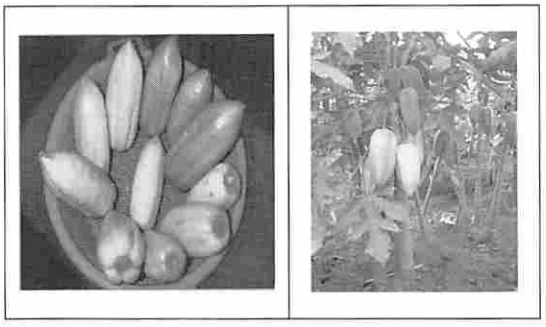


Figura 1. Frutos de jigacho en diversos estados de maduración y babaco en la planta.

Se determinaron las propiedades físicas y químicas de las dos frutas en sus tres estados de maduración, entendiéndose por fruto verde (fruto con la cáscara 75% verde), pintón (fruto con la cáscara que tiene aproximadamente un 50 % de zonas amarillas) y maduro (fruto con la cáscara totalmente amarilla).

Metodología

Luego de la recepción de la materia prima, se seleccionaron las frutas y se determinaron las propiedades físicas y químicas de la fruta entera; luego se peló en forma manual, se separó las semillas y se licuó para obtener la pulpa; por último mediante expresión a través de tela de lienzo se obtuvo el jugo.
Todas las determinaciones se realizaron con un mínimo de 5 frutas y por duplicado, los métodos utilizados fueron:
Densidad. Según la Norma INEN 391, con el uso de picnómetros.
Coeficiente volumétrico de expansión térmica. Se determinó a partir de la densidad a diferentes temperaturas, según lo indicado por Alvarado (1996).
Gravedad específica. Para la determinación de la gravedad especifica del jugo, se utilizaron 250 cm^3 de la muestra en una probeta en la que se introduce un hidrómetro con una precisión de 0,001. Para la determinación de la gravedad especifica en el fruto entero, se procedió a

establecer el peso en aire y sumergido en agua, y utilizar la ecuación G = Waire / (Waire – Wagua), según lo indicado por Alvarado (1996).
Tensión superficial. Mediante el estalagnómetro de Traube según lo indicado por Alvarado (1996).
Calor específico. Según el método de mezclas según lo indicado en Alvarado y Aguilera (2001).
Difusividad térmica. Mediante pruebas de transferencia de calor en estado variable en cilindros de geometría infinita según lo indicado en Alvarado y Aguilera (2001).
Conductividad térmica. Se calculó a partir de la difusividad térmica, la densidad y el calor específico.
Viscosidad. Se utilizaron viscosímetros capilares tipo Ostwald y agua destilada como referencia para jugo, según lo indicado por Alvarado y Aguilera (2001).
Coeficiente térmico para flujo. A partir de los datos de viscosidad a distintas temperaturas con una ecuación tipo Arrhenius.
Tamaño. Se midieron la altura y diámetros de la fruta utilizando un pie de rey Craftsman.
Volumen. Por registro del volumen de agua desplazado.
Peso. Con una balanza Owalabor, precisión 0,1 g.
Porcentaje de cáscara, pulpa y semilla. Mediante diferencia de pesos utilizando la balanza Owalabor.
pH. Mediante el uso de un potenciómetro Cole-Parmer
Sólidos solubles. Según la Norma INEN 380.
Sólidos en suspensión. Según la Norma INEN 388.
Humedad y sólidos totales. Según la Norma INEN 382

TABLA 1 PROPIEDADES FÍSICAS DEL JIGACHO (*Vasconcellea stipulata*) Y DEL BABACO (*Vasconcellea pentagona*)

Propiedades	Jigacho			Babaco		
	Verde	Pintón	Maduro	Verde	Pintón	Maduro
Densidad en fruta entera (kg/m^3)	975	1016	1026	973	1011	1022
Densidad en pulpa a 20°C (kg/m^3)	1051	1046	1041	1042	1036	1031
Densidad en pulpa a 50°C (kg/m^3)	1034	1031	1027	1026	1018	1015
Densidad en jugo a 20°C (kg/m^3)	1040	1035	1030	1026	1022	1014
Densidad en jugo a 50°C (kg/m^3)	1025	1020	1016	1010	1004	1000
Coeficiente de expansión térmica en jugo (1/K) 10^4	6,01	5,78	5,74	6,56	6,74	6,37
Gravedad específica en fruta	1,009	1,018	1,028	1,007	1,012	1,024
Tensión superficial en jugo (N/m) 10^2	5,92	4,97	4,18	6,82	6,27	5,90
Calor específico en pulpa (kJ/kg K)	4,10	3,79	3,60	4,11	3,89	3,66
Calor específico en jugo (kJ/kg K)	3,98	3,68	3,54	3,88	3,75	3,67
Difusividad térmica en fruta (m^2/s)10^7	1,18	1,25	1,32	1,26	1,35	1,38
Difusividad térmica en pulpa (m^2/s)10^7	1,11	1,19	1,27	1,19	1,25	1,33
Conductividad térmica en fruta (W/m K)	0,49	0,54	0,50	0,48	0,52	0,55
Conductividad térmica en pulpa (W/m K)	0,48	0,47	0,48	0,50	0,51	0,51
Viscosidad en jugo a 20°C (Pa. s x 10^3)	2,079	2,609	3,110	1,240	1,907	2,321
Viscosidad en jugo a 50°C (Pa. s x 10^3)	1,124	1,256	1,541	0,643	1,089	1,104
Coeficiente térmico para fujo (K)	1930	2041	2146	2028	2079	2311
Largo (m)	0,181	0,172	0,165	0,231	0,228	0,251
Diámetro (m)	0,062	0,063	0,061	0,088	0,092	0,099
Volumen ($10^4 m^3$)	3,27	3,16	2,82	5,29	6,83	8,16
Peso (kg)	0,318	0,320	0,290	0,588	0,687	0,833
Porcentaje de cáscara (%)	7,62	8,95	8,10	7,53	7,58	8,34
Porcentaje de semilla (%)	0,38	0,37	0,59	0,15	0,16	0,14
Porcentaje de pulpa (%)	92,00	90,68	91,31	92,32	92,26	91,52
Sólidos totales en pulpa (%)	9,54	8,32	6,60	7,69	6,69	5,08
Sólidos solubles en pulpa (°Brix)	6,71	8,26	9,79	3,99	5,44	7,96
Sólidos solubles en jugo (°Brix)	6,63	8,58	9,79	3,95	8,51	9,12
Sólidos en suspensión en jugo (% volumen)	4,12	5,48	6,98	1,82	3,00	3,39
pH en pulpa	3,85	4,22	4,45	4,75	5,04	5,34
pH en jugo	3,88	4,27	4,49	4,77	5,01	5,34
Humedad en pulpa (%)	90,5	91,7	93,3	92,3	93,3	95,00

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los valores de todas las determinaciones realizadas en las muestras de jigacho y babaco, en sus tres estados de maduración.

Los valores de la densidad son mayores en el jigacho con relación a los de babaco, lo anterior se cumple en las tres presentaciones, fruta entera, pulpa y jugo; el jigacho es una fruta más pequeña pero más compacta. En la fruta entera se puede notar que la densidad y la gravedad específica se incrementan conforme avanza la maduración, por lo contrario en pulpa y jugo los valores de densidad disminuyen, esto último está asociado con la disminución de sólidos totales en la pulpa y el aumento de la humedad.

En la Figura 2 se observa los cambios del inverso de la densidad ($1/\rho_T$) a distintas temperaturas (T) para el cálculo del coeficiente volumétrico de expansión térmica de jugo de babaco maduro. Existe una muy buena asociación lineal entre estas dos variables lo que posibilita el cálculo del coeficiente (β) a partir del intercepto y de la pendiente, con el uso de la ecuación:

$$(1/\rho_T) = (1/\rho_o) + (\beta/\rho_o)\,T$$

Los valores establecidos en jugo de jigacho y babaco presentaron diferencias de significado estadístico entre frutas y debido a la maduración.

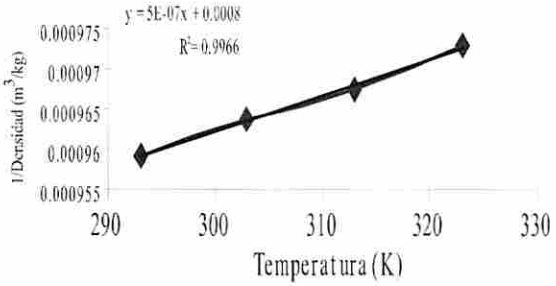


Figura 2. Valores del inverso de la densidad a varias temperaturas para determinar el coeficiente volumétrico de expansión térmica en jugo de babaco maduro.

La tensión superficial de los jugos disminuye conforme avanza la maduración, los valores registrados en el jugo de babaco son mayores (68,2 hasta 59,0 [mN/m]) que los de jugo de jigacho (59,2 hasta 41,8 [mN/m]), estos datos son comparables con los publicados por Alvarado (1966) para diferentes frutas.

Con relación a las propiedades térmicas, los valores del calor específico de la pulpa son ligeramente superiores a los del jugo, al igual que los de babaco con relación a jigacho, los datos en general son próximos a los de agua por el alto contenido de humedad y disminuyen conforme avanza la maduración. Un comportamiento similar se observa en los datos de la difusividad y de la conductividad térmica, los valores son algo mayores en el fruto entero con relación a los de pulpa; sin embargo conforme avanza la maduración los valores de la difusividad térmica aumentan, no así los de conductividad térmica que se mantienen próximos a 0,5 [W/m K].

La viscosidad de los jugos de jigacho es mayor que la de jugos de babaco, en los dos casos se incrementa con la maduración. Con el propósito de definir el efecto de la temperatura sobre esta propiedad, en la Figura 3 se presenta una representación tipo Arrhenius que conduce al cálculo de un coeficiente térmico para flujo (K*), que corresponde a la pendiente y que está relacionado con la energía requerida para producir flujo, con el uso de la ecuación siguiente:

$$\ln \eta = \ln \eta_0 + ((K^*)/T_a)$$

Los valores de esta constante se incrementan conforme avanza la maduración y son mayores en el jugo de babaco, indicando que el jugo de babaco requiere una mayor cantidad de energía para mantener su flujo.

Los valores de la altura, diámetro, volumen y peso son mayores en el babaco, pues son frutas más grandes con relación al jigacho; la forma es similar, son óvalos alargados que al ser cortados en forma transversal presentan cinco puntas lo que explica la denominación general de "starfruit". El porcentaje de cáscara se incrementa conforme avanza la maduración.

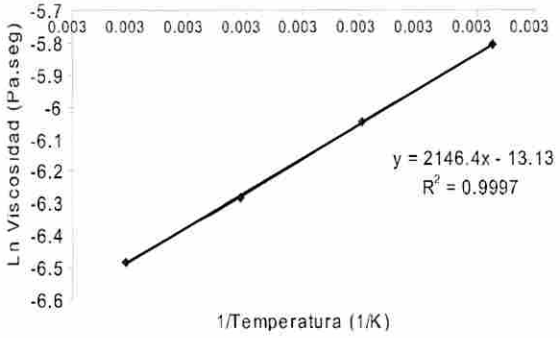


Figura 3. Valores del inverso de la temperatura absoluta contra el logaritmo natural de la viscosidad en jugo de jigacho maduro.

Los sólidos totales de la pulpa disminuyen conforme avanza la maduración de las dos frutas. El contenido de sólidos solubles en pulpa y jugo aumenta con la maduración y son mayores en jigacho con relación al banano. El contenido de sólidos en suspensión en jugo de jigacho es mayor que el registrado en jugo de babaco y sería una de las razones de los datos de viscosidad más altos. El jigacho es una fruta más ácida que el babaco, el pH de la pulpa y del jugo aumentan conforme avanza el estado de maduración. La humedad de la pulpa aumenta cuando se incrementa el estado de maduración y en todos los casos es mayor en el babaco que en el jigacho.

CONCLUSIONES

Se presenta información útil para propósitos de ingeniería, tecnología y control de calidad de dos frutas poco conocidas, el jigacho y el babaco, cosechadas en tres grados de maduración. Las diferencias establecidas refuerzan la necesidad de utilizar los valores de las propiedades físicas específicos para cada fruta, a pesar de pertenecer las dos frutas a la familia de las caricáceas.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por el apoyo a través del Centro de Investigaciones (CENI).

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, J de D. y Aguilera, J. M. 2001. Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 401p.

Alvarado, J. de D. 1996. Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. OEA. Quito, Ecuador. Radio Comunicaciones. 524p.

Castillo, M. 2003. Evaluación de tres sistemas de podas en Jigacho bajo condiciones de invernadero. Informe UTA. Ambato-Ecuador. 50 p.

EL COMERCIO. 2002. El baby-babaco es poco conocido en la fruticultura. Artículo. 12 de Octubre del 2002. p. B1.

Guerrero, D. 1999. Cultivo de Babaco en Loja. Proyecto VLIR. Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador. p. 10-35.

INEN. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Varios años. Norma INEN 380, Norma INEN 381, Norma INEN 382, Norma INEN 388 y Norma INEN 391.

NRC. 1989. National Research Council. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press. Washington, D.C. p: 253-261.

PROPIEDADES REOLOGICAS DE ALGUNOS CREMOGENADOS DE MANGO (*Mangifera indica L)*

Salamanca Grosso, Guillermo[1]; Díaz Crismat, Carolina y Salazar Mendoza Boris Eduardo
[1]GRUPO DE INVESTIGACIONES MELLITOPALINOLOGICAS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
PBX +57(8) 264 42 19 Fax +57(8) 264 48 69
B. Santa Helena A.A. 546 - Ibagué, COLOMBIA. Email: salamancagrosso@gmail.com

Palabras clave: Tecnología de Alimentos. Mango. Propiedades Fisicoquímicas. Reología

RESUMEN

Se estudio el comportamiento de la viscosidad de cremogenados de mango (*Mangifera indica L)* en las variedades: Hilacha, Irwin, Springfield, Tommy, Van Dyke y Yulima. Utilizando un viscosímetro Brookfield DV-II+Pro, el comportamiento de los fluidos es del tipo seudoplastico, la variedad Irwin, presenta la menor variación al esfuerzo de cizalla en los dos estados de madurez estudiados, el mango Hilacha exhibe los mayores valores. La viscosidad es dependiente del contenido de sólidos solubles, materia en suspensión y contenido de pectinas. Los cremogenados presentan mayor viscosidad en los estados de menor madurez fisiológica y son significativamente diferentes a los observados en las muestras listas para el consumo.

INTRODUCCIÓN

Los cremogenados de fruta son productos generados de la transformación de las pulpas y se han definido como materias primas susceptibles de fermentación pero no fermentas y que se obtienen por molturación, tamizado o ultrahomogenizacion de la parte comestible de frutas, enteras o peladas sin eliminar la fracción acuosa que constituye el zumo. El puré o pulpa, también se ha definido como el producto obtenido a partir de la fruta fresca, luego de eliminar mediante procedimientos físicos parte del agua que lo constituye. Los cremogenados de frutas como elaborados semiintegrales que son, han alcanzado una gran importancia económica en la industria alimentaria actual, mostrando un gran futuro comercial ya que son la base a partir de la cual se elaboran una amplia gama de productos finales como: zumos de fruta con pulpa y los néctares de fruta, mermeladas, alimentos infantiles y alimentos funcionales. El uso de estos como base para la elaboración de los productos relacionados, presenta una serie de ventajas bien definidas frente al método tradicional de utilizar la fruta como materia prima, ya que contribuye a la reducción de costos y volumen durante el almacenamiento, como también costos de trasporte de materias primas e incrementa la relación beneficio y contribuye positivamente la disminución de perdidas en poscosecha de frutas y hortalizas (Salamanca *et al*, 2006; Pacheco, et al, 2006). El mango (*Mangifera indica* L.), es un fruto de gran importancia en regiones tropicales y subtropicales. Se producen más de 14 millones de toneladas, correspondiendo el 65% de ésta producción a la India. El mango es un fruto con gran aceptación debido a su color, sabor agradable, aroma y particularmente es una buena fuente de vitaminas C y A. Los principales países exportadores de fruta de mango en su orden de importancia son Filipinas, Tailandia, México e India. Países como Brasil, Colombia y Venezuela, tiene un gran potencial de exportación a Estados Unidos y la Unión Europea, sin embargo, su la comercialización principalmente para Colombia y Venezuela, se ha visto restringida al comercio local, principalmente debido a la falta de canales de comercialización y posibilidades para su trasformación, a la falta de manejo y transporte inadecuados a los centros de abasto. Vale indicar que el mango después de cosechado tiene una vida de almacenamiento corta, que oscila entre 4 y 5 días a 22 °C, como ocurre en las zonas de producción y hasta 10 o 12 días a 12 °C en los comercios de abasto; es por este motivo es importante establecer métodos y condiciones óptimas para su conservación. En general los frutos de origen tropical desarrollan un conjunto de desórdenes fisiológicos conocidos como daños por el frío y los frutos de mango están sujetos a cambios y daños por el frío cuando se almacenan a temperaturas menores de 13°C, por lo tanto el almacenamiento prolongado es difícil. Las temperaturas comprendidas entre 12 y 13°C son consideradas óptimas para el almacenamiento de estos frutos. En Colombia las variedades de mayor demanda comercial son coincidentes con las nativas entre ellas el mango Hilacha (*Magdalena river*), Azúcar, Pechopaloma y Vallenato (Salamanca. *et al*, 2006). La oferta para las variedades mejoradas reside en las variedades: Albania, Irwin, Filipino, Kent, Keitt, Sprinfield, Sulfaida, Tommy Atkins y Van Dyke. El consumo de frutos de mango en el mundo ha pasado del consumo fresco a la demanda industrial para la elaboración y desarrollo de alimentos entre ellos néctares, refrescos, jugos, sorbetes y sobremesas gelificadas, gracias al contenido de sólidos solubles, pH favorable, tenor de pulpa, suculencia y contenido de fibra. (Siqueira *et al* 1988; Cerezal et al, 1995; Pelegrine, 1999). En la fabricación de productos y derivados de mango, se usa pulpa de fruta concentrada que se somete a procesado de industrialización, que demandan del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas. Dentro de estas propiedades el comportamiento reológico es importante como diagnostico de la calidad y comportamiento en el procesado, así como en la validación y uso de equipos tales como bombas, y sistemas de agitación. (Ibarz. *et al*, 1996; Queiroz. Et al, 1996). Las principales alteraciones o modificaciones indeseables que se producen en zumos y derivados de fruta afectan a cambios en la textura, como ablandamientos, insolubilizaciones o pérdidas de capacidad de retención de agua; en el sabor, con desarrollo de sabores a acaramelado, rancidez u otros sabores extraños; en el color, por oscurecimientos o decoloraciones; y en el valor nutritivo por pérdida o degradación de vitaminas, proteínas y minerales (Tannenbaum, 1982). La inexistencia de datos reológicos para las frutas colombianas y para la industria nacional ha obligado a los productores a usar bases de datos de procesos realizados en otros países y para frutas de composición diferente a las producidas en zona andina e interandina. En la obtención de jugos, pulpas y cremogenados con destino a la industria, también se hace indispensable caracterizar sus propiedades que definen las condiciones de uso y generan valor agregado a las variedades según sean las necesidades de la industria.

En las determinaciones de viscosidad de los fluidos, usualmente se hace necesario considerar el esfuerzo cortante de cizalla (τ), que se puede entender como la fuerza (F) por unidad de área (A), necesaria para alcanzar un elemento de deformación (dinas cm^{-2}) conforme a la relación:

$$\tau(dinas/cm^2) = \frac{F}{A} \qquad \text{Ec-1}$$

La velocidad de corte ó cizalla (γ), se define como el cambio de velocidad dv a través de la distancia dh entre dos placas. Las unidades se expresan como reciproco del tiempo (s^{-1}). La velocidad de corte se incrementa a medida que la velocidad del plato superior aumenta y la distancia entre los dos platos se hace más pequeña. La relación que expresa esta variación es de la forma:

$$\gamma(1/s) = \frac{dv\,(cm/s)}{dh\,(cm)} \qquad \text{Ec-2}$$

Durante la evaluación de la viscosidad de líquidos, materiales semilíquidos o pastosos, el fluido entre los platos resiste el movimiento del plato superior, la resistencia al flujo entonces queda definida como viscosidad del material (η) y es en síntesis la relación entre el esfuerzo de corte aplicado (τ) y la velocidad de corte adoptada por el fluido (γ) representada por la ecuación:

$$\eta = \frac{\tau\,(1/s)}{\gamma\,(dina/cm^2)} \qquad \text{Ec-3}$$

Existen dos tipos diferentes de comportamientos reológicos bien marcados que suelen presentar comportamiento Newtonianos o no y que pueden ser independientes o no del tiempo. En el primer caso la viscosidad es constante e independientemente del esfuerzo de corte al cual se somete el fluido, en el segundo caso la viscosidad depende del esfuerzo de corte aplicado. La mayoría de los materiales con alguna significancia industrial son no newtonianos. Diversos autores han investigado el comportamiento de purés y zumos de frutas, entre ellos algunos derivados de tomate, confituras de fruta, ketchup y mostaza francesa. El conocimiento de las propiedades de comportamiento al flujo y de deformación de los alimentos son imprescindibles en el diseño y dimensionado de equipos tales como cintas transportadoras, tuberías, tanques de almacenamiento, pulverizadores o bombas para el manejo de alimentos. Además, la viscosidad se utiliza para la estimación y cálculo de los fenómenos de transporte de cantidad de movimiento, calor y energía (Boger y Tiu. 1974; Rao, 1986; Manohar, *et al* 1990; Queiroz, 1998).

El comportamiento reológico de un fluido alimentario puede describirse según distintas ecuaciones que relacionan el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación. En la literatura existen muchos modelos para describir este comportamiento, sin embargo son varios los autores (Odigboh y Mohsenin, 1975; Kokini, 1992) que coinciden al afirmar que uno de los modelos más comúnmente usados y de aplicación general para ajustar los datos experimentales y expresar cuantitativamente el comportamiento al flujo de los fluidos inelásticos independientes del tiempo es el modelo propuesto por Herschel y Bulkley. Existen alimentos en los que su comportamiento depende del tiempo de actuación del esfuerzo realizado sobre ellos. Finalmente, existe otro grupo de alimentos que se comportan como fluidos viscosos y sólidos elásticos a la vez, son los fluidos viscoelásticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron cremogenados de mango de las variedades Hilacha (*Magdalena river*), Irwin, Sprinfield, Tommy Atkins Van Dyke y Yulima. Obtenidas a partir de frutos estandarizados mediante análisis de textura, sólidos solubles y pruebas de cromaticidad para dos estados de madurez identificados como (III y IV). En la tabla 1 se recogen los parámetros de pH, Brix y pectinas (g/100g) de cremogenados. En el estudio de variables fisicoquímicas se analizaron lotes de fruta seleccionada. Una vez elaborados los cremogenados se realizaron las determinaciones siguiendo las directrices del manual de métodos analíticos AOAC (1999). El contenido de sólidos solubles se determinó en la unidad refractométrica Eloptron de Schmidt-Haensch. El pH se determino usando un electrodo combinado de Ross (Orion Reseach) en la unidad ORION 420A. La fibra por valoración gravimétrica. Los resultados de las caracterizaciones fisicoquímicas, se analizaron siguiendo análisis de varianza y las diferencias entre medias fueron evaluadas con el test de comparaciones múltiples de *Tukey* con un nivel de significación del 5%. En todos los casos se uso Statgraphics plus™ 5.1 y Minitab 15™. En el procesado, luego de un proceso de selección y lavado, se removió la epidermis y se dejo expuesto el mesocarpio, que se fue cortando en piezas pequeñas haciendo uso de un cuchillo en acero inoxidable. Inmediatamente después se prepararon las muestras haciendo uso de un homogenizador Samurai™ 8543 (120V 60Hz 300 Watts). Estos se percolaron a través de un tamiz de 16 mm. Parte de estos se congelaron a 4 °C cuando fue necesario;

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de cremogenados en las variedades de mango en dos estados de madurez.

Variedad	pH (20°C)	°Brix (%P/P	Pectinas (%P/P)
Estado de madurez III			
Hilacha	4.80 ± 0.26^{a}	13.3 ± 0.20^{a}	13.4 ± 2.20^{a}
Tommy	4.00 ± 0.48^{b}	8.64 ± 1.20^{b}	29.8 ± 0.03^{b}
Irwin	4.40 ± 0.22^{a}	12.3 ± 0.64^{a}	6.51 ± 0.10^{d}
Sprinfield	3.33 ± 0.07^{c}	5.62 ± 0.53^{c}	16.3 ± 0.07^{a}
Yulima	$4.67 \pm 0.11_{a}$	8.6 ± 1.04^{b}	9.16 ± 0.27^{c}
Van Dyke	4.44 ± 0.08^{b}	13.1 ± 0.35^{a}	13.2 ± 1.42^{a}
Vallenato	4.44 ± 0.06^{b}	13.2 ± 0.35^{a}	10.5 ± 0.23^{c}
Estado de madurez IV			
Hilacha	5.46 ± 0.47^{a}	14.2 ± 1.06^{a}	10.2 ± 2.10^{a}
Tommy	$5.08 \pm 0.50_{a}$	12.7 ± 1.00^{a}	13.9 ± 0.93^{b}
Irwin	4.70 ± 0.11^{b}	16.1 ± 1.72^{b}	5.32 ± 0.06^{e}
Sprinfield	3.84 ± 0.49	12.3 ± 1.31^{a}	8.26 ± 0.42^{a}
Yulima	$5.18 \pm 0.18_{a}$	12.7 ± 2.10^{a}	5.34 ± 0.08^{c}
Van Dyke	$5.12 \pm 0.26_{a}$	14.7 ± 0.45^{b}	5.00 ± 0.14^{c}
Vallenato	$4.82 \pm 0.27_{b}$	14.9 ± 1.01^{b}	3.38 ± 0.11^{b}

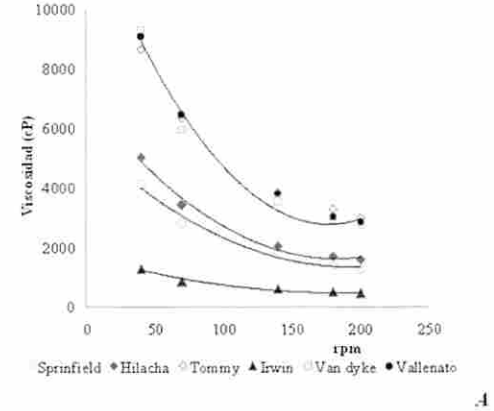
Las determinaciones de viscosidad se realizaron en la unidad Brookfield DV-II+Pro, dispuesta con un sensor de temperatura y disponible con los sensores de medición LV1, LV2, LV3 y LV4. El control del sistema se hizo a través del Software Reocalc 42.4 Rheometer l, desde donde se fijaron 5 velocidades: 40, 70, 140,180 y 200 rpm. Los cremogenados se termostataron a 20°C y se usaron 500 ml. en las determinaciones. El tiempo de corrida en cada ensayo se programo para 4 minutos, considerando que los dos minutos iniciales pueden presentarse tazas de deformación variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

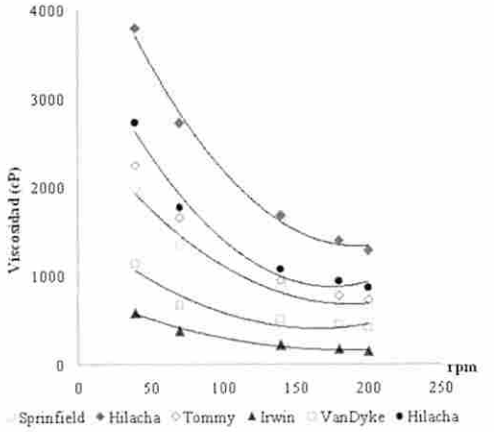
Existen diversos factores que influyen en el comportamiento reológico de los alimentos entre ellos la presión, la estructura, el gradiente de velocidades de deformación y el tiempo de tratamiento de la muestra. Los cremogenados analizados básicamente corresponden a una dispersión de partículas sólidas en una solución acuosa que contiene fibra soluble, azúcares, ácidos orgánicos, sales y pectinas como una dispersión de la forma sólido/líquido debido al tamaño de las partículas suspendidas (superior a 0.5nm) se comportan como un sol y son responsables del comportamiento reológico global. El comportamiento reológico de la viscosidad de los cremogenados en las variedades de mango estudiadas, se recogen en la tabla 1. De la relación Viscosidad (η) y velocidad de corte (v) se deduce que el incremento de la velocidad de cizalla reduce la viscosidad del material. Este comportamiento tipo se conoce como fuerza de cizallamiento laminar, en el cual se considera que las moléculas constitutivas son perturbadas en la vecindad del rotor (spindle), con una reorientación paralela a la superficie del elemento perturbador, que se acompaña de una ruptura o reorganización continua de la estructura, dando como resultado una menor resistencia al flujo, que es causada por los componentes de alto peso molecular principalmente pectinas de alto medio y bajo metoxilo y la dispersión de sólidos (azucares pigmentos y vitaminas) de la fase sólida suspendida.

Para una misma temperatura y velocidad de deformación, el esfuerzo cortante sobre los cremogenados, toma valores más altos al aumentar la concentración de sólidos solubles, haciendo que el fluido tenga un comportamiento pseudoplástico que es frecuente en este tipo de fluidos de consistencia semidensa. Vale indicar que el contenido de pectinas de los frutos de

mango suele influenciar el esfuerzo cortante a una velocidad cortante; la reducción en el contenido de pectina en un 5.7% puede hacer decrecer la viscosidad hasta en un 50%. De los gráficos de la figura 3 se deduce que los cremogenados de fruta de mango, presentan mayor viscosidad en los estados de madurez 3, que son significativamente diferentes a los observados en las muestras del estado de madurez 4.



A



B

Figura 3. Perfil de viscosidad para los cremogenados de mango de frutos en estado 3 (A) y 4 (B).

La variedad Hilacha presento la mayor viscosidad en los dos estados evaluados, mostraron una clara relación entre la reducción del contenido de pectinas, a esto contribuye el alto contenido de fibra insoluble la cual refuerza la estructura y genera una mayor resistencia al flujo. La maduración del mango es de forma gradual, caracterizada por una progresiva despolimerización de las pectinas y polisacáridos hemicelulosicos con perdidas significativos de galactosa, arabinosa y manosa. En los cremogenados de mango estas pectinas existen bajo la forma de agregados solubles y bajo condiciones normales pueden ser considerados como precursores de la gelificacion,

CONCLUSIONES

El estudio de las propiedades reológicas de los cremogenados d mango, se presenta como una herramienta prelimina orientativa en la aptitud para el procesado de pulpas de la variedades: Hilacha, Irwin, Springfield, Tommy, Van Dyke Yulima, a su vez es el primer trabajo de caracterización desde e punto de vista viscoelástico. La variedad Irwin, presenta menc variación al esfuerzo de cizalla en los dos estados de madure estudiados. La viscosidad es dependiente del contenido d sólidos solubles, materia en suspensión y contenido de pectinas Los cremogenados presentan mayor viscosidad en los estado de menor madurez fisiológica y son significativament diferentes a los observados en las muestras de mayor madurez.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC INTERNATIONAL 1999. Official Methods of Analysis 16th edition. Maryland. USA.

BOGER, D.; TIU, C. 1974. Rheological properties of food products and their use in the design of flow systems. *Food Technol.* 26, 325-335.

CEREZAL. P.; BATISTA, A.; PIÑERA, R. 1995. Evaluation de cultivares de mango para la elaboración de pulpas", *Alimentaria*. 260, 29-31.

PACHECO, G.; FORERO, F.; SALAMANCA. G.; GARCÍA, E.; TAKEGAMI, J.; SALAMANDO, C. 2005. Evaluación de las principales variedades de mango (*Mangifera indica L.*) susceptibles al ataque de mosca de la fruta (*Anastrepha obliqua*). Memorias XI Congreso Colombiano de Ciencias Biológicas. ACCB. Universidad Autónoma de Occidente. Cali. Colombia.

G. SALAMANCA; F. FORERO; J. GARCÍA. 2006. *Consideraciones sobre investigaciones relevantes en la investigación del Mango en Colombia.* Memorias IX Congreso Venezolano de Fruticultura. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto Estado Lara.

IBARZ, A.; GONÇALVES, C.; EXPLUGAS, S. 1996 Rheology of clarified passion fruit juices. *Fruit Processing*, 6, 330-333.

KOKINI, J.; 1992. Rheological properties of foods. En "Handbook of food engineering". Heldman, D. Lund, D. Marcel Dekker. pp. 1-38.

MANOHAR B.; RAMAKRISMA, R.; RAMTEKE, R.S. 1990. Effect of pectin content on flor properties of mango pulp concentrates. Journal of Texture studies. Vol. 21. 179-190.

ODIGBOH, E.; MOHSENIN, N. 1975. Effects of concentration on the viscosity profile of cassava starch pastes during the cooking-cooling process. *J. Texture Stud*; 5 .441-457. 1975.

PELEGRINE, D. 1999. *Comportamento reológico das polpas de manga e abacaxi*", DEA/FEA/UNICAMP, Campinas.

QUEIROZ, A. 1998. *Estudo do comportamento reológico dos sucos de bacaxi e manga*", T.Doutorado, DEA/FEA/UNICAMP. Campinas.

QUEIROZ, A.; VIDAL. J.;. GASPARETTO, C. 1996. Influência dos sólidos suspensos na reologia do suco de abacaxi", *XIV Encontro Sobre Escoamento em Meios Porosos*, Uberlândia, vol 1. 49-53..

RAO. M. 1986. Rheological properties of fluid food. En "Engineering propertires of foods". Rao, M. Y Rizvi, S. H. E. Marcel Dekker.

SIQUEIRA, D.; BOTREL, N.; CARVALHO, V.; RAMOS, V.; COUTO, F. Características fisicas e quimicas de vinte cultivares de mangueira (*Mangifera indica L.*)", *Revista Brasileira de Fruticultura*, 10, 49-54. 1988.

TANNENBAUM, S. 1982. Modificaciones químicas y biológicas de los alimentos y su influencia sobre la calidad. En "Introducción a la ciencia de los alimentos". Fennema, O. R. Editorial Reverté Barcelona.

VIDAL. J. 1977. *Estudo reológico do suco de manga-efeito dos sólidos insolúveis*", D. de Mestrado, DEA/FEA/UNICAMP. Campinas.

PROPIEDADES FÍSICAS DEL FRUTO, PULPA Y JUGO DE LA NARANJILLA INIAP-PALORA (*Solanum quitoense x Solanum sessiliflorum*).

Alvarado, Jaime; Muñoz, Sonia; Medina, Soraya y Alvarado, Juan de Dios
Universidad Técnica de Ambato
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
Casilla 18-01-0334
Ambato – Ecuador

Palabras clave: propiedades físicas, reológicas, térmicas, naranjilla, frutas.

RESUMEN

En muestras de la variedad de naranjilla híbrida INIAP-Palora, se realizaron las determinaciones siguientes. Fruto entero: Peso, volumen, dimensiones, gravedad específica, espacios libres entre frutas, calor específico, difusividad y conductividad térmicas. Pulpa: Densidad a cuatro temperaturas, parámetros reológicos como función de la temperatura, energía de activación según los datos del índice de consistencia, calor específico, difusividad térmica y conductividad térmica. Jugo filtrado: Densidad como función de la temperatura, coeficiente volumétrico de expansión térmica, viscosidad como función de la temperatura, energía de activación para iniciar el flujo, calor específico, difusividad y conductividad térmicas.

Se presentan los datos promedios con su respectiva desviación estándar, que caracterizan al fruto y a sus partes principales. La información es útil para propósitos de cálculos de ingeniería para la simulación, diseño y construcción de equipos para el almacenamiento técnico de la fruta; en trabajos que conduzcan a su industrialización, mediante aplicación, adaptación o desarrollo de tecnologías, así en la elaboración de jugos y néctares. El trabajo llena en buena parte, la carencia de datos sobre este cultivo andino.

INTRODUCCIÓN

La naranjilla es un fruto cuyo cultivo prácticamente desapareció por causa de enfermedades agronómicas, por ventaja cruces con otras variedades permitieron su resurgimiento y actualmente se lo encuentra en especial en los valles de Pastaza, Napo y Yunguilla en Ecuador.

En especial el tamaño y el rápido deterioro del jugo de esta solanácea por problemas de oxidación, motivó buscar la mejora genética con la participación de la Universidad de Indiana y un programa del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), llegándose a obtener un híbrido INIAP-Palora como resultado del cruzamiento en polinización dirigida de *Solanumm sessiliflorum*, variedad Coccona Yantzaza y *Solanum quitoense*, variedad Baeza Roja (Heiser y colaboradores, 1995).

A pesar de la potencialidad económica por su sabor y aroma específicos y la versatilidad de usos, por ser una variedad nueva no existen datos o se conoce muy poco sobre los valores y los cambios en las propiedades físicas de esta naranjilla y de su parte comestible, lo que obstaculiza cualquier investigación o desarrollo de tecnologías. Con el propósito de llenar en parte este vacío, se determinaron varias de las propiedades físicas más utilizadas, las cuales se presentan en este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron frutos maduros de naranjilla INIAP-Palora (Solanum quitoense, Lam x Solanum sessiliflorum), el fruto es de forma redonda ligeramente achatada, de color amarillo, su pulpa es de color verde amarillento, es jugosa y poco consistente, aromática al momento de la cosecha y de sabor ácido. En la Figura 1 se presentan imágenes de esta fruta.

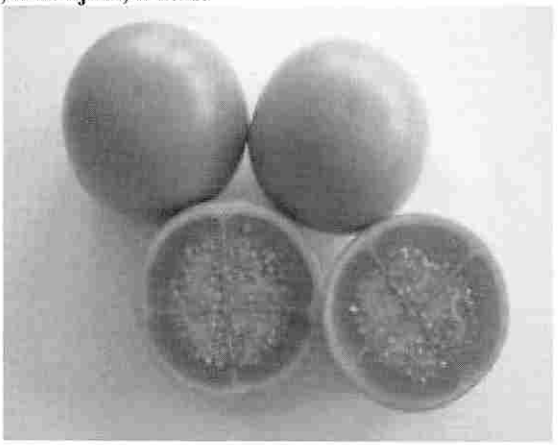


Figura 1. Frutos de naranjilla.

Los frutos fueron lavados individualmente para luego realizar las determinaciones siguientes: Peso de cada una de las naranjillas en el aire y sumergido en tolueno, con el uso de una balanza de precisión 0,01 g, marca Cobos. Volumen desalojado, utilizando una probeta de 1000 [ml]. Diámetro mayor y diámetro menor, con la ayuda de un calibrador pié de rey, marca Craftsman (0,001 pulg). El valor de la densidad se calculó, dividiendo el peso en el aire para el volumen desalojado, densidad verdadera, o para el volumen que incluye los espacios con aire entre frutos, densidad aparente. Los valores de espacios libres entre frutos se expresan como porcentaje, con el uso de la ecuación siguiente:

$$(\varphi) = (1 - (\rho_A/\rho_V)) * 100$$

Donde φ es el porcentaje de espacios con aire ente frutos, ρ_A es la densidad aparente y ρ_V es la densidad verdadera. El valor de la gravedad específica se determinó, relacionando el peso en el aire y la pérdida aparente de peso del fruto sumergido en tolueno, previamente se midió la gravedad específica del tolueno con la ayuda de un hidrómetro marca CMS con una precisión de 0,001. Luego, con un cuchillo se peló la cáscara, se extrajeron las semillas, para posteriormente, con la ayuda de una balanza electrónica Mettler (0,001 g), registrar el peso de la cáscara y de las semillas.

Los métodos utilizados para las distintas determinaciones, realizadas en la pulpa y en el jugo filtrado, por duplicado y en cuatro muestras cosechadas en fechas diferentes, fueron:

Densidad mediante picnómetros, balanza analítica y baños termostáticos con una precisión de 0,5°C, estabilizados a intervalos de 5°C entre 10° y 80°C, según el método descrito por Alvarado en Alvarado y Aguilera (2001). El coeficiente volumétrico de expansión térmica (β), se cuantificó utilizando la ecuación que relaciona el inverso de la densidad y la temperatura, de los valores del intercepto y de la pendiente.

$$(1/\rho_T) = (1/\rho_0) + (\beta/\rho_0)\,T$$

La viscosidad del jugo filtrado se midió con viscosímetros tipo Ostwald previamente calibrados, según lo indicado por Alvarado en Alvarado y Aguilera (2001), las medidas se realizaron a intervalos de 5°C entre 10° y 80°C, con la muestra termostizada

en un baño con una precisión de 0,1°C. Mediante un gráfico del inverso de la temperatura absoluta (T_A) contra el logaritmo natural de la viscosidad (η), se estableció el valor de la pendiente que corresponde a un coeficiente térmico (K*) relacionado con la energía para el flujo, según un modelo tipo Arrhenius.

$$\ln(\eta) = \ln(\eta_0) + (K^*/T_A)$$

Para la determinación de los parámetros reológicos en la pulpa, en un vaso de precipitación alto de 600 ml, se transfirieron 500 ml de pulpa de naranjilla, previamente licuada por 5 minutos hasta homogenizar la muestra. Se acopló el rotor LV3 de un viscosímetro rotacional digital marca Brookfield modelo LV-I, instalado con el brazo protector. Los valores del índice de consistencia **(K)**, y del índice de comportamiento al flujo **(n)**, correspondientes al comportamiento pseudoplástico, se calcularon con la ecuación del modelo de la ley de la potencia, según el método descrito por Alvarado (1996).

$$\tau = K(\gamma)^n$$

Los valores correspondientes al comportamiento tipo mixto, que son los dos índices indicados, más el esfuerzo de fluencia, se calcularon con el modelo de Casson según lo indicado por Charm (1981).

$$\tau^{0,5} = \tau_0^{\,0,5} + K'(\gamma)^{0,5}$$

Los valores del coeficiente térmico para flujo, se calcularon con la aplicación de la ecuación tipo Arrhenius, utilizando los datos del índice de consistencia.

El calor específico (C_p) se determinó por calorimetría según el método desarrollado por Hwang y Hayakawa (1979), previa cuantificación de la capacidad calórica del calorímetro y por aplicación de balances de energía en pruebas efectuadas entre 70° y 40°C.

Mediante ensayos de transferencia de calor en un baño termostático, con registro de los cambios de temperatura a diferentes tiempos, en el centro de frutos seleccionados por su esfericidad o de cilindros de cobre llenos con la muestra de pulpa y aislados en los extremos con tapones de caucho, de una longitud diez veces mayor con relación al diámetro, y un termómetro

digital con termopar de una precisión de 0,1°C; se determinó la difusividad térmica, según el método sugerido por Charm (1981), que considera el radio de la esfera o del cilindro y el factor de calentamiento experimental. En adición, por disponerse de los datos de la densidad y del calor específico, se calculó la conductividad térmica.

TABLA 1. RESUMEN DE DATOS SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS DETERMINADAS EN NARANJILLA HÍBRIDO INIAP- PALORA

PROPIEDAD	UNIDAD	FRUTA ENTERA*	PULPA**	JUGO**
Dimensiones:	[m]			
Diámetro mayor		0,0552± 0,00378		
Diámetro menor		0,0492± 0,00296		
Volumen	[m^3]			
Extra		0,000115		
De primera		0,00090		
De segunda		0,000078		
De tercera o industrial		0,000055		
Pesos:	[kg]			
De la fruta		0,0837± 0,0028		
Sumergida en tolueno		0,0074± 0,0004		
De la cáscara		0,0116± 0,0007		
De las semillas		0,0026± 0,0004		
De la parte comestible		0,0693± 0,0017		
Gravedad específica:				
A 15°C		0,935± 0,008		
Densidad:	[kg/m^3]			
Aparente (20°C)		479±11		
Verdadera (20°C)		968±22		
A 10°C			1034	1030
A 20°C			1033	1027
A 30°C			1032	1023
A 40°C			1031	1017
Espacios con aire (voids)	[%]	51±1		
Coeficiente de expansión:	[1/K]			
Entre 10° - 20°C				0,00033
Entre 20° - 30°C				0,00041
Entre 30° - 40°C				0,00058
Viscosidad:	[Pa.s]			
A 10°C				0,00338
A 20°C				0,00247
A 30°C				0,00185
A 40°C				0,00140
Índice de comportamiento de flujo:				
Pseudoplástico (10° - 40°C)			0,43	
Índice de consistencia	[Pa s^n]			
Pseudoplástico				
A 10°C			2,62	
A 20°C			1,85	
A 30°C			1,78	
A 40°C			1,36	
Tipo mixto (según Casson)				
A 10°C			0,61	
A 20°C			0,36	
A 30°C			0,41	
A 40°C			0,26	
Esfuerzo de fluencia:	[Pa]			
A 10°C			0,95	
A 20°C			0,85	
A 30°C			0,82	
A 40°C			0,74	
Coeficiente térmico para flujo:	[KI]			
Newtoniano				2321
Pseudoplástico			1792	
Calor específico	[J/kg.K]	3440	3447	3516
Difusividad térmica	[m^2/s]	$1,43*10^{-7}$	$1,32*10^{-7}$	$1,37*10^{-7}$
Conductividad térmica	[W/m.K]	0,46	0,47	0,49

* Valores promedios de 144 determinaciones por duplicado ± desviación estándar

** Valores obtenidos por duplicado en 4 muestras, cada una proveniente de 36 unidades y cosechadas durante 4 meses

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores promedios de las propiedades físicas medidas en frutos sanos, adquiridos en diferentes fechas durante dos años. En varios casos los datos corresponden a distintas temperaturas.

Fruto entero.

El tamaño de esta variedad es mayor comparado con el de otras variedades como la Puyo (Alvarado, 2000), los diámetros mayor o ecuatorial y menor o polar son próximos a 5,5 [cm] y son un indicativo de la esfericidad de esta fruta. Una clasificación de acuerdo con el tamaño de la fruta fue hecha por el INEN (1990), distingue cuatro categorías, extra cuando el diámetro mayor supera los 6 [cm], de primera que es la más común con diámetros entre 5,5 y 6,0 [cm], de segunda entre 5,0 y 5,5 [cm] y de tercera o de uso industrial con un diámetro menor a 5,0 [cm]; los datos de volumen presentados permiten distinguir el tamaño promedio de estas categorías que van desde 116 [cm^3] en la extra hasta 55 [cm^3] en la de uso industrial.

Se destaca el alto porcentaje de la parte comestible, 83%, y el bajo porcentaje de semillas, 3%, las cuales son pequeñas y numerosas, la cáscara es más gruesa con relación a la observada en otras variedades. La gravedad específica es menor que la del agua, es decir que los frutos sanos flotan en agua. La densidad aparente o de bulto que incluye en su cálculo los espacios entre las naranjillas debido a su esfericidad presentó un valor bajo, 479 [kg/m^3]; el valor de la densidad verdadera o real calculado con el volumen de cada fruta sin considerar los espacios entre frutos, fue de 968 [kg/m^3]; según lo anterior el porcentaje de espacios con aire que quedan entre las frutas cuando se las almacena al granel (voids) es próximo a la mitad del volumen total que ocupa un lote de frutas.

Pulpa

La densidad de la pulpa disminuye ligeramente con el incremento de la temperatura, una unidad [kg/m^3] por cada 10°C, desde 1034 a 10°C hasta 1031 a 40°C.

Con relación al comportamiento reológico se destaca lo siguiente. En el intervalo de temperatura desde 10 a 40°C, el valor del índice de comportamiento de flujo se mantiene aproximadamente constante en 0,43, valores inferiores a la unidad son característicos de fluidos no newtonianos que presentan pseudoplasticidad; recordar que el modelo de Casson asume un valor de 0,5. Los datos del índice de consistencia, determinados en las muestras licuadas de pulpa, considerando un comportamiento pseudoplástico definido por el modelo de la ley de la potencia, indican una disminución de los valores desde 2,62 [Pa. s^n] a 10°C hasta 1,36 [Pa. s^n] a 40°C; valores menores se obtuvieron al aplicar el modelo de Casson que van desde 0,61 hasta 0,26 [Pa. $s^{0,5}$] a las dos temperaturas indicadas.

Los dos modelos utilizados, tanto para comportamiento pseudoplástico y de tipo mixto según Casson, describen en forma adecuada la reología de éstas pulpas, con coeficientes de correlación superiores a 0,9. Obviamente con el modelo de Casson para el tipo mixto, se obtiene una mayor cantidad de información, útil en especial cuando se calcula la potencia de bombas para el transporte. Los valores del esfuerzo de fluencia mínimo, llamado también umbral de fluencia, disminuyen desde 0,95 hasta 0,74 [Pa] conforme aumenta la temperatura desde 10 hasta 40°C.

El calor específico ($\mathbf{C_p}$) de la pulpa de naranjilla es de 3 447 [J/kg. K], valor muy próximo al determinado en el fruto entero, 3 440 [J/kg. K]. Alvarado (1991) publicó una ecuación que relaciona el calor específico con el contenido de agua o humedad de frutas, su aplicación conduce a obtener valores ligeramente inferiores, para una humedad de 82 [g/100 g] de 3 385 [J/kg. K], las diferencias del orden del 2% se explican por los cambios en la humedad.

El valor de la difusividad térmica determinado en pulpa de naranjilla fué: $\alpha = 1{,}32 * 10^{-7}$ [m^2/s]; y de la conductividad térmica, $\mathbf{k}$ = 0,47 [W/m.K]. Estos valores se aproximan a otros publicados por Alvarado (1994).

Jugo filtrado.

Los valores de la densidad (ρ) expresados en [kg/m^3] disminuyen con el incremento de la temperatura (**T**) en °C, desde 1030 hasta 1017 a 10° y 40°C. respectivamente.

Con los datos del inverso de la densidad que corresponde al volumen específico, se calcularon los valores del coeficiente volumétrico de expansión térmica a intervalos de 10°C, se estableció un incremento de los valores, en forma similar a lo publicado para el agua, los datos están comprendidos entre $3{,}3*10^{-4}$ hasta $5{,}8*10^{-4}$ [1/K].

La viscosidad disminuye con el incremento de la temperatura, registrándose una disminución de valores desde 3,38 [mPa.s] a 10°C hasta 1,40 [mPa.s] a 40°C. Estos valores son similares a otros datos establecidos en jugos filtrados de diversas frutas (Alvarado y Romero. 1989).

Con relación a las propiedades térmicas, en jugo natural de naranjilla se determinó un valor de 3516 [J/kg.K] para el calor específico, ligeramente superior al determinado en la pulpa y en el fruto entero. El valor de la difusividad térmica determinado en jugo de naranjilla fué: $\alpha = 1{,}37*10^{-7}$ [m^2/s]; y de la conductividad térmica, $\mathbf{k}$ = 0,49 [W/m.K].

En conjunto, los datos presentados llenan el vacío de la falta de información técnica sobre este promisorio fruto, posibilitan su caracterización y son de utilidad para cálculos y simulación de procesos a los que puede ser sometida la naranjilla INIAP-Palora, en la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por el soporte financiero a través de Proyectos Internos del Centro de Investigaciones (CENI), Proyecto: Biofilms (PCIC-UTA).

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

Alvarado JdeD (2002). Propiedades físicas del fruto, pulpa y jugo de la naranjilla. *Ciencia y Tecnología*, 1:115-125.

Alvarado JdeD y Aguilera JM (2001) *Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos*. pp.1-28, 49-60. Zaragoza, España. Editorial Acribia.

Alvarado JdeD (1996) *Principios de Ingeniería Aplicados a los Alimentos*. pp.225-227, 142, 152. OEA. Quito, Ecuador: Radio Comunicaciones, División de Artes Gráficas.

Alvarado JdeD (1994) Propiedades físicas de frutas. IV. Difusividad y conductividad térmica efectiva de pulpas. *Investigación Aplicada Latinoamericana* 24:41-47.

Alvarado JdeD (1991) Specific heat of dehydrated pulps of fruits. *J. Food Process Eng.* 14:189-195.

Alvarado JdeD, Romero C (1989) Physical properties of fruits. I-II. Density and viscosity of juices as function of soluble solids content and temperature. *Latin American Applied Research (LAAR)*, 19:15-21.

Charm S (1981) *The Fundamentals of Food Engineering*. 3th. ed. pp.57-59. Westport, Connecticut: AVI Pub. Co. Inc.

Heiser Ch, Rodríguez V, Soria J, Soria N, Barrera H, Ulcuango H, Pizango J (1995) Información técnica para la inscripción del híbrido de naranjilla INIAP-Palora. Quito-Ecuador. INIAP. 15p.

Hwang MP, Hayakawa KI (1979) A specific heat calorimeter for foods. *J.Food Sci.* 44:435-438.

INEN (1990). Folletos de divulgación: Manejo en fresco de naranjilla. Quito, Ecuador. INEN.

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE GOMA XANTANA, POR EL MËTODO DINÁMICO POR VARIACIÓN DE PRESIÓN

Carbajal De Nova, Rosa Isela[1]; Tecante-Coronel, Alberto[2]
1) UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA, IPN DEPARTAMENTO DE BIOINGENIERÍA, Av. Acueducto s/n Barrio la Laguna Ticoman CP 07340, Delegación Gustavo A.Madero. México D.F.
2) FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGíA, Conjunto E, Ciudad Universitaria CP 05230, DelegaciónCoyoacán. México
rcarbajal@acei.upibi.ipn.mx

Palabras clave: k_La, coeficiente transferencia oxígeno, xantana

RESUMEN

La xantana es una de las gomas de origen microbiano de mayor uso en la industria alimentaría por sus propiedades como espesante y modificador de las propiedades funcionales de los alimentos. (Morris 1987).
En el proceso para producción de xantana existe una interacción recíproca entre la acumulación de polisacárido y la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación. La concentración de oxígeno disuelto determina la productividad del proceso, y es el reactivo limitante.
Durante la producción de xantana, la determinación experimental de la velocidad de transferencia de oxígeno, se realiza poco, pues requiere la determinación experimental del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_La), parámetro difícil de obtener, ya es que altamente dependiente de las condiciones de mezclado en el reactor.
El método dinámico por variación de presión (MDVP) se plantea como una alternativa para la obtención del k_La, ya que la determinación experimental es independiente del patrón de mezclado.
El MDVP había sido caracterizado solamente en soluciones de electrolitos por lo que el objetivo específico de este trabajo es la obtención de los intervalos de operación en caldos de fermentación para producción de xantana.

INTRODUCCIÓN

El método dinámico por variación de presión (MDVP), fue propuesto por Linek y colaboradores (1987), como una alternativa para poder cuantificar los efectos de la película de líquido que rodea a los sensores que detectan la concentración de oxígeno disuelto, sobre el coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_La). En este método se determina un parámetro (L) que sirve para indicar el espesor de la película, el cual es incluido en el cálculo del k_La.

El método dinámico por variación de presión, mide el cambio en la concentración de oxígeno disuelto en respuesta a una perturbación introducida en el medio, y relaciona la capacidad de respuesta a la perturbación con la capacidad de transferencia de oxígeno que tiene el medio. La perturbación introducida es un cambio en la presión interna del tanque, la cual se logra al ocluir parcialmente la salida de la corriente de gas que se introduce en el reactor. Al aumentar la presión dentro del tanque la presión parcial del oxígeno dentro de cada burbuja de aire también se incrementa, por lo que hay un incremento en la solubilidad, hasta alcanzar el estado de equilibrio correspondiente a la nueva presión. Como el cambio se lleva a cabo en todas las burbujas al mismo tiempo la determinación es independiente del patrón de mezclado.
Para que el cambio en la señal de oxígeno disuelto corresponda a un cambio en la presión parcial de oxígeno dentro de las burbujas, y estos cambios puedan relacionarse con la velocidad de transferencia de oxígeno dentro del reactor se requiere que el oxígeno sea la especie que reaccione al cambio de presión; en una corriente de aire también se encuentran otras especies gaseosas como el nitrógeno y el vapor de agua, por lo que el flux de nitrógeno que también es un gas de baja solubilidad debe ser equimolar con el de oxígeno y la presión de vapor del agua debe permanecer constante en el intervalo de cambio de la presión interna del tanque (cambio pequeño de la presión interna). Así mismo las propiedades de las burbujas de la fase gaseosa como el volumen, la densidad (el gas se comporta como fluido incompresible) y el área superficial deben permanecer constantes durante la determinación, lo que trae como consecuencias prácticas que la temperatura, el hold-up (fracción de gas en la dispersión gas-líquido), y el flujo másico de gas, sean constantes durante la determinación. Y para que el k_La sea el parámetro representativo de la velocidad de transferencia de oxígeno, se requiere que la mayor resistencia a la transferencia sea la película de líquido adyacente a la burbuja.
El registro del estado en transitorio ocasionado por el cambio de presión, es la base del cálculo del k_La. El cambio de presión es posible efectuarlo en ambos sentidos, aumentándola o disminuyéndola, pero el incremento es la forma práctica más fácil de lograrlo, y tiene resultados más exactos (Linek *et. al.* 1994). El cambio de presión no es mayor a 20 kPa, ya que cambios mayores pueden inducir la nucleación espontánea de las burbujas en el medio y cambiar el patrón de distribución del oxígeno disuelto. Como el cambio en la concentración de oxígeno depende del cambio en la presión dentro de las burbujas, se produce en todos los sitios del reactor al mismo tiempo, sin que intervengan el desplazamiento de las burbujas en las corrientes de líquido, por lo que la determinación de k_La se vuelve independiente del patrón de mezclado. Los cambios que se registran tanto en la concentración de oxígeno como en la presión dentro del tanque, están afectados por las características de funcionamiento de los sensores utilizados. Las respuestas de los sensores se obtienen experimentalmente, mediante la utilización de la teoría de los momentos, que dice que el funcionamiento de los sensores puede deducirse a través de las características de las señales. La respuesta del sensor de oxígeno, obtenida a partir de las señales, es corregida al tomar en cuenta la respuesta de la parte electrónica del sensor, y el espesor de la película de líquido adherida a la superficie del sensor. La respuesta electrónica del sensor se obtiene a partir de la respuesta al cambio en una corriente gaseosa, la cual primero está compuesta por un gas inerte (el más usado es nitrógeno) y después por una corriente que contiene oxígeno (aire, mezclas enriquecidas u oxígeno puro). El cambio puede hacerse en varias opciones descritas por Linek *et. al.* (1993). La medida del espesor de la película (L) se obtiene experimentalmente a partir de la desviación en la señal obtenida en aire, en donde hay una ausencia de película de líquido sobre la superficie, y la obtenida en el líquido saturado bajo las condiciones de mezclado del tanque. Los momentos de los sensores de presión y de oxígeno (sin considerar el efecto de la película de líquido) se obtienen a partir del área entre la respuesta normalizada de los sensores de oxígeno y presión. El k_La se calcula a través de los momentos de los sensores.

MATERIALES Y METODOS

Biorreactor. Se utilizó un biorreactor, tipo tanque enchaquetado de acero inoxidable, de 20 L de capacidad, con fondo hemisférico, agitador mecánico central y puertos para muestreo e instrumentación. El diámetro del tanque fue 13.3 cm con 4 placas deflectoras de 1.5 cm de ancho. En la tapa del reactor se instalaron 2 puertos con extensión de tubing de acero inoxidable de 1/8 in; en uno de los puertos se instaló una válvula reguladora para restringir la salida del flujo de aire, en el otro puerto se instaló un sensor digital para medición de presión (Cole-Parmer, USA).

Fermentación. Se empleo la cepa *Xanthomonas campestris* CDBB-B-157, en Medio, el cual contiene Na_2HPO_4 (10 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), K_2SO_4 (1 g/L), NaCl (1 g/L), $MgSO_4$ (0.2 g/L), $CaCl_2$ (0.01) , $FeSO_4$ (0.001) Extracto de levadura (1 g/L), Peptona de caseina (1 g/L) y glucosa (20 g/L). Condiciones de operación 30◦C, agitación de 100 rpm, flujo de aire 12 L/minuto.

Mediciones de presión. La presurización del tanque se realizó restringiendo la salida del aire del reactor cerrando parcialmente la válvula reguladora del puerto sobre la tapa del tanque. El sensor de presión se conectó directamente al otro puerto de salida, para medir la presión del gas en el interior del tanque.

Cálculo de la concentración de oxígeno disuelto. La máxima solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo (C*) se consideró la disminución de la solubilidad del oxígeno por la presencia de los componentes del medio. El % de tensión de oxígeno disuelto (%TOD) indicado por el sensor se convierte a concentración de oxígeno disuelto (C_L) mediante la ley de Henry; donde la constante de Henry (H) incluye el efecto de los solutos y se expresa como coeficiente de Bunsen (α)

Determinación de k_La. Los cambios que se registran tanto en la concentración de oxígeno como en la presión dentro del tanque, están afectados por las características de funcionamiento de los sensores utilizados. Las respuestas de los sensores se obtienen experimentalmente, mediante la utilización de la teoría de los momentos. La concentración de oxígeno obtenido a partir de las señales, es corregida al tomar en cuenta la respuesta de la parte mecánica del sensor, y el espesor de la película de líquido adherida a la superficie del sensor.

La respuesta mecánica del sensor se obtiene a partir de la respuesta al cambio en una corriente gaseosa, la cual primero está compuesta por nitrógeno y después por una corriente que aire. Las constantes de respuesta del sensor se obtienen colocando el sensor sobre una válvula de 3 vías (Linek *et al.*, 1993)de manera que la corriente de gas actué perpendicularmente sobre la membrana del sensor. Se hace pasar nitrógeno por la membrana, hasta obtener una lectura de cero, y después se hace pasar aire (a la presión de entrada al tanque), registrándose el porcentaje de presión parcial registrado por el sensor cada 3 segundos, durante los primeros 30 segundos y después cada 5 segundos. Los porcentajes de presión parcial de oxígeno se normalizan. La medida del efecto del espesor de la película sobre la señal de oxígeno (parámetro L) se obtiene experimentalmente a partir de la desviación en la señal obtenida en aire, en donde hay una ausencia de película de líquido sobre la superficie que se calibra al 100% de saturación, y la obtenida en el líquido saturado bajo las condiciones de mezclado del tanque. Los momentos de los sensores de presión y de oxígeno (sin considerar el efecto de la película de líquido) se obtienen a partir del área entre la respuesta normalizada de los sensores de oxígeno y presión. El k_La se calcula a través de los momentos de los sensores, empleando la ecuación

$$k_L a = \frac{1}{b_G - b_P - b_H}$$

Monitoreo. Se realizo un registro continuo de la concentración de oxígeno disuelto; a intervalos regulares de tiempo se realizó la determinación de k_La.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del k_La tanto en el medio de cultivo como en el caldo de fermentación se lleva a cabo de acuerdo a lo reportado por Linek et al. (1989a); sin embargo se observa un efecto de la composición, ya que el tiempo necesario para la estabilización de la señal transitoria se incrementó significativamente, a 100 rpm 270 s para agua, 750 s para el medio S.

El valor de k_La del medio de cultivo fue 0.005960 s^{-1}. El valor del kLa durante la fermentación se mantuvo en este orden de magnitud El valor máximo de k_La, es el del medio de cultivo saturado con aire, correspondiente al valor del k_La al momento de la inoculación. El k_La determinado a lo largo de la fermentación, muestra un patrón de variación oscilatorio, en vez de una tendencia en donde el valor de k_La se estabilizara como se reporta en fermentaciones para la producción de gomas alimenticias.

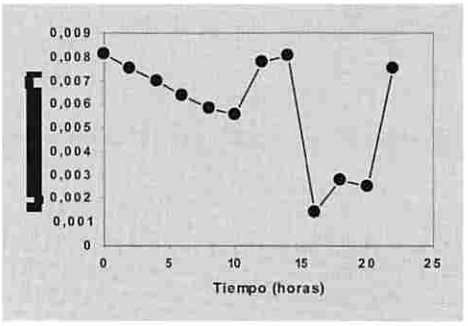


Figura 1. Evolución del k_La determinado por MDVP. fermentación para producción de xantana.

En los caldos de fermentación después de alcanzada la fase estacionaria del microorganismo, se observa que el caldo cambia los tiempos de retención de las burbujas de aire, efecto notado en la cantidad de burbujas que se acumulan en las muestras de caldo, dandole un aspecto esponjoso; la aparición de las burbujas se encuentra caracterizada por un descenso en la presión interna de la cabeza de aire retenida en el tanque.

Cuando se realiza la determinación del k_La por MDVP en el caldo en estas condiciones, al incrementar la presión dentro del tanque no se produce un cambio en la señal del sensor de oxígeno; si se eliminan estas burbujas del caldo de fermentación y se realiza nuevamente la determinación de k_La, se puede llevar a cabo la medición; lo que indica que la presencia de las burbujas retenidas es una limitante a la determinación de k_La por MDVP.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el MDVP es aplicable en medios de cultivo y caldos de fermentación. La determinación experimental no es afectada por el cambio en las etapas de crecimiento del microorganismo o de las condiciones de operación de la fermentación; pero no puede realizarse cuando hay una acumulación de burbujas de gas en el caldo de fermentación. Se detecto un efecto de los solutos disueltos para formar el medio de cultivo, que provoca un aumento en el tiempo de la determinación; sin embargo no se encontró una relación directa entre los componentes del medio y el tiempo necesario para alcanzar el estado estable de la señal, ya que este incremento se mantiene similar entre el medio de cultivo y el caldo de fermentación en todos los tiempos muestreados.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

Linek V., Moucha T., Dousova M., Sinkule J., (1994) Measurement of k_La by Dynamic Pressure Method in Pilot-Plant Fermentor, Biotech. and Bioeng., vol. 43, pp 447 - 482

Linek V., Benes V., Sinkule J., Moucha T., (1993) Non-Ideal Pressure Step Method for k_La Measurement, Chem. Eng. Sci., vol. 48, No. 9, pp 1593 – 1599.

Linek V., Vacek V., Benes P., Sinkule J. (1989a) Transient Characteristics of Oxygen Probes With Significant Liquid Film Effects, Biotech. and Bioeng., vol. 33, pp 39 - 48.

Linek V., Vacek V., Benes P., (1987) A Critical Review and Experimental Verification of the Correct Use of the Dynamic Method for the Determination of Oxygen Transfer in Aerated Agitated Vessel to Water, Electrolyte Solutions and Viscous Liquids, The Chem. Eng. J., vol. 34, pp 11– 34

Morris V., (1987) New and Modified Polysaccharides. In Food Biotecnology (King R., Cheetham P., ed.), vol. I. Elsevier, England

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL ALMIDÓN NATIVO Y MODIFICADO DE LA RAIZ DEL CHAYOTE (*Sechium edule*).

Cruz, Ezri; Villanueva, Mauro; Antonio, Ma.del Carmen; Jiménez, Maribel y Beristain, Cesar Ignacio
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS. UNIVERSIDAD VERACRUZANA.
DEPTO. DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO. GRUPO UNIPHARM DE MÉXICO.
verde2222_@hotmail.com
XALAPA – VERACRUZ - MÉXICO.

Palabras clave: Almidón, Fosfatación, Succinatacion, Hidrolisis, Sechium edule.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades fisicoquímicas del almidón obtenido de la raíz de chayote (chayotextle) en su forma nativa y después de haber realizado tres modificaciones (Fosfatación, Succinatación e Hidrólisis). El Chayotextle se le atribuye un uso principalmente alimenticio, sin embargo, no existen estudios ni de extracción del almidón ni evaluación de sus propiedades fisicoquímicas.

Al analizar los diferentes almidones obtenidos se encontró que la densidad aparente (0.55) y compactada (0.74) fue mayor para el almidón hidrolizado respectivamente y menor para el almidón succinatado respectivamente. Sin embargo, el índice de Hausner fue mayor para el almidón fosfatado (1.53). Con respecto a la distribución de tamaño de partícula, el 63.6% de las partículas tuvieron un tamaño menor a 74 μ el almidón que presentó menor porcentaje de solubilidad fue el almidón nativo con un valor de 19.75 % y el de mayor porcentaje de solubilidad fue el almidón fosfatado con un valor de 57.55 %. El pH del almidón nativo e hidrolizado tuvo un carácter ácido, en cambio el almidón fosfatado y succinatado tuvieron pH básico de 11.6 y 7.6 respectivamente, la evaluación de ángulo de reposo al almidón succinatado fue el más alto con un ángulo de 20.60°, los demás tuvieron un ángulo aproximado de 12.87°. No hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la velocidad de flujo para los diferentes tipos de almidones analizados.

INTRODUCCION

El chayote es una curcubitacea de la cual se utiliza principalmente su fruto pero también es utilizada su raíz, llamada chayotextle, es tuberosa con grandes cantidades de almidón.Esta planta es común en Centroamérica y México principalmente en las zonas de Veracruz y parte de Tabasco, crece en suelos húmedos y sin exposición directa al sol.
Existen varios estudios de la extracción, evaluación del almidón y su posterior utilización en procesos alimentarios, de diferentes tubérculos como son: la papa, yuca, arracacha, malanga, etc. Pero no se ha realizado ningún tipo de estudios a la raíz del chayote (*Sechium edule*) llamada comúnmente chayotextle.

Los estados del país que se destacan por su producción de chayote a nivel comercial son: Veracruz, Jalisco, Michoacán, México y Guanajuato.

De los estados mencionados el que ocupa el lugar número uno en producción es Veracruz produciendo más del 78 % de un total de 100 % en el país, produciendo en el 2003 un total de 78,581 toneladas de chayote generando más de 143,608 miles de pesos, utilizando 1,227 hectáreas solo en el estado de Veracruz; a nivel nacional la producción contó con un total de 100,620 toneladas de chayote produciendo 187,589 miles de pesos, para lograr esta producción se utilizaron 1,816 hectáreas en diferentes estados los que se mencionan a continuación en orden descendiente de producción; Veracruz 78.09 %, Michoacán 14.55 %, Jalisco 3.34 %, San Luis Potosí 1.98 %, Guanajuato 1.29 % y otros 0.75 %.

Dentro del estado de Veracruz se destacan varios municipios que son los responsables de la gran producción de chayote de la especie (Sechium edule Sw.) los más importantes son: con el 35.55 % Ixtaczoquitlán produce 34.451 toneladas generando 59,447 miles de pesos, con 23.49 % Actopan produciendo 22,767 toneladas generando 45,535 miles de pesos, 11.14 % Ixhuatlan del Café produce 10,800 toneladas generando 18,900 miles de pesos, 8.20 % Coscomatepec produce 7,952 toneladas y genera 13,916 miles de pesos, 7.61 % Huatusco produce 7,380 toneladas y genera 12,546 miles de pesos y otros municipios producen el 14.01 % con 13,541 toneladas, generando 23,097 miles de pesos.

Las hortalizas en sus diferentes formas (hojas, flores, frutos, tallos y raíces) juegan un papel importante en la dieta humana. Aunque el chayote es generalmente cultivado por los frutos, también suelen utilizarse las hojas tiernas y las puntas de los tallos.

El chayotextle es comúnmente utilizado en la alimentación humana, preparándose en forma parecida a las papas y con un sabor similar al camote. Su fécula es de muy fácil digestión, se usa también como forraje de ganado, especialmente en cerdos. Cada año se extrae solo una parte de la raíz a fin de conservar la planta, solo en plantas caseras ya que para que la calidad de fruto no se pierda los sembradios comerciales retiran totalmente la raíz a los dos años de cosecha.

Según algunos cálculos una planta de chayotextle mediana puede producir de 20 a 25 kg al año de raíz tuberosa.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se utilizó Chayotextle obtenido del mercado local, y los reactivos usados fueron: acido clorhídrico, tiocianato de amonio, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético glacial, yoduro de potasio. , succinato de sodio, tripolifosfato de sodio, hidróxido de sodio.

Métodos

Extracción
Por medio de una molienda húmeda por el método Rodríguez (2005).

Modificaciones
Fosfatación: método de Zilli (2005). Se pesaron y se depositaron en un recipiente de vidrio almidón, se agregó tripolifosfato de sodio y agua destilada. La suspensión se agitó durante 30 minutos, después se filtró y el residuo sólido se secó a 40-45 °C. Este se pulverizó y se dejó a 65 °C por 90 minutos y 20 minutos más a 155 °C.
Succinatación: método Sandoval (2005). En agua se disolvió el almidón y adicionó gradualmente succinato de sodio; se ajustó el pH a 8 con NaOH al 12 % se dejó reposar por 3 h y se ajustó el pH a 8, luego se centrifugó, posteriormente se dejó secar por 24 h, después se pulverizó y se tamizó con malla 60.

Hidrólisis: método de Ferrer (2002). Se realizó colocando HCl al 5 % en almidón con una relación sólido/liquido 30:1 a 47.7 °C y se agregó agua y se colocó en baño María durante 8 h una vez terminado el tiempo se ajustó el pH a 5 con NaOH al 10 % o con HCl al 5 % posteriormente se centrifugó; el sedimento se secó en estufa de circulación forzada a 45 °C por 24 h, el almidón seco se pulverizó y se tamizó en malla 60.

Pruebas para evaluar almidón
Densidad aparente y compactada: método de Díaz (1999).

Índice de Hausner: método de Fernández (1998). Mientras el valor del cociente sea más alto el flujo del polvo será menor.

Distribución de tamaño de partícula: método de Martínez (2006).

Solubilidad: método de Pifferi (1999) y Schoch (1964). Se reportó en gramos de soluto en 10 ml de solución. La fórmula para solubilidad utilizada fue la siguiente:

$$\%\ Solubilidad = \frac{P3\,(ml \times 10)}{P1}$$

En donde: P3 y P1 son los pesos inicial y final.

pH: método AOAC (1980). Solución al 20% y se determinó pH con un potenciómetro.

Angulo de reposo y velocidad de flujo: método de Rafael (1999).

La fórmula para el ángulo de reposo es:

$$\alpha = \frac{Arc\ tang\ h}{r}$$

En donde: h es la altura del cono y r es el radio del cono.

La fórmula para la velocidad de flujo:

$$vf = \frac{g}{0.788\,dt \times t}$$

En donde : G son los gramos del polvo a evaluar y t es el tiempo en segundos.

Poder de hinchamiento: método de Schoch (1964) y Sathe y Salunkhe (1981). La fórmula para poder de hinchamiento es:

$$poder\ de\ hinchamiento = \frac{P2 \times 100}{P1 \times (100 - \%\ solubilidad)}$$

En donde: P2 es el peso medio y P1 es el peso inicial.

Humedad: método de AOAC (1980) por diferencia de peso.

Viscosidad: método de Zurima (2003).

RESULTADOS

En la densidad aparente no hubo diferencias significativas entre los diferentes tipos de almidones obtenidos, siendo el almidón hidrolizado el de mayor densidad y el de menor, el almidón succinatado.

En el índice de Hausner se observó que el almidón hidrolizado fue el de menor valor (1.35) mientras que el almidón fosfatado presentó un valor ≥ a 1.53.

La velocidad de flujo figura 1. Como se observa hubo diferencias significativas entre cada uno de los almidones siendo menor el almidón nativo y mayor en el almidón hidrolizado.

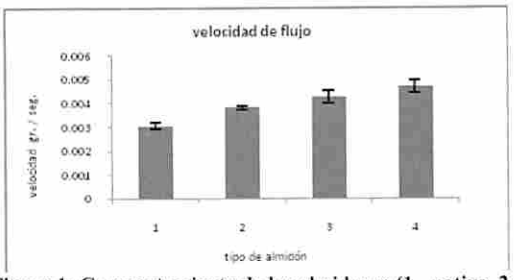


Figura 1: Comportamiento de los almidones (1.- nativo, 2.- fosfatado, 3.- succinatado y 4.- hidrolizado) en la evaluación de la velocidad de flujo.

En el ángulo de reposo los almidones reportaron datos similares con excepción del almidón succinatado con un valor de 0.5503 ° (figura 2).

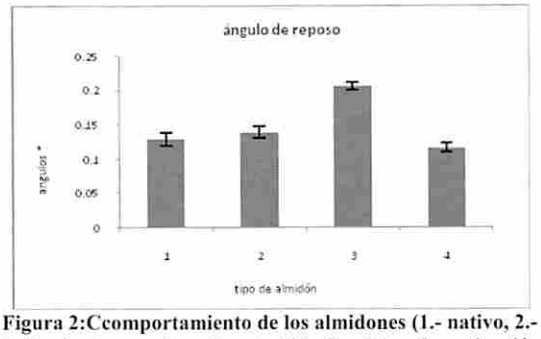
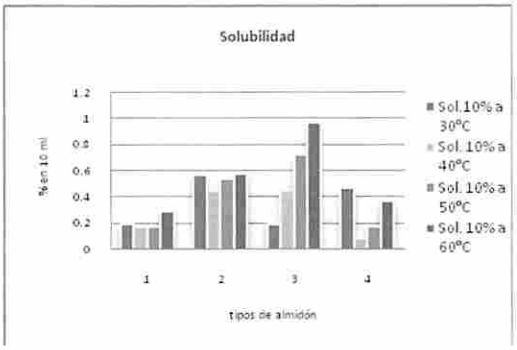


Figura 2:Ccomportamiento de los almidones (1.- nativo, 2.- fosfatado, 3.- succinatado y 4.- hidrolizado) en la evaluación de ángulo de reposo.

La figura 3 y 4 muestran la solubilidad al igual que el poder de hinchamiento se realizó a diferentes temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) en una solución al 10% de almidón.

El comportamiento de los almidones en la evaluación de la solubilidad fue el siguiente:



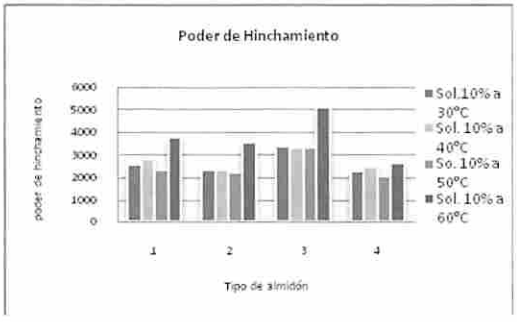


Figura 3 y 4: Comportamiento de los almidones (1.- nativo, 2.- fosfatado, 3.- succinatado y 4.- hidrolizado) en las evaluaciones de solubilidad y poder de hinchamiento.

El almidón nativo presentó un comportamiento irregular ya que disminuyó su solubilidad en las primeras 3 temperaturas y después subió drásticamente en la temperatura de 60° C. El almidón fosfatado se comportó de una forma más regular aunque en la temperatura de 30° C inició con una solubilidad de 0.5755 % en 10 ml, pero empezó y se incrementó hasta 0.5827% en 10 ml.

El almidón succinatado tuvo un comportamiento típico iniciando con una solubilidad baja a la temperatura de 30° C aumentando gradualmente hasta que llegó a la solubilidad de 0.9747% en 10 ml, que no solo fue la solubilidad mayor del almidón succinatado, sino también de los demás almidones. Por último, el almidón hidrolizado se comportó de forma muy similar al almidón fosfatado pero con porcentaje de solubilidad menor.

En la prueba de poder de hinchamiento los 4 almidones se comportaron de forma muy similar entre si y sin variaciones significativas entre ellos.

En la evaluación del tamaño de partícula los almidones presentaron valores muy similares y fueron de 65.9% para el almidón nativo, 63.7% para el almidón fosfatado, 66.9% para el hidrolizado y 57.9% para el almidón succinatado y en general para estos fueron de 74µ y este tamaño de partícula es el que se reportó en la literatura debe tener el almidón. (Handbook of exipients 2002).

El almidón hidrolizado tuvo un valor de 5.7 en la evaluación del pH y el almidón fosfatado un valor de 11.6, estos valores pueden justificarse por el carácter de las respectivas modificaciones, el almidón succinatado contó con un valor de pH de 7.6 y el almidón nativo un pH de 5.9.

En la evaluación de la humedad los almidones fueron comparados con el almidón de maíz que se utiliza comúnmente en las industrias alimenticias y los resultados se muestran en la figura 5 observándose que el almidón nativo presentó el menor valor de % de humedad (2.29 %) y el de mayor valor de % es el almidón hidrolizado (16.40 %), pero todos estuvieron dentro del porcentaje de humedad recomendado por la literatura (de 10 a 18%) (Handbook of exipients 2002).

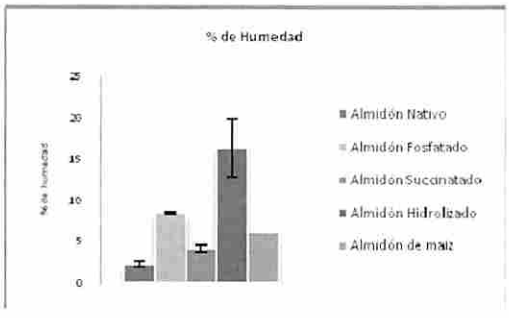


Figura 5: muestra el comportamiento de los almidones estudiados en la evaluación de % de humedad.

CONCLUSIONES

El almidón succinatado tuvo un mayor porcentaje de solubilidad, poder de hinchamiento, ángulo de reposo y velocidad de flujo, lo cual le confiere buenas propiedades en la elaboración y transporte de alimentos.

Los almidones hidrolizado, fosfatado y nativo no mostraron diferencias en las propiedades fisicoquímicas analizadas a excepción del porcentaje de humedad.

El almidón hidrolizado presentó el mayor porcentaje de humedad aproximadamente 2.5 veces más del doble del porcentaje de humedad encontrado para el almidón de maíz.
Estos resultados permiten considerar al almidón nativo y a los modificados como un aditivo en la elaboración y preparación de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias Básicas, área de alimentos, de la Universidad Veracruzana y al Departamento de Investigación y Desarrollo de la empresa Grupo Unipharm de México, por el apoyo y financiamiento.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

- Rodriguez D. Espitia M., Caicedo Y. E., Córdoba Y. E., Baena Y., Mora C. E. Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacatecnicas del almidón de arracacha (Arracacia xanthorriza). Rev. Col. Cienc.Quim.Farm. 34(2),140-146. 2005.
- Zilli H.O. Obtención y caracterización de almidones fosfatados de malanga criolla.(Colocasia esculenta).Tesis profesional Doctorado.2005. Xalapa Ver.
- Sandoval A. A. Rodríguez Sandoval E., Fernandez Quintero A. Aplicación del análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. DYNA 72-146(2005):pp45-53.
- J.R.Ferrer, Cinética de la hidrólisis acida de bagacillo de caña de azúcar. Rev. Fac. Agron.(LUZ).2002,19:23-33
- Diaz M. M. Carreras Collazo I. Síntesis y caracterización del almidón oxidado para su posterior evaluación como agente aglutinante en tabletas. Rev. Cubana Farm. 1999;33(2):98-103.
- Fernandez M. Sol A. Bilbao Revoredo O., Nieto Acosta O. M., Henríques Rodríguez R. D. Utilización de quitina en formas farmacéuticas. Tabletas. Rev. Cubana Farm 1998;32(3):194-7.
- Martínez S. F. Estudio piloto en mediciones de tamaño de partícula.2006.Centro Nacional de Metodología.
-Pifferi G. Santero P., Pedrani M. Quality and functionality of exipients. IL Framaco 54 (1999)1-14.
- Rafael León Rodriguez. Alexander González Calzadilla, Luis Martínez Álvarez, Yamilka Roberto Cordovés.,Estudio de preformulación del citrato de dietil carbamazina., Revista Cubana Farm 1999 vol 33(2):104-10
- Zurima M. G. P. y Elevina E. P. S. Evaluación fisicoquímica y funcional de almidones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pre gelatinizados y calentados con microondas.Acta científica Venezolana, 54: 127-137, 2003.
- HandBook of exipients. 2002. FDA.
-Horwitzs, W. (de) (1980). Oficial Methods of Análisis of the Association of official analytical chemists. 13ª Ed.,Edit. Publishing by the AOAC. Washington, D. C.

MODIFICACIÓN DE UN EQUIPO EXPERIMENTAL PARA LA MEDICIÓN DEL EQUILIBRIO LÍQUIDO-VAPOR A ALTA PRESIÓN, A SER EMPLEADO PARA SISTEMAS MULTICOMPONENTES QUE INCLUYEN CO_2 + ETANOL + (BOLDINA, CATEQUINA)

Jorge E. Gutiérrez[1], José M. del Valle[2], Juan C. de la Fuente[1,*]
[1] DEPT. PROCESOS QUÍMICOS, UNIV. TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
Av. España 1680, VALPARAÍSO, CHILE
[2] DEPT. ING. QUÍMICA Y BIOPROCESOS, PONT. UNIV. CATÓLICA DE CHILE
Vicuña Mackenna 4860, SANTIAGO, CHILE
*** Fax: (56-32) 2654478. Tel. (56-32) 2654221. E-mail: juan.delafuente@usm.cl**

Palabras claves: Boldina, Catequina, CO_2 Supercrítico, Equilibrio Líquido-Vapor, Etanol, Sistemas Binarios.

RESUMEN

Un equipo experimental para la medición del equilibrio líquido-vapor a alta presión, originalmente diseñado para utilizar el método sintético, ha sido modificado para operar con el método analítico. Se ha incorporado un sistema de muestreo off-line que permite cuantificar las cantidades de cada uno de los componentes presentes en las fases en equilibrio, y que será utilizado para estudiar sistemas multicomponentes que incluyen compuestos bioactivos obtenidos del boldo (boldina, catequina). La validación del equipo y técnica experimental se llevó a cabo replicando datos existentes del equilibrio líquido-vapor para el sistema binario CO_2 + etanol, en condiciones de temperatura y presión en el rango 313-338 K, y 1.2-11 MPa, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Boldo (*Peumus boldus* M.), planta endémica de Chile, utilizada como remedio en desórdenes digestivos y hepatobiliares, contiene una variedad de principios activos, tales como alcaloides, flavonoides, aceites esenciales y otros compuestos (de la Fuente y col., 2007). Entre ellos, boldina y catequina, son los principales componentes de las fracciones de alcaloides y flavonoides, respectivamente (de la Fuente y col., 2005). Diversos estudios han mostrado el efecto antioxidante benéfico de boldina y otros compuestos bioactivos del boldo (Speisky y col., 1994; del Valle y col., 2004; Quezada y col., 2004).

La extracción de compuestos bioactivos se ha realizado tradicionalmente utilizando solventes orgánicos; como alternativa, el uso de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO_2) se presenta como una alternativa limpia, de bajo costo, y que asegura un mínimo daño al producto y al medioambiente. Adicionalmente, el empleo de agentes modificadores o co-solventes como etanol (considerado modificador natural para los productos alimenticios), permite incrementar significativamente la solubilidad de compuestos polares o con baja presión de vapor, logrando un aumento la dependencia entre solubilidad y temperatura (Brunner, 2005).

El diseño y optimización de procesos para la extracción de compuestos bioactivos de productos naturales mediante el empleo de métodos no tradicionales, como SC-CO_2, requiere de información del equilibrio liquido-vapor (ELV). Establecer parámetros básicos de proceso como rendimiento, temperatura y presión de operación para los extractores y separadores, es especialmente relevante contar con datos del ELV. Con atención a la compleja naturaleza de los sistemas que incluyen CO_2 + modificador + compuestos bioactivos, escasa información disponible, e imposibilidad de predecir condiciones de equilibrio mediante modelos termodinámicos, los datos de equilibrio deben son de la mayor relevancia para el desarrollo del proceso de extracción.

El objetivo de este trabajo es disponer de un equipo experimental para la medición del ELV a alta presión utilizando un método analítico, de sistemas multicomponentes, que incluyen compuestos bioactivos naturales como boldina y catequina.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales

Los materiales empleados en este trabajo incluyeron CO_2 (99.99% pureza) obtenido de AGA-Chile S.A., y etanol grado HPLC (99.9% pureza) obtenido de JT Baker (Phillipsburg, NJ).

Equipo Experimental

La Figura 1 describe el equipo experimental, (modificado) para la medición de ELV a alta presión de sistemas multicomponentes. El elemento principal es una celda de celda visual de equilibrio de alta presión, equipada con un pistón móvil y capacidad variable de 100-300 cm^3 (2.12 VID ViewCell, Thar Technologies, Pittsburg, PA). La presión al interior de la celda es medida con un transductor de presión (Heise, Shelton, CT) con una precisión de 0.01 MPa. La temperatura de equilibrio se controla y monitorea con una precisión de 0.1 K utilizando un controlador PID (Digi-Sense, Vernon Hills, IL) conectado a cuatro resistencias eléctricas (1000 W) encargadas de proveer energía para calefaccionar la celda. El sistema puede ser operado hasta 373 K y 68 MPa.

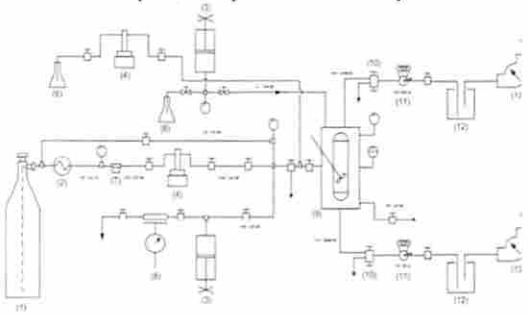


Figura 1 Equipo experimental para la medición del equilibrio a alta presión de operación dual, métodos sintético y analítico.
(1) Estanque de CO_2, (2) Enfriador, (3) Compresor Manual, (4) Bomba Jeringa, (5) Recipiente Solución Hidroetanólica, (6) Recipiente de Agua, (7) Filtro en Línea, (8) Balanza Analítica, (9) Celda de Equilibrio de Volumen Variable, (10) Válvula de Tres Vías, (11) Válvula de Muestreo, (12) Trampa Fría, (13) Medidor de Gases.

En la operación con la metodologia sintética se emplean las bombas de jeringa (Teledyne Isco, 206D, Lincoln, NE) para la carga a la celda de cantidades perfectamente conocidas de CO_2 y mezclas de modificador + soluto (de la Fuente y col., 2007).

En la operación del equipo experimental en método analítico. *i.e.*, muestreo del líquido y del vapor en equilibrio, se recolectan ambas fases en sendas trampas frías; el contenido de CO_2 se determina con un medidor de gases (Ritter, TG05/5, Bochum Alemania) de precisión del 0.1 cm^3. La masas de modificador y soluto en las trampas frías se cuantifica con una balanza analítica (Chyo, MJ-500, Kyoto Japón) de precisión de 0.001 g.

Metodología Experimental

La operación del equipo experimental en el método analítico comienza con la carga del modificador y el soluto a la celda de equilibrio (la que previamente ha sido evacuada y xxx); a continuación se alimenta a la celda de tres a cinco ocasiones CO_2 (a baja presión) con el propósito de eliminar el aire

remanente; la carga de CO_2 se realiza mediante la bomba jeringa, operando a flujo volumétrico constante. Con los componentes cargados en la celda se pone en marcha el control de temperatura, de acuerdo al valor seleccionado para la experiencia, así como el sistema de agitación. Es necesario un periodo de alrededor de dos horas para que se logre el equilibrio en el sistema. El análisis de las fases incluye la toma de cuatro a cinco muestras a intervalos de 20 minutos, para cada una de las cuales se registra previamente las condiciones de presión y temperatura de equilibrio. Las alícuotas de ambas fases, líquida y vapor, retiradas de la celda por el fondo y tope, respectivamente, son despresurizadas empleando válvulas de dos vías, a caudal controlando mediante válvulas de flujo. La despresurización de ambas muestras origina la condensación de ambos, modificador y soluto, que son recolectados en una trampa de muestreo sumergida en un baño frío. Las cantidades de cada una de las fases condensadas son determinadas por gravimetría; el soluto, por medio del análisis de la mezcla condensada utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El contenido de CO_2 en ambas fases es medido volumétricamente utilizando los medidores de gases. La información obtenida consiste en valores isotérmicos de la presión y composiciones de ambas fases, líquido y vapor, en equilibrio

RESULTADOS

La validación del equipo y técnica experimental se llevó a cabo mediante la replicación de datos existentes de ELV para el sistema binario CO_2 + etanol a 313, 323 y 338 K, solvente supercrítico y modificador presentes en la extracción de compuestos bioactivos de hojas de boldo (de la Fuente y col., 2007). La Figura 1 informa los resultados a 313 K de la composición de la fase líquida en equilibrio, está figura incluye a modo de comparación valores obtenidos por Jennings y col. (1991), Tsivintzelis y col. (2004), y, Joung y col. (2001). Las mediciones del ELV para la isoterma de 323 K son informadas en la Figura 2, y comparadas con datos de literatura, Jennings y col. (1991) y Joung y col. (2001).

Los resultados a 338 K son comparados con las mediciones realizadas por Jennings y col. (1991) y Joung y col. (2001), y presentados en la Figura 3. Del análisis de las figuras 1 a 3 se concluye que existe correspondencia entre los datos de composición molar de la fase líquida medidos en este trabajo, con los disponibles en la literatura.

Para la fase vapor se están al presente llevando a cabo mediciones experimentales. Los resultados preliminares para 313 K indican composiciones de la fase vapor de 0.988 y 0.979 mol CO_2/mol, a presiones de 7.19 y 7.47 MPa, respectivamente. Estos valores son comparables a los informados para la misma temperatura por Jennings y col. (1991) y Joung y col. (2001), *i.e.*, 0.9897 y 0.9849 mol CO_2/mol, para presiones de 7.453 y 7.34 MPa, espectivamente. Adicionalmente, Tsivintzelis y col. (2004), informan para 314.5 K, 0.9841 y 0.9795 mol CO_2/mol, para 7.26 y 7.51 MPa, respectivamente.

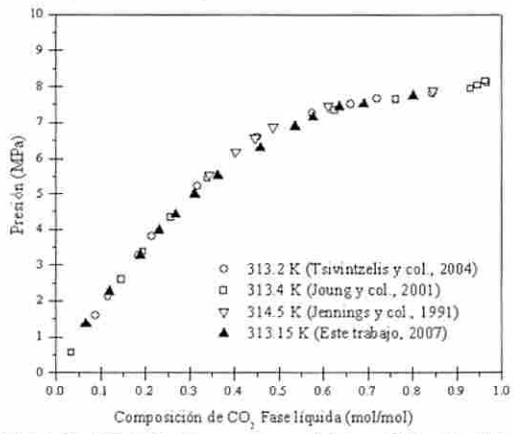


Figura 1: Equilibrio líquido-vapor para el sistema CO_2 + etanol a 313 K.

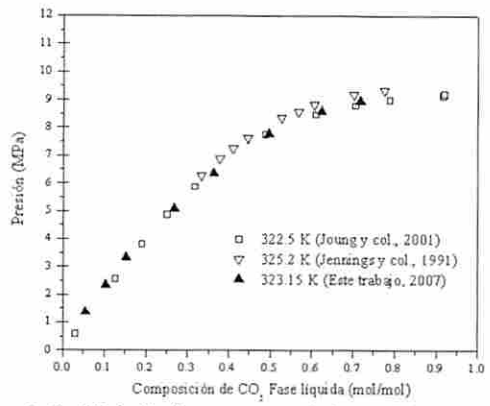


Figura 2: Equilibrio líquido-vapor para el sistema CO_2 + etanol a 323 K.

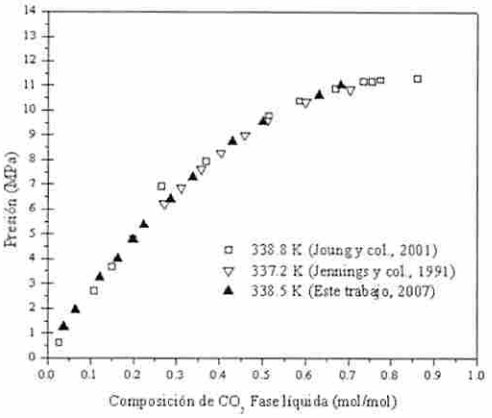


Figura 3: Equilibrio líquido-vapor para el sistema CO_2 + etanol a 338 K.

CONCLUSIONES

Se dispone de un equipo experimental para la medición del equilibrio líquido-vapor que puede ser operado hasta 373 K y 68 MPa empleando alternativamente el método estático y/o analítico, con muestreo de la fase líquida y vapor, y cuya operación ha sido validada frente a información disponible en la literatura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el aporte de Fondecyt-Chile (Proyecto 105-0828). La colaboración técnica proporcionada por Ana I. González y Gonzalo Núñez es muy apreciada.

REFERENCIAS

Brunner G., J. Food Eng. 67 (2005) 21-33.

de la Fuente J. C., N. Quezada, J. M. del Valle, Fluid Phase Equil. 235 (2005) 196-200.

de la Fuente J. C., G. A. Nuñez, J. M. del Valle, Fluid Phase Equil. Available on line (2007).

del Valle J. M., C. Godoy, M. Asencio, J. M. Aguilera, Food Res. Int. 37 (2004) 695-702.

Tsivintzelis I., D. Missopolinou, K. Kalogiannis, C. Panayiotou, Fluid Phase Equil. 224 (2004) 89-96.

Jennings D. W., R. Lee, A. S. Teja, J. Chem. Eng. Data. 36 (1991) 303-307.

Joung S. N., C. W. Yoo, H. Y. Shin, S. Y. Kim, K. Yoo, C. S. Lee, W. S. Huh, Fluid Phase Equil. 185 (2001) 219-230.

Quezada N, M. Asencio, J.M. del Valle, J.M. Aguilera, B. Gómez, J. Food Sci. 69 (2004) C371-C376.

Speisky H., B. K. Cassels, Pharmacol. Res. 29(1994) 1-10.

COEFICIENTES DE ACTIVIDAD A DILUCIÓN INFINITA EN COMPUESTOS BIOACTIVOS: BOLDINA, CATEQUINA, CAPSAICINA, β-CAROTENO, NARINGENIN Y QUERCETINA

Jorge E. Gutiérrez, Jorge A. Ullóa, Juan C. de la Fuente(*)
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPT. DE PROCESOS QUÍMICOS, LAB. DE TERMODINÁMICA DE PROCESOS
Av. España 1680, VALPARAÍSO, CHILE
(*)Email: juan.delafuente@usm.cl

Palabras claves: Coeficientes de actividad, Boldina, Catequina, Capsaicina, β-Caroteno, Naringenin, Quercetina, Ecuación de Estado a Contribución Grupal.

RESUMEN

Coeficientes de actividad a dilución infinita de los solutos no polares y polares; *n*-heptano, *n*-hexano, *n*-octano, *n*-decano, benceno, tolueno, metanol, etanol, *n*-propanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo y tetracloruro de carbono en compuestos bioactivos presentes en plantas vegetales; boldina, catequina, capsaicina, β-caroteno, naringenin y quercetina, han sido medidos empleando cromatografía de gases para temperaturas en el rango de 303 a 333 K. Sobre la base de estos resultados, se discute el efecto de la temperatura y la estructura de los compuestos bioactivos sobre los coeficientes de actividad.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos bioactivos que pueden obtenerse a partir de plantas vegetales, tales como, boldina y catequina del boldo (*Peumus boldus* M.), capsaicina y β-caroteno del ají (*Capsicum annuum* L.), naringenin presente en el exprimido de naranja (*Citrus aurantium* L.) y quercetina de la cebolla (*Allium cepa* L.), son de gran importancia en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Los mencionados principios bioactivos exhiben una gran actividad antioxidante, pueden ser aplicados tópicamente como remedio, mediante la acción directa sobre los receptores del dolor, poseen un elevado valor nutricional, son fuente de colores naturales, pesticidas, *etc.*, como ha sido señalado en el trabajo presentado por Quezada y col. (2004).

Como una alternativa a los métodos convencionales de extracción, el uso de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO_2) ha mostrado ventajas, como lo son, su bajo costo, no toxicidad, y la posibilidad de evitar el daño en compuestos térmicamente lábiles (Brunner, 1994). El apropiado desarrollo de procesos con CO_2 como solvente requiere el conocimiento de datos y modelos de solubilidad del soluto o mezclas de solutos en SC-CO_2.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la medición de coeficientes de actividad a dilución infinita (γ^{∞}) de solventes orgánicos de bajo peso molecular (*n*-heptano, *n*-hexano, *n*-octano, *n*-decano, benceno, tolueno, metanol, etanol, *n*-propanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo y tetracloruro de carbono) en boldina, catequina, capsaicina, β-caroteno, naringenin y quercetina. Los valores de γ^{∞} son útil información para la evaluación del diámetro crítico de esfera dura de compuestos bioactivos, término repulsivo de la ecuación de estado de contribución grupal (GC-EoS), modelo propuesto para correlacionar datos de solubilidad de compuestos bioactivos en SC-CO_2 (Bottini y col., 1999).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales

Los solutos *n*-heptano, *n*-hexano, *n*-octano, *n*-decano, benceno, tolueno, metanol, etanol, *n*-propanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo. y tetracloruro de carbono, fueron grado HPLC con una pureza >99%, todo ellos adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Boldina (99% pureza), catequina (98% pureza), capsaicina (95% pureza), β-caroteno (95% pureza), naringenin (96% pureza) y quercetina (95% pureza) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Metodología

Los coeficientes de actividad a dilución infinita fueron medidos empleando cromatografía gaseosa inversa, de acuerdo a la metodología propuesta por Laub y col. (1978). La Figura 1 describe el equipo experimental utilizado. Un cromatógrafo de gases (Fisions Instruments, GC 9000 modelo, Milán, Italia), equipado con un detector de ionización de llama (FID) fue empleado para las mediciones de γ^{∞}. El caudal volumétrico del gas transportador, hidrógeno, se estableció cercano a 18 cm^3/min, determinado mediante un medidor de flujo de film de jabón, con una precisión de ±10 cm^3/min. La caída de presión en la columna (60-70 kPa) fue cuantificada con la ayuda de un manómetro de tubo en U relleno con mercurio (precisión ±1.3 kPa). Las temperaturas de la columna en el interior del cromatógrafo y la corriente de salida de los gases transportadores, fueron medidas con termocuplas tipo J ajustadas a ±0.1 K, y leídas con un transductor de múltiples canales (Digi-Sense, Vernon Hills, IL). Jeringas de 20 µL se emplearon para inyectar los solutos al cromatógrafo (Hamilton, Reno, NV).

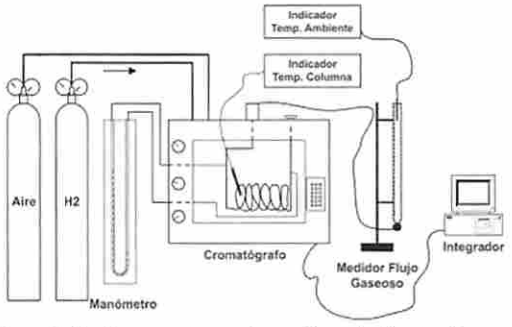


Figura 1. Equipo experimental para la medición de γ_i^{∞}

En la construcción de las columnas cromatográficas, un tubo de acero inoxidable de diámetro de 1/8 de pulgada y aproximadamente 2 m de longitud se rellenó con cantidades conocidas de la fase estacionaria, una mezcla de solvente (compuesto bioactivo) y soporte inerte (Chromosorb W, 60/80 mesh), pesadas utilizando una balanza analítica (Acculab, Edgewood, NY; precisión ±0.001 g). La preparación de la mezcla requirió disolver 0.5-1.1 g de solvente y 2-3 g de soporte en 50 cm^3 de metanol, con el propósito de depositar el solvente sobre el soporte. A continuación el metanol fue eliminado de la mezcla mediante un proceso de evaporación en vacío y atmósfera de nitrógeno. La columnas cromatográficas utilizadas en este trabajo contenían 14-33% (w/w) de compuesto bioactivo (libre de metanol). Foco y col. (1996, 2006) informan detalles del equipo y técnica experimental.

La determinación de los coeficientes de actividad se logra empleando la relación termodinámica descrita en la ecuación (1), de acuerdo a Din y col., (1995).

$$\ln\gamma_i^{\infty} = \frac{(B_{ii} - \tilde{V}_i)P_i^{Sat}}{RT} \ln\left[\frac{273.15 \cdot R}{MW_S \cdot P_i^{Sat} \cdot \hat{V}_G^{\circ}}\right] \qquad (1)$$

donde, i y S representan al soluto y compuesto bioactivo (solvente), respectivamente. Los parámetros P_i^{Sat}, $\tilde{V}_i$, y B_{ii}

corresponden a la presión de saturación, volumen molar y segundo coeficiente virial del soluto a T, temperatura de la columna; MW_s representa el peso molecular del compuesto bioactivo; R (= 8.314 J/mol K) es la constante universal de los gases; $\hat{V}_G^o$ es el volumen específico de retención a 231.15 K, *i.e.*, el volumen del gas transportador normalizado, necesario para arrastrar fuera de la columna rellena el soluto con una masa W_s de solvente, calculado a partir del tiempo de retención del soluto en la columna, t_i, mediante la ecuación (2).

$$\hat{V}_G^o = \frac{273.15}{T_F}\frac{P_F - P_W^{Sat}}{P_o}\frac{J_3^2}{W_S}(t_i - t_A)F \qquad (2)$$

donde, t_A y F representan, respectivamente, el tiempo de retención en la columna y flujo de gas transportador (hidrógeno) a condiciones de temperatura y presión en el medidor de film de jabón, T_f y P_F; P_W^{Sat} es la presión de saturación de agua a la temperatura T_F; P_o indica la presión a la salida de la columna; J_3^2 es el factor de corrección de James-Martin para el gradiente de presión y compresibilidad del gas al interior de la columna (Conder y col., 1979).

El análisis del error cometido en la estimación de los valores de γ^∞ de acuerdo a las imprecisiones de los elementos de medición utilizados ha sido estimada en <5% (Foco y col., 2006).

RESULTADOS

Las tablas 1 a 3 informan los valores medidos en este trabajo de coeficientes de actividad a dilución infinita para los seis compuestos bioactivos a 303, 313, 323 y 333 K. Las columnas rellenas contenían 1.1, 0.9, 0.5, 0.8, 1.1, y 1.1 g de boldina, catequina, capsaicina, β-caroteno, naringenin y quercetina, respectivamente. Estas cantidades permitieron asegurar que la masa de compuesto bioactivo en las columnas fue lo suficiente para prevenir la adsorción del soluto sobre el soporte sólido, dando lugar a errores en la medición de los coeficientes de actividad.

Tabla 1. Valores de γ^∞ para Boldina y Catequina, en diferentes solventes orgánicos desde 313 a 333 K.

Soluto	γ^∞					
	Boldina			Catequina		
T / K	313	323	333	313	323	333
n-Heptano	108.9	102.3	113.8	129.7	147.4	129.1
n-Octano	117.8	117.7	117.6	119.2	115.4	128.4
n-Decano	96.4	106.3	108.4	113.3	96.7	95.1
Tolueno	146.5	131.8	136.2	131.2	121.0	131.6
Metanol				35.1	33.2	29.9
Etanol	95.7	80.5	80.8	24.9	25.0	25.0
n-Propanol	114.3	107.0	103.3			
Acetato de etilo	71.0	79.9	68.9			
Acetona				6.8	9.0	7.9
Tetracloruro de carbono	104.1					

Tabla 2. Valores de γ^∞ para Capsaicina y β-Caroteno, en diferentes solventes orgánicos desde 303 a 333 K.

Soluto	γ^∞							
	Capsaicina				β-Caroteno			
T / K	303	313	323	333	303	313	323	333
n-Heptano	221.0	226.2	107.1	119.7	116.1	119.9	118.3	119.9
n-Hexano				124.5				
n-Octano	221.3	228.9	113.5	132.9	115.1	122.7	124.3	119.3
n-Decano	302.1	300.9	152.8	156.6	156.8	149.4	139.5	131.2
Benceno	100.3	92.3	30.2	22.5				
Tolueno	102.5	66.5	31.5	29.3	99.5	94.7	95.5	94.7
Metanol	28.5	19.6	12.6	23.4	1.8	1.8	1.9	1.8
Etanol	47.4	34.4	17.1	30.2	11.9	8.2	9.5	8.2
n-Propanol	55.6	50.6	18.2	29.0	47.8	51.6	26.3	48.6
Acetato de etilo	77.2	86.3	27.0	24.4	66.8	47.9	42.6	38.3
Acetona	65.5	51.0	19.2	18.1				
Cloroformo	37.3	32.6	11.4	11.4	32.6	25.3	22.3	19.6
Tetracloruro de carbono	109.7	72.3	28.5	26.0				

Tabla 3. Valores de γ^∞ para Boldina y Catequina, en diferentes solventes orgánicos desde 303 a 333 K.

Soluto	γ^∞					
	Naringenin			Quercetina		
T / K	313	323	333	313	323	333
n-Heptano	200.3	313.43	260.0	261.04	202.05	154.85
n-Hexano	55.4	89.14	74.85	67.27	56.16	51.16
n-Octano	142.1	194.58	137.81	174.50	158.93	116.08
n-Decano	171.02	181.04	172.94	314.92	201.35	91.32
Benceno	17.41	89.43	75.56	71.65	65.57	49.95
Tolueno	60.74	104.51	95.14	104.25	71.29	108.88
Metanol	8.82	9.71	8.89	17.60	12.72	8.27
Etanol	4.68	14.73	10.33	9.65	6.96	4.99
n-Propanol	8.39	13.12	10.43	8.15	5.31	99.15
Acetato de etilo	3.07	3.18	4.36	4.31	3.03	2.39
Acetona	6.61	19.15	13.98	23.53	21.2	21.75
Cloroformo	99.42	131.66	385.03	85.96	101.73	76.48
Tetracloruro de carbono	60.53	74.81	139.29	126.06	118.73	100.75

Los resultados informados en las tablas 1 a 3 permiten verificar que el efecto de la temperatura sobre los valores de coeficiente de actividad es dependiente de la polaridad del soluto; se observa en general una tendencia creciente para los compuestos no polares, y decreciente para compuestos polares.

Los valores mayores de γ^∞ se verifican para las mezclas que contienen alcanos y compuestos bioactivos. Este comportamiento es esperado en atención a las interacciones no polar - polar entre el soluto y el compuesto bioactivo de naturaleza polar.

El análisis de valores de γ^∞ para alcanos incluidos en las tablas 1 a 3 indica que al incrementarse el número de carbono en la molécula, el valor del coeficiente de actividad disminuye. Con la información para alcoholes de cadena lineal se observa un comportamiento inverso, *i.e.*, un incremento en el número de átomos de carbono incrementa el valor de γ^∞ (Foco y col., 2006).

La información obtenida en este trabajo se empleará como base para la determinación de los parámetros característicos necesarios para representar el equilibrio a alta presión de sistemas que contienen de compuestos bioactivos y solventes supercríticos, mediante ecuaciones de estado a contribución grupal.

CONCLUSIONES

Coeficientes de actividad a dilución infinita han sido medidos para una serie de compuestos orgánicos no polares y polares en compuestos bioactivos de interés, boldina, catequina, capsaicina, β-caroteno, naringenin y quercetina, temperaturas en el rango de 303 a 333 K.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el aporte de Fondecyt-Chile (Proyecto 105-0828). La colaboración técnica proporcionada por Ana I. González es muy apreciada.

REFERENCIAS

Bottini S.B., T. Fornari, E.A. Brignole, Fluid Phase Equil. 159-160 (1999) 211-218.

Brunner G., Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes, Springer, New York, NY (1994).

Conder J., C. Young, Physicochemical Measurements by Gas Chromatography, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ (1979).

Din C., G. Foco, T. Fornari, S.B. Bottini, Latin Am. App. Res. 25 (1995) 243-247.

Foco G., A. Bermudez, S. B. Bottini, J. Chem. Eng. Data. 41 (1996), 1071-1074.

Foco G., S. B. Bottini, N. Quezada, J. C. de la Fuente, C. J. Peters, J. Chem. Eng. Data. 51 (2006) 1088-1091.

Laub R., R. Pecsok. Physicochemical Applications of Gas Chromatography, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ (1978).

Quezada N, M. Asencio, J.M. del Valle, J.M. Aguilera, B. Gómez, J. Food Sci. 69 (2004) C371-C376.

INFLUENCIA DE LA HUMEDAD SOBRE LA TEXTURA Y LAS PROPIEDADES ACUSTICAS DE PAPAS FRITAS

Barrero_Carvajal, Maria Claudia, Casas_Forero, Nidia, Cáez_Ramírez, Gabriela.
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
Km 21 Autop Norte de Bogotá, D.C. e-mail: gabriela.caez@unisabana.edu.co
Chía - Colombia

Palabras clave: Propiedades físicas, propiedades acústicas, textura, papas fritas, humedad

RESUMEN

La influencia de la humedad del almacenamiento sobre la crujencia de papas fritas en bolsa fue evaluada por el análisis de las características acústicas y de textura. Con el incrementó de la actividad de agua, el número de picos o acontecimientos acústicos disminuyen, tanto que a actividades de agua 0.55, no se presentaron picos de sonido, así como tampoco picos de fractura en el análisis de textura. El valor de la firmeza y la energía de masticación requerida para romper el producto se incrementa con el aumento de la actividad de agua, reduciendo la crujencia del producto. Por tanto el número de eventos acústicos decrecen con el incremento de la actividad de agua, mientras la firmeza y la energía de masticación se incrementan. Asimismo se encontró que existe una relación estadísticamente significativa (ANOVA α=0.05) entre la evaluación acústica y los parámetros de textura analizados para muestras de papa fritas.

INTRODUCCIÓN

La papas, cortadas en finas rodajas y fritas en aceite a alta temperatura (papas fritas de bolsa), son el snack preferido por gran parte de los consumidores debido a la sensación que se experimenta al masticar (crunch). El consumidor mide la calidad de este tipo de productos en función de la sensación de crujencia.

El método tradicional para medir la crujencia de un alimento se realiza mediante paneles de catadores especializados. Sin embargo este método es de difícil objetividad y costoso caro de realizar, por lo que hay gran interés en la industria alimentaria por desarrollar métodos objetivos de evaluación (Rojo, 2005). Entre ellos se destacan dos grandes grupos, por un lado los que estudian principalmente el sonido producido por el material al romper (Tesch et al. 1996), y por otro los que estudian las propiedades mecánicas del material tratando de relacionarlas con la textura (kita, 2002).

Drake (1963), estudio el papel del sonido como una medida de la calidad de los alimentos y encontró que al fracturar un alimento este emite sonidos con diferente amplitud y frecuencia, además en otros estudios (Drake, 1965) demostró que la amplitud de los sonidos que se producen durante la masticación muestran una buena correlación con la intensidad de la crujencia obtenida de la percepción sensorial.

Tesch, Normand, y Peleg (1996) estudiaron el efecto de actividad de agua en propiedades mecánicas y acústicas de dos alimentos crujientes. Encontrando que para actividades de agua por encima de 0.65, la emisión acústica disminuye tanto que el producto se convierte en un producto silencioso. Por otra parte demostraron el efecto de plastificación del agua en los productos analizados, a través de características mecánicas (fuerza de fractura) y acústicas (amplitud máxima).

Numerosos autores han investigado el efecto del contenido de humedad y de la actividad de agua en características acústicas de los productos de cereal (Dacremont, 1995; Duizer et al. 1998; Roudaut, Tesch et al. 1996), quienes indican que existe una relación entre la intensidad del sonido emitido y el contenido de humedad del producto.

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la humedad sobre las características acústicas y de textura de papas fritas en bolsa.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales.

El material empleado en este estudio son papas fritas de bolsa adquiridas en un mercado local. Las muestras fueron removidas de su empaque y almacenadas a 5 condiciones de humedad relativa (11, 33, 55, 65 y 85%), preparadas a partir de soluciones saturadas según Labuza, durante 5 días a temperatura ambiente. Cada tratamiento se evaluó con tres replicas y para cada una de las muestras se determinó, el contenido de humedad, la actividad de agua, la firmeza mediante análisis de textura y el crunch con análisis de sonido.

Métodos.

Determinación del contenido de humedad.
Método de estufa AOAC 20.013 de 1980.

Determinación de actividad de agua.
Fue medida usando la Novasina Thermoconstanter TH200 a una temperatura de 20°C.

Análisis de textura.
Utilizando el texturometro TAXT2, se realizó un test de medida de fuerza de compresión utilizando una sonda cilíndrica P5 con velocidad de ensayo de 0,5 mm/s y una fuerza de 30 g. Se determino firmeza, fracturabilidad y energía de masticación.

Análisis de sonido
El sonido emitido durante la fractura de las papas, al realizar la prueba de textura se grabo, para esto se ubico un micrófono de sensibilidad -62 dB a + 4 dB (a 1Kz) con respuesta de frecuencia de 100 Hz a 10 Khz a 10 cm del punto donde se emitía el sonido. Las ondas producidas se registraron en el programa AudioEdit Deluxe versión 4,10. Del grafico obtenido se determinó el número de picos producidos y el valor del pico más alto de cada onda.

RESULTADOS.

Isoterma de sorción

Las muestras de papas fritas tienen una humedad inicial de 0,016± 0,001 g agua/g m.s y una actividad de agua de 0.171± 0.01. El comportamiento de la humedad y de la actividad de agua de la muestra al ser sometida a cinco condiciones de almacenamiento, se muestra en la figura 1; en está se observa que el producto tiene un comportamiento de isoterma tipo II.

De acuerdo con las ecuaciones de GAB y BET, se calculó la humedad de monocapa, y el valor obtenido con la ecuación de GAB (Xm= 0,061 g agua/g m.s.) es igual con respecto del obtenido con la ecuación de BET (Xm= 0,06 g agua/g m.s.).

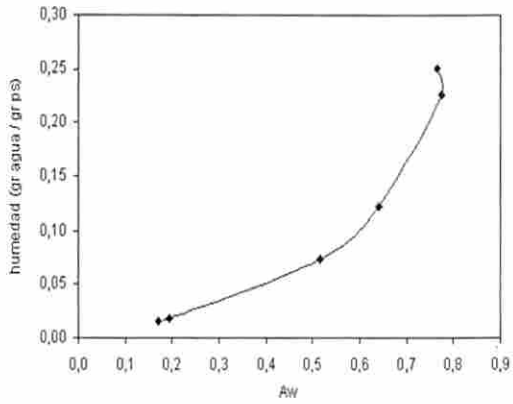


Figura 1. Isoterma de sorción de papa fritas

Evaluación del sonido.

El sonido de crujencía es producido por la vibración de las partículas del alimento en el momento de masticar generando ondas que viajan a través del aire a diferentes intensidades dependiendo de la cantidad de energía acústica que contenga el sonido generado por la energía mecánica del proceso de masticación, en este caso del proceso de fractura de las papas por un efecto mecánico.

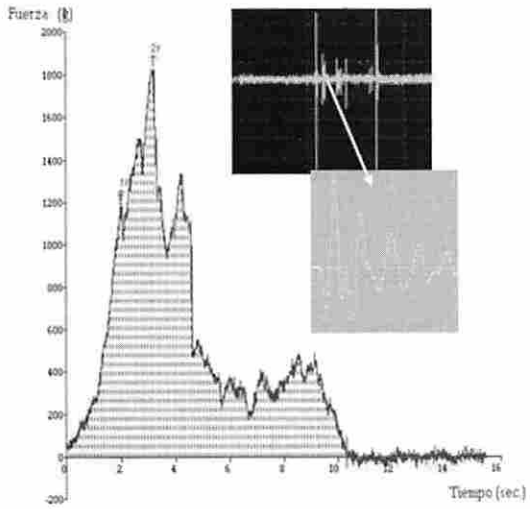


Figura 2. Medida de textura y sonido de la muestra almacenada a 33%

El sonido grabado durante el proceso de la fractura del producto por la aplicación de fuerza mecánica, se transforma en ondas sonoras que tienen picos (Figura 2). Entre más picos haya, más crujiente será el producto.

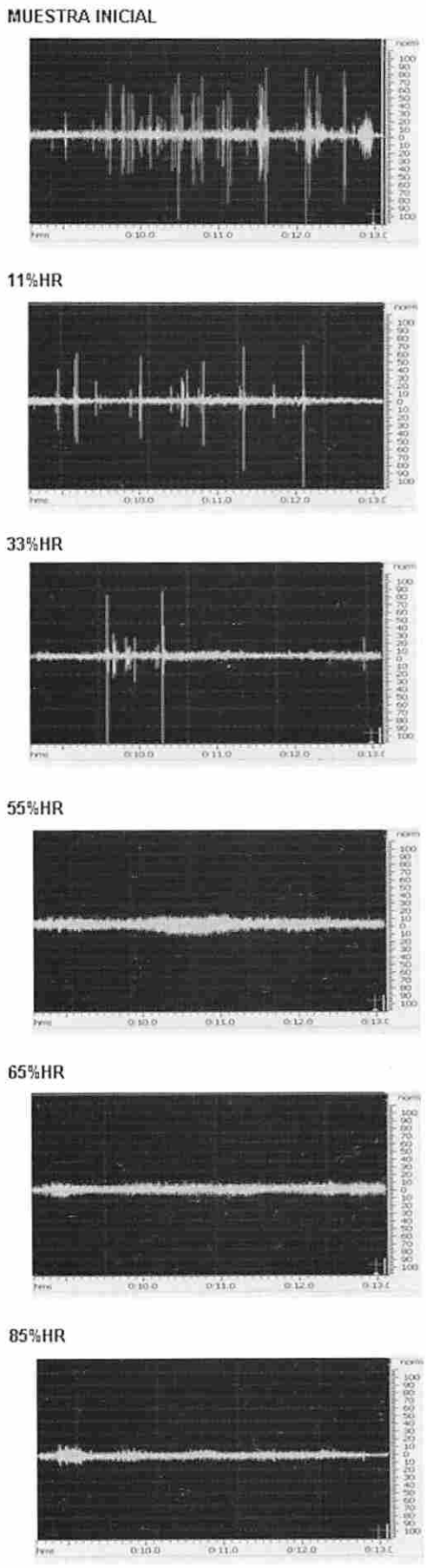


Figura 3. Influencia de la actividad de agua sobre la relacione entre amplitud de la emisión acústica de las papas fritas.

En el caso de las papas fritas que es un producto crujiente, los pulsos del sonido se producen tan rápido que lo que parece ser un onda, son las unión de muchos pulsos, como se observa en figura 2. Cada pulso de sonido esta asociado a un valor de fuerza dado en el análisis de textura.

Las curvas de amplitud vs tiempo que se muestran en la figura 3 muestran que con el incrementó de la actividad de agua, el número de picos o acontecimientos acústicos disminuyen, tanto que a humedades superiores a 0.55, no se presentaron picos de sonido (figura 4), así como tampoco picos de fractura en el análisis de textura. Lo cual coincide con Sanz, et al. 2007, en papas fritas y Marzec et al.2007, pan blanco y de centeno.

Igualmente se observa que la amplitud de las ondas también van decreciendo con el aumento de la actividad de agua, presentándose las menores amplitudes para actividades mayores o iguales a 0.55. Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos de amplitud y numero de picos, se encontró que no hay diferencia significativa (ANOVA α=0.05) en actividades de agua menor de 0.55.

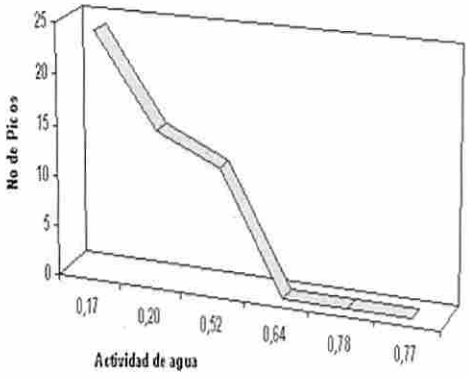


Figura 4. Relación entre el No de picos de sonido y la actividad de agua de la muestra

Evaluación de la textura

Una típica curva de fuerza – tiempo obtenida durante el proceso de fractura de papa frita se muestra en la figura 2. El perfil obtenido para la muestra de papa almacenada a 33%HR muestra la existencia de varios picos de diferente amplitud reflejando la presencia de una estructura quebradiza. Este mismo compartimiento lo presenta la muestra inicial y la almacenada a un 11%HR, mientras las almacenadas por encima de 55%, la presencia de estos picos desaparecen

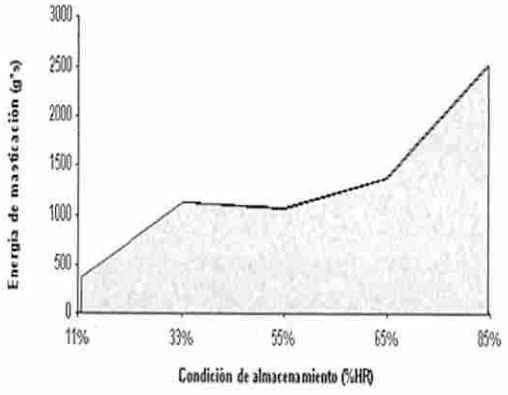


Figura 5. Relación entre la energía de masticación y las condiciones de almacenamiento.

El valor de la firmeza y la energía de masticación requerida para romper el producto se incrementa con el aumento de la actividad de agua (Figura 5), debido a que al intercambiar humedad con el ambiente, se incrementa el agua disponible y se pierde la crujencia del producto, por tanto el producto pasa de ser crujiente a ser uno cauchoso, generándose una transición vítrea.

De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que hay una relación estadísticamente significativa (ANOVA α=0.05) entre la evaluación acústica y los parámetros de textura analizados para muestras de papas fritas analizadas. Lo cual concuerda con Mehinagic, 2006; quien encontró una relación entre la textura, el análisis sensorial y la evaluación del sonido para manzanas.

CONCLUSIONES.

- Entre más picos haya en las ondas sonoras generadas por la masticación, más crujiente será el producto.
- El número de eventos acústicos decrecen con el incremento de la actividad de agua, mientras la firmeza y la energía de masticación se incrementa.
- Existe una relación entre el número de picos de sonido y el parámetro de textura – fracturabilidad para las muestras de papa fritas analizadas.

REFERENCIAS.

Dacremont, C. 1995. Spectral composition of eating sounds generated by crispy, crunchy and crackly foods. Journal of Texture Studies, 26(1): 27–43.

Drake, B. K. 1963. Food crunching sounds. An introductory study. J. of Food Science, 28: 233–241.

Drake, B. K. 1965. Food crunching sounds: comparison of objective and subjective data. J. of Food Science, 30: 556–559.

Duizer, L. M., Campanella, O. H., & Barnes, G. R. G. 1998. Sensory, instrumental and acoustic characteristics of extruded snack food products. Journal of Texture Studies, 29(4): 397-411.

Kita, A. 2002. The influence of potato chemical composition on crisp texture. Food Chemistry. 76: 173-179.

Labuza, T., Bell, L. 2000 Moisture Sorption : Practical Aspets of Isotherm Measurement and Use. ISBN 1-891127-18-7

Marzec, A., Lewicki, P., Ranachowski, Z., 2007. Influence of water activity on acoustic emisión of flan extruded bread. J. of Food Engineering, 79: 410 – 422

Mehinagic E., Royer, G., Symoneaux R., Jourjon F. 2006. Relactionship between apple sensory attributes and instrumental parameters of texture. J. Fruit and Ornamental Plant Research , 14: 25-37

Rojo, F. & Vincent J. 2005. Ensayos mecánicos en patatas fritas. Anales de mecánica de la fractura. 22: 231 – 236

Sanz, T., Primo-Martín, C., Vliet, T. 2007. Characterization of crispness of French fries by fracture and acoustic measurements, effect of pre-frying and final frying times.Food Research International, 40: 63-70

Tesch, R., Normand, M., & Peleg, M. 1996. Comparison of the acoustic and mechanical signatures of two cellular crunchy cereal foods at various water activity levels. J. Science of Food and Agriculture, 70(3): 347–352.

DENSIDAD DE ZUMO CONCENTRADO DE NARANJA. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DE LA CONCENTRACIÓN

Garza, S.; Guitart, E.; Garvín, A.; Ibarz, A.
UNIVERSIDAD DE LLEIDA (UdL)- UTPV - CeRTA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRARIA
Departamento de Tecnología de Alimentos.
E. mail: garza@tecal.udl.cat
Av. Rovira Roure, 191 25198 - LÉRIDA - ESPAÑA

Palabras clave: propiedades físicas, densidad, zumo concentrado, naranja

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la influencia de la temperatura y del contenido en sólidos solubles sobre la densidad de zumo clarificado de naranja elaborado industrialmente. Se determinaron las densidades del zumo en el rango de temperaturas de 10 a 70 °C, y a concentraciones comprendidas entre 10 y 65,5 °Brix. Los resultados experimentales fueron ajustados a diferentes modelos y ecuaciones con el fin de obtener una ecuación que permita predecir el valor de la densidad del zumo en función de las dos variables estudiadas. El efecto de la temperatura, en el rango de concentraciones estudiado, puede ser descrito según un modelo lineal, mientras que el efecto de la concentración, a las temperaturas estudiadas, se ajusta mejor a un modelo polinomial cuadrático. El efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre la densidad de zumo de naranja clarificado puede ser descrito mediante la siguiente ecuación empírica:

$$\rho = 1{,}043 - 1{,}3\cdot10^{-3}T + 3{,}73\cdot10^{-3}c + 1{,}9\cdot10^{-4}c^2$$

siendo: ρ la densidad en $g\cdot cm^{-3}$; T la temperatura en Kelvin; y c la concentración en °Brix.

INTRODUCCIÓN

Los zumos de cítricos son los zumos más consumidos en todo el mundo y constituyen un sector muy importante de la industria alimentaria (Kimball, 2001). Su popularidad se debe, además de a su agradable sabor y sensación refrescante, a sus beneficios nutricionales, muy apreciados por el consumidor.

Los avances técnicos en el proceso de elaboración de este producto permiten que se conserven casi todas las sustancias nutritivas de la fruta fresca, y los métodos de conservación le confieren una larga vida útil. El mercado ofrece varios tipos de zumos, obtenidos a partir de diversos procedimientos tecnológicos entre los que cabe destacar: exprimido con medios mecánicos, concentrado, deshidratado, tamizado (puré). Sin embargo, la mayor parte de los zumos consumidos son elaborados a partir de concentrados y cremogenados de fruta, por lo que este sector de la industria agroalimentaria es de una gran importancia.

El valor del producto final, es decir, su calidad, dependerá de los métodos utilizados durante su procesado, almacenamiento, envasado y transporte. Para una correcta ejecución de cada una de las etapas del proceso de elaboración, es preciso disponer de información acerca de las propiedades físicas del producto que se está procesando. En el caso de los concentrados, y productos intermedios, el conocimiento de la densidad es imprescindible para un correcto diseño de la planta de concentración y una adecuada evaluación de su rendimiento. La densidad de los zumos concentrados se ve afectada por su concentración (contenido en sólidos solubles) y por la temperatura. La importancia de esta propiedad se puede comprobar en el efecto que la variación de la densidad puede tener sobre la transferencia de calor durante el proceso de concentración. Por este motivo, es necesario conocer los valores de la densidad en función de la concentración y de la temperatura.

Son varios los autores que han estudiado el efecto que la temperatura y la concentración tienen sobre las propiedades físicas en general, y sobre la densidad en particular, de diferentes zumos de frutas. Con frecuencia, los datos aportados, vienen expresados en forma de ecuaciones empíricas, generalmente, de tipo polinomial, en las que se predice la variación de la densidad del producto estudiado en función de determinadas condiciones de temperatura y concentración.

Algunos autores (Choi y Okos, 1986) han desarrollado una ecuación para calcular la densidad de un alimento en función de las densidades y de las fracciones másicas de sus diferentes componentes. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han basado en deducir ecuaciones empíricas para un determinado producto y en unas condiciones concretas. Así, Constenla *et al.* (1989) determinaron una ecuación para calcular la densidad del zumo clarificado de manzana en los rangos de 12 a 68,5 °Bix y de 20 a 80 °C de temperatura. Aguado e Ibarz (1988) propusieron un modelo diferente, también para zumo clarificado de manzana con un contenido en sólidos solubles comprendido entre 10 y 71 °Brix, y en un rango de temperaturas de 5 a 70 °C.

En la bibliografía científica se pueden encontrar diversas referencias a trabajos realizados con otros tipos de zumos clarificados, en los que se modeliza la evolución de la densidad en función de factores como la temperatura, el contenido en sólidos solubles u otros. Así, Ibarz y Miguelsanz (1990), modelizaron el comportamiento de la densidad del zumo clarificado de pera. Garza *et al.* (2006) informan sobre un modelo lineal para predecir la densidad de un zumo de piña (*Ananas sp*) concentrado (64,1 °Brix) en función de la temperatura. Zuritz *et al.* (2005), estudiaron el efecto de la temperatura y de la concentración, sobre la densidad de zumo clarificado de uva. Cepeda y Villarán (1999) determinaron la densidad del zumo de *Malus floribunda*, tanto clarificado como turbio, en función de la temperatura y la concentración del zumo. También se han estudiado zumos no clarificados; Alvarado (1993) aportó datos de densidades de diversos zumos de frutas filtrados, pero no clarificados, a distintas temperaturas; Magerramov (2006) estudió la variación de la densidad de zumos concentrados de melocotón y granada naturales entre 5 °C y 130 °C de temperatura y sometidos a distintas presiones. Martins *et al.* (2006) estudiaron la influencia de la temperatura y la concentración sobre la densidad del zumo de ciruela amarilla (*Spondias Bombin*) desde los 0,4 °C hasta los 77,1 °C, y a concentraciones de 8,8 a 49,4 °Brix. Gratao *et al.* (2005) estudiaron, entre otras propiedades, la variación de la densidad del zumo de fruta de la pasión, con un contenido en pulpa de 2,4 -2,8 %, en el rango de temperaturas de 0,4 °C a 68,8 °C y con unos contenidos de agua comprendidos entre 0,506 y 0,902 (expresado en base húmeda).

En el caso concreto del zumo de naranja, pueden encontrarse en la bibliografía algunos trabajos específicos que estudian la evolución de la densidad para zumos con unas determinadas características u obtenidos a partir de variedades concretas de naranjas. Así, Moresi y Spinosi (1980) basan su trabajo en

zumo de naranja de la variedad italiana Ovale; Telis-Romero *et al.* (1998), estudian un zumo con pulpa, obtenido a partir de naranjas de la variedad brasileña Pera-Río; Ramos e Ibarz (1998), estudian la densidad del zumo concentrado clarificado. En general, puede afirmarse que, a pesar de los estudios realizados, la información de que se dispone no abarca todo el rango de temperaturas y concentraciones que se presentan en todo el proceso de elaboración, o bien, corresponden a otros tipos de zumos u obtenidos a partir de diferentes variedades.

El objetivo principal de este trabajo ha sido aportar datos experimentales de la densidad de zumo concentrado y clarificado de naranja en función de la temperatura y del contenido en sólidos solubles del producto. Además se han obtenido ecuaciones empíricas que permiten predecir el valor de la densidad en función de la temperatura y de la concentración.

MATERIALES Y METODOS

Materiales.

Para la realización de este estudio se utilizó como materia prima zumo de naranja concentrado, clarificado y despectinizado, con una concentración inicial de 65,7 grados Brix. Dicho concentrado fue obtenido industrialmente y suministrado por la empresa NUFRI SAT, una industria transformadora de fruta dedicada a la producción de semielaborados (concentrados y cremogenados de fruta) ubicada en la comarca del Segriá (Lérida).

El concentrado fue conservado en congelación a temperaturas de, aproximadamente, -15 °C hasta el momento de su utilización.

A partir del concentrado inicial de 65,7 °Brix se obtuvieron, mediante dilución con agua destilada, muestras de zumo de naranja de las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 65.5 °Brix. Las cuales, fueron objeto del estudio realizado en este trabajo.

Métodos.

Determinación de la densidad

La determinación de la densidad del zumo de naranja a las diferentes concentraciones y temperaturas estudiadas se realizó según la metodología descrita en el Método 1 de la IFFJP (*Internacional Federation of Fruit Juice Producers*, 1989)

Para la medida de la densidad se utilizó un picnómetro de 50 ml de capacidad, el cual había sido cuidadosamente limpiado. Para cada una de las temperaturas se siguió el siguiente proceso: se llenó el picnómetro con agua destilada y se colocó en un baño de precisión para viscosímetros VB-1423 (J.P. Selecta SA. Abrera, España), previamente atemperado a la temperatura seleccionada. Una vez la temperatura se había equilibrado, se enrasaba el picnómetro, siempre sumergido en el baño. Posteriormente, se retiraba el picnómetro del baño, se secaba cuidadosamente, y se pesaba en una balanza analítica con 0,0001 g de precisión (A&D Company Limited, Tokio, Japan). Se siguió el mismo procedimiento con cada una de las concentraciones del zumo de naranja estudiado.

Se determinó la densidad del zumo de naranja clarificado y despectinizado a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 65,7 grados Brix, y a las temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C. Para cada temperatura y concentración se realizaron tres repeticiones de la determinación de la densidad.

Tratamiento estadístico de los datos

A los datos obtenidos experimentalmente se les aplicó el test de la Q de Dixon, con el objeto de determinar su validez y eliminar los resultados sospechosos de ser anómalos. Para el ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos estudiados se utilizó la aplicación Statgraphics Plus Versión 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Englewood Cliffs, NJ, USA). Los intervalos de confianza de los resultados se calcularon a partir de los datos evaluados correspondiendo a un intervalo de confianza del 95% de una distribución t-Student. La bondad de los modelos ajustados se evaluó en base al coeficiente de determinación (R^2), el nivel de significación ($p<0,05$), y el análisis de residuos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características físico-químicas del zumo de naranja concentrado y clarificado estudiado en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Características físico-químicas del zumo de naranja concentrado.

pH a 20 °C	3,68
Contenido en sólidos solubles (°Brix)	65,7
Azúcares reductores (g/l)	67,12
Azúcares no reductores (g/l)	22,26
Densidad a 20 °C (kg/m^3)	1333,6

Las densidades del zumo de naranja concentrado y clarificado se han medido en un rango de temperaturas de 10 a 70 °C y de concentraciones de 10 a 65,5 °Brix.

En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos experimentalmente para la densidad a las diferentes temperaturas y concentraciones estudiadas.

Tabla 2.- Valores experimentales de la densidad de zumo de naranja concentrado a diferentes temperaturas y concentraciones.

Conc (°Brix)	10	20	30	40	50	60	65,5
T*(°C)	Densidad(kg/m3)						
10	1042,37	1087,34	1134,71	1186,05	1241,82	1301,44	133,793
20	1042,04	1086,24	1133,69	1183,95	1238,75	1297,02	133,359
30	1041,43	1085,05	1132,23	1182,50	1236,43	1294,62	133,074
40	1040,91	1084,41	1130,92	1181,44	1235,00	1293,28	132,875
50	1040,62	1083,48	1130,26	1181,00	1234,08	1292,02	132,801
60	1040,01	1083,30	1130,05	1180,68	1233,92	1292,44	132,792

Los resultados experimentales obtenidos para la densidad son comparables y muy próximos a los obtenidos por Ramos e Ibarz (1998)

De manera general, la evolución de la densidad se ajusta al comportamiento esperado, presentando una disminución a medida que aumenta la temperatura y un aumento con la concentración en sólidos solubles de la muestra.

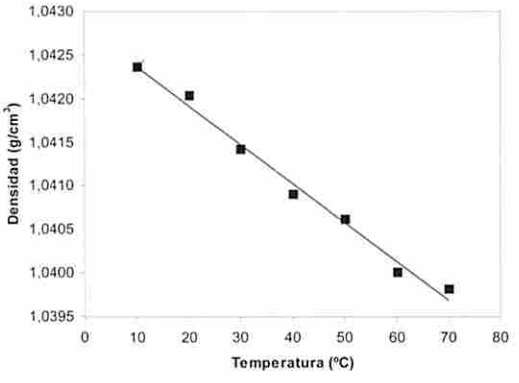


Figura 1.- Variación de la densidad de una muestra de zumo de naranja de 10 °Brix en función de la temperatura (■ valores experimentales; — curva ajustada).

Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura y de la concentración sobre la densidad, se ajustaron los datos experimentales, mediante regresión múltiple, a diversos modelos para tratar de determinar cual de ellos describe su comportamiento de manera más adecuada. En ambos casos, los modelos analizados fueron el lineal, el cuadrático, el exponencial y el exponencial cuadrático. El efecto de la temperatura sobre la variación de la densidad (Figura 1) puede ser descrito por un modelo lineal:

$$\rho = A + Bc$$

mientras que el efecto de la concentración (Figura 2) parece ajustarse mejor a un modelo cuadrático del tipo:

$$\rho = A + BT + CT^2$$

Siendo: T la temperatura (Kelvin); c la concentración del zumo (ºBrix) y A, B y C parámetros que dependen de la temperatura y concentración seleccionadas.

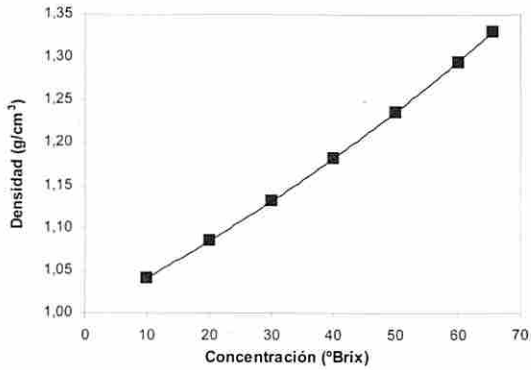


Figura 2.- Variación de la densidad de una muestra de zumo de naranja a 30 ºC en función de la concentración (■ valores experimentales; — curva ajustada).

Para estudiar el efecto combinado de la concentración y la temperatura sobre la densidad se han utilizado cuatro modelos (Tabla 3) algunos de los cuales han sido utilizados en varios trabajos por diversos autores (Ibarz y Miguelsanz, 1989; Ramos e Ibarz, 1998; Cepeda y Villarán, 1999; Zuritz et al., 2005; Martins et al., 2006)

Tabla 3.-Ajustes a los modelos combinados de la variación de la densidad con la temperatura y la concentración.

Modelo	A	$B \cdot 10^3$	$C \cdot 10^3$	$D \cdot 10^6$	R^2
$\rho = A + BT + Cc + Dc^2$	1,043±0,017	-1,3±0,5	3,7±0,3	1,9±0,3	0,9999
$\rho = (A + BT)\exp(Cc + Dc^2)$	1,036±0,012	-1,1±0,4	3,90±0,21	0,7±0,3	0,9999
$\rho = (A + Cc + Dc^2)\exp(BT)$	1,038±0,013	-1,1±0,4	3,9±0,3	2,0±0,3	0,9999
$\rho = A\exp(BT + Cc + Dc^2)$	1,037±0,013	-1,1±0,4	3,90±0,21	0,7±0,3	0,9999

Todos los modelos presentan un R^2 similar y con valores muy próximo a la unidad. La representación gráfica de los valores experimentales de la densidad frente a los teóricos predichos por cada modelo también dio resultados muy similares para los cuatro modelos, con pendientes muy próximas a uno y ordenadas en el origen muy próximas a cero, por lo que todos los modelos ensayados resultan adecuados. Dado que no se encontraron diferencias significativas entre los modelos, a la hora de elegir un modelo para describir la variación de la densidad del zumo clarificado de naranja en función de la temperatura y de la concentración, se optó por el modelo más sencillo, el polinómico de segundo orden, que viene expresado por la siguiente ecuación:

$$\rho = 1{,}043 - 1{,}3\cdot10^{-3}T + 3{,}73\cdot10^{-3}c + 1{,}9\cdot10^{-6}c^2 \qquad (1)$$

donde: ρ es la densidad en $g\cdot cm^{-3}$; T es la temperatura en Kelvin y *c* la concentración del zumo en ºBrix.

Este mismo modelo ha sido aplicado por otros autores (Ibarz y Miguelsanz, 1989; Ramos e Ibarz, 1998) en el caso de zumos de fruta clarificados.

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo muestran que la temperatura y sobre todo el contenido en sólidos solubles tienen una gran influencia sobre la densidad del zumo de naranja clarificado en los rangos analizados. Los modelos empíricos han resultado ser adecuados para estimar la densidad en el rango de 10 a 70 ºC y de 10 a 65,5 ºBrix. La ecuación propuesta (1), describe bien el comportamiento de la densidad, y por su sencillez, puede ser usada en las aplicaciones de los procesos relacionados con las operaciones de flujo de fluidos y transferencia de calor.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Aguado, M. A., Ibarz, A. 1988. Variación de la densidad de un zumo de manzana con la temperatura y concentración. *Alimentación: Equipos y Tecnología*, (Marzo-Abril/98) pp. 209–216
- Alvarado, J. D., 1993. Viscosidad y energía de activación de jugos filtrados. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33, pp. 87–93.
- Cepeda, E., Villarán, M. C., (1999). Density and Viscosity of *Malus floribunda* juice as a function of concentration and temperature. *Journal of Food Engineering* 41, pp 103-107.
- Choi Y. y Okos M.R. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods. In Food Engineering and Process Applications (M. Maguer and P. Jelen, eds.) pp. 93–101, Elsevier Applied. Science Publishers, Londres.
- Constenla, D. T., Lozano, J. E. and Crapiste, G. H., 1989. Thermophysical properties of clarified apple juice as a function of concentration and temperature. *Journal of Food Science* 54, pp. 663-668.

Garza, S., Reinoso, A.M, Ibarz, A. 2006. Efecto de la temperatura sobre la densidad de un zumo de piña concentado. *Alimentaria* 374, pp. 100-101.

- Gratao A.C.A., Silveira, V., Polizelli M.A, Telis-Romero J. 2004. Thermal properties of passion fruit juice as affected by temperature and water content. *Journal of Food Process Engineering* 27, pp. 413–431.
- Ibarz, A.; Miguelsanz, R. 1989. Variation with temperature and soluble solids concentration of the density of a depectinised and clarified pear juice. *Journal of Food Engineering*, 10, pp. 319-323.
- Internacional Federation of Fruit Juice Producers, IFFJP; 1989. Methods of analyses. Zug, Switzerland.
- Kimball, D. A., 2001. Procesado de cítricos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Magerramov, M.A. 2006. Density of the concentrates of peach and pomegranate juices at elevated state parameters. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics* 79, pp. 811-816.
- Martins, M.M., Caetano da Silva, S., Tadini, C.C., Nocoletti, V.R. Telis-Romero, J. 2006. Influence of temperature and concentration on thermophysical properties of yellow mombin (*Spondias mombin*, L.). *European Food Research and Technology* 223, pp. 585-593.
- Moresi, M., Spinosi, M. 1980. Engineering in the production of concentratred fruti juices. 1. Fluid physical properties of orange juices. *Journal of Food Technology* 15, pp. 265-276.
- Ramos, A.M.; Ibarz, A. 1998. Density of juice and fruit puree as a function of soluble solids content and temperature. *Journal of Food Engineering*, 35, 57-63.
- Telis-Romero, J., Telis, V:R:N., Gabas, A:L., Yamashita, F. 1998. Thermophysical properties of brasilian orange juice as affected by temperatura and water content. *Journal of Food Engineering*, 38, 27-40.
- Zuritz, C.A.; Muñoz Puntes, E.; Mathey, H.H.; Pérez, E.H.; Gascón, A.; Rubio, L.A.; Carullo, C.A.; Chernikoff, R.E.; Cabeza, M.S. 2005. Density, viscosity and coefficient of thermal expansion of clear grape juice at different soluble solid concentrations and temperatures. *Journal of Food Engineering*, 71, 143-149.

EFECTO DE LA DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS: TEXTURA Y MICROESTRUCTURA DE FRUTOS DE UCHUVA *Physalis peruviana*

Gómez Ana M; Pinzón, Magda I.; López, Anna F.; Rojas Andrés M.
UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES EN POSTCOSECHA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROINDUSTRIALES
Calle 12 Norte Carrera 15. E. mail: postcosecha@uniquindio.edu.co
ARMENIA - COLOMBIA

Palabras clave: propiedades físicas, uchuva, deshidratación osmótica; textura; microestructura

RESUMEN

Se estudiaron parámetros físicos como: la textura, y la microestructura óptica en rodajas de uchuva *Physalis peruviana* deshidratadas osmóticamente. La deshidratación osmótica (DO) se llevó a cabo en solución de 60 °Brix y con un tiempo de 300 minutos.

En los ensayos de textura, utilizando una celda Kramer, se observó un descenso en los valores de fuerza en los trozos deshidratados con respecto a los trozos frescos de uchuva. En cuanto a la microestructura se evidenciaron cambios estructurales de las células, esto debido al tratamiento de la DO, resaltándose el encogimiento de algunas células y la perdida de la turgencia de las mismas, además de la pérdida de la uniformidad del tejido, la poca presencia de gránulos de almidón y la gran cantidad de espacios intercelulares.

INTRODUCCIÓN

La uchuva *Physalis peruviana* es un fruto susceptible a grandes pérdidas en postcosecha debido a sus características fisiológicas tan particulares, obliga al productor a desarrollar nuevas alternativas para su transformación y conservación. Para tal fin, a nivel industrial se han aplicado diferentes técnicas; tales como la congelación, refrigeración, deshidratación, y actualmente, métodos como la deshidratación osmótica, siendo ésta una tecnología de preservación que reduce las pérdidas postcosecha y proporciona una opción para transformarla, utilizando materiales muy comerciales y de fácil acceso, para así, disminuir las pérdidas y aumentar los ingresos en la cadena productiva; además, este proceso es menos drástico lo que permite obtener productos con características similares a los productos frescos (Fischer y otros, 2000).

Los procesos de la deshidratación osmótica son procesos que generan cambios en la apariencia física de los frutos aunque algunos no sean perceptibles por el ojo humano (Rosenthal, 2001).

Es por esta razón en este trabajo se reporta la incidencia en las características físicas: textura, y cambio en la microestructura durante la DO de frutos de uchuva; las cuales son determinantes en la calidad de los alimentos. Estos análisis considerados sensoriales, actualmente, se relacionan con métodos instrumentales los cuales se refiere a la medición y cuantificación de las características de los productos (Rosenthal, 2001; Allan-Wojtas y otros, (2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los frutos de uchuva que se utilizaron para este trabajo fueron seleccionados mediante un estudio de mercado, el estudio arrojó como resultado un distribuidor mayorista de la Central de Abastos (Armenia, Quindío, Colombia), donde se adquirieron los frutos durante todo el tiempo de la experimentación. Para los análisis se seleccionaron frutos de uchuva entre el 70 y 75% de madurez, color 4 - 5 de la Tabla de Color (Gómez, 2005.

Métodos

Análisis fisicoquímicos

Los trozos de fruta utilizados para el proceso de DO y posterior análisis físicos: textura, cambio en la microestructura, se caracterizaron fisicoquímicamente midiendo parámetros de actividad de agua empleando un equipo marca DECAGON Pa_w KIT Water Activity Meter calibrado con soluciones saturadas de NaCl 6.0 molal en agua (a_w 0.760 ± 0.003 marca Decagon) y de LiCl 13.41 molal en agua.(a_w 0.250 ± 0.003 marca Decagon) (Pinzón 2006), los °Brix se midieron en un refractómetro Mettler Toledo Refracto 30P escala de 0 a 85°Brix (AOAC, 932.012) y el pH (AOAC 918.12) se determinó utilizando un potenciómetro marca Metrohm 704 serie 01 con un electrodo de penetración Metrohm 6.0226. 100 pH 4-9/0-40°C para realizar una punción directa sobre el producto; estos análisis se hicieron antes y después del proceso de DO.

Deshidratación osmótica

Para el proceso de deshidratación osmótica se utilizó una solución deshidratantes de 60 °Brix a un tiempo de 300 minutos, trabajando a presión atmosférica, con una relación fruto : jarabe de 1:5 y en estado estacionario.

Textura

Los análisis de textura se realizaron en un texturómetro marca TA XTplus Stable Micro System utilizando una celda de corte tipo Kramer, tanto para los trozos de uchuva frescos como luego de someterlos al proceso de DO.

Microscopía óptica

Para el análisis microscópico se obtuvieron secciones finas de los trozos uchuva frescos y deshidratados osmóticamente y se tiñeron con solución de lugol. El análisis se realizó con un microscopio óptico Axi Ostar plus marca Zeizz.

Diseño experimental

Para todos los análisis realizados de textura se obtuvieron 18 repeticiones a las cuales se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de comparación con distribución t Student, aplicando un intervalo de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico Statistix versión 7.0.

RESULTADOS

Para la realización de este trabajo se ejecutaron análisis fisicoquímicos: actividad de agua, °Brix y pH con el fin de caracterizar la materia prima y la procesada, obteniéndose los resultados que se relacionan en las Tablas 1:

Tabla 1. Evaluación de parámetros fisicoquímicos para trozos de uchuva frescos y deshidratados osmóticamente

	°Brix	aw	pH
FRESCO	15,18	0,92	3,76
DO	18,76	0,89	3,75

Textura

La textura se refiere a aquellos atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto, perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos. (Lara, Lescano, 2004). Para los trozos de uchuva utilizando el ensayo de cizalla con celda Kramer, se

obtuvo una fuerza máxima de 8.57 Kg en fresco y se evidenció un descenso en los trozos deshidratados a un valor de 7.36 Kg. (Tabla 2). Este descenso puede ser debido a los cambios ocasionados por el proceso de deshidratación osmótica el cual causa la desactivación de la pectinesterasa la cual proporciona la formación de la estructura intermolecular a nivel de la pared celular entre las propias pectinas y otros polímeros presentes en la pared celular las cuales son menos rígidas y más solubles en agua. (Aguilar, et al, 1999).

Tabla 2. Evaluación instrumental de textura mediante análisis de fuerza de cizalla en celda Kramer, para trozos de uchuva frescos y deshidratados osmóticamente

	Uchuva Fresca	Uchuva DO
	Fuerza (kg)	Fuerza (kg)
MEDIA	8,57	7,36
DESV. ESTANDAR	1,44	0,87

Conforme con la prueba t - Student se puede afirmar que hay diferencias significativas en la textura, entre los frutos frescos y los frutos procesados por deshidratación osmótica, esto se puede explicar por los cambios estructurales en las células provocados por el procesado del fruto como resultado de complejas interacciones entre las respuestas de sus componentes químicos al tratamiento con la solución deshidratante. (Rosenthal, 2001).

Microestructura Óptica

Es una técnica eficiente rápida y fácil para comparar las modificaciones que sufren las estructuras celulares de frutas frescas frente a aquellas sometidas a algún tratamiento de conservación (Allan-Wojtas, et al, 2001).

Haciendo uso de la microscopia óptica como un complemento del análisis durante el proceso de DO, se permite observar el comportamiento celular interno de la fruta fresca y después del tratamiento de DO, a el igual que evidenciar la influencia que tienen internamente las células del mesocarpio, al ser sometidas a las concentraciones de la solución deshidratante utilizada durante el proceso de doble transferencia de sustancias entre el interior de la fruta, y la solución osmótica. (González, 1998)

Para lograr mayores contrastes se usó lugol como un colorante específico que tiñe partes específicas de las células y/o reaccionan con ellas produciendo una opacidad diferente logrando una precisa identificación de estructuras.

En la figura 1a - 1d se aprecian células correspondientes a trozos de uchuva fresca; los cuales se presentan como un parámetro de comparación con respecto a los cambios ocurridos en la fruta deshidratada osmóticamente, en donde se observa claramente células parenquimáticas típicas de uchuva; estas células se presentan completamente turgentes son isodiamétricas, contienen gránulos de almidón grandes en su interior, se disponen de forma ligeramente superpuesta, especialmente en la parte del endocarpio; es decir en la pared interna del pericarpio y cerca de la placenta, alrededor de las semillas, situación que coincide con lo descrito por Roth (1977). En la figura 1b. se aprecian células parenquimáticas bien definidas y se detallan gránulos de almidón. Estos gránulos se encuentran almacenados en las células que ocupan la zona del endocarpio. En la figura 1c se evidencian células en buen estado composicional y la figura 1d permite ver en detalle gránulos de almidón y algunos espacios intercelulares, además de la forma alargada de las células. Según Roth (1977), fruto de plantas que pertenecen a la familia Solanacea, tales como la uchuva, presentan células cilíndricas paralelas al eje longitudinal.

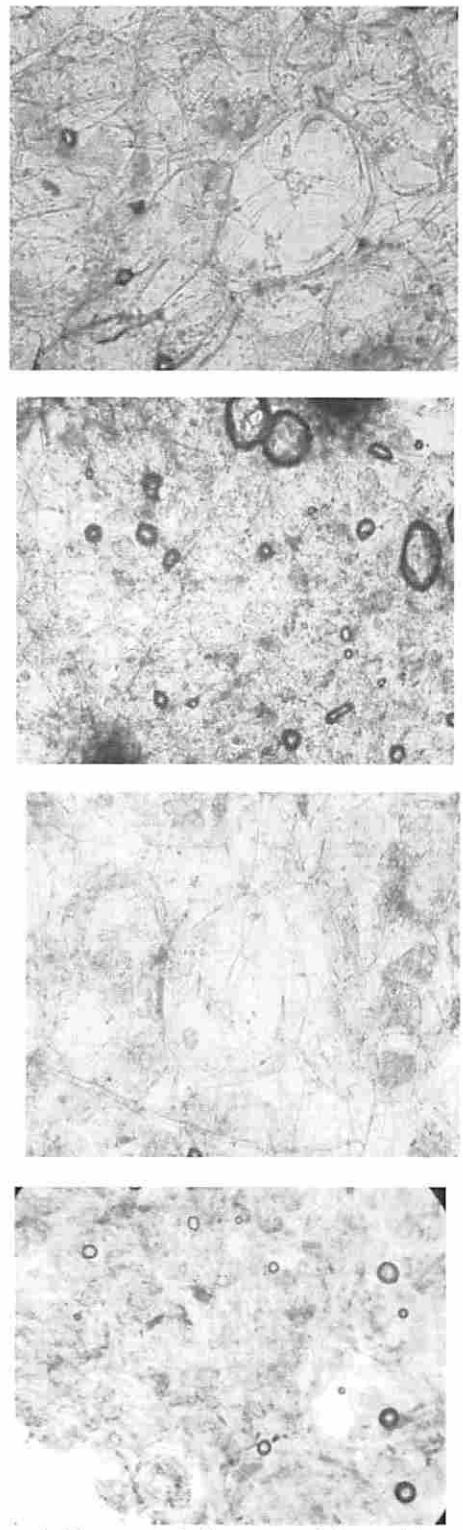
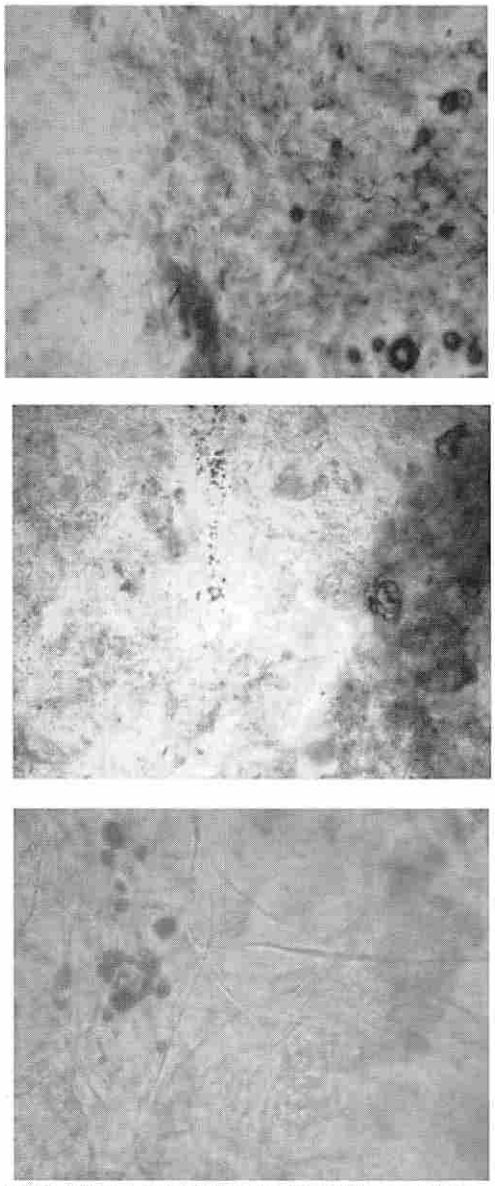


Figura 1. Microscopia óptica mostrando los cambios microestructurales de uchuva fresca teñida con lugol

En la figura 2a – 2c para uchuva DO, se evidencia claramente espacios intercelulares, células poco turgentes y agolpadas y se caracteriza por alguna presencia de los gránulos de almidón, referenciados en las figuras 2a, 2b y 2c para uchuva deshidratada osmoticamente, los cuales se presentan como sustancia abundante y principal de este fruto, además, se muestra un plano general en el cual se observa el aumento de los espacios intercelulares, un tejido. parenquimático menos compacto y una notoria superposición celular.



2a

2b

2c

Figura 2. Microscopia óptica mostrando los cambios microestructurales de trozos de uchuva DO teñidos con lugol

CONCLUSIONES

La ganancia de sólidos en trozos de uchuva que se presenta durante el proceso osmótico, genera un producto cuyas características texturales se inclinan hacia las de un producto gomoso con alta cohesividad y baja dureza.

Los diferentes tratamientos de conservación disminuyen la firmeza de los frutos; sin embargo, se ha comprobado en este trabajo que la deshidratación osmótica, para trozos de frutos de uchuva, a pesar de ser un tratamiento fuerte, protege los frutos de la perdida de firmeza, debido a la ganancia de sólidos al final del tratamiento osmótico.

Se observaron cambios estructurales de las células en trozos de uchuva, debido al tratamiento de DO, resaltando el encogimiento de algunas células y la perdida de la turgencia

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Agroindustriales, Laboratorio de Investigaciones en Postcosecha, Al Centro de Investigaciones en Biodiversidad, CIBUQ, Armenia, Colombia. Al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias, Colombia.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

- Aguilar, C., Reyes, M.L., De la Garza, H., Cointreras – Esquivel, J. "Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB – TL y la textura de vegetales procesados". Revista de la Sociedad Química de México, Vol. 43, Num 2 (1999) 54 – 62.
- Allan-Wojtas, P., Forney, C.F., Carbyn, S. E., Nicholas, U. K. (2001). "Microestructural indicators of quality-related characteristics of Blueberries – An integrated approach". Lebensm.-Wiss.U.-Technol. 34(1) 23 – 32.
- AOAC. (1997). "Official methods of análysis", 16th Ed., 3rd Rev. Current through March. 1997. Supplement. 16th Edition on CDROM Association of Official Analytical Chemist, Washington D.C.
- Fischer, G; Flórez, V, Sora, A. 2000. "Producción, poscosecha y exportación de la uchuva". Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá, Colombia, pág. 11.
- Gómez, A. M. (2005). "Deshidratación osmótica de uchuva Physalis peruviana y lulo La Selva *Solanum quitoense* Lam. a presión atmosférica, con pulso de vacío y secado por aire caliente". Proyecto de Investigación del programa de Jóvenes Investigadores 2005. Conciencias – Universidad del Quindío, Laboratorio de Investigaciones en postcosecha. Armenia, Quindío.
- González, A. M. (1998). "Célula vegetal". Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Agroindustria Argentina. www.biologia.edu.ar/
- Lara N, Lescano G (2004). "Textura de Alimentos. Medida instrumental y aplicaciones". Plegable No. 223, Departamento de Nutrición y Calidad, Estación Experimental Santa Catalina, INIAP, Quito, Ecuador.
- Pinzón, M. (2000). "Evolución de la composición y propiedades físicas durante el crecimiento y maduración de híbridos de lulo, Solanum quitoense Lam". Tesis doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Pinzón, M.I. (2006). "Evolución de componentes del aroma y del sabor durante la cinética de deshidratación osmótica de frutas tropicales lulo La Selva y uchuva". Facultad de ciencias Agroindustriales, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia.
- Rosenthal, A, J., (2001). "Textura de los alimentos medida y percepción". Editorial. Acribia S.A. Zaragoza, España. P. 255, 265 – 269
- Roth, I. (1977). "Fruits of angiosperms".Universidad Central de Venezuela, Caracas.pp. 461- 471.

INFLUENCIA DE MODIFICACIONES DE β-CICLODEXTRINA SOBRE SU INTERACCIÓN CON EL AGUA Y LIGANDOS DE DISTINTA ESTRUCTURA

Dos Santos Ferreira, Cristina, Mazzobre, María Florencia, Elizalde, Beatriz y Buera, María del Pilar.
Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160. Ciudad Universitaria C1428EGA, Buenos Aires, Argentina.
E. mail: fmazzobre@yahoo.com.ar

Palabras claves: propiedades físicas, ciclodextrinas, encapsulación, sorción, transición vítrea, estructura.

RESUMEN

Las ciclodextrinas (CDs) son capaces de formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas de tamaño y geometría adecuadas. Estas moléculas se relacionan por interacciones no covalentes, dando lugar a un sistema en equilibrio, donde el ligando puede liberarse lentamente por desplazamiento de dicho equilibrio. La encapsulación molecular en CDs de ingredientes alimenticios lipofílicos, permite aumentar la estabilidad de flavores, vitaminas, colorantes o lipidos. El objetivo de este trabajo fue comparar las propiedades de una ciclodextrina modificada, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPBCD) con las de BCD. Se estudiaron en particular propiedades de sorción, térmicas y capacidad para formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos. Se utilizarom como ligandos a encapsular un alcohol terpénico, alfa-terpineol, (ATerp) y ácido mirístico (AMir) de baja solubilidad en solventes polares, como modelos de numerosos aditivos y flavores alimenticios. Las modificaciones estructurales en la superficie externa del anillo de la BCD confirieron a la matriz propiedades de sorción, solubilidad, amorficidad, capacidad de formar hidratos diferentes a las de la BCD original. La presencia de una T_g bien definida permitió confirmar las características amorfas de las CD y sus complejos

Si bien la formación del complejo no afectó las isotermas de sorción de la HPBCD, sí produjo una disminución de los valores de T_g lo que indica que en presencia de ATerp se producen modificaciones estructurales que afectan las características físicas de la matriz.

Es interesante destacar que además de la polaridad, la estructura espacial del ligando afecta significativamente el grado y la forma espacial de inclusión, su liberación y la interacción de los sistemas con el agua. Estos datos serían útiles para seleccionar condiciones de almacenamiento o predecir vida útil de productos formulados con complejos de este tipo.

INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos obtenidos industrialmente por degradación enzimática del almidón. Los cuatro tipos naturales más comunes, α, β, γ y δ-CD (con 6, 7, 8 y 9 glucosas respectivamente) difieren en el tamaño del anillo y en su solubilidad. Las moléculas de CDs tienen una forma espacial de cono truncado con una parte interior hidrofóbica y una exterior hidrofílica. Son capaces de formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas de tamaño y geometría adecuadas. Estas moléculas se relacionan por interacciones no covalentes, dando lugar a un sistema en equilibrio, donde el ligando puede liberarse lentamente por desplazamiento de dicho equilibrio.

Durante los últimos años se han investigado sus estructuras y propiedades para diferentes aplicaciones en alimentos (Szente y col., 2004), farmacología (Uekama y col., 1998) o biotecnología.

La encapsulación molecular en CDs de ingredientes alimenticios lipofílicos, permite aumentar la estabilidad de flavores, vitaminas, colorantes o lipidos. La utilización de CDs en distintos procesos tecnológicos ha permitido mejorar el valor nutritivo, las características sensoriales y vida útil de diferentes productos. Pueden usarse como intermediarios en distintos procesos, por ejemplo en la concentración de aceites esenciales o separación de componentes no deseados (Hedges y col., 1999).

Se han preparado derivados no tóxicos modificando químicamente las CDs. Muchos derivados amorfos de CDs tienen mayor solubilidad en agua, mayor estabilidad física y microbiológica y distinta capacidad para formar complejos que las CDs naturales.

El objetivo de este trabajo fue comparar las propiedades de sorción, térmicas y capacidad para formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos de una ciclodextrina modificada, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPBCD) con las de BCD. Se utilizaron como ligandos a encapsular un alcohol terpénico y ácido mirístico, ambos de baja solubilidad en solventes polares, como modelo de numerosos aditivos y flavores alimenticios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se empleó β-Ciclodextrina (BCD) y 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, grado de sustitución 0.6 (Mr 1380) (HPBCD) y ácido mirístico (AMir) de SigmaChemical Co.St Louis MO USA. El α-terpineol (ATerp) se obtuvo de Polymetron S.R.L. Alemania.

Métodos

Preparación de los sistemas. Los complejos de ATerp/BCD, ATerp/HPBCD y AMir/HPBCD se obtuvieron por el método de coprecipitación en medio acuoso (Hedges, 1998). Todos los sistemas se congelaron a –26°C y se liofilizaron.

Isotermas de sorción. Luego del liofilizado, las muestras se distribuyeron en viales de vidrio y se expusieron a distintas humedades relativas (HR) (rango 11-97%) a 25°C. Se determinó el contenido de agua de las muestras (por método gravimétrico) y se expresó en % base seca (b.s.).

Propiedades térmicas. Se empleó calorimetría diferencial de barrido para verificar la formación de complejos ATerp con BCD o HPBCD y para determinar las temperaturas de transición vítrea de los sistemas analizados.

RESULTADOS

Isotermas de sorción de agua

En la Figura 1 se muestran las isotermas de sorción de agua a 25°C obtenidas para HPBCD y para BCD deshidratadas comparadas con la isoterma de desorción obtenida para BCD. Las isotermas de sorción y desorción determinadas para BCD están de acuerdo con datos publicados por otros autores (Girish y col, 1995). Comparando las curvas de sorción se observa que a bajas humedades relativas el contenido de agua es similar en las dos ciclodextrinas estudiadas. Entre 33 y 75% HR la BCD adsorbe más agua que la HPBCD y alcanza un *plateau* a partir de 52%HR que se debe a la formación de un hidrato cristalino estable de la ciclodextrina. La isoterma obtenida para HPBCD liofilizada siguió un comportamiento de tipo sigmoideo y mostró un incremento marcado del contenido de agua a

humedades relativas mayores que 85%. Las muestras de HPBCD se encontraban colapsadas a partir de 84% HR mientras que no se observó colapso de la BCD a ninguna de la HR estudiadas. La estructura del hidrato de BCD ha sido

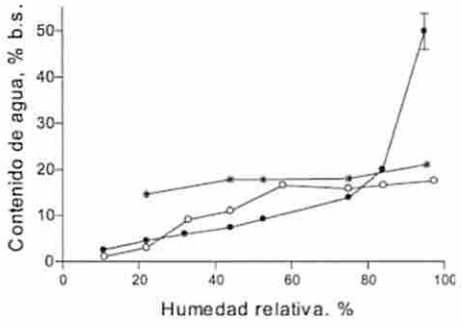


Figura 1. Isotermas de sorción de agua a 25°C para HPBCD (●) y BCD (○) liofilizadas comparadas con la isoterma de desorción obtenida para BCD (*).

determinada por varios métodos (Winkler y col., 2000). La BCD cristaliza a partir de soluciones acuosas como dodecahidrato o undecahidrato (Fujiyama et al., 1983). Lidner y Saenger (1978, 1982) observaron que la mitad de las moléculas de agua se ubican en sitios específicos de la cavidad, el resto se distribuye entre la superficie y los intersticios de las ciclodextrinas. Las moléculas de agua de la cavidad se encontrarían en un estado "activado" y podrían ser fácilmente removidas por ligandos capaces de formar complejos con la CD. La baja solubilidad relativa de la BCD ha sido explicada en términos de interacciones entre grupos oxhidrilos secundarios adyacentes a la cavidad y las moléculas de agua. Por lo tanto cualquier cambio estructural en la molécula de BCD modifica la solubilidad de la misma y su relación con el agua.

Los valores de contenido de agua obtenidos para ambas CDs a las distintas HR expresados como moles de agua por mol de CD indicaron que para un contenido de agua de aproximadamente 15% b.s., habría 8 moléculas de agua/molécula de CD lo cual se corresponde con las especificaciones del producto comercial. A proporciones menores de agua esta se halla comprometida en el interior de la cavidad. A proporciones mayores que 15% b.s. la cantidad de moléculas de agua corresponde a la del hidrato cristalino estable. Para la HPBCD no se encontró información bibliográfica sobre isotermas o estructura de hidratos. A partir de los resultados de la Figura 1 se puede concluir que a bajas HR, donde la isoterma de la HPBCD coincide con la de sorción de la BCD, el agua estaría en el interior de la cavidad pero la modificación estructural superficial de la HPBCD afectaría la conformación de la cavidad y su interacción con el agua. A HR altas (mayores que 85%) la HPBCD presenta más afinidad por el agua ya que tiene mas grupos hidrofílicos superficiales que la BCD y por lo tanto le proporciona mayor solubilidad. Las curvas de adsorción y desorción obtenidas para BCD presentaron histéresis importante, es decir que se produce un bio estructural con formación de un estado hidratado estable. Pande y col., (1995) y Nakai y col., (1986) observaron que cuando las moléculas de agua del hidrato dejan la cavidad de la BCD, se produce un colapso de la estructura dando lugar a una nueva forma polimórfica.

Complejos ATerp con BCD o HPBCD.

Se realizaron análisis térmicos por DSC para verificar la formación de complejos α-Terp con BCD o HPBCD. En la Figura 2 se muestran los termogramas obtenidos para los sistemas liofilizados que contenían ATerp en presencia de HPBCD o en presencia de BCD en distintas relaciones molares, comparados con el termograma obtenido para el terpeno liofilizado puro.

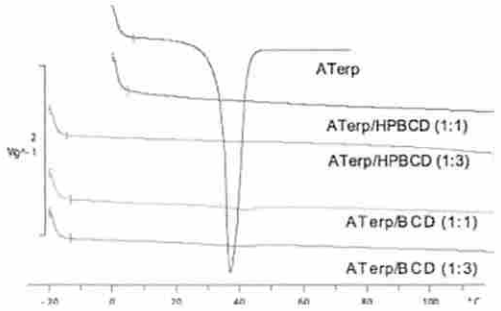


Figura 2. Termogramas obtenidos para sistemas liofilizados que contenía a-Terp en presencia de HPBCD o en presencia de BCD en distintas relaciones molares, comparados con el termograma obtenido para el terpeno liofilizado puro.

Para los sistemas combinados ATerp/HPBCD y ATerp/BCD se obtuvieron las isotermas de sorción de agua a 25°C (Figura 3 a,b). Se observa que las propiedades de sorción para los sistemas que contenían ATerp fueron similares a las de la HPBCD sola. El comportamiento fue algo diferente a altas HR donde la presencia del ATerp redujo el contenido de agua en el sistema. En la Figura 3b se observa que la incorporación del terpeno modificó significativamente la isoterma de sorción de la BCD ya que la sorción de agua fue mucho menor para cualquiera de los sistemas combinados que para la BCD sola. Estos resultados estarían confirmando la formación del complejo ATerp/BCD en cualquiera de las relaciones estudiadas. La presencia de ciertos ligandos interfiere con la capacidad de la BCD para interactuar con el agua ya que estas moléculas se dispondrían en la cavidad ocupando sitios activos para el solvente (Szejtli, 1998).

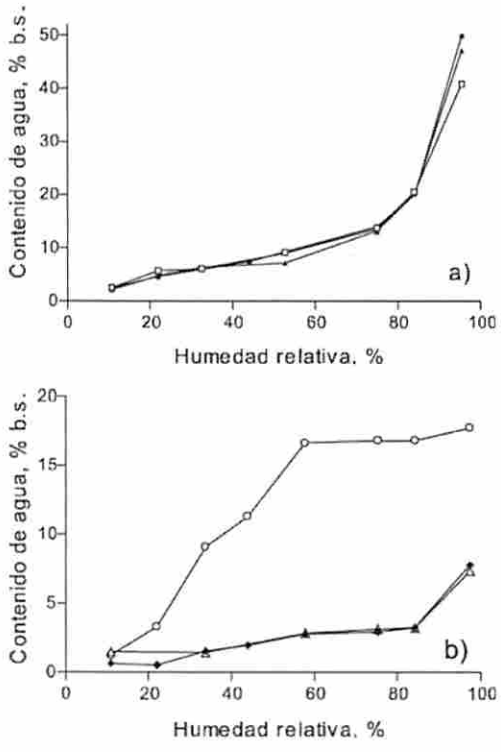


Figura 3. Isotermas de sorción de agua a 25°C para: a) HPBCD (●), complejos ATerp/HPBCD 1:1 (□) y 1:3 (▲), y b) BCD (○), complejos ATerp/BCD 1:1 (♦) y 1:3 (△).

La presencia de una T_g bien definida permitió confirmar las características amorfas de los sistemas en todos los casos. En la Figura 4 se muestran los valores de T_g obtenidas para HPBCD y para los complejos a-Terp/HPBCD. Se observa que los valores de T_g disminuyen gradualmente al aumentar el contenido de agua de la matriz y, para un mismo contenido de agua, al aumentar la proporción de ATerp en la matriz de ciclodextrina. Si bien la formación del complejo no afectó de manera significativa las isotermas de sorción de la HPBCD (Figura 3a), sí produjo una disminución de los valores de T_g lo cual estaría indicando que en presencia de ATerp se producen modificaciones estructurales que afectan las características físicas de la matriz. Por otro lado no se detectaron en el termograma transiciones que pudieran evidenciar la presencia de formas cristalinas hidratadas. Los valores de T_g obtenidos se correspondieron con el aspecto físico de las muestras, que se encontraban colapsadas cuando su T_g era menor que 25°C. Para la BCD sólo se pudo determinar la T_g de los sistemas conteniendo hasta 15 % de agua b.s. ya que a humedades mayores la forma estable de la BCD es el hidrato cristalino.

La estabilidad de los complejos ATerp/HPBCD se estudió evaluando por DSC la aparición de ATerp libre en función del tiempo de almacenamiento a 25°C. Los termogramas obtenidos tanto para los sistemas ATerp/HPBCD como para los ATerp/BCD no mostraron el endoterma correspondiente al ATerp en ninguna de las condiciones estudiadas (relaciones molares y humedades relativas entre 11 y 97%) luego de 60 días de almacenamiento, lo cual muestra que la estabilidad fue buena tanto en la HPBCD como en la BCD. La selección de uno u otro sistema dependerá de la aplicación posterior y de la solubilidad requerida.

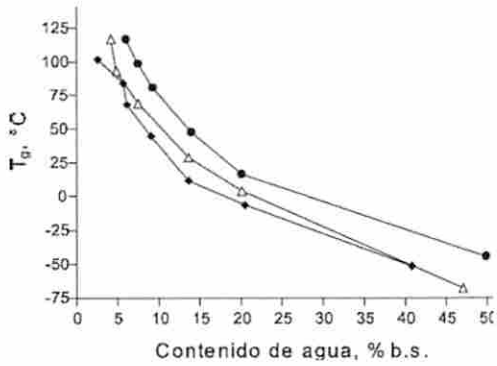


Figura 4. Temperaturas de transición vítrea determinadas por DSC para HPBCD (●) y para los sistemas combinados ATerp/HPBCD en relaciones molares 1:1 (♦) y 1:3(△) en función del contenido acuoso.

Complejos AMir/HOPCD

La inclusión de AMir en la HOPCD no fue completa ya que la señal endotérmica a 50ºC (que coincide con la temperatura de fusión de dicho ácido) no desapareció en los termogramas. A diferencia de lo que ocurre con la encapsulación de otros compuestos, se observó mayor inclusión de AMir a medida que las HR y/o el tiempo aumentaban (la cantidad de AMir libre disminuía). Los sustratos como los ácidos grasos que tienen una cadena no polar larga, se incluyen solo parcialmente y una molécula de ligando puede estar asociada a más de una molécula de CD (Regiert, 2007).

CONCLUSIONES

Las modificaciones estructurales en la superficie externa del anillo de la BCD confirieron a la matriz propiedades de sorción, solubilidad, amorficidad, capacidad de formar hidratos diferentes a las de la BCD original.

Las metodologías empleadas permitieron obtener complejos estables de ligandos hidrofóbicos como el a-terp o el AMIR tanto con HPBCD como con BCD en relaciones molares 1:1 y 1:3.

La presencia de una T_g bien definida permitió confirmar las características amorfas de las CD y sus complejos, salvo para BCD a humedades mayores de 15 % en que la forma estable es el hidrato cristalino. La inclusión de un ligando aumenta el carácter amorfo de la BCD justamente por interferir en la formación del hidrato. Si bien la formación del complejo no afectó de manera significativa las isotermas de sorción de la HPBCD, sí produjo una disminución de los valores de T_g lo cual estaría indicando que en presencia de a-terp se producen modificaciones estructurales que afectan las características físicas de la matriz.

Es interesante destacar que además de la polaridad, la estructura espacial del ligando afectan significativamente el grado de inclusión, su liberación y la interacción de los sistemas con el agua. Estos datos serían útiles para seleccionar condiciones de almacenamiento o predecir vida útil de productos formulados con complejos de este tipo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBACyT X226), Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología CONICET (PIP5977 y PIP6562), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 20680 y PICT PICT 20545.) por el financiamiento de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

-Fujiwara,T., Yamazaki, M., Tomizu, Y.,Tokuoka, R. Tomita, K., Matsuo, T., Suga, M. and Saenger, W.. 1983. The Crystal structure of a new form of β-cyclodextrin water inclusion complexes. Nippon Kagaku Kaishi, 181-187

-Girish, S., Pande, Shangraw, R.F.. 1995. Characterization of β-cyclodextrin for direct compression tableting: II.The role of moisture in the compactibility of β-cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutics. 124: 231-239

-Hedges, A. and Mcbride, C.. 1999. "Utilization of Cyclodextrin in Food". American Assoc. of Cereal Chemists, Inc., October, vol. 44, NO.10, 700-704.

-Lindner, K. and Saenger, W.. 1978. β-cyclodextrin dodecahydrate: Crowing of water molecules whitin a hydrofobic cavity. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 17: 694-695.

-Lindner, K. and Saenger, W.. 1982. Crystal and molecular structure of cyclohepta-amylose dodecahydrate. Carbohyd. Res., 99: 103-115.

-Regiert, M.. 2007. Oxidation-stable linoleic acid by inclusion in α-cyclodextrin. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 57: 471-474.

-Szejtli, J.. 1998. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem. Rev., 98: 1743-1753.

-Szente, L. and Szejtli, J.. 2004. Cyclodextrins as food ingredients. Trends in Food Science and Technology, 15: 137-142.

-Uekama, K., Hirayama, F. and Irie, T.. 1998. Cyclodextrin drug Carrier Systems. Chem. Rev., 98: 2045-2076.

DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA DE PAN TIPO HALLULLA

Negrete, Catalina; Santander, Roberto; Salinas, Katherine
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE.
DPTO. CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.
FACULTAD TECNOLÓGICA.
Av. Ecuador 3769. E-mail. cnegrete@lauca.usach.cl
SANTIAGO – CHILE

Palabras claves: propiedades físicas, conductividad térmica, transferencia de calor, pan tipo hallulla.

RESUMEN

El propósito de este trabajo, fue implementar una metodología de medición de conductividad térmica para productos panaderos chilenos terminados. Para ello, se diseñó previamente un equipo de medición óptimo, aplicando una metodología probada basada en la Norma 442-1989 Std del IEEE. Para la puesta en marcha, se compararon mediciones de conductividad térmica de pan tipo hallulla utilizando el equipo recién implementado con mediciones logradas con un equipo certificado. Observándose que los valores medidos con el equipo de la sonda térmica presentaron una buena correspondencia con los valores del equipo certificado. Para la prueba definitiva del sistema de medición, se planteó una hipótesis que permitiera comparar un mismo tipo de pan pero de distintas procedencias. Los resultados experimentales se analizaron de acuerdo a un diseño completamente aleatorio, constituido por un factor denominado procedencia del pan con tres niveles: industrial, semi-industrial y de laboratorio. Se midieron el peso, volumen, densidad aparente, contenido de humedad y conductividad térmica; cada medición se realizó con tres repeticiones por diez días ocupando siempre muestras de pan fresco.

Los resultados indicaron que la procedencia del pan influía directamente en las propiedades físicas y sobre la conductividad térmica (0,197, 0,223 y 0,304 W m^{-1} K^{-1}; para semi industrial, industria y laboratorio, respectivamente), debido principalmente al método de elaboración, materias primas utilizadas, metodología de medición entre otros.

Se logró implementar una metodología de medición de conductividad térmica para productos panaderos terminados, utilizando un sistema de medición sencillo y rápido. Además, se pudo evaluar experimentalmente y comparar la conductividad térmica de pan tipo hallulla, de distintas procedencias, con valores obtenidos por correlaciones empíricas; concluyendo que para cada procedencia existió un amplio rango de resultados de conductividad térmica y que debido a que las correlaciones son dependientes de numerosas variables, los valores calculados presentaron diferencias significativas con respecto a los medidos instrumentalmente.

INTRODUCCIÓN

Algunos autores han investigado las propiedades térmicas de los alimentos en general, para hacer más fácil la modelación de procesos industriales o de laboratorio, que requieren de transferencia de calor tales como: la cocción, la esterilización comercial, el refrigerado y congelado entre otros. La idea de que estudios teóricos puedan predecir correctamente los fenómenos de transporte tales como la transferencia de calor real en cada proceso ha generado un gran interés en predecir o determinar cada una de las propiedades térmicas de los alimentos. Desde entonces varios investigadores han llevado su trabajo a aquello.

El interés en evaluar las propiedades térmicas de los alimentos surgió por la necesidad de modelar la transferencia de calor en alimentos. En consecuencia todo análisis de transferencia de calor para calentar o enfriar productos requiere conocer las propiedades termofísicas tal como la conductividad térmica.

El presente es un estudio de tipo experimental que tiene como objetivo implementar una metodología de medición de conductividad térmica de productos panaderos terminados. Para esto se tomó como referencia un método de medición desarrollado para ser utilizado mayoritariamente en estudios de suelos, pero ampliamente nombrado en estudios de alimentos como: "método de la fuente lineal de calor" o "método de la sonda", que consiste, básicamente en aplicar un flujo de calor lineal al producto y medir la temperatura que va adquiriendo en forma radial, de acuerdo a la ecuación planteada en la Norma 442-1989 Std del IEEE esta, considera que el aumento de la temperatura de la sonda depende directamente de las propiedades termofísicas del medio en que se inserta.

La principal motivación del estudio fue obtener valores de conductividad térmica mediante el método de la sonda y de esta forma contribuir al conocimiento de las propiedades térmicas de productos panaderos fabricados en Chile para su posterior uso en investigación aplicada en transferencia de calor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

Los ingredientes para la elaboración del pan tipo hallulla fueron: harina de trigo para panificación de calidad estándar , agua potable, materia grasa vegetal hidrogenada, sal comestible y levadura prensada.

Los análisis a la materia prima (harina), se realizaron de acuerdo a las normas establecidas.

En el proceso de elaboración del pan se utilizó: balanza granataria, amasadora, sobadora,: cámara fermentación controlada y horno eléctrico.

Para el producto terminado, se utilizaron: balanza analítica, estufa de humedad, fuente de poder, multímetro y volunómetro.

En la medición de conductividad térmica, se utilizaron: sonda térmica de acero inoxidable tipo K de 8 mm de diámetro, 80 mm de longitud, 50 W de Potencia máxima. Fuente de poder, multímetro de temperatura (exactitud 0,05% + 0,3 [°C]), multímetro digital (exactitud: 0,5% + 3d, Resolución: para 2 [V] de 1 [mV]).

Métodos

Implementación del equipo de medición

La Norma 442-1989 Std del IEEE establece claramente los componentes del equipo de medición de resistividad de suelos para mediciones en terreno y también para mediciones en el laboratorio, este último se consideró para desarrollar el equipo utilizado en las mediciones de conductividad térmica en productos panaderos terminados.

Debido a que la norma citada es referente a análisis de suelos, se ajustaron las características de la sonda térmica tales como: potencia disipada, sensor de temperatura, largo y diámetro. Los ensayos preliminares indicaron la potencia disipada por la sonda, por unidad de longitud, en este caso fue de 0,1435 [W cm^{-1}]. Sweat (1986), describió niveles de potencia usados entre 0,05 y 0,3 [W cm^{-1}], señalando que productos de mayor conductividad térmica requieren altos niveles de potencia para lograr un incremento de temperatura adecuado para la medición. Por otra parte, Drouzas (1988) quién midió la conductividad térmica de muestras de almidón granular usando el método del hilo caliente, utilizó para este efecto niveles de potencia entre 0,05 a 0,15 [W cm^{-1}]. De esta forma, se diseñó una sonda térmica que fue implementada por la empresa COMIND, expertos en resistencias térmicas e instrumentos industriales.

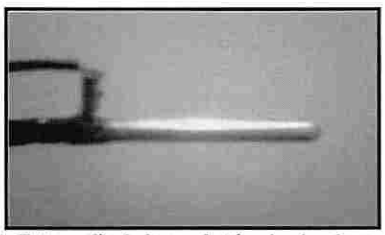


Fig. 1. Fotografía de la sonda térmica implementada

Puesta en marcha de la sonda térmica

Con el fin de comprobar el funcionamiento de la sonda térmica, se realizaron diez mediciones de pan tipo hallulla proveniente de una panadería industrial, utilizando el equipo de medición diseñado y un equipo certificado.

Las mediciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Metrología Térmica del Departamento de Ingeniería Mecánica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Chile.

Primero se calibró el equipo certificado, midiendo la conductividad térmica de un material aislante de valor conocido, especialmente empleado para esto, luego se confirmó la exactitud del equipo para este tipo de material.

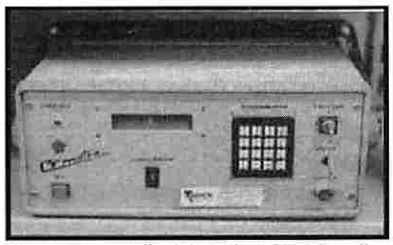


Fig. 2. Fotografía del equipo CT-Metre".

Después se programó el equipo CT-Metre para ser usado con la sonda correspondiente, procediendo a ejecutar el programa. El equipo busca automáticamente la estabilidad térmica entre la muestra y la sonda, luego se enciende la luz que da inicio al proceso. Finalizado el proceso de evaluación, el equipo toma unos segundos en chequear y procesar los datos obtenidos para la determinación de la conductividad térmica del material.

Para realizar la medición utilizando la sonda térmica diseñada, se ajustó la fuente de poder a una potencia de 1,2 [W], la sonda entonces generaba 0,2 [W cm $^{-1}$], se tomo la temperatura del proceso cada 15 segundos hasta alcanzar la temperatura de 50 [°C], grafican do la temperatura en función del logaritmo del tiempo, y se estimó la conductividad térmica de la muestra

Tabla 1. Datos de medición de conductividad térmica usando la sonda térmica y el equipo certificado (CT-Metre)

Muestra	Sonda	CT Metre
1	0,193	0,159
2	0,193	0,177
3	0,199	0,148
4	0,219	0,162
5	0,219	0,183
6	0,189	0,151
7	0,203	0,142
8	0,200	0,160
9	0,198	0,148
10	0,211	0,171
X	**0,202**	**0,160**
S	**0,011**	**0,013**
CV	**5,221%**	**8,422%**

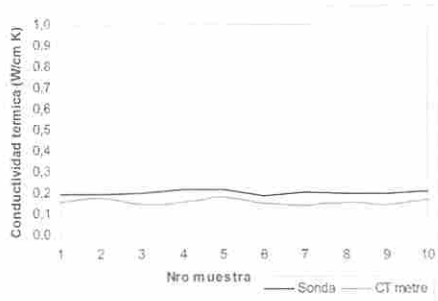


Fig. 3. Medición de conductividad térmica usando equipo CT-Metre y equipo de sonda térmica

Elaboración de pan tipo Hallulla

La panificación se realizó de acuerdo a la formulación tradicional de pan tipo hallulla indicada en la tabla 2 y de acuerdo al diagrama de flujo correspondiente a la elaboración de pan tipo hallulla.

Tabla 2. "Formulación de Hallullas"

Materia Prima	Porcentaje
Harina	100
Agua	*50
Materia grasa	4
Levadura	2
Sal	2

Fuente: Negrete (2000)

- Según la información del Farinograma

Tratamiento Estadístico de los Resultados

Las variables de respuesta se estudiaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), que permite identificar la existencia de diferencias significativas de cada muestra en relación con las demás, estableciendo un nivel de confianza del 95%. Para los casos en que se encontraron diferencias significativas en los resultados, se utilizó el test de comparación múltiple de Tukey, identificando los grupos de homogeneidad y las diferencias entre cada par de factores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conductividad térmica

Los resultados de las mediciones experimentales de conductividad térmica mediante el sistema implementado se muestran en la tabla 3. Observándose diferencias significativas para las medias de cada nivel entre la procedencia del pan y la conductividad térmica medida.

Tabla 3. "Conductividad térmica para cada procedencia del pan [W m^{-1} K^{-1}]"

Repetición	Industrial	Semi-industrial	Laboratorio
1	0,229	0,185	0,283
2	0,223	0,200	0,286
3	0,239	0,207	0,303
4	0,213	0,201	0,332
5	0,219	0,200	0,304
6	0,222	0,194	0,324
7	0,229	0,195	0,302
8	0,238	0,194	0,291
9	0,205	0,203	0,324
10	0,213	0,191	0,289
Promedio	**0,223**	**0,197**	**0,304**

Estas diferencias (letras distintas) se aprecian mejor en la figura 5.

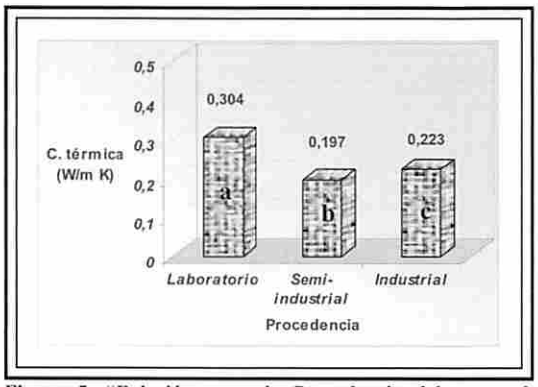


Figura 5. "Relación entre la Procedencia del pan y la Conductividad térmica"
Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

De acuerdo a las propiedades físicas evaluadas (contenido de humedad y densidad aparente), no es extraño observar que el pan proveniente de panadería Semi-industrial, presente un valor menor de conductividad térmica que las otras categorías, ya que ambas propiedades también resultaron ser menores.
A fin de poder comparar las mediciones realizadas, se calculó la conductividad térmica de los panes provenientes de las tres categorías mediante correlaciones empíricas planteadas por diversos autores, las cuales dependen principalmente del contenido de humedad, densidad aparente o temperatura del producto.
El análisis de varianza para la conductividad térmica del pan elaborado en el Laboratorio según el método de obtención, estimó diferencias estadísticamente significativas para las medias de cada método. Además, se encontró mayor diferencia entre el valor de conductividad térmica calculado por la correlación propuesta por Bakshi y Yoon (1,293 W m^{-1} K^{-1}) citada por Negrete (2000) (Tabla 4) y el valor experimental utilizando la Sonda térmica (0,304 W m^{-1} K^{-1}).

Tabla 4. "Conductividad Térmica medida con el método de la sonda y calculada mediante diferentes correlaciones para cada procedencia del pan [W m^{-1} K^{-1}]"

Procedencia	Experi-mental	Bakshi y Yoon	Baik y col.	Metel et al.
Laboratorio	0,304	1,293	1,032	0,428
Semi-industrial	0,197	0,386	0,611	0,492
Industrial	0,223	0,419	0,684	0,445

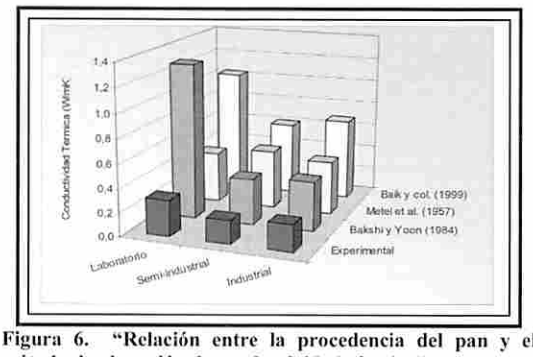


Figura 6. "Relación entre la procedencia del pan y el método de obtención de conductividad térmica"

Las muestras elaboradas en la panadería Semi-industrial, presentaron diferencias significativas, observándose que la mayor diferencia se obtuvo con la correlación de Baik (0,611 W m^{-1} K^{-1}) y el método de medición experimental utilizando la sonda térmica (0,197 W m^{-1} K^{-1}). El mismo comportamiento presentó el pan proveniente de panadería industrial.

CONCLUSIONES

Se logró implementar una metodología de medición de conductividad térmica para productos panaderos terminados, utilizando un sistema de medición sencillo y rápido.
Las mediciones del sistema implementado con respecto a las del equipo certificado, presentaron una buena correspondencia (superior al 80%) .
Las propiedades físicas, peso, volumen y densidad aparente del pan tipo hallulla presentaron diferencias significativas según la procedencia del pan (Industrial, Semi-industrial o de Laboratorio).
La conductividad térmica se vio notablemente afectada por la procedencia del pan. Por lo que, es posible concluir, que productos panaderos del mismo tipo, no tienen la misma conductividad térmica, ya que sus propiedades físicas son diferentes.
La medición de la conductividad térmica en forma experimental entrega valores mas reales acerca de esta propiedad, en comparación a aquellos calculados por correlaciones empíricas, debido a que éstas dependen de propiedades como la temperatura del producto, contenido de humedad o densidad aparente, dejando fuera otros factores importantes y difíciles de definir (la estructura del producto, espacios vacíos, contacto partícula-partícula, composición química, etc.), pero que están presentes en el producto al momento de medir experimentalmente con la sonda térmica.
La utilización de la sonda térmica, permite medir conductividad térmica en productos panaderos terminados de cualquier tipo, en solo 10 minutos de medición, sin ocupar gran espacio en el laboratorio y con un sistema de cálculo relativamente fácil.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo como al Departamento de Investigación Científica y Tecnológica (DICYT) de la Universidad de Santiago de Chile que hicieron posible la realización de este trabajo (Proyecto DICYT N°080471NZ).

REFERENCIAS

AACC (1983). "Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol I-II. Octava Edición.
Alvarado, J., Aguilera, J. (2001) "Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos". Editorial Acribia. Zaragoza, España. 189-213.
Farias, A. (2005). "Evaluación de las Propiedades Térmicas, Físicas y Sensoriales en Pan Especial tipo Molde, con Fibra de Soya a Nivel Piloto". Trabajo de titulación para optar al título de de Ingeniero de Alimentos. Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile. .17-19.
Gupta, T. R. (1993). "Thermal Conductivity of Indian Unleavened Flat Bread at Various Stages of Baking". Journal of Food Process Engineering. 16(3), 227-235,14ref.
Hagemann, D. (2000). "Diseño y Construcción de Equipos Destinados a la Evaluación de Conductividad Térmica Efectiva de Suelos". Trabajo de titulación para optar al título de Ingeniero Civil en Mecánica. Facultad de Ingeniería, Universidad de Santiago de Chile. 42-45, 48-58.
Mondaca, R. (2003). "Determinación de la Conductividad Térmica de Medios Heterogéneos en Función de la Profundidad". Trabajo de titulación para optar al título de Ingeniero Civil en Mecánica. Facultad de Ingeniería, Universidad de Santiago de Chile. 2-22.
Muramatsu, Y. Tagawa, A. Kasai, T. (2005). "Effective Thermal Conductivity of Rice Flour and Whole and Skim Milk Powder". Journal of Food Science. 70 (4):E 284.
Negrete, C. (2000). "Análisis de Perfil de Temperaturas, en Función del Tiempo, en Productos de Panificación y su Efecto en las Propiedades Físicas". Tesis de Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 60-62 y 76.

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA CARNE DE RES, CERDO Y PAVO

Ochoa Oscar, Diosa Carlos, Puerta Juan, Gómez Hader
Centro de Investigación y Desarrollo Cárnico, Industria Alimentos Zenú S.A.
Carrera 64C 104 – 03 Medellín Colombia

Palabras Claves: Propiedades físicas, Conductividad eléctrica, Calentamiento óhmico, Carnes.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue medir los valores de la conductividad eléctrica de tres materiales cárnicos usados en la industria de las carnes procesadas y determinar la relación que tiene el comportamiento de esta propiedad con la temperatura del material. El método experimental consistió en seleccionar muestras de músculos magros de los tres tipos de carne objeto de estudio, luego se congelaron y, posteriormente, se sometieron a una fuente de voltaje de 68 Voltios de corriente alterna y 60Hz de frecuencia, durante la prueba se registró la variación en la temperatura de la muestra. Se halló que la conductividad eléctrica de las muestras aumenta en forma proporcional con la temperatura de la muestra y que el mayor valor lo presenta la carne de pavo, en segundo lugar cerdo y en tercer lugar res.

INTRODUCCIÓN

La industria de los alimentos no es ajena a la dinámica de desarrollado que la tecnología le ha dado a la industria en general. El consumo masivo y creciente de alimentos procesados ha obligado a optimizar los métodos de transformación de las materias primas y a buscar nuevas alternativas que incrementen sus rendimientos y garanticen altos niveles de calidad.

En las empresas de carnes uno de los procesos críticos, por su impacto en la seguridad de los productos y en el costo final de productos, es el proceso térmico; los procesos tradicionales garantizan las condiciones que el producto requiere, sin embargo, cada día se encuentran alternativas que permiten resultados similares, o superiores, tanto en la calidad del producto como de sus rendimientos. Estos procesos alternativos han sido denominados procesos emergentes.

Los procesos térmicos emergentes se agrupan en dos categorías: aquellos que no involucran un cambio en la temperatura, son llamados procesos no térmicos, entre ellos se destacan: las altas presiones, irradiación, pulsos eléctricos de alta frecuencia y descontaminación de superficies; otra categoría es la de aquellos que generan incremento en la temperatura del material, entre ellos se destacan: microondas, calentamiento de alta frecuencia y calentamiento óhmico (Barbosa-Cánovas,1999).

Entre los tratamientos emergentes se destaca el calentamiento óhmico, el cual consiste en hacer pasar una corriente eléctrica a través de un material alimenticio que tiene la capacidad de conducir la corriente. Esta corriente genera un calentamiento en el material debido a la resistencia eléctrica que lo caracteriza (McKenna et al, 2006). Esta tecnología ha sido probada en Europa, Asía y Estados Unidos para el procesamiento de materiales como: leche, vegetales, carnes, salsa entre otros con excelentes resultados (Zoltai y Swearingen, 1996), se ha combinado con procesos tradicionales para procesar productos como hamburguesas (Öskan, N., Ho, I. y Mohammed, F., 2004) y ha sido utilizada para desarrollar equipos para el descongelamiento de bloques de carne (Robert et al, 1998).

El calentamiento óhmico es una excelente oportunidad para la industria procesadora de carnes y un aspecto importante en la implementación de este proceso es determinar la capacidad de la carne para conducir la corriente eléctrica, conductividad eléctrica y su relación con el cambio de la temperatura producido en el material. El objetivo de este trabajo es determinar la relación que existe entre estas dos variables en la carne de res, cerdo y pavo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se realizaron utilizando muestras de músculos magros de res, cerdo y pavo, para cada tipo de material se prepararon tres muestras de área transversal cuadrada de lado 0.03 m y longitud de 0.1 m, estas muestras fueron congeladas y almacenadas para homogenizar su temperatura. A cada una de las muestras se le realizó un análisis proximal para determinar su composición.

Durante las pruebas las muestras fueron ubicadas en la celda diseñada para el proyecto como se muestra en la Figura 1.

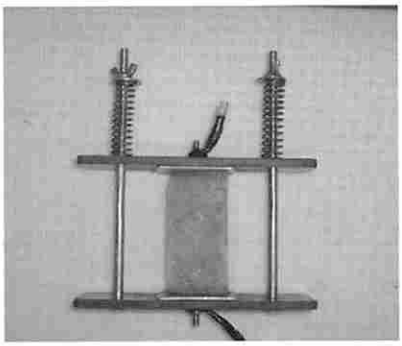


Figura 1 : Preparación de las muestras

La celda de pruebas se conecto a un circuito eléctrico conformado por una fuente de voltaje regulado y ajustada en 68 voltios de corriente alterna y 60 Hz de frecuencia, un voltímetro, un amperímetro, una resistencia limitadora de la corriente y un sistema de adquisición de datos para el registro de temperaturas en tres puntos del eje de la muestra. En la Figura 2 se presenta un esquema del equipo.

El equipo de medida fue construido siguiendo el diseño presentado por Shirsat y que se ajusta a la siguiente expresión (Shirsat et al, 2004):

$$k = S * \frac{l}{A}$$

Donde k es la conductividad eléctrica (S m^{-1}), S es el inverso de la resistencia eléctrica (S), l es la longitud de la muestra (m) y A es el área transversal de la muestra (m^2). El inverso de la resistencia (S) se mide en Siemes.

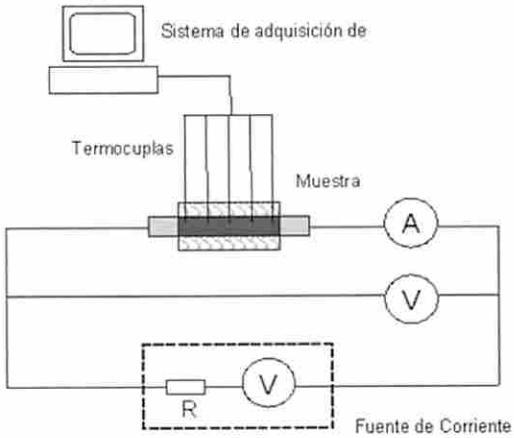


Figura 2 : Esquema del equipo de medida

Para el análisis proximal se siguieron los siguientes procedimientos: para determinar el contenido de grasa se utilizó el método AOAC 964.12 (1990) " Fat (Crude) in sea food. Rapid modified Bab Cock Method", el contenido de humedad se determinó por medio del método COPANT 968 Carne y sus productos - Determinación del contenido de humedad – Método de referencia, para el caso del contenido de cenizas se utilizó el método Fisher y la cantidad de proteína se obtuvo restando la cantidad de los demás elementos del peso total de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado experimental obtenido para la conductividad eléctrica de la carne de cerdo, se compara con el valor reportado por Shirsat en su trabajo sobre el calentamiento óhmico (Shirsat et al, 2004), es de anotar que estos valores no corresponden a músculos con igual composición y esto podría explicar la diferencia entre los valores presentados en la Tabla 1. En una segunda fase de este trabajo se realizará una investigación buscando relacionar el valor de la propiedad con la composición de las muestras y la temperatura.
En la Tabla 1 se presentan, adicionalmente, los valores de la conductividad eléctrica para un músculo magro de pavo y un músculo magro de res. En la revisión del estado del arte no se encontraron reportados valores para estos materiales, lo que se constituye en un aporte al estado del arte y sirven de referencia para identificar el efecto que tiene el tipo de material en el valor de la propiedad.

Tabla 1
Conductividad Eléctrica para carne de cerdo, res y pavo
Medida a 20°C, 6.8 V/cm, 60 Hz

Muestra	Conductividad Eléctrica (S/m)
Cerdo[a]	0.76
Cerdo	1.04
Res	0.55
Pavo	1.10

[a] Valor medido a 20°C,3.6 V/cm, 50 Hz (Shirsat et al,2004)

El registro continuo de la temperatura en la muestra permitió construir el perfil que describe el calentamiento que sufre la muestra cuando circula la corriente eléctrica a través de ella. En la Figura 3 se presenta el perfil típico de temperatura de las muestras.
En el perfil de temperaturas presentado en la Figura 3 se identifica dos partes importantes, cada una con un comportamiento particular: la primera parte corresponde a las temperaturas por debajo de la temperatura de congelación y la segunda parte corresponde a las temperaturas superiores a la temperatura de congelación de la muestra. Para determinar el comportamiento de las muestras con precisión se divide el estudio de la conductividad eléctrica de la muestra a temperaturas inferiores y superiores a la temperatura de congelación.

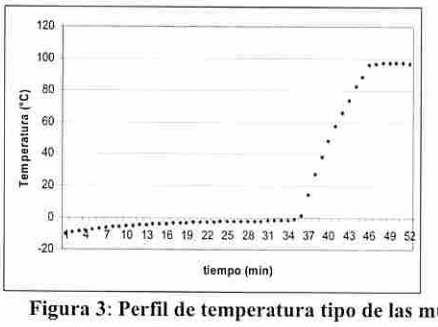


Figura 3: Perfil de temperatura tipo de las muestras

Para las temperaturas inferiores al punto de congelación el comportamiento se ajusta a un polinomio de orden 4 con la siguiente expresión:

$$k = c_1 T^4 + c_2 T^3 + c_3 T^2 + c_4 T + c_5$$

En la Figura 4 se presenta el comportamiento típico de la conductividad eléctrica como función de la temperatura antes del punto de congelación.

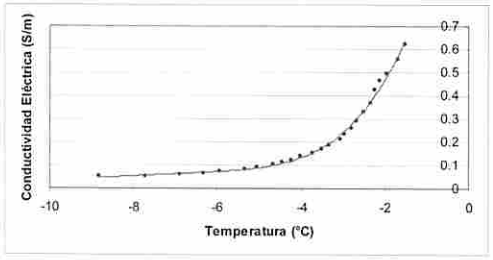


Figura 4 : Conductividad Eléctrica para temperaturas antes del punto de congelación

Para las temperaturas superiores al punto de congelación el comportamiento es lineal y se ajusta a una expresión de la siguiente forma:

$$k = c_6 * T + c_7$$

En la Figura 5 se presenta el comportamiento típico de la conductividad eléctrica como función de la temperatura antes del punto de congelación.

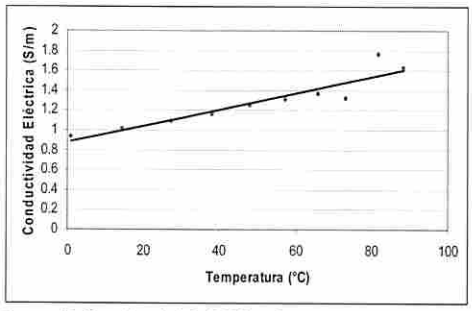


Figura 5 Conductividad Eléctrica para temperaturas después del punto de congelación

El valor para las constantes c_1 a c_7 depende del tipo de carne y de su composición fisicoquímica. En la Tabla 2 se presentan valores preliminares de estas constantes para los músculos magros de res, cerdo y pavo, los materiales objeto de estudio en este trabajo.

Tabla 2
Valores de las constantes

Muestra	c_1 S/m°C⁴	c_2 S/m°C³	c_3 S/m°C²	c_4 S/m°C	c_5 S/m	c_6 S/m°C	c_7 S/m
Cerdo	0.001	0.0286	0.2871	1.255	2.1285	0.0082	0.873
Res	0.0006	0.0147	0.1245	0.4523	0.7261	0.0107	0.322
Pavo	0.0006	0.0172	0.1791	0.8328	1.5417	0.0134	0.836

Los valores obtenidos de la conductividad eléctrica para los tres materiales objeto de estudio se presentan en la Figura 6, se observa como el material que presenta una mayor conductividad es pavo, seguido por el cerdo y con una menor conductividad la res, es decir las carnes blancas tiene una mayor conductividad.

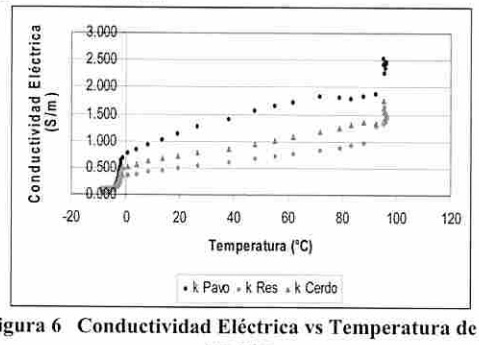


Figura 6 Conductividad Eléctrica vs Temperatura de la muestra

CONCLUSIONES

El valor para la conductividad eléctrica de la carnes estudiadas presenta una relación muy estrecha con la fase en la que se encuentren los líquidos que hacen parte del material, eso obligó a realizar el análisis teniendo como frontera la temperatura de congelación de la muestra. Esta forma de analizar los datos permitió obtener expresiones matemáticas simples para representar el comportamiento de la propiedad.

En el rango de temperaturas superiores al punto de congelación la diferencia entre los materiales es más significativa que la que se observa en las temperaturas inferiores al punto de congelación. La explicación a esto sería posible darla sólo cuando se cuente con el análisis proximal de las muestras como factor del diseño experimental, sin embargo, este comportamiento es un aporte valioso al estudio de esta propiedad.

El material que presenta el mayor valor para la conductividad eléctrica es el pavo, seguido por el cerdo y con menor valor la res, es decir, las carnes blancas tienen una mayor capacidad para conducir la corriente eléctrica.

El estudio de esta propiedad se convierte en una excelente oportunidad para desarrollar la aplicación a nivel industrial del calentamiento óhmico como proceso alternativo a los procesos tradicionales. Por esta razón se deja planteada la segunda fase de la investigación para profundizar en el conocimiento de esta propiedad.

REFERENCIAS

Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R. y Swanson,B.G. Nonthermal preservation of foods. New York,USA, Marcel Dekker, 1999.

McKenna, B.M., Lyng, J. y Shirsat, N.B. Advances in radic frecuency and ohmic heating of meats. Journal of Food Engineering, 77, 215-229,2006.

Öskan, N., Ho, I. y Moammed, F.,Combined ohmic and plate heating of hamburger patties: quality of cooked patties, Journal of Food Engineering, 63, 141-145, 2004.

Robert,J.S.,Balaban,M.O., Zimmerman,R. y Luzuriaga,D., Desing and testing of a prototype ohmic thawing unit. Computer an Electronics in Agriculture, 19, 211-222, 1998).

Shirsat, N. B., Lyng, G.J., Brunton, N.P. y McKenna, B.M. Ohmic processing: Electrical Conductivities of pork cups. Meat Science, 67, 507- 514, 2004.

Zoltai,P y Swearinge, P. Product Development Considerations for Ohmic Processing. Food Technology., 263–166, May 1996.

INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE GORDURA *LOW TRANS* NA CRISTALIZAÇÃO DA MANTEIGA DE CACAU

Quast, L.B[2].; Luccas, V[1].; Malavazzi, M[1].; Kieckbusch, T.G[2].
[1] Ital, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Cereal Chocotec
[2] Unicamp, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Termofluidodinâmica
[2] Cidade Universitária "Zeferino Vaz". CEP: 13081-970 - Campinas – SP – Brasil. Caixa Postal: 6066
Telefone: (55-019) 3521-3906 - Fax: (55-19) 3521-3922. e-mail: leda@feq.unicamp.br

Palavras-chave: cristalização, gordura *low trans*, manteiga de cacau

RESUMO

Estudou-se a influência da incorporação de gordura CBR *Low Trans* nas propriedades físicas da manteiga de cacau. Foram realizadas misturas de manteiga de cacau com 5, 10, 15, 20, 25 e 30% de CBR (*Cocoa Butter Replacer*). As misturas, derretidas a 40°C, foram pré-cristalizadas em reator de escala piloto durante 8 minutos (tc), reaquecidas até 31°C e depositadas em moldes para resfriamento em túnel com circulação forçada de ar com temperatura média de 11,5°C. As amostras embaladas foram mantidas na temperatura de 23°C durante 15 dias e então caracterizadas quanto à textura (força máxima de fratura - Kg_f) e grau de cristalização (*temperindex* – TI). Misturas com até 15% de CBR apresentaram propriedades físicas próximas às da manteiga de cacau pura. A presença da gordura *Low Trans* não modificou as características de cristalização da manteiga de cacau. A análise de *temperindex* mostrou não ser adequada para a determinação do grau de cristalização de gorduras, sendo indicada apenas para medidas em massas de chocolate.

INTRODUÇÃO

A CBR é uma gordura não-láurica, com distribuição de ácidos graxos similar à manteiga de cacau, mas com diferente estrutura em triglicerídeos e pode ser utilizada como substituta à manteiga de cacau. A Resolução RDC nº264, de 22 de setembro de 2005 (Anvisa, 2007-a) permite a substituição parcial da manteiga de cacau no chocolate por gorduras vegetais alternativas, entre elas, a CBR (*Cocoa Butter Replacer*). Com a obrigatoriedade da indicação do teor de ácidos graxos *trans* na rotulagem de alimentos, estabelecido pela Resolução RDC nº360, de 23 de dezembro de 2003 (Anvisa, 2007-b), cresce cada vez mais a busca por gorduras com baixo teor de ácidos graxos *trans*, denominadas *Low Trans*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da incorporação de gordura *Low Trans* na força máxima de fratura e no grau de cristalização, ou *temperindex*, de misturas com a manteiga de cacau.

MATERIAL E MÉTODOS

Matérias-primas: manteiga de cacau desodorizada, composta por uma mistura de manteiga de cacau do Brasil (Pará e Bahia) e da Indonésia (Barry Callebaut Brasil S/A); gordura CBR *Low Trans*, obtida pelo processo de interesterificação química a partir do óleo de palma (Fuji Vegetable Oil, Inc.).

Foram realizadas misturas binárias de manteiga de cacau com 5, 10, 15, 20, 25 e 30% de CBR. A pré-cristalização da manteiga de cacau e das misturas foi realizada em um reator de 700mL, acoplado a dois banhos termostatizados para controle de temperatura. As condições utilizadas na pré-cristalização foram: velocidade de agitação média de 96rpm; temperatura de cristalização (Tc) de 24°C; tempo de cristalização de 8 minutos e temperatura de reaquecimento de 31°C (Itamoto *et al.*, 2006). A taxa de resfriamento foi próxima de 2,0°C/min, adequada para a indução de cristais do tipo beta, forma considerada estável para a manteiga de cacau (Luccas, 2001). As amostras foram caracterizadas quanto à força máxima de fratura em um Texturômetro Universal TA-XT2i, da Stable Micro Systems, com o probe HDP/3PB (Three point bend rig) e o grau de cristalização ou *temperindex* (TI) em um Temperímetro marca Sollich (Itamoto *et al.*, 2006). Os resultados da força de fratura foram avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança. A figura 1 ilustra as etapas de processamento e avaliação física das amostras obtidas.

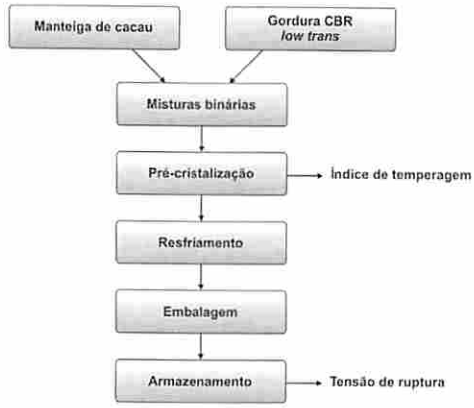


Figura 1. Etapas de processamento e avaliação física das amostras.

A tabela 1 apresenta os métodos utilizados na caracterização das gorduras.

Tabela 1. Métodos utilizados na caracterização das gorduras

Determinação	Método
Acidez (% ácido oléico)	AOCS – Método Ca 5a – 40 (FIRESTONE, 1998)
Índice de iodo (cg de iodo adsorvido/g de amostra)	AOCS – Método Cd 1c - 85 (FIRESTONE, 1998)
Índice de saponificação (mg de KOH/g de amostra)	AOCS – Método Cd 3a – 94 (FIRESTONE, 1998)
Umidade (%)	AOAC – Método Karl Fisher (MARTIN, 1977)
Composição em ácidos graxos	AOCS – Método 1 – 62 (FIRESTONE, 1998)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados das análises físico-químicas e da composição em ácidos graxos das gorduras.

Tabela 2. Caracterização físico-química da manteiga de cacau e da gordura CBR *Low Trans*

Determinação	Manteiga de Cacau	Gordura CBR *Low Trans*
Acidez (% ac. Oléico)	1,70 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Índice de Iodo (cg de iodo adsorvido/g de amostra)	34,91 ± 0,44	36,81 ± 0,07
Índice de saponificação (mg de KOH/g de amostra)	195,37 ± 1,19	209,32 ± 2,01
Umidade (%)	0,343 ± 0,002	0,230 ± 0,020

Tabela 3. Composição em ácidos graxos da manteiga de cacau e da CBR *Low Trans*

Ácido Graxo	Manteiga de Cacau (%)	CBR *Low Trans* (%)
Ácido palmítico (C16:0)	25,54	52,74
Ácido esteárico (C18:0)	35,36	6,25
Ácido oléico (C18:1)	33,93	*Cis* 32,21 *Trans* 4,22
Ácido linoléico (C18:2)	2,95	*Cis* 1,30 *Trans* 0,24
Outros	2,22	3,04
Saturados	*62,59*	*61,94*
Monoinsaturados	*34,26*	*36,52*
Poliinsaturados	*3,15*	*1,54*

Os baixos valores de acidez e umidade apresentados na tabela 2 indicam que ambas as gorduras encontravam-se em boas condições de uso. Os valores de índice de iodo e de saponificação da manteiga de cacau estão muito semelhantes aos obtidos por Luccas (2001) e Ruscheinsky (2005).

Na tabela 3 verifica-se que os principais ácidos graxos encontrados na manteiga de cacau foram o esteárico, o oléico e o palmítico, constituindo 94,83% da sua composição. O principal ácido graxo presente na CBR *Low Trans* foi o ácido palmítico, contribuindo com 52,74%, seguido pelo ácido oléico na configuração *cis*, com 32,21%. O teor total de ácidos graxos *trans* encontrado na gordura foi de 4,46%. Segundo a Resolução RDC nº360, dependendo do nível de uso dessa CBR na fabricação de chocolates o produto poderá ser considerado como alimento *Zero Trans* se apresentar teor de gorduras *trans* menor ou igual a 0,2g/porção.

A gordura CBR *Low Trans* apresenta teor de ácidos graxos monoinsaturados próximo ao da manteiga de cacau. Embora com menor teor de ácidos graxos saturados, a presença dos ácidos graxos *trans* na CBR confere propriedades físicas similares às da manteiga de cacau. Isso justifica a sua utilização como gordura alternativa à manteiga de cacau na produção de chocolates e produtos análogos.

A Figura 2 apresenta a variação de temperatura durante o tempo de pré-cristalização da manteiga de cacau e das misturas com a gordura CBR cristalizadas na temperatura de 24ºC por 8 minutos.

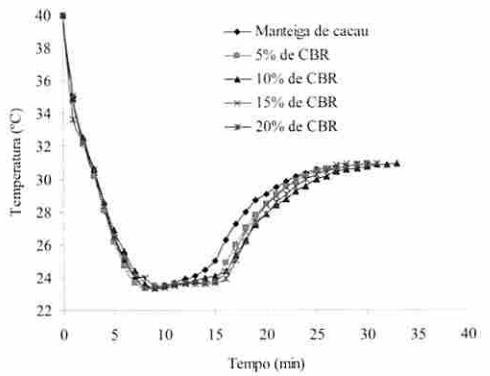


Figura 2. Curvas de pré-cristalização da manteiga de cacau e das misturas na temperatura de 24ºC por 8min.

Observa-se pela Figura 2, que a taxa média no resfriamento das amostras foi de 2,0ºC/min. O desenvolvimento das curvas foi idêntico, esse comportamento já era esperado, pois a manteiga de cacau está presente em maior proporção nas misturas avaliadas. O comportamento das curvas está semelhante ao sugerido por Talbot (1994) para a pré-cristalização de chocolates.

A tabela 4 apresenta os resultados do grau de cristalização e da força de fratura para a manteiga de cacau pura e para as misturas binárias de manteiga de cacau com a gordura CBR *Low trans*.

Tabela 4. T*emperíndex* e força máxima de fratura da manteiga de cacau e das misturas binárias com a CBR *Low Trans*, pré-cristalizadas a 24ºC por 8 minutos

Amostras	*Temperíndex* (TI)	Força máxima de fratura (Kg_f)
Manteiga de cacau	nd	$5,30 \pm 0,55^{ab}$
5% de CBR	nd	$5,55 \pm 0,76^{a}$
10% de CBR	nd	$4,76 \pm 0,31^{abc}$
15% de CBR	5,4	$4,39 \pm 0,46^{b}$
20% de CBR	3,3	$4,24 \pm 0,56^{c}$

nd - não detectado

* Análises de tensão de ruptura realizadas com 8 repetições. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças estatisticamente significativas.

Observa-se que a análise de t*emperíndex* não apresentou resultados conclusivos, já que o equipamento não forneceu leitura para algumas amostras. Esse mesmo comportamento havia sido constatado por Itamoto *et al.*, (2006), e pode ser devido à natureza das amostras, já que o equipamento foi desenvolvido para analisar massas de chocolate, com partículas suspensas como açúcar, leite e cacau, e não para gorduras puras ou misturas. Também pode-se constatar que a tensão de ruptura da manteiga de cacau foi estatisticamente semelhante às amostras com 5, 10 e 15% de gordura CBR. Em termos de processo, as barras foram facilmente desmoldáveis após o resfriamento. Já com 20% de adição de CBR *Low Trans* as barras apresentaram dificuldade de desmoldagem e rápido derretimento nas mãos.

Buscando-se adequar o experimento para ampliar o uso da CBR *Low Trans*, realizou-se novos ensaios modificando as condições de pré-cristalização, ou seja, diminuiu-se a temperatura de 24ºC para 23ºC e aumentou-se o tempo de cristalização de 8 para 10 minutos. As novas curvas de pré-cristalização e os novos resultados da força de fratura estão apresentados na figura 3 e na tabela 5, respectivamente.

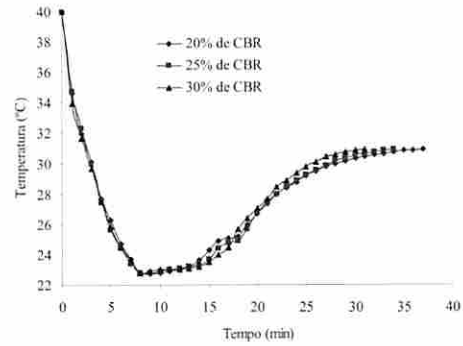


Figura 3. Curvas de pré-cristalização da manteiga de cacau e das misturas na temperatura de 23ºC por 10min.

Como era esperado, o comportamento das curvas da figura 3 foi semelhante ao das curvas apresentadas previamente na figura 2. Em ambos os casos, a taxa de resfriamento e reaquecimento das amostras foi mantido constante.

Tabela 5. Força de fratura "snap test" das misturas, pré-cristalizadas a 23ºC por 10 minutos

Amostras	Força de fratura "Snap test" (Kg_f)
20% de CBR	$3,23 \pm 0,77^{a}$
25% de CBR	$4,21 \pm 0,22^{b}$
30% de CBR	$3,94 \pm 0,44^{ab}$

* Análises de tensão de ruptura realizadas com 8 repetições. Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças estatisticamente significativas.

Mesmo com as alterações na temperatura e no tempo de cristalização, as amostras continuaram apresentando cristalização irregular com dificuldade na desmoldagem e fácil derretimento, inviabilizando em primeira avaliação, a sua aplicação em misturas na fabricação de chocolates.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foram realizados os ensaios, as mistura contendo 5%, 10% e 15% de CBR *Low Trans* apresentaram propriedades físicas adequadas para o uso na fabricação de chocolate. A gordura CBR *Low Trans* não interferiu nas propriedades de cristalização das misturas. A análise de *temperíndex* mostrou não ser adequada para a determinação do grau de cristalização de gorduras.

REFERÊNCIAS

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: http//:www.anvisa.gov.br. Acesso em: 3 de fev. 2006 - a.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução RDC nº 360 de 23 de Dezembro de dezembro de 2003. Disponível em: <http//:www.anvisa.gov.br> Acesso em: 06 fev. 2007 - b.

FIRESTONE, D. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the AOCS.** 5.ed.. Illinois: American Oil Chemists Society, 2v, 1998.

ITAMOTO, J. M.; LUCCAS, V.; QUAST, L. B. Influencia da incorporação de gorduras vegetais na cristalização da manteiga de cacau. **Relatório Final**, 35p. , Comissão Pibic – ITAL, 2006.

LUCCAS, V. Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à mantiga de cacau para uso na fabricação de chocolate. 2001.195p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTIN, R. A. J. Collaborative study of the dtermination of moisture in chocolate by Karl Fischer Titration. **Journal of the AOAC**, v.60, nº3, p.654-657, 1977.

RUSCHEINSKY, N. Estudo da cristalização e fracionamento térmico a seco da gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schumann). 2005. 88p. **Tese (Mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TALBOT, G. Chocolate temper. In: Beckett, S.T (Ed.). **Industrial chocolate manufacture and use.** 2 ed. London: Chapman & Hall, 1994, 408p.

CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE PRODUCTOS A TRAVES DE DISEÑO DE MEZCLAS Y CARACTERIZACION DE UN CREMOGENADO LACTEO DE MARACUYA

(*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener)

[1]Guillermo Salamanca Grosso; [1]Nelson Rodriguez Arias; [2]Carmen Rosa Pérez Figueredo
Diana Marcela Sánchez Romero
[1]GRUPO DE INVESTIGACIONES MELLITOPALINOLOGICAS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
PBX +57(8) 264 42 19 Fax +57(8) 264 48 69
B. Santa Helena A.A. 546 - Ibagué, COLOMBIA. Email: salamancagrosso@gmail.com
FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE QUIMICA
UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA
AVENIDA CENTRAL DEL NORTE CAMPUS UNIVERSITARIO DE TUNJA

Palabras clave: Procesado. Diseño experimental. Maracuyá. Propiedades Fisicoquímicas. Tecnología de Alimentos.

RESUMEN

El Maracuyá (*Passiflora edulis*), es una fruta tropical de gran mercado y aceptación en Colombia. La fruta presenta características organolépticas que la hacen muy apetecida en la industria de los refrescos y conservas, debido a la presencia de vitaminas y su aroma fragante. En este trabajo se presenta una contribución al desarrollo de productos a través de diseño de mezclas y caracterización de un cremogenado lácteo de maracuyá (*Passiflora edulis var.flavicarpa*). Teniendo como objetivo la optimización de las mezclas se obtuvo que la acidez es de 262.8 meqKg^{-1} el pH es de 3.43, y los °Brix de 4.40. Los óptimos observados en % correspondieron al 27 de maracuyá, 61 de base láctea y 12 de azúcar. Los costos estimados para este producto optimizado son de 2.27 US/kg. . El producto optimizado mantiene las propiedades de la fruta, provee vitaminas A y C además de su facilidad para la dispersión en la matriz láctea. El jugo no revela flora microbiana importante y los niveles observados hacen el jugo un material seguro.

INTRODUCCIÓN

El maracuyá es un fruto tropical que se procesa para la elaboración de jugos, bebidas refrescantes y concentrados que pueden ser usados para compotas, flanes y otros tipos de postres (Garduño, 2002). La fruta pertenece a las Pasiloras entre las que se distinguen hasta 400 especies y solo 30 comestibles Chan, (1993), (Swi-Bea y Ming-Jen, 1996), Jangtiani, *et al* (1998). En la homogenización de los componentes del jugo crudo, la industria hace uso de enzimas para favorecer el rendimiento y la separación de la fibra soluble de las semillas (Argaiz, et al, 1995; Flórez, 2006). El jugo de alguna manera puede ser considerado como un producto relativamente nuevo por lo que ha ido aumentando su demanda hasta alcanzar niveles hasta de 18 mil Tn/año. Los mayores niveles de producción corresponden a Ecuador y Brasil, en menor proporción México (Arenas et al, 1994), Colombia, Venezuela, Nueva Zelanda, Sur África, India e Indonesia. En el caso de Colombia se ha observado una creciente área dedicada a su cultivo, que se hace sobre las variedades amarilla (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener) y morada (*Passiflora edulis* var. púrpura Sims), en Antioquia, Huila, Valle, Caldas y Cundinamarca. Vásquez, *et al.* (1992). Schwetesius y Gómez, 1996 han relacionado el potencial del fruto y sus posibilidades artesanales en la preparación de alimentos. Estas razones han motivado el desarrollo de productos, a través de herramientas de diseño estadístico, que permitan conocer y optimizar mezclas de componentes para la puesta en el mercado de alimentos de alto valor biológico, en este sentido se buscan nuevas formas de consumo que cumplan con los requerimientos de calidad. Alemania, Brasil, Australia y Japón serian países objetivo, pues han demostrado interés en el fortalecimiento producción y consumo de productos exóticos (Salamanca, et al, 2006).

METODOLOGÍA.

Materia prima: Los frutos fueron adquiridos en Pitalito (Huila-Colombia: Lat. 1°51´N Lo. 76°02´O), los cuales pertenecen a la variedad flavicarpa, luego se transportaron a la planta de procesado (Frutiexpres-Espinal-Colombia), haciendo uso de canastillas plásticas de 60x45x40cm.

El procesado: La obtención del jugo, se inició con la selección y preparación del fruto. La materia prima seleccionada se reviso y seleccionó teniendo cuenta criterios de madurez fisiológica y aptitud para el consumo); una vez preseleccionada la fruta, se sometido a un proceso de lavado con el fin de eliminar materiales indeseables y microorganismos adheridos a la cáscara. Las operaciones tendientes a la obtención del jugo se hicieron a través de centrifugación y separación de las semillas usando un sistema de tamizado de 0.5mm de paso. Se removió el aire contenido en el jugo para evitar posibles efectos de estabilidad en el color, por oxidación y actividad enzimática y perdida de la Vitamina C. El jugo se empacó al vacio en bolsas de 19x15 cm usando un sistema de vacio V_{AC} 559 (Oster Food Saver Vacum™).

Parámetros fisicoquímicos: En la caracterización de la materia prima, se siguieron las metodologías descritas en el manual de métodos analíticos para alimentos de la AOAC (1999). La Acidez se estimo en me/Kg usando hidróxido de sodio 0.1N; el pH se determino potenciométricamente. Las propiedades cromáticas se determinaron directamente sobre la materia prima y en cada una de las mezclas preparadas para la valoración fisicoquímica. Se hicieron registros fotográficos continuos siguiendo la metodología descrita por León *et al.* (2006). En este caso se construyó una cámara cromática a la cual se acopló una cámara digital Samsung™ de 10.1 Mega pixeles de resolución, dispuesta verticalmente a 42.5 cm de las muestras y un ángulo de 90 grados. El iluminante usado correspondió a un sistema de 4 lámparas fluorescentes Ligting Depot™, de 16W (60 cm) con una temperatura de color equivalente a 6500°K e índice de color cercano a 95%. El estudio de imágenes se hizo en un PC IBM ThinkPad™ usando el software Munsell™ 7.0.1 2006, operado con iluminante D65 y observador 10°.

Conservación: Se estimo el tiempo estimado para el proceso de congelación como única condición de conservación del producto se estimó usando la ecuación de Nagaoka (Citado por Casp y Abril, 2003).

Análisis microbiológico: El jugo recién extraído, se empacó al vacio en bolsas de 19x15 cm usando un sistema de vacio V_{AC} 559 (Oster Food Saver Vacum™) el conjunto se sometió a congelación inmediata. Una vez congelado se trasfirió al laboratorio de Microbiología donde se realizaron las diluciones decimales y con ello las evaluaciones para mesófilos aerobios 30°C, mohos y levaduras. La estabilidad del producto inicialmente se evaluó a 25°C por 7 horas. Evaluando la acidez y pH.

Mezclas: Las mezclas de los derivados lácteos se realizaron en cada una de las proporciones indicadas a una temperatura de 15°C. Se realizaron operaciones de pesado y mezcla intima para los componentes yogur, azúcar y finalmente jugo de Maracuyá. El producto se homogenizo usando una mezcladora Oster Hand Mixer portátil de 5 velocidades, motor Heavy Duty Modelo 4450-08 operada a 110 V 50-60Hz. Cada mezcla se mantuvo a 6.0°C hasta el momento de las evaluaciones fisicoquímicas, que se realizaron a temperatura ambiente. Los rangos establecidos para los componentes de las mezclas (Codificados en composición y fracción de 0 a 1, según rango alto o bajo) se fijaron en % como **A** (Jugo de maracuyá): 15-30 (0.15-0.30), **B**. Derivado lácteo (Yogur): 60-75 (0.60-0.75) y **C.** Azúcar refinada: 10-25 (0.10-0.25). A cada una de las mezclas se les determinó la Acidez, pH y °Brix. El diseño simplex-Centroide usado se muestra en la figura 1.

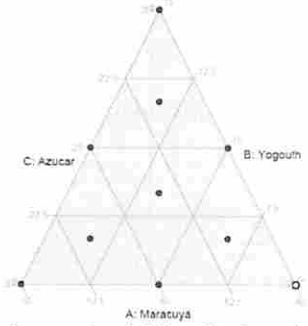


Figura 1. Diseño experimental D-optimal para la evaluación de cremogenados lácteos de maracuyá.

En el estudio de las variables y proceso de optimización se uso la herramienta Design Expert 7.0™ . Graficos y superficies de contrno adicionales se costruyeron con Statistica 4.0™.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la obtención del jugo de maracuyá, la separación de los arilos de la semilla, es la operación que define gran parte de la calidad del producto, ya que al romperse las semillas generan lóbulos de grasa que provocan la rancidez viéndose afectadas las características organolépticas (Flórez, 2006). El jugo de la fruta contiene más de 200 componentes volátiles que lo hacen atractivo en la industria de los alimentos y elaboración de dulces y confites (Nascimiento et al, 1996; Werkhoff et al, 1998), El tamaño del fruto oscila entre 6.0 y 9.5 cm de longitud, con un diámetro de 5.5 a 8.0 cm, con un peso entre 75 y 175g. En cuanto su estructura, está distribuida en aproximadamente 49% por el pericarpio y 51% de pulpa, la cual está constituida por arilos, jugos y semilla. En ocasiones se pueden presentar arilos sin semilla "placenta" la cual se caracteriza por poseer un alto contenido de pectina. Los parámetros fisicoquímicos asociados al jugo de maracuyá se recogen en la tabla 1. El jugo se caracteriza por su aroma, acidez y bajos niveles en cenizas, la humedad no supera el 86%. El color es amarillo, la cromaticidad rojo/verde (a^*) oscila entre 23.8±0.37 y la luminancia (L) con 72.9±2.30. La conservación de la masa de jugo es estable solo bajo condiciones de congelación. La exposición del jugo al ambiente genera cambios de pH, perdida del aroma y pardeamiento. En la figura 2, se muestra la evolución del pH para el jugo de maracuyá en un periodo de 7 horas.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas globales de Jugo de Maracuyá

Propiedades Fisicoquímicas	Unidades	Valores
Humedad	%p/p	85.5±1.40
Sólidos totales	%p/p	14.6±1.60
Sólidos solubles	°Brix	13.6 ± 0.01
Glucosa	%p/p	1.45[b,c]
Fructosa	%p/p	1.98
Sacarosa	%p/p	0.91
Vitamina A (Retinol)	µg/100g	241[e]
Vitamina C	mg/100g	64.8[d]
Densidad	kgm^{-3}	993.4
Cenizas	%p/p	0.70[a]
Acidez Total	$meqKg^{-1}$	589±1.60
pH	Un. (20°C)	2.50±0.28
Actividad de agua	a_w	0.974±0.001
Capacidad calorífica (Cp)	$Jkg^{-1}°C^{-1}$	4063
Conductividad térmica (k)	$Wm^{-1}°C^{-1}$	0.647
Difusividad térmica (α)	m^2s^{-1}	0.160
Luminancia (L)	Unidades	72.9±2.30
Croma. verde/Rojo (a^*)	Unidades	4.22±0.37
Croma. amarillo/azul (b^*)	Unidades	76.4±0.70
Croma (C)	Unidades	12.8±0.06

a (Flórez, 2004); b,c Arjona et al (1991; Senter, et al (1992). d Vinci et al, 1995. e Mercandante, et al, 1998.

El producto presenta buena estabilidad, pero requiere de congelación al vacio. El perfil para el contenido de sólidos solubles muestra diferencias significativas entre los promedios observados en el tiempo (Pvalor < 0.05). Se percibe un ligero incremento en los sólidos solubles entre 0 y 4 horas.

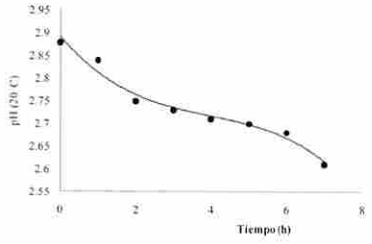


Figura 2. Evolución del pH para el jugo de maracuyá en un periodo de 7 horas.

La actividad enzimática sobre los sólidos totales podria incidir en el incremento de los sólidos solubles por efectos de hidrólisis. En la figura 3 se muestra la relación °Brix y tiempo para el jugo.

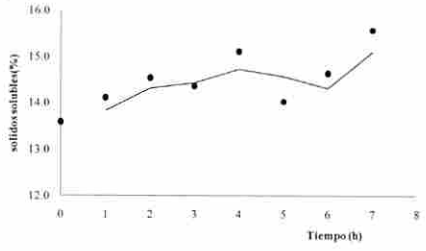
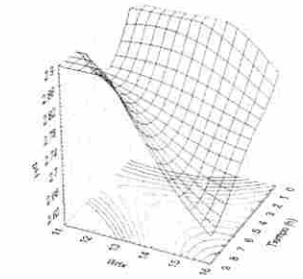
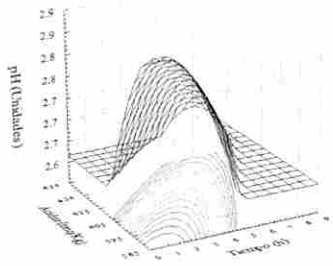


Figura 3. Media móvil para los sólidos solubles del jugo de maracuyá en 7 horas.

Respecto de la conservación, el tiempo estimado de congelación compacta para el producto es de 2.5 a 3.0 h. En estas condiciones se evita la perdida de aromas, perdida de humedad y penetración de oxigeno reduciendo la actividad enzimática y perdidas de vitamina C por oxidación. La figura 4 ilustra los perfiles de respuesta de las relaciones tiempo acidez y sólidos solubles en un periodo de 7 horas. La energía necesaria para cambiar en 20°C un kg el producto es de 1190.6 kJ.



A



B

Figura 4. A). Perfil para la relación pH-Brix-Tiempo en el jugo de Maracuyá y B). pH-Acidez total-Tiempo.

La materia prima utilizada en la elaboración de cremogenados de frutas contienen distintos géneros y especies de microorganismos. Las bacterias, mohos y levaduras son las más frecuentes, la viabilidad y actividad de estos agentes microbianos depende de la composición y disponibilidad de sustratos, que pueden ofrecer condiciones optimas para el crecimiento y desarrollo. En las muestras analizadas se encontraron aerobios mesófilos, mohos y levaduras no se identificaron enterobacterias. En la tabla 2. Se recogen los valores observados en el jugo congelado.

Cremogenado lácteo: La mezcla de yogur, jugo de maracuyá y azúcar es densa y viscosa. La mezcla debe llevar el orden que se acaba de relacionar, dadas las características acidas del jugo se generan grumos cuando se realizan mezclas en otro orden. El incremento de la fruta en la mezcla causa un descenso en la acidez. Adiciones de edulcorante a valores entre 8 y 12% mitigan el efecto acido y resaltan las propiedades aromáticas de la fruta aportándole fragancia y frescura (Tabla 3).

Tabla 2. Propiedades microbiológicas del jugo de Maracuyá

Propiedades Microbiológicas	Unidades	Valores	BOE
Mesófilos	ufc/g	140 *a* 160	$1x10^4$
Mohos/Levaduras	ufc/g	60 *a* 65	$1x10^2$
Coliformes	ufc/g	< 2	Ausencia

BOE = Boletín Oficial Español

Las mezclas son homogéneas u presentan niveles de acidez y pH diferentes, el yogur igualmente ofrece condiciones ideales para la dispersión de los componentes. La Figura 5 ilustra la superficie de contorno para la relación azúcar-pH a un valor definido de base láctea.

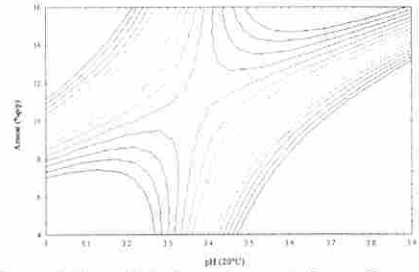


Figura 5. Superficie de contorno Azúcar-pH para el derivado lácteo de maracuyá

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos asociados a mezclas lácteas de yogur y cremogenado de maracuyá

Jugo	Yogur	Azúcar	L	*a**	*b**	C	Acidez	pH
%p/p			Cielab				meq/kg	20ºC
28.3	58.3	13.3	57.8	-16.1	3.76	53.5	218.7	3.64
23.3	63.3	13.3	60.4	-15.2	44.8	47.3	196.9	3.76
20.0	65.0	15.0	58.4	-15.8	44.6	47.1	207.3	3.74
30.0	55.0	15.0	58.2	-15.0	53.5	55.4	248.9	3.20
30.0	65.0	5.00	57.9	-14.0	52.2	54.3	306.9	3.27
30.0	65.0	5.00	58.2	-15.0	50.2	52.3	306.9	3.27
28.3	63.3	8.33	58.5	-14.5	49.6	51.6	268.1	3.26
26.7	61.7	11.7	57.5	-15.5	49.0	51.4	328.6	3.26
25.0	65.0	10.0	58.2	-13.7	46.0	48.0	245.9	3.30
20.0	65.0	15.0	60.0	-17.8	50.9	54.0	199.5	3.41
30.0	55.0	15.0	57.6	-14.3	55.7	57.5	248.9	3.20
30.0	60.0	10.0	58.3	-15.3	54.0	56.1	231.7	3.09
25.0	60.0	15.0	58.1	-14.3	49.9	52.0	255.3	3.28

Optimización: Los resultados generados en la valoración de las mezclas, se ajustan a diferentes modelos, en particular el pH, Acidez, cromaticidad amarillo/azul (*b**), Croma y la función de costo (lineales), la Luminancia (L) y cromaticidad verde/rojo (*a**) a relaciones cuadrática y cubica especial respectivamente. Los valores óptimos de las mezclas en la restricción: **A** (Jugo de maracuyá): 15-30% **B.** (Yogur): 60-75% y **C.** Azúcar refinada: 10-25% se corresponden a: 26./% de jugo de fruta de maracuyá, 61.7 de base de yogur y 11.7% de azúcar. Los costos estimados para esta relación son del orden de 2.27 US/kg (4308.6$Col.) (Tabla 4).

Tabla 4. Valores estimados de la optimización de una mezcla láctea de yogur y cremogenado de maracuyá

Respuesta	Predicción	E. M. Estándar	Intervalos de confianza 95%	
pH	3.36	0.05	3.25	3.47
Acidez (meq/Kg)	251.0	9.10	230.8	271.3
*a**	-15.5	0.73	-17.3	-13.7
L	58.3	0.20	57.9	58.8
Costo ($Col)	4308.6	-	4308.5	4308.6

E.M. Error medio estándar.

El modelo que se ajusta para la mezcla en relación al pH es: $pH=0.65(\%M_J)+4.31(\%Y_Y)+4.47(\%A_Z)$; la acidez es de tipo lineal y de la forma: $A_{T(meq/kg)} = 207.7(\%M_J)+245.6(\%Y_Y)+300(\%A_Z)$; la función de costo del producto en pesos es lineal: Costo ($) = $217.1(\%M_J)+4211.4(\%Y_Y)+4497.1(\%A_Z)$, donde M_J, Y_Y y A_Z representan la fracción porcentual de los componentes. Estas relaciones son altamente significativas. En las figura 6 se recogen las relaciones entre variables tendientes a la optimización de los componentes del derivado lácteo de maracuyá.

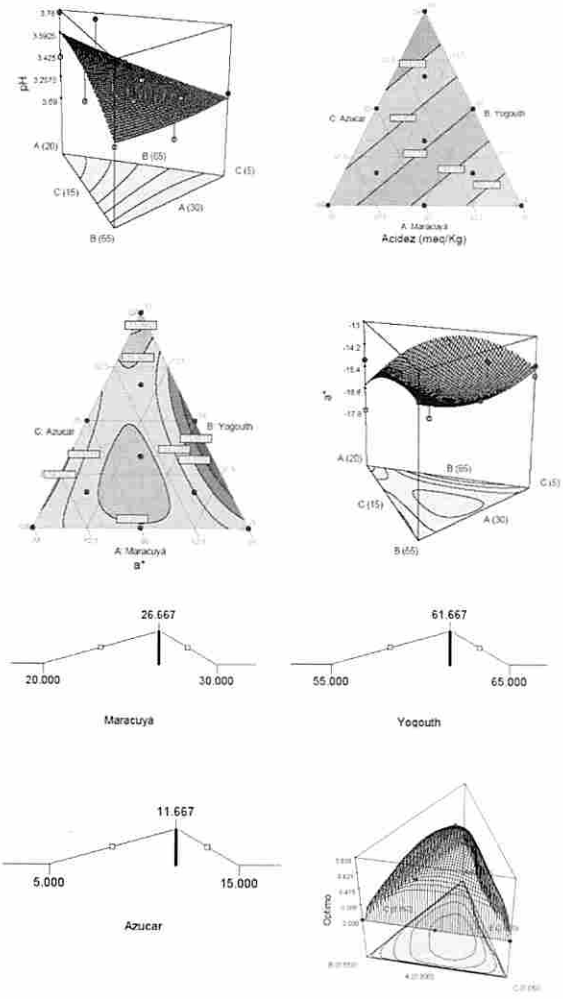


Figura 6. Relaciones entre variables y optimización de los componentes del derivado lácteo de maracuyá.

CONCLUSIONES

El trabajo permitió desarrollar y optimizar una nueva forma de consumo de jugo de maracuyá (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener) a través de herramientas de diseño experimental hasta lograr la mejor combinación. El procesado del jugo no revela flora microbiana importante y los niveles observados hacen el jugo un material seguro. Se estimaron las propiedades térmicas del jugo. El producto optimizado mantiene las propiedades de la fruta, provee vitaminas A y C además de su facilidad para la dispersión en la matriz láctea de yogur. La composición del producto clasifica al material como un alimento de alto valor biológico.

BIBLIOGRAFÍA

GARDUÑO, T. A. 2000 Son amplias las posibilidades de producir en México bebidas funcionales a base de jugos de fruta. Industria Alimentaria. México.

FLÓREZ, L. 2006. Propiedades y caracterización morfológica del fruto de maracuyá amarillo (*Pasiflora edulis var. Flavicarpa degener).* En: Propiedades fisicoquímicas y sistemas de procesado. Productos hortofrutícolas en el desarrollo agroalimentario. COLCIENCIAS-Universidad del Tolima.

VASQUEZ, S. J.; CHACÓN, A. C. 1992. El cultivo del maracuyá. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

ARENAS, O. Establecimiento de un cultivo de Maracuyá *(Pasiflora edulis* var. flavicarpa*)* en campo: evaluación de las características físicas y químicas de los frutos para su posible evaluación tecnológica. México. 1994.

CHAN, H.T. 1993. Passion fruit, papaya and guava juices. In Fruit Processing Technology. Auburdale, Florida: Agscience, Inc.

JANGTIANI, J.; CHANG Jr.; H. SAKAI, W. 1998. Passion Fruit In B. Scweigert (Ed). Tropical Fruit Processing. Food Science and Tecnology a Series of Monographs. Academic Press Inc, San Diego.

NASCIMIENTO, T; RAMOS J.; MENEZES J. 1996. Physical chemical characterization of the yellow passion fruit (*Pasiflora edulis var.* Flavicarpa Deg.) grow in different season. In: Sociedade Brasileiro de fruticultura (eds.), XVI. Resumos. 20-25:483.

FLORES AVILA, E. 2004. *Desarrollo de una Bebida Funcional de Maracuyá (Passiflora edulis f. flavicarpa).* Tesis Maestría. Ciencia de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas, Puebla. México.

SALAMANCA, G.G.; RODRIGUEZ, A.N.; OSORIO, T. M. 2006. Proyecto especial. Propiedades fisicoquímicas microbiológicas y estabilidad enzimática de cremogenados de frutas tropicales. Comité Central de Investigaciones. Universidad del Tolima Colombia.

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA, AMIDO E PROTEÍNA DE DUAS ESPÉCIES DE AMARANTO: *Amaranthus caudatus* E *Amaranthus cruentus*

Tapia-Blácido, Delia [1]; Sobral, Paulo[2] y Menegalli, Florencia[1]
[1] Unicamp, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos
[2] USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos
1 Rua Monteiro Lobato s/n. Cidade Universitária Zeferino Vaz.
CEP 13083-862-Campinas, SP- Brasil, Caixa-Postal: 139.
Telefone: (55 19) 35214039 – Fax: (55 19) 35214027. E.mail. drtapia@fea.unicamp.br

Palavras chaves: propriedades físicas, farinha, amido, proteína, amaranto.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar o amido, a farinha e a proteína de amaranto de duas espécies: *Amaranthus caudatus* e *Amaranthus cruentus*, a fim de avaliar as diferenças entre essas espécies. Foi realizada a caracterização físico-química com a determinação da composição centesimal, perfil de ácidos graxos da fração lipídica da farinha e o perfil eletroforético das proteínas de amaranto. Também foi realizado o estudo da gelatinização por calorimetria diferencial de varredura (DSC) das suspensões em água do amido e da farinha de amaranto. O processo de gelatinização dessas suspensões também foi estudado por reologia. Os resultados mostraram diferenças entre as espécies de amaranto na composição, nas propriedades térmicas e reológicas durante a gelatinização do amido e da farinha.

INTRODUÇÃO

O amaranto é uma planta dicotiledônea cultivada na América desde antes da chegada dos espanhóis, alcançando seu apogeu nos períodos Maia, Asteca, e Inca e era considerado até então, um alimento sagrado para esses povos. O *Amaranthus caudatus* é uma espécie cultivada nos vales interandinos do Peru e da Bolívia, em altitudes de 2700 até 3500 metros acima do nível do mar. É uma planta anual, adaptável a climas temperados e frios, de rápido crescimento e elevada altura (1,80 a 2,60 m). O *Amaranthus cruentus* BRS Alegria é uma espécie originaria da variedade AM 5189 procedente dos Estados Unidos que foi adaptada aos solos dos cerrados brasileiros, através de um esforço técnico desenvolvido pela Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados.

Devido ao importante conteúdo de amido, proteínas e lipídios, as sementes de amaranto representam um material promissor para a extração de diversos sub-produtos (farinha, amido, proteína) que podem ter usos diversos na industria de alimentos. Por isso, o objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar a farinha, amido e proteína a partir das sementes de amaranto de duas espécies *Amaranthus caudatus* e *Amaranthus cruentus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizados grãos de duas espécies de amaranto: *Amaranthus caudatus*, cultivado em Callejón de Huaylas (Huaraz, Peru), e *Amaranthus cruentus*, variedade BRS Alegria, cultivada em Santa Catarina (Brazil).

Obtenção da farinha, amido e proteína

A farinha de amaranto foi preparada segundo o método desenvolvido por Tapia-Blácido (2003). O amido foi isolado segundo a metodologia proposta por Perez et al. (1993). A proteína foi obtida realizando algumas modificações na metodologia de extração do amido (Tapia-Blácido, 2006).

Caracterização física-química dos materiais extraídos

Os materiais extraídos do grão das duas espécies de amaranto foram caracterizados para determinação do teor de umidade, cinzas, proteína e lipídios totais, segundo a metodologia da AOAC (1997). O teor de amilose foi determinado no amido, segundo o método proposto por Juliano (1971). O perfil eletroforético das proteínas das duas espécies de amaranto (*A.caudatus* e *A.cruentus*) foi obtido segundo a metodologia de Laemmli (1970), com modificações. A determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de amaranto extraído das farinhas das duas espécies de amaranto seguiu a metodologia proposta por Hartmann & Lago (1973).

Estudo da gelatinização das suspensões de amido e de farinha por DSC

Foram preparadas suspensões com concentrações de 4%, 10%, 30% e 50% de amido e farinha em água, das duas espécies de amaranto (*A. caudatus* e *A. cruentus*). Essas suspensões foram analisadas em um calorímetro diferencial de varredura (DSC) da TA-Instruments – Modelo 2920, com software Thermal Analyst e um sistema de resfriamento dotado de um RCS (Controlled Refrigeration System). Os termogramas foram obtidos empregando-se uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto, varrendo uma faixa de temperatura de 30 a 100°C.

Estudo da gelatinização das suspensões de amido e farinha por Reologia

O processo de gelatinização de suspensões de amido e farinha foi estudado por reologia dinâmica utilizando-se um reômetro rotacional de tensão controlada (CarriMed CSL^2 500, TA Instruments, USA) com geometria de cone e placa de 6 cm. Os testes oscilatórios foram realizados no intervalo de visco-elasticidade linear (0,07 Pa). Os valores de G' e G" foram obtidos durante o aquecimento (40°C a 90°C) e o resfriamento (90 a 40°C). A taxa de aquecimento utilizada foi de 2°C/min e freqüência de 1 Hz.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da composição centesimal da farinha, amido e proteína extraídos do grão de amaranto das espécies *Amaranthus caudatus* e *Amaranthus cruentus* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal dos materiais extraídos.

Material	Umidade (% bs)	Proteína (% bs)	Lipídio (% bs)	Cinzas (% bs)	Amilose (% bs)
FCA	7,97±0,18	14,21±0,77	8,93±0,03	2,14±0,03	7,58±0,40
ACA	8,10±0,18	1,32±0,05	0,19±0,08	0,75±0,17	8,20±0,80
PCA	2,58±0,54	73,83±0,74	-	2,87±0,21	-
FCR	9,05±0,2	14,08±0,3	7,96±0,19	2,10±0,03	11,86±0,2
ACR	10,41±0,14	0,90±0,03	0,29±0,13	1,74±0,06	13,06±0,05
PCR	4,19±0,08	62,95±0,10	-	4,0±0,57	-

FCA, ACA, PCA: farinha, amido e proteína da espécie *A. caudatus* e FCR, ACR, PCR da espécie *A. cruentus*.

Observa-se que a umidade da proteína de amaranto seco por liofilização foi menor do que a farinha e o amido, que foram secos por convecção forçada. Embora se pretendesse separar todo o amido da proteína, observou-se que este material apresentou teor de amido na sua composição, sendo maior na espécie *Amaranthus cruentus*. Independente da espécie de amaranto, a farinha foi composta principalmente de amido (~75%), seguido pela proteína (~14%) e lipídios (~8%). Por outro lado, o amido extraído do grão de amaranto apresentou teores de proteína e lipídios baixos indicando que o método de extração foi eficiente. O teor de lipídios da farinha foi maior

para a espécie *A. caudatus* (8,93%), entretanto o teor de amilose foi menor para esta espécie (7,58%) quando comparado com a espécie *A. cruentus* (11,86%). O teor de amilose do amido de amaranto também foi maior para a espécie *A. cruentus*, diferindo com o relatado por Calzetta (1999) e Pampa (2003), que obtiveram menores teores de amilose, 6,6% e 5,8%, respectivamente; mas foi concordante ao encontrado por Pereira (2004) (13,47%).

O perfil eletroforético (Figura 1) das farinhas e proteínas (espécies *A.cruentus* e *A.caudatus*) mostrou bandas localizadas entre a faixa de 43 a 67 kDa, uma banda de maior concentração e outra de menor concentração entre a faixa de 30 a 43 kDa, e três bandas na faixa de 20,1 a 30 kDa. Essas bandas foram atribuídas às subunidades de globulinas 11 S, globulina P, glutelinas e albuminas. Por outro lado, também foram observados bandas menores de 20 kDa, que são características das albuminas e glutelinas. Observaram-se ainda, agregados insolúveis de alto peso molecular, que não puderam ingressar no gel, os quais são característicos de algumas frações de albuminas. O perfil eletroforético da farinha de *Amaranthus caudatus e Amaranthus cruentus* não mostrou grandes diferenças entre as espécies de amaranto. As farinhas desengorduradas das duas espécies de amaranto também apresentaram perfis eletroféreticos similares.

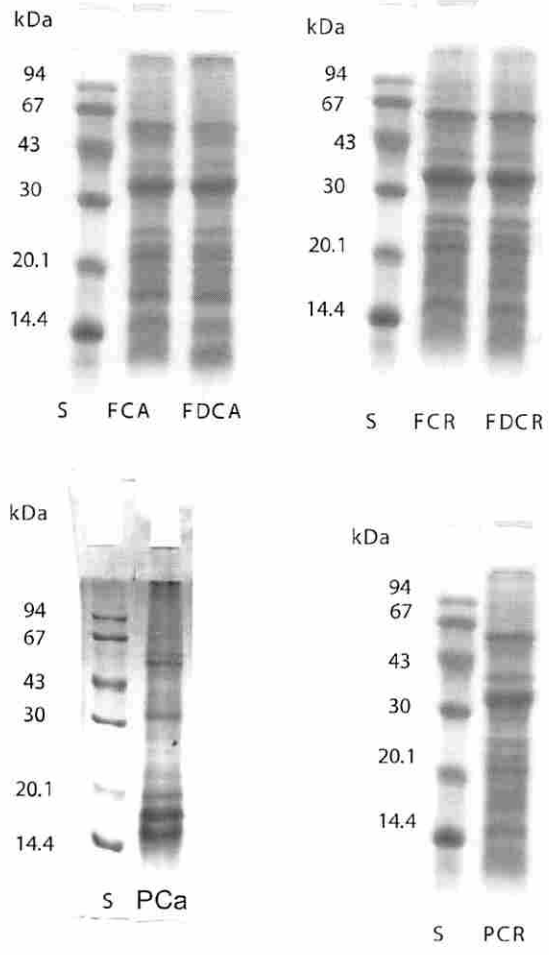


Figura 1. Perfil eletroforético dos materiais extraídos. (S) mistura das frações puras, (FCA, FDCA, PCA) farinha, farinha desengordurada e proteína da espécie *A. caudatus* e (FCR, FDCR, PCR) da espécie *A. cruentus*.

A Tabela 2 apresenta o perfil de ácidos graxos dos lipídios da farinha de amaranto da espécie *Amaranthus cruentus* e da espécie *Amaranthus caudatus*. Os ácidos graxos predominantes nos lipídios da farinha das duas espécies de amaranto, em seqüência decrescente, são: ácido linoléico (C18:2), oléico (C18:1), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). O conteúdo de ácido linoléico e do esteárico (44,48% e 4,10%) foi maior na farinha de amaranto da espécie *A. caudatus* quando comparado com a farinha de *A. cruentus* (39,84% e 3,61%). Entretanto o conteúdo de ácido oléico foi superior na farinha de *A. cruentus* (32,97%).

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (% área) da fração lipídica das farinhas das duas espécies de amaranto.

Ácidos graxos	*A. cruentus*	*A. caudatus*
C14:0	0,20 ± 0,004	0,22 ± 0,004
C16:0	19,96 ± 0,001	19,08 ± 0,01
C16:1	0,15 ± 0,003	-
C17:0	0,62 ± 0,001	0,62 ± 0,007
C18:0	3,61 ± 0,004	4,10 ± 0,01
C18:1	32,97 ±0,002	28,82 ± 0,02
C18:2	39,84 ± 0,01	44,48 ± 0,004
C18:3	0,81 ± 0,002	0,89 ± 0,005
C20:0	0,85 ± 0,002	0,97 ± 0,005
C20:1	0,26 ± 0,002	0,22 ± 0,001
C22:0	0,37 ± 0,002	0,35 ± 0,006
C24:0	0,34 ± 0,001	0,22 ± 0,004

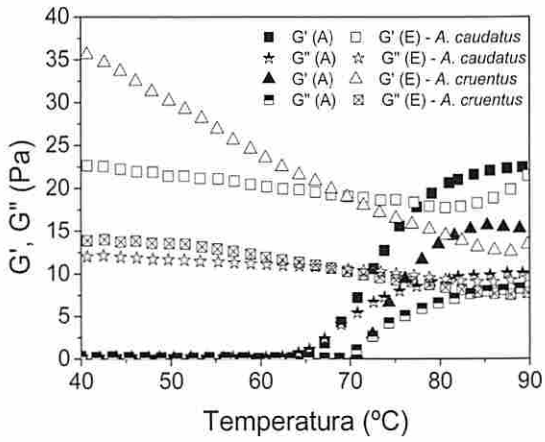
Na Tabela 3 apresentam-se os valores de To (temperatura de inicio de gelatinização), Tm (temperatura de pico) e ΔH (entalpia de gelatinização) das suspensões de amido e farinha das duas espécies de amaranto. Observa-se que os valores To e Tm encontrados para o intervalo de gelatinização do amido e da farinha de amaranto da espécie *Amaranthus cruentus* foram maiores do que a espécie *A. caudatus*. O maior valor de To e Tm no intervalo de gelatinização do amido da espécie *Amaranthus cruentus* sugere que o tamanho dos cristalitos e a associação destes cristalitos dentro do grânulo de amido são de alta ordem de magnitude. Também se observa que a temperatura de início de gelatinização do amido e da farinha de amaranto das duas espécies (*A. caudatus* e *A.cruentus)* diminuiu à medida que aumentou o conteúdo de água no sistema: amido-água. A água atua como plasticizante, diminuindo a temperatura de transição vítrea (Tg) do amido e facilitando com isso, a fusão dos cristais dos grânulos contidos na suspensão (Resio, 1999). Por outro lado, observou-se que as suspensões de farinha da espécie *A. cruentus* apresentaram maiores valores de To e Tm quando comparado com os valores obtidos para as suspensões de amido. Entretanto, as suspensões de farinha da espécie *A. caudatus* apresentaram menores valores de To e Tm do que as suspensões de amido da mesma espécie.

Tabela 3. Valores de To, Tm e ΔH das suspensões de amido e farinha das duas espécies de amaranto.

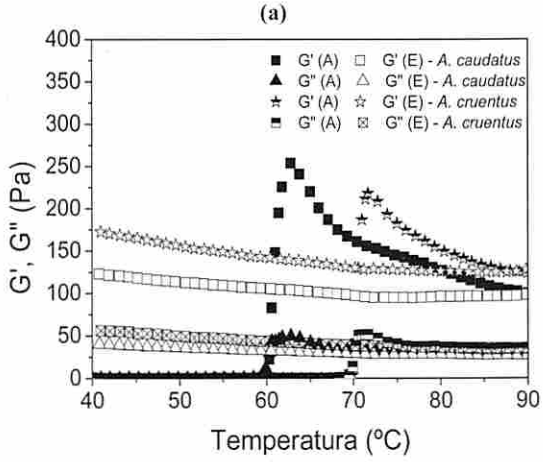
Suspensões		To (°C)	Tm (°C)	ΔH (J/g m.seca)
4 : 96	ACR	68,4±0,33	72,1±0,3	11,90±1,09
	FCR	68,8±0,18	72,6±0,42	9,58±0,35
10 : 90	ACR	68,7±0,20	72,5±0,33	14,53±0,55
	FCR	69,3±0,21	73,2±0,33	10,15±0,14
30 : 70	ACR	69,3±0,09	73,0±0,01	12,19±0,38
	FCR	70,6±0,03	74,7±0,10	9,77±0,02
50 : 50	ACR	69,5±0,14	73,4±0,13	13,51±1,31
	FCR	71,3±0,28	75,8±0,06	9,82±0,27
4 : 96	ACA	60,5±0,11	66,3±0,20	14,30±0,87
	FCA	57,2±0,03	64,7±0,15	9,05±1,01
10 : 90	ACA	61,0±0,17	66,9±0,22	12,25±1,01
	FCA	57,9±0,05	65,5±0,22	9,87±0,87
30 : 70	ACA	61,5±0,12	68,3±0,08	14,20±0,36
	FCA	58,6±0,10	66,7±0,15	9,92±0,65
50 : 50	ACA	61,6±0,17	68,9±0,15	14,45±0,51
	FCA	59,1±0,24	68,8±0,05	10,84±0,26

ACR, FCR, amido e farinha da espécie *A. cruentus* e ACA, FCA, da espécie *A. caudatus*.

As curvas de gelatinização (aquecimento de 40 a 90ºC), e posterior gelificação (resfriamento de 90 a 40ºC) das suspensões de amido e suspensões de farinha estão apresentadas na Figura 2. O comportamento viscoelástico, expresso em termos do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G") foi monitorado durante esse processo. Em todos os casos, os valores de G' foram maiores do que os valores de G". Também foi observado um aumento acentuado dos valores de G' e G" durante o estágio inicial da gelatinização. Esse início da gelatinização implica a difusão da água para dentro dos grânulos de amido, consequentemente se produzindo o inchamento do grânulo de amido, com a subseqüente liberação de moléculas de amilose.



(a)



(b)

Figura 2. Curvas de G' e G"de suspensões de (a) Amido e (b) farinha. (A) aquecimento, (E) resfriamento.

No processo de gelatinização das suspensões de farinha de amaranto foi observado um rápido incremento no valor de G' e G" (Figura 2b). Esses valores aumentaram em forma acelerada até atingir um valor máximo de G' e G". As suspensões de amido de amaranto não mostraram este comportamento (Figura 2a), mas amidos de milho e batata mostraram comportamento semelhante à farinha de amaranto durante o aquecimento (Singh et al., 2002). Esses autores também observaram que, com o aumento da temperatura, o valor de G' diminuiu, indicando que a estrutura do gel era destruída durante o aquecimento prolongado. Essa destruição foi devida à fusão da região cristalina que permanece no grânulo de amido inchado, a qual se deforma e libera as partículas. Os valores de G' e G" foram maiores para a farinha quando comparado com o amido de amaranto. Isto sugere que as proteínas e lipídios presentes na farinha sejam os responsáveis pelo maior valor de G'. Singh et al. (2002) observaram que a adição de ácido esteárico produz um aumento no valor de G' devido à formação de complexos amilose-lipídio durante o aquecimento do amido de batata. No caso da farinha de amaranto, este material apresenta um importante conteúdo de ácido linoleico, oléico, palmítico e esteárico, que facilitaria a formação do complexo amilose-lipídio, originando um aumento no valor de G' quando comparado com o amido de amaranto. Além disso, a presença das proteínas na farinha de amaranto também poderia ter contribuído com o maior valor de G' e G". Em misturas de amido e proteína, foi relatado que o efeito da proteína na estrutura do gel depende do tipo de amido. Alguns autores observaram que a adição de proteína de glúten aumentou o valor de G' do amido de trigo e centeio (Lindahl & Eliasson, 1986). Entretanto, Bejosano & Corke, (1999) observaram que a adição de proteína de amaranto diminuiu a força do gel (<G') do amido de milho. Nos reogramas obtidos neste trabalho também se verificou que a temperatura de início de gelatinização foi maior para a espécie *A. cruentus* e que a farinha da espécie *A. caudatus* apresenta menor temperatura de gelatinização do que o amido dessa mesma espécie, contrário ao observado com a espécie *A. cruentus*.

CONCLUSÃO

O grão de amaranto, por seu alto conteúdo de amido, proteínas e lipídios, representa uma matéria prima para a extração de produtos com diferentes características. As condições de cultivo como clima e solo afetam as propriedades dos produtos extraídos a partir do grão de amaranto. As duas espécies cultivadas em meios diferentes apresentaram diferenças nas propriedades dos produtos extraídos.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento (processo nº 02/13045).

REFERENCIAS

- AOAC. 1997. *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, D.C.
- Bejosano, P.F. and Corke, H. 1999. Effect of Amaranthus and buckwheat proteins on the rheological properties of maize starch. Food Chemistry, 65: 493-501.
- Calzetta, R. A. 1999. "Almidón de amaranto: Obtención y evaluación de sus características fisicoquímicas". Dissertação de Mestrado em Bromatología y Tecnología de Industrialización de alimentos. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 127 p.
- Hartmann, L. and Lago, R. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice, 22: 475-476.
- Juliano, B. O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. Cereal Science Today, 6: 334-340.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Lindahl, L.; Eliasson, A.C. 1986. Viscoelastic properties of starch gels. J. Sci. Food Agric., 37: 1125-1132.
- Pampa, N. 2003. "Estudo do comportamento reológico com cisalhamento estacionário e oscilatório de suspensões de amido de amaranto *(Amaranthus cruentus)*". Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Brasil. 149 p.
- Pereira, L. B. 2004. "Caracterização de suspensões e géis de amido de amaranto: efeito da adição de sacarose e NaCl nas propriedades reológicas e térmicas". Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Brasil. 141p.
- Perez, E.; Bahnassey, Y.A. and Breene, W.M. 1993. A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. Starch/Stärke, 45:211-214.
- Resio, A.C. 1999. "Almidón de amaranto: Obtención y evaluación de sus características fisicoquímicas". Dissertação de Mestrado. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Singh, J.; Singh, N. and Saxena, S.K. 2002. Effect of fatty acids on the rheological properties of corn and potato starch. J. Food Eng., 52:9-16.
- Tapia-Blácido, D. 2003. "Obtenção e caracterização de biofilmes a base de farinha de amaranto (*Amaranthus Caudatus*). Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas. Brasil. 151p.
- Tapia-Blácido, D. 2006. "Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos". Tese de Doutor em

PROPIEDADES DE TEXTURA Y ESTABILIDAD CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN DE GELES DE MEZCLAS DE ALMIDONES DE ORIGEN ANDINO

Vásconez, Miguel[1]; Ruales, Jenny[2]; Álvarez, Yamila[1], Ortega-Ojeda, Fernando[1] y Flores, Nelly[2]
[1]UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO, CASILLA POSTAL 17-12-841, CUMBAYÁ.
Email: miguelv@usfq.edu.ec
[2]ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL, DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, LADRÓN DE GUEVARA. P.O. BOX 1701 2759
QUITO – ECUADOR

Palabras Clave: propiedades físicas, mezclas de almidones, textura, estabilidad congelación.

RESUMEN

Los almidones son uno de los ingredientes más utilizados en la industria alimentaria. Cuando éstos sufren una modificación química, sus propiedades pueden ser incluso mejoradas. El propósito del presente trabajo fue estudiar las propiedades de mezclas de almidones de origen andino que puedan servir para reemplazar el uso de almidones modificados. Para ello se investigó usando dos técnicas, la de estabilidad congelación/descongelación y las propiedades de textura. Los almidones de taso, quinua y achira, cuando son mezclados entre ellos, resultan en valores de sinéresis muy bajos tras repetidos ciclos de congelación/descongelación, una cualidad muy deseable para distintas aplicaciones en la industria

Por otra parte, se observó que los almidones de papa o achira resultan en geles de mayor dureza, y aquellos de zanahoria blanca son extremadamente blandos. Dichas propiedades pueden ser de gran utilidad al momento de escoger un almidón adecuado para una determinada aplicación. Los resultados del presente trabajo pueden ser ampliados en futuras investigaciones para introducir el uso de mezclas de almidones en procesos industriales.

INTRODUCCIÓN

Los almidones son ingredientes de gran uso en la industria alimentaria, debido principalmente a su gran espectro de funcionalidad en los alimentos. Pese a esto, la búsqueda por obtener alguna propiedad específica en almidones nativos puede tener inconvenientes, razón por la cual la industria ha comenzado a utilizar almidones modificados. Estos almidones sufren algún cambio físico o químico que les permite impartir en el producto la propiedad deseada, mas la inclinación del mercado actual por los productos naturales o sin mayor modificación limita un poco el uso de estos como ingredientes. Por esta razón es deseable encontrar almidones que satisfagan las necesidades de la industria sin necesidad de utilizar modificaciones químicas.

La hipótesis del actual trabajo planteó que el uso de mezclas de almidones nativos puede resultar en mejores propiedades funcionales que el uso de los almidones nativos puros. Estudios previos han sugerido que la mezcla de almidones reduce la retrogradación, pues la mezcla de almidones es no aditiva y cada almidón contribuye de acuerdo a sus propiedades individuales (Gunaratne y Corke, 2007; Liu y Lelièvre, 1992; Ortega-Ojeda y Eliasson, 2001; Ortega-Ojeda, 2004). Estudios también han observado que algunas mezclas de almidones nativos se comportan como un almidón modificado químicamente (Obanni y Bemiller, 1997). Con el presente trabajo se pretendió investigar otras propiedades funcionales de las mezclas, utilizando para ello especies nativas, algunas de ellas poco utilizadas como fuente de almidón. Por lo mencionado anteriormente, se escogieron seis plantas nativas andinas (papa, quinua, amaranto, zanahoria blanca, achira y taso) para estudiar las propiedades de los almidones nativos puros de cada una de estas y de mezclas al 50% de todos los almidones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Las fuentes de las que se extrajo el almidón fueron tubérculos, cereales, raíces y rizomas andinos que incluyeron: papa (P), quinua (Q), amaranto (Am), achira (A), zanahoria blanca (Z) y taso (T). Se utilizó el baño de un Rotavapor Büchi Heating Bath B-490 (Büchi Labortechnik AG, Suiza). La centrífuga utilizada fue una Centra GP8 (Thermo Fisher Scientific, USA) con un rotor 218A. Los tubos utilizados para la formación de los geles y la centrifugación fueron tubos de policarbonato con tapa selladora de polipropileno de 16 mL, aptos para temperaturas superiores a los 100°C e inferiores a los -20°C. Los envases para la preparación de los geles de almidón para el análisis de textura fueron envases de vidrio con capacidad para 250 mL con tapa metálica. El equipo utilizado para el análisis de textura fue un TA-XT2i (SMS Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) provisto del software de análisis de datos Textura Expert v. 1.22.

Métodos.

Estabilidad Congelación/Descongelación

Todas las muestras se analizaron por triplicado. Un total de 21 mezclas o almidones puros fueron analizados para medir la sinéresis o separación de agua producto de cinco ciclos repetidos de congelación/descongelación. Una suspensión al 10% de almidón fue preparada añadiendo 1 g de la muestra (+/- 0.001 g) a 9 mL de agua destilada, y homogeneizada utilizando un *vortex*. Las muestras se colocaron en el baño de agua del Rotavapor a 89°C de temperatura y calentadas por un periodo de 40 minutos. Durante el calentamiento, los tubos fueron invertidos 5 veces consecutivas cada minuto para asegurar que el gel se homogenice y no quede agua condensada fuera del mismo. Una vez terminado el calentamiento, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente por un periodo de 25 minutos sin tapa. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron tapados y pesados. Una vez finalizado lo anterior, todos los tubos fueron colocados en un congelador a -18°C por 18 horas.

El dia siguiente, todos los tubos se retiraron del congelador y se descongelaron a temperatura ambiente por 6 horas. Los tubos del ciclo correspondiente a ese día se centrifugaron a 2510 x g por 15 minutos. Inmediatamente acabado esto, los tubos se invirtieron para remover el agua separada de la suspensión de almidón. Los tubos invertidos se dejaron sobre papel toalla por 15 minutos, después de lo cual fueron pesados. Los tubos que correspondían a ciclos subsiguientes fueron devueltos al congelador para su posterior análisis.

Análisis de Textura

Todas las muestras se analizaron por triplicado. La preparación fue hecha en frascos de vidrio de 250 mL, colocando 67 mL de una suspensión de almidón en agua al 10% (en base a almidón). Los pesos añadidos de cada muestra fueron corregidos según la humedad y el contenido de almidón de la muestra. Inmediatamente, los frascos fueron agitados a fin de homogenizar la muestra, colocados en el baño de agua del Rotavapor a 85°C de temperatura y calentados por un periodo de 40 minutos. Durante el calentamiento, la suspensión en los frascos fue agitada constantemente a 200 rpm hasta el momento en que se dio la gelatinización de la muestra. En dicho instante se paró la agitación, a fin de obtener una superficie lisa facilite la medición posterior en el texturómetro.

Una vez terminado el calentamiento, las muestras se dejaron a temperatura ambiente por un período de 18 horas.

Al día siguiente, las muestras fueron analizadas en un Analizador de Textura TA-XT2i utilizando el método de Análisis de Perfil de Textura (TPA). El análisis fue realizado utilizando una sonda metálica cilíndrica de 6 mm de diámetro (P/6), con velocidades de pre y post ensayo, y durante el ensayo de 1 mm/s, para una compresión del 66%. El pico de fuerza fue determinado como dureza (g fuerza), y la primera área negativa del perfil fue denominada adhesividad (g fuerza .s).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estabilidad Congelación/Descongelación.

El modelo estadístico que se utilizó para el análisis de los datos consiste de las dos variables que se estudian, es decir, la muestra y el ciclo de congelación/descongelación, más la variable de la interacción entre ambos, que llamaremos muestra-ciclo (MC). El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías en el que se analiza el efecto de la muestra, el ciclo y la interacción MC.

El análisis indica que los tres componentes del modelo son significativos. Esto significa que existe una diferencia significativa entre las distintas muestras de almidón analizadas y existe también diferencia en la sinéresis de una misma muestra entre distintos ciclos. El hecho de que la interacción MC sea significativa complica el análisis de los datos pues se torna más difícil analizar los efectos individuales por separado. Sin embargo, es posible observar que la contribución de la muestra a la variación total del modelo es considerablemente alta, lo que indicaría que la fuente del almidón tiene una gran importancia en el porcentaje de sinéresis que muestra el gel tras el proceso de congelación/descongelación. A pesar de que el ciclo es una variable que también afecta el resultado, esta no es tan significativa como la muestra. Esto significa que existen algunas muestras para las que los valores de sinéresis varían mucho según el ciclo de congelación/descongelación, pero en la mayoría, el ciclo no tiene tanta importancia como tiene la procedencia del almidón.

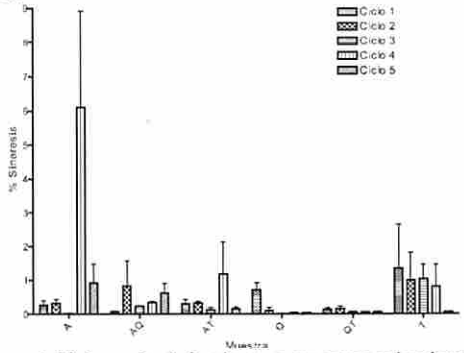


Figura 1. Valores de sinéresis para muestras seleccionadas

Los resultados de la Figura 1 sugieren que las muestras que contienen taso, quinua o achira tienen por lo general valores de sinéresis muy bajos o cero durante todos los ciclos. Considerando los valores de sinéresis para las muestras puras de taso, achira y quinua se puede observar que estas tienen valores de sinéresis bajo, pero significativos. El análisis indica que cuando estas tres fuentes se mezclan entre sí, se obtiene valores menores que cuando se encuentran puras, lo que indica un sinergismo entre los almidones que apoya la hipótesis original de este proyecto: las mezclas de almidones pueden dar características funcionales que superan a las de los almidones puros. Esto también ha sido demostrado con otras fuentes de almidón en trabajos anteriores (Ortega-Ojeda, Larsson y Eliasson, 2004). Estos resultados sugieren que el uso de almidones de taso, quinua o achira puede resultar en un beneficio funcional en el alimento, pues dichos almidones muestran valores muy bajos de sinéresis en procesos de congelación/descongelación. Este hecho es extremadamente deseable en alimentos que se venden congelados y deben ser descongelados, o aquellos que una vez preparados por el usuario son congelados para ser consumidos en el futuro.

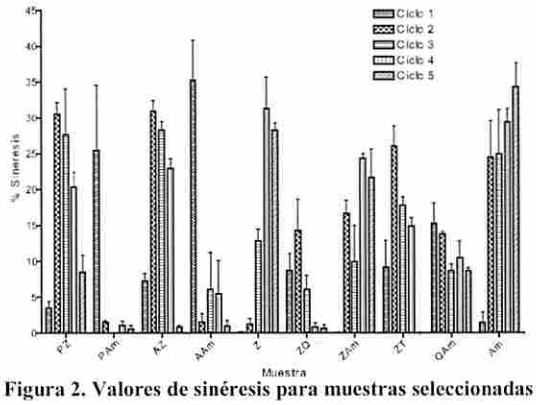


Figura 2. Valores de sinéresis para muestras seleccionadas

La Figura No. 2 muestra los almidones que resultaron en los valores más altos de sinéresis. De la misma se puede observar que todas las mezclas que contienen zanahoria blanca muestran un porcentaje de sinéresis considerable en alguno de los ciclos. Algo similar sucede con las muestras que contienen almidón de amaranto, que también muestran niveles significativos de sinéresis en algunos ciclos. La diferencia más notable entre los almidones de zanahoria blanca y amaranto parece ser que las mezclas que contienen zanahoria blanca muestran un cierto grado de sinéresis en casi todos los ciclos, mientras que aquellas que contienen amaranto dan valores para ciertos ciclos. Tal es el caso de las mezclas de amaranto con achira y amaranto con papa que muestran elevados valores para el primer ciclo, pero valores mucho más bajos para los demás ciclos de congelación/descongelación. Por último, es interesante notar que las mezclas de zanahoria blanca con quinua (ZQ) o de amaranto con taso (AmT), que contienen un almidón que resulta en valores altos de sinéresis y otro que da valores muy bajos, muestran los valores más pequeños de separación de agua en las muestras que contienen zanahoria blanca o amaranto. Como se muestra en la Figura 2, el gel de almidón de zanahoria blanca llegó a mostrar valores de sinéresis cercanos al 30%, y la muestra de quinua resultó en valores muy cercanos al 0%; es entonces interesante notar que la mezcla de ambas obtiene una sinéresis alrededor del 15%. Esta observación puede ser explicada mediante la hipótesis que sugiere que la mezcla de almidones es aditiva, y que cada almidón aporta al total según sus propiedades individuales. En el caso de la mezcla AmT, el amaranto puro resulta en valores sobre el 30%, el taso puro alrededor de un 1%, y la mezcla de ambos obtiene un 6%. Este caso resulta más interesante pues la mezcla, además de no ser aditiva, parece mostrar un sinergismo de las propiedades de cada almidón en la mezcla final.

Análisis de Textura.

El resultado de la prueba de ANOVA para el análisis de dureza de las distintas muestras indica una alta significancia ($p<0.001$) en la diferencia entre las muestras. Esto se puede observar de manera clara en la Figura 3 a continuación.

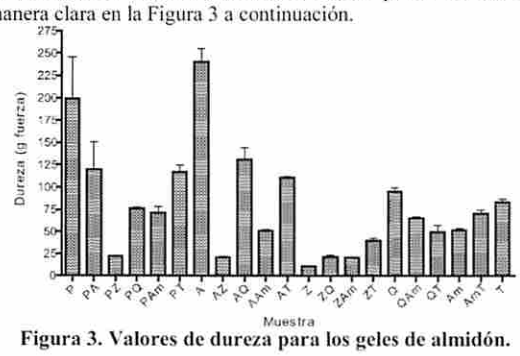


Figura 3. Valores de dureza para los geles de almidón.

De la figura anterior se obtiene que los almidones puros de achira (A) y papa (P) resultan en geles más duros que cualquiera de los otros puros o mezclas de almidones. Les siguen entre los más duros las muestras AQ, PA, PT, AT y Q. Este grupo indica que una mezcla que contenga almidón de achira o papa resulta en un gel de mayor dureza, seguido por aquellos que contienen quinua o taso. Es interesante notar que al mezclar A y P se obtenga un gel de dureza bastante menor que la de los geles de sus componentes puros. Esto indicaría que la mezcla de almidones no es aditiva en cuanto a la dureza del gel. Adicionalmente, el análisis estadístico de separación de medias de Tukey demuestra que el gel de papa puro tiene una dureza significativamente mayor que cualquiera de las mezclas que contienen papa. Algo similar sucede con el almidón de achira y sus mezclas. En contraste, las muestras que dan los menores valores de dureza son aquellas que contienen zanahoria blanca. Esto se debe a que el gel de zanahoria blanca pura es de una consistencia muy suave, y ni siquiera la mezcla de la zanahoria blanca con papa o achira logra formar un gel de dureza media o alta.

Los resultados del análisis de adhesividad de los geles se muestran en la Figura 4 a continuación.

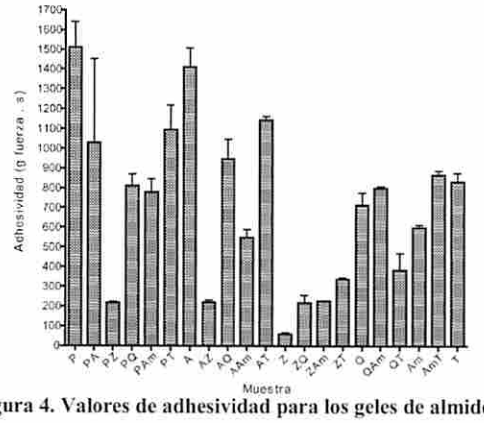


Figura 4. Valores de adhesividad para los geles de almidón.

La figura anterior muestra resultados similares a los que se observan para los valores de dureza. Los almidones puros de papa y achira producen geles con alta adhesividad, al igual que las mezclas de achira y papa con taso y papa y quinua con achira. Por el contrario, y similar a lo sucedido con la dureza, los geles menos adhesivos son aquellos que contienen almidón de zanahoria blanca, con el de zanahoria blanca pura otorgando el menor valor de adhesividad de todos los almidones.

CONCLUSIONES

Mediante este trabajo se logró medir la estabilidad de mezclas de almidón preparadas al 10% simulando lo que sucede en un sistema real que es sometido a repetidos ciclos de congelación/descongelación. Al comparar estadísticamente los valores obtenidos, se puede observar que los almidones de taso, quinua o achira dan resultados de sinéresis muy bajos. Dichos valores son más bajos aún cuando en vez de usar los almidones puros recientemente mencionados, se utilizan mezclas entre ellos. Estos resultados soportan la hipótesis de que las mezclas de almidones son no aditivas. Las mezclas de quinua con achira, achira con taso o taso con quinua, por nombrar algunas, dan resultados de sinéresis extremadamente bajos, lo que sugiere su uso en aplicaciones que se vean sometidas a cambios de congelación/descongelación. Tales usos pueden incluir su adición como ingrediente a sopas instantáneas, salsas, postres helados, entre otros. Por otra parte, se observó que los almidones de papa o achira resultan en geles de mayor dureza, y aquellos de zanahoria blanca son extremadamente blandos. Dichas propiedades pueden ser de gran utilidad al momento de escoger un almidón adecuado para una determinada aplicación.

Los resultados obtenidos demuestran que las mezclas de almidones adquieren propiedades interesantes que, de profundizarse las investigaciones en el tema, pueden resultar en su uso por parte de la industria alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue financiado por SENACYT, Proyecto CEREPS-PIC 065.

REFERENCIAS

- Gunaratne, A. y Corke, H. 2007. Gelatinizing, Pasting, and Gelling Properties of Potato and Amaranth Starch Mixtures. Cereal Chemistry, 84: 22-29
- Liu, H. y Lelièvre, J. 1992. A Differential Scanning Calorimetry Study of Melting Transitions in Aqueous Suspensions Containing Blends of Wheat and Rice Starch. Carbohy. Polym., 17: 145-149
- Obanni, M. y Bemiller, J.N. 1997. Properties of Some Starch Blends. Cereal Chemistry, 74: 431-436
- Ortega-Ojeda, F. E. 2004. Interactions between Amylose, Native Potato, Hydrophobically Modified Potato and High Amylopectin Potato Starches. Food Engineering Doctoral Thesis, Lund University. Lund (Sweden). ISBN: 91-7422-044-6.
- Ortega-Ojeda, F. y Eliasson, A.-C. 2001. Gelatinisation and Retrogradation Behaviour of Some Starch Mixtures. Starch/Stärke, 53: 520-529
- Ortega-Ojeda, F., Larsson, H., Eliasson, A.-C. 2004. On the Dispersion and Small-Amplitude Oscillation Measurements of High Amylopectin Potato Starch. Starch/Stärke, 55: 121-130.

PROPIEDADES REOLÓGICAS Y FISICOQUÍMICAS DE NATILLAS DE LECHE

Elizondo Rosales G.A., Sosa Morales M.E. y Vélez-Ruiz J.F. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas, Puebla, Santa Catarina Mártir, Cholula, 72820- Puebla, México.
e-mail: jorgef.velez@udlap.mx

Palabras clave: propiedades físicas, natilla, reología, textura

RESUMEN

Las natillas son consumidas en México como postre y su demanda ha aumentado recientemente, cada marca comercial incluye diferencias en composición, así como en propiedades físicas y sensoriales. Existen pocos estudios relacionados con su formulación, sus propiedades reológicas y fisicoquímicas, por lo que es importante realizar trabajos de investigación en natillas. Los objetivos de este trabajo fueron: medir las propiedades fisicoquímicas y reológicas de una natilla elaborada a base de leche y efectuar pruebas sensoriales, para medir el grado de aceptación. Se caracterizaron 4 natillas comerciales las cuales fueron utilizadas como referencia. Los sistemas o natillas analizados fueron preparados con diferentes niveles de concentración de almidón y de goma, tipo de azúcar y sabor. Al evaluar las propiedades de flujo, se observó que todas las natillas presentaron comportamiento no Newtoniano de tipo tixotrópico, se observó que dos parámetros reológicos (τ_0 y K) disminuyeron con el tiempo de almacenamiento, mientras que el índice de flujo (n) aumentó. El esfuerzo de cedencia fue afectado por la concentración de almidón ($p< 0.05$), y el coeficiente de consistencia fue afectado por la cantidad de fructosa. Las propiedades fisicoquímicas no fueron afectadas significativamente por el almacenamiento. Por otro lado, la fuerza de compresión, la adhesividad y el porcentaje de sinéresis fueron afectados significativamente por el tiempo de almacenamiento, siendo el porcentaje de sinéresis mayor, mientras más tiempo es almacenado el producto. La sustitución de sacarosa por fructosa en los sistemas, resultó en una disminución de τ_0 y K, y un aumento de n, haciendo más inestables los sistemas, al presentar mayor grado de sinéresis. Al realizar las pruebas sensoriales correspondientes, los jueces no detectaron diferencia significativa entre una natilla con sacarosa respecto a la endulzada con fructosa. Las propiedades viscoelásticas mostraron que G'>G'', típico de geles débiles, se encontraron diferencias significativas en la viscoelasticidad de los sistemas analizados.

INTRODUCCIÓN

En México y en todo el mundo, se ha observado un gran incremento en la producción de natillas; estos postres de leche presentan una mayor vida de anaquel que la leche o el queso fresco (Pomareda, 1999). En 1998, 1.15% de la leche fue destinado para cajetas y otros productos lácteos (natillas y pudín entre ellos), mientras que en el 2005 aumentó a 3.0% (SAGARPA, 1990).

Las natillas son postres lácteos semisólidos; existen marcas comerciales las cuales son diferentes en su composición así como en sus propiedades físicas y sensoriales. Este postre semisólido es resultado de una mezcla de leche, agua, almidón y azúcar; aunque suele adicionar algún tipo de hidrocoloide (González y Costell, 2006).

La calidad de las natillas se ve afectada dependiendo de la forma que este alimento sea elaborado. La agitación de las natillas debe ser empleada sólo cuando se quieran cambios deseables, ya que las propiedades de flujo de estos productos se ven afectadas por los ingredientes, la agitación, así como por el calentamiento. Para una natilla formulada con los ingredientes típicos, como leche, huevo, almidón y azúcar, la temperatura de calentamiento de 85°C no debe ser excedida durante su elaboración, ya que si sobrepasa dicha temperatura, se afecta la consistencia de las natillas. Las propiedades reológicas y sensoriales de este producto están influenciadas, particularmente, por las presencia de algunos ingredientes como grasa, almidón o hidrocoloides, así como sus interacciones, el tipo de almidón (Abu Jdayil et al., 2004; Tarrega et al., 2005; Vélez et al., 2006) y las características del procesamiento de elaboración (Vélez et al., 2005), entre otras variables. Por lo que el objetivo de este estudio consistió en analizar el efecto de algunos ingredientes en las propiedades físicas de natillas a base de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las materias primas fueron adquiridas en supermercados o laboratorios de la localidad.

Preparación de Natillas

Se prepararon 2 grupos de natillas o sistemas. En el primer lote se elaboraron 9 sistemas, 8 con el siguiente diseño experimental: 2 niveles de almidón: 5 y 6% p/v, 2 tipos de azúcar: fructosa y sacarosa y 2 niveles de goma: 0.02 y 0.04%p/v), y un testigo, tomando la formulacion de natilla propuesta por la organización COST (COST, 2003), y fueron identificados del 1 al 9. Para el segundo grupo, los sistemas formulados tomaron en consideración los resultados del primer lote y también se elaboraron 9 sistemas (2 niveles de almidón: 5 y 6% p/v, 2 niveles de fructosa: 5 y 8% y 2 tipos de saborizante: coco y vainilla) que generarron 8 sistemas, y como control la natilla COST, en este caso la identificación fue literal, A a K para los sistemas e I para el control.

Los sistemas se prepararon haciendo modificaciones a la metodología de Rivas (2005). A continuación se presenta el método de elaboración de las natillas:

1) Mezclar el azúcar con el almidón y la goma (xantana o carragenina) con 200 mL de leche entera.
2) Calentar 800 mL de leche a 50°C y agregar la mezcla preparada en (1).
3) Agitar con una batidora a la velocidad mínima (45 rpm) por 10 min, a la temperatura mencionada.
4) Elevar la temperatura de la mezcla, a 82°C-84°C durante 10 min con agitación de 150 rpm.
5) Agregar el saborizante si la formulación lo incluye, y enfriar a temperatura ambiente,
6) Colocar las muestras en recipientes, refrigerar a 4°C, y almacenar durante 4 semanas.

Propiedades Reológicas:

Para la determinación de las propiedades reológicas, se utilizó un viscosímetro Brookfield DV-I. Se ajusto a 0 y se seleccionó la aguja adecuada (2LV). Se coloco la aguja, y se realizaron las lecturas del porcentaje del torque (%τ) a diferentes velocidades rotacionales (rpm). Antes de cada lectura se midió la temperatura. La velocidad de deformación y el esfuerzo cortante se calcularon con las siguientes ecuaciones, tomando en cuenta que la constante del viscosímetro es de 14374 dinas cm.

$$\gamma = \frac{2\omega R_c^2}{(R_c^2 - R_b^2)} \qquad (1)$$

Donde:

γ es la velocidad de corte (s^{-1})
R_c es el radio del contenedor
R_b es el radio de la aguja
ω es la velocidad angular, la cual se calcula:

$$\omega = \frac{2\pi N}{60} \qquad (2)$$

N son las revoluciones por minuto del viscosímetro.

$$\tau = \frac{M(T_{max})}{2\pi R_b^2 L} \quad (3)$$

τ es el esfuerzo cortante
M es la lectura del viscosímetro/ 100
T_{max} es el torque máximo (14374 dinas-cm)
L es la longitud efectiva de la aguja.

El esfuerzo de cedencia (τ_0) se calculó por medio del modelo de Casson,

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + K_c\sqrt{\gamma} \quad (4)$$

Al obtener τ_0 se ajustó a la ecuación o modelo de Herschel-Bulkley (HB) el índice de flujo (n) y el coeficiente de consistencia (K)

$$\tau = \tau_0 + K\gamma^n \quad (5)$$

Asimismo, al no considerar el esfuerzo de cadencia, se realizó el ajuste con la ecuación de Ostwald-deWaele (OD, o Ley de Potencia), y se calculó n y K.

$$\tau = +K\gamma^n \quad (6)$$

Para seleccionar el mejor modelo, se calculó el PEM (porcentaje de error medio) y el RMSE (raiz media del error) en que se obtienen las diferencia entre el valor experimental y el valor predicho o calculado.

$$\frac{100}{n}\left[\sum_{i=1}^{n}(\tau\,\exp - \tau pred)\right] \quad (7)$$

$$\frac{1}{n}\left[\sum_{i=1}^{n}(\tau\,\exp - \tau pred)^2\right]^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

Propiedades Viscoelásticas
Para la determinación de las propiedades viscoelásticas, se utilizaron platos paralelos con superficie rugosa, con diámetro de 60 mm, a una distancia de 1 mm de la muestra en un reómetro de esfuerzos controlados (Advanced Rheometer), Modelo AR 2000, TA Instruments. Se efectuó un barrido de esfuerzo, para conocer el límite de la zona lineal. El barrido de frecuencia utilizado se encontró en el intervalo de frecuencia de 0.01-10 Hz. Se registraron los valores del módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G''), el ángulo tangente (tan δ) y la viscosidad compleja (η), mismos que fueron calculados usando el software integrado, TA Data Análisis.

Propiedades Fisicoquímicas.
La determinación de las características fisicoquímicas se realizó con base en métodos oficiales o reportados.

Humedad/Sólidos Totales
Para la determinación de humedad, se utilizó el método de AOAC 16.032 (1984) el cual consiste evaporar la mayor cantidad de agua posible, para posteriormente colocar en una estufa de vacío Cole Palmer (modelo 05053-10) durante 2 horas a 75°C y a una presión de vacío de 15 a 20 mmHg.

Determinación del pH
Se utilizó el potenciómetro digital Orión 420A (Lab Extreme, Inc., MI.), calibrado con pH 4 y pH 7.

Evaluación del Color
Se determinó instrumentalmente por medio del Colorímetro Gardner, Colorgard System/05 (Hunter Lab., Reston, VA), en modo de reflectancia, usando los parámetros *L* (luminosidad), *a* (verde a rojo) y *b* (azul a amarillo) de la escala de Hunter, habiéndose calibrado previamente con los mosaicos blanco y negro.
Se determinó el cambio neto de color de la siguiente forma:

$$\Delta EMC = \sqrt{(L_i - L_0)^2 + (a_i - a_0)^2 + (b_i - b_0)^2} \quad (9)$$

Donde: L_i es la luminosidad en la i-ésima semana, L_0 es la luminosidad en la semana inicial (semana 0), y de manera correspondiente a y b.

Determinación de la Densidad
La densidad se determinó con picnómetros de Grease de acero inoxidable.

Evaluación de la Textura
Se utilizó el texturómetro modelo TA-TAXT2 (Texture Technologies Corp., Scardale, NY), para medir la fuerza de adhesión de la natilla, así como la fuerza de compresión necesaria para desplazar 1 cm la natilla.
El método consiste en colocar un émbolo de acero inoxidable de 4 cm de diámetro en el brazo del texturómetro y comprimir la natilla con una velocidad de 1.0 mm/s; se mantiene esa fuerza en la base del contenedor de la natilla durante 10 s y se calcula la fuerza máxima de compresión, así como la adhesividad (fuerza necesaria para despegar el émbolo de la muestra) (Rivas, 2005)

Porcentaje de sinéresis

Se utilizó la centrifuga Adams Analytical modelo 01131 (Clay Adams.,de Becton Dickinson) centrifugando 10 g de cada natilla por 20 min a 450 0rpm, y relacionando el peso de sobrenadante con el peso de muestra utilizado (Keogh y O´Knnedy, 1998).

Análisis sensorial.
Para determinar la aceptación general del producto, se efectuaron pruebas sensoriales afectivas. La prueba fue realizada con ayuda de (20-25) jueces no entrenados para seleccionar el producto preferido. Se realizaron 3 pruebas con escala hedónica, la primera con natillas del primer grupo (1-9), la segunda con natillas del segundo grupo (A-H) y la última con natillas seleccionadas del segundo grupo.

Análisis Estadístico
Se realizó un análisis factorial 2^k (siendo k el número de factores), en este caso fueron 4 factores (goma, almidón y azúcar, tiempo de almacenamiento). Se realizó un análisis de varianza ($\alpha = 0.05$), y se observaron los efectos principales y las principales interacciones, con el Software Minitab 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los reogramas ascendente y descendente, se obtuvieron las propiedades reológicas de las natillas aplicando los modelos de OD y HB. Ambos modelos mostraron buenos ajustes y con errores semejantes, por incluir el esfuerzo de cadencia y menor error se comentan las propiedades reológicas del modelo HB. Para el primer grupo y solo el reograma ascendente, τ_0 varió de 0.28 a 7.7 Pa, K de 5.7 a 177 Pa-s^n, y n de 0.20 a o.41, la Figura 1 muestra la evolución del coeficiente de consistencia durante el almacenamiento.

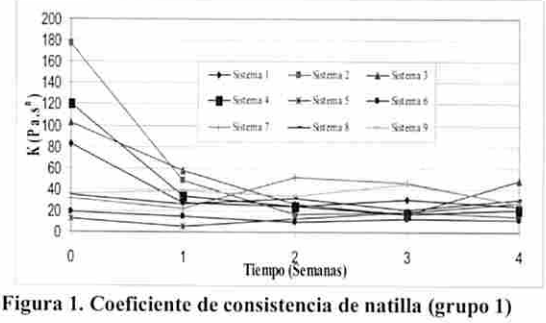


Figura 1. Coeficiente de consistencia de natilla (grupo 1)

Con respecto a τ_0 las variables que son significativas ($\alpha = 0.05$) y afectan negativamente son: edulcorante, tiempo y las interacciones entre almidón/tiempo y goma/tiempo, mientras que las que son significativas y afectan positivamente son: goma, edulcorante/tiempo y almidón. Entre las variables que causan un efecto positivo en K, la variable que es más significativa es el almidón, lo cual ha sido reportado en otros trabajos (Abu-Jdayil et al., 2004; Rivas, 2005); además, los sistemas con fructosa tuvieron una mayor consistencia que los preparados con sacarosa. En todos los sistemas el comportamiento fue pseudoplástico y disminuyó con respecto al tiempo de almacenamiento.
Para el segundo grupo de natillas que solo se almacenó por tres semanas, el comportamiento fue similar, los sistemas A, B y E, F presentaron los menores esfuerzos de cedencia con respecto a los sistemas C, D y G, H los cuales contenian 6% de almidón en su formulación. La cantidad de fructosa influyo en τ_0, los sistemas

D y H que contienen 8% presentan un mayor valor que los sistemas C y G los cuales contienen solo 5%, los cuatro sistemas contienen 6% de almidón. La Figura 2 muestra la evolución de τ_0 con el almacenamiento.

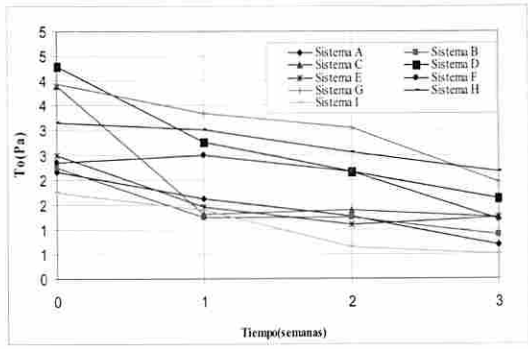


Figura 2. Esfuerzo de cedencia de las natillas (grupo 2)

Los sistemas A-I tienen coeficientes de consistencia (K) entre 24.34 y 65.88 Pa-s^n, siendo el menor el sistema que en su formulación contiene 5% almidón, sabor coco y 8% fructosa y el mayor el que contiene 6% almidón, sabor vainilla y 8% sacarosa. Estos valores de K fueron muy parecidos a los de natillas comerciales (25.76 y 51.71 Pa.s^n), la mas alta correspondió a la marca Dannette y la mas baja a la Nestlé. En la semana 0 tos los sistemas A-I se asemejan mas a los comerciales, pero al aumentar el tiempo de almacenamiento la consistencia de los sistemas A y G decrece hasta 7.52 - 15.17 Pa-s^n. Al efectuar el análisis de varianza, se determinó que las variables que afectan positivamente, son el almidón y la interacción fructosa/almidón. Las variables que afectan negativamente son: tiempo y almidón/ tiempo.

En las pruebas dinámicas, se notó que para los 6 sistemas analizados la zona de viscoelasticidad lineal fue muy estrecha, ya que se observó que los geles colapsaron cuando las deformaciones son muy altas y el esfuerzo oscilatorio es mayor de 10 Pa. Los sistemas C y D con vainilla, mostraron más elasticidad que los sistemas G y H con sabor a coco En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, la humedad varió entre 79.8 y 83.5 %, como se esperaba se mantuvo estable y los valores son comparables con el trabajo de Rivas (2005). La sinéresis fue nula al principio, en los sistemas 1-4, 6-8, A-H, y aumentó rápidamente con el tiempo de almacenamiento, a un promedio de 10, 25 y 42% respectivamente para las primeras tres semanas. Los cambios netos de color fueron bajos durante el almacenamiento, menores a 3.6% para ambos grupos. Como se esperaba, la densidad no cambió significativamente y osciló entre 1040 y 1090 kg/m^3. El pH de alrededor de 6.5 disminuyó poco durante el almacenamiento

Las fuerzas de compresión (1.2-9.9 N) y adhesividad (0.6-10.5 N-s) específicas para cada natilla, disminuyeron como consecuencia de la pérdida de estructura.

Finalmente las pruebas sensoriales mostraron el buen grado de aceptabilidad (5.7-7.2) de las natillas sin sabor y con fructuosa, y las que incluyeron sabor fueron mejor evaluadas.

CONCLUSIONES

La caracterización tanto de natillas comerciales como de los sistemas preparados fue útil, ya que con el conocimiento de las propiedades reológicas, así como de las propiedades fisicoquímicas, se puede y podrá tener un mejor control en la calidad de éste producto; también ayudará a tener un mejor diseño de equipos y procesos industriales.

Al evaluar los parámetros reológicos y determinar el porcentaje de error de los dos modelos utilizados, Herschel-Bulkley y Ostwald-deWaele, se observó un mejor ajuste del que considera el esfuerzo de cedencia. Se observó que el tiempo de almacenamiento es una variable que influye significativamente en las propiedades reológicas, lo cual es de esperarse por la pérdida paulatina de estructura o estabilidad física. τ_0 y K disminuyeron al incrementarse el tiempo de almacenamiento, mientras que n aumentó.

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas; humedad, densidad, pH y color, fueron propiedades no afectadas significativamente por el almacenamiento. En cambio, la fuerza de compresión, la adhesividad y el porcentaje de sinéresis fueron afectadas significativamente por el tiempo de almacenamiento, siendo el porcentaje de sinéresis mayor, mientras mas tiempo es almacenado el producto.

Es importante mencionar que la concentración de almidón en las natillas, afecta significativamente las propiedades reológicas, así como fisicoquímicas, debido a que a mayor cantidad se genera una mayor estabilidad en el gel formado y por lo tanto el esfuerzo de cedencia (τ_0), el coeficiente de consistencia (K), la fuerza de compresión y la adhesividad aumentan.

Se determinó que la concentración del edulcorante utilizado, afecta significativamente las propiedades evaluadas, ya que al aumentar la concentración de sacarosa o fructosa, aumentan τ_0, K, fuerza de compresión, adhesividad y disminuye n. Se observó que la sustitución de sacarosa por fructosa en las natillas, disminuyó significativamente el esfuerzo de cedencia (τ_0), el coeficiente de consistencia (K), la fuerza de compresión, la adhesividad, y en contraparte, generó incremento significativo del índice de flujo (n). También cabe destacar que la sustitución de sacarosa, por fructosa en la formulación de las natillas, disminuye la estabilidad de las mismas, aumentando el porcentaje de sinéresis, el cual es un defecto de calidad.

La goma es una variable la cual afecta significativamente en el color, siendo la luminosidad la mas afectada.

Las natillas preparadas que mas se asemejan las natillas comerciales, son los sistemas 5-8 y B-F, todos formulados con fructosa.

En las evaluaciones sensoriales, se determinó que la sustitución de sacarosa por fructosa, no es significativa (los jueces no percibieron la diferencia de edulcorantes en el producto). Se observó que las natillas mejor aceptadas son las que contienen mayor concentración de edulcorante y sabor a coco. Finalmente, el sistema mejor aceptado fue el H, con concentraciones de 8% de fructosa, 6% de almidón, .04% de goma y sabor a coco.

REFERENCIAS

Abu-Jdayil, B., Mohameed, H. y Eassa, A. 2004. Rheology of Wheat Starch-Milk-Sugar Systems: Effect of Starch Concentration, Sugar Type and Concentration and Milk Fat Content. J. Food Eng. Vol. 64: 207-212.

A.O.A.C. 1984. "Official Methods of Analysis of A.O.A.C International". Maryland, E.U.

Pomareda, B.C. 1999. Globalización y el mercado internacional de lácteos. En taller, La normativa ambiental, exigencias y oportunidades, San José, Costa Rica, Octubre.

Rivas, J. A., 2005. Caracterización reológica y fisicoquímica de postres de leche, tipo natilla. Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas, Puebla, México.

Tárrega, A., Vélez, J. F. y Costell, E. 2005. Influence of milk on the rheological behaviour of cross-linked waxy maize and tapioca starch dispersions. Food Research International, 38:759-768

Vélez, J. F., González, T. L. y Costell, E. 2005. Rheology of custard model systems: Influence of milk fat and hydrocolloid type. European Food Research and Technology. 221:342-347.

Vélez-Ruiz J.F., Hernando I., González–Tomás L., Pérez-Munuera I., Quiles A., Tárrega A., Lluch M.A. y Costell E. 2006. Rheology and microstructure of custard model systems with cross-linked waxy maize starch. Flavour and Fragance Journal. 21: 30-36.

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO OSMÓTICO NO EQUILÍBRIO HIGROSCÓPICO DA ACEROLA (*Malpighia emarginata* DC)

Silva, V.A.[1], Alsina, O.L.S[2] & Araújo, S.W.C.[3]
[1,2,3] UFCG, Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Engenharia Química.
Avenida Aprígio Veloso, 882, Bodocongó. CEP: 58109-970 - Campina Grande, PB – Brasil.
Telefone: (83) 3310-1115 - Fax (83) 3310-1114
e-mail: odelsia@deq.ufcg.edu.br
Palavras-chave: Acerola, Isotermas de sorção, Atividade de água, Desidratação osmótico.

RESUMO

A acerola (*Malpighia emarginata* DC) é cultivada nas regiões do nordeste e do sudeste do Brasil. O alto teor de umidade da fruta provê um substrato ideal para a proliferação dos microorganismos. Porém, processos como secagem tornam possível a conservação por um período de tempo mais longo mediante a diminuição da atividade de água. A atividade de água é um dos parâmetros mais importantes para a indústria de alimentos e diminuindo a níveis adequados, inibe a reprodução destes microorganismos. No presente trabalho foi estudado as curvas isotérmicas de sorção da acerola *in natura* e osmoticamente desidratada em soluções de sacarose, 40° e 70°Brix durante 24 horas, nas temperaturas de 30, 40 e 50°C. A atividade de água (a_w) das amostras era determinada através de medida direta no Thermoconstanter Novasina® (TH-200). Foi observado que a acerola após o pré-tratamento osmótico mostrou o mesmo comportamento de equilíbrio que as amostras *in natura*. O modelo de GAB ajustou as curvas isotérmicas experimentais que apresentam um ajuste com desvio entre ± (0,01-0,08) para a umidade de monocamada e coeficiente de correlação de 0,9978.

INTRODUÇÃO

O Brasil é uma terra privilegiada no que diz respeito à produção de frutas. É o terceiro produtor mundial, sendo que suas exportações apresentaram um crescimento de 30%. As frutas nacionais são saborosas, saudáveis e nutritivas, no entanto, grande parte da colheita é desperdiçada com estimativas que apontam para 40% de perdas (Silva, 2004).

A acerola conhecida como cereja das Antilhas, cujo nome científico é *Malpighia emarginata* DC, têm sido uma fruta largamente cultivada nos últimos anos na região nordestina do Brasil. Tem assumido grande importância pelo seu valor nutricional, pois é uma fonte natural de vitamina C ou ácido ascórbico (Netto, 1986).

A preservação dos alimentos pela remoção de água permite a redução do crescimento microbiano e reduz o desenvolvimento da maioria das reações bioquímicas que ocorrem na presença de umidade, sendo de grande interesse para a indústria de alimentos (Silveira & Alves, 2002). Assim, é necessário o conhecimento das relações existentes entre o produto, a temperatura e a umidade relativa do ar ambiente objetivando iniciativas e estudos com a finalidade de amenizar estas possíveis alterações (Corrêa et al., 2005).

O processo de osmose consiste basicamente na remoção da água de uma solução menos concentrada, contida dentro de uma membrana semipermeável, envolvendo essa membrana com uma solução mais concentrada (Travaglini et al., 1997).

Este processo consiste em mergulhar frutas e vegetais em soluções hipertônicas (açúcares, cloreto de sódio, glicerol, entre outras), permitindo que ocorra uma troca de massa em dois sentidos. Dois fluxos de massa principais existem: o fluxo de água que difunde do interior da amostra para a solução circunvizinha, e no sentido oposto, um fluxo concomitante da substância osmótica que difunde da solução no tecido desidratado. O terceiro fluxo consiste na perda de alguns sólidos naturais da substância desidratada. Este fluxo não apresenta nenhum significado na troca de massa, mas tem uma influência nos valores nutritivos finais e propriedades organolépticas do alimento. O resultado da troca de massa é uma diminuição da água com um aumento simultâneo do ganho dos sólidos assim como uma mudança da constituição química do alimento desidratado. (Lenart, 1996).

Durante desidratação de frutas inteiras, no caso de uvas, ameixas secas, cerejas, etc., a pele age como uma membrana semipermeável que controla a taxa de transferência de água da fruta para meio externo (Telis et al., 2000). Neste sentido, Silva (1998) estudou o efeito de diversos pré-tratamentos com a finalidade de diminuir a resistência da película da acerola e reduzir o tempo da secagem e posteriormente (Silva, 2004) estudou a cinética da desidratação osmótica da através da película da acerola.

Segundo Welti Ch. & Vergara (1997), a atividade de água é muito adequada para indicar a estabilidade de um produto, toma em conta a interação da água com outros constituintes dos alimentos em condições de equilíbrio termodinâmico e pode ser considerada uma medida indireta da água que está disponível nesse produto.

Atividade de água (a_w) é uma propriedade físico-química definida como a relação entre a pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor da água pura, medidas à mesma temperatura. (Gouveia, 1999). O teor de água de equilíbrio é alcançado, quando a pressão parcial de vapor de água no produto iguala-se à do ar que o envolve. (Corrêa et al., 2005).

A maioria das reações químicas e o crescimento microbiano vêm reduzindo consideravelmente quando diminui a atividade de água (Welti Ch. & Vergara, 1997).

O crescimento dos microrganismos depende da a_w em razão da influência da pressão osmótica sobre as trocas através das membranas. O intervalo da a_w no qual são observados os desenvolvimentos microbianos varia de 0,6 a 0,99. Em geral, o valor ótimo da a_w para o crescimento se situa entre 0,9 e 0,99. Abaixo deste valor o crescimento é moderado, retardado ou inibido. Assim, todo microrganismo é caracterizado por um valor de a_w mínimo, abaixo do qual não pode mais se desenvolver (Santin, 1996). De um modo geral, pode-se dizer que o ponto de conservação ótimo dos produtos biológicos, sem aditivos nem refrigeração, se situa geralmente entre 0,25 e 0,35 (Welti Ch. & Vergara, 1997).

A relação entre o teor de água de um determinado produto e a umidade relativa de equilíbrio, ou atividade de água, para uma temperatura específica, pode ser expressa por equações matemáticas, que são denominadas isotermas ou curvas de equilíbrio higroscópico.

Segundo Park et al. (2000) com o intuito de prever o comportamento das isotermas, diversos autores propuseram modelos de ajuste de isotermas de sorção, que totalizam cerca de 77 diferentes equações. Estes modelos são úteis no conhecimento das características dos produtos.

Através da construção de isotermas, podem-se resolver numerosos problemas de processamento e estocagem de produtos alimentícios (Pena et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho é estudar as curvas isotérmicas de sorção da acerola *in natura* e após desidratação osmótica em soluções de sacarose, 40° e 70° Brix durante 24 horas, nas temperaturas de 30°, 40° e 50°C.

Modelo de GAB

Modelos matemáticos que descrevem isotermas de sorção são de fundamental importância, pois com certo número de pontos experimentais é possível ajustar uma isoterma teórica e desta forma fazer a correspondência entre conteúdo de umidade do alimento (X) e atividade de água (a_w) podendo-se extrapolar valores de difícil determinação experimental (Santin, 1996).
O modelo de Guggenheim-Anderson-De Bôer (GAB), equação (1), é um modelo semiteórico de sorção em multicamada que permite um bom ajuste para a maioria dos alimentos, em cima de uma maior variação de temperatura e atividade de água (Okos et al.; Rahman) citados em Rahman et al. (1997).

$$X_{eq} = \frac{Xm.C.K.a_w}{(1-K.a_w).(1-K.a_w+C.K.a_w)} \qquad (1)$$

Onde: X_{eq} é umidade de equilíbrio em base seca (g água/g sólidos secos), a_w a atividade de água, Xm a umidade da monocamada (base seca), C a constante relacionada com o calor de sorção da monocamada e K a constante relacionada com o calor total de sorção.
A equação da isoterma de GAB é uma extensão do modelo de BET tomando em conta as propriedades modificadas na região de multicamada e as propriedades líquidas pela introdução de um terceiro parâmetro, a constante K (Rahman et al., 1997).

MATERIAL E MÉTODOS

As frutas utilizadas in natura, adquiridas no comércio de Campina Grande-PB, foram escolhidas de modo a apresentar grau de maturidade semelhante, consistência mais firme, tamanho e cor semelhante, cascas sem fissuras ou manchas. A atividade de água foi determinada nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, nas amostras in natura e tratadas osmoticamente em concentrações de 40 e 70 °Brix durante 24 h. As amostras in natura e tratadas foram colocadas em fatias nos porta-amostra de plástico, previamente pesadas e submetidas à secagem em estufa de circulação de ar a 70 °C. Este procedimento era realizado em triplicata para cada amostra. Em determinados intervalos de tempo, retirava-se uma amostra da estufa para posterior determinação da atividade de água (aw), por medida direta utilizando um aparelho analisador de atividade de água Thermoconstanter Novasina® (TH-200).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras de 1 a 4 são apresentados os resultados obtidos para as isotermas de equilíbrio da acerola *in natura* e após desidratação osmótica. O efeito da temperatura sobre as isotermas é ilustrado nas Figuras 1, 3 e 4. Diversos autores mostraram que o aumento da temperatura produz uma diminuição do conteúdo de umidade de equilíbrio. Por exemplo, Vazquez et al.. (1999) observaram que para uma determinada atividade de água, o conteúdo de umidade de equilíbrio de uvas diminuiu com aumento da temperatura. Neste trabalho o efeito do aumento da temperatura sobre as isotermas de sorção das acerolas *in natura* foi observado para altas atividades de água entre 0,6 e 0,85, região onde há uma pequena redução do conteúdo de umidade de equilíbrio com o aumento da temperatura. No entanto, observa-se que, para atividade de água abaixo de 0,5 e acima de 0,85, as curvas são praticamente coincidentes e sobrepostas em todas as temperaturas.
O aumento da concentração na desidratação osmótica aumenta o ganho de açúcar durante o processo. Este acréscimo de sólidos solúveis na fruta corresponde a um maior conteúdo de umidade de equilíbrio, para uma mesma atividade de água como mostra a Figura 2, sendo mais notória entre as atividades de água de 0,65 e 0,9. O aumento acentuado do conteúdo de umidade em altas atividades de água devido ao açúcar, foi também relatado por Saravacos et al. (1986). No entanto, observa-se também através da Figura 2 que as curvas são praticamente coincidentes e sobrepostas nas amostras que envolvem *in natura* e tratamento osmótico para uma mesma temperatura de 30 °C em atividade de água abaixo de 0,5 e acima de 0,9.
Observa-se nas Figuras de 1 a 4 que o modelo de GAB Equação 1, pode ser usado adequadamente para representação das isotermas de sorção de acerola, ajustando-se muito bem aos dados experimentais, com coeficiente de correlação alto e cujos parâmetros do modelo estão apresentados na Tabela 1. A Tabela mostra os resultados diretos da regressão não–linear do modelo de GAB obtidos através do software Microcal Origin®. para a acerola *in natura* e submetida ao tratamento osmótico.

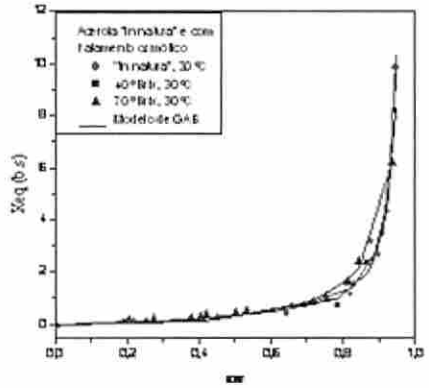


Figura 1-Isotermas de sorção da acerola *in natura* nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C

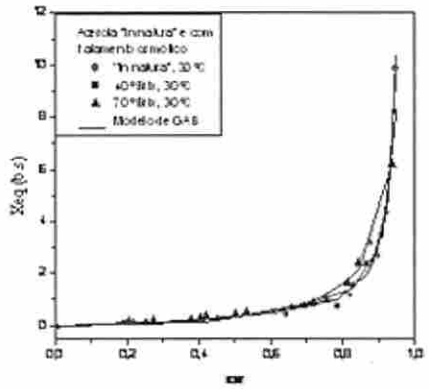


Figura 2-Isotermas de sorção da acerola *in natura* e desidratada osmoticamente (40 e 70 °Brix) na temperatura de 30 °C

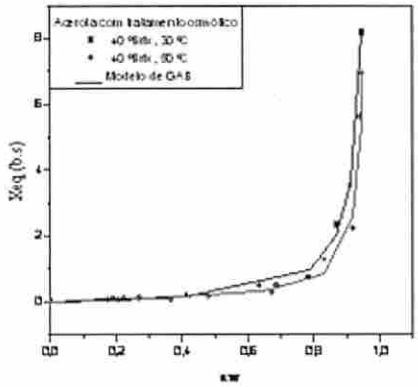


Figura 3-Isotermas de sorção da acerola desidratada osmoticamente (40 °Brix) nas temperaturas de 30 e 40 °C.

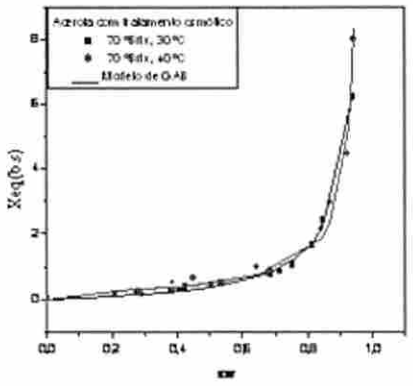


Figura 4-Isotermas de sorção da acerola desidratada osmoticamente (70 °Brix) nas temperaturas de 30 e 40 °C

Também pode ser observado na Tabela 1, que as constantes C e K do modelo aumentam com a temperatura, na mesma condição do processo osmótico. Pode-se afirmar que em geral o conteúdo de umidade de monocamada aumenta com o processo osmótico e com a concentração de sacarose. Esta tendência parece geral com exceção da isoterma de 50 °C da amostra in natura que apresentou um comportamento oposto: o Xm é ligeiramente maior e os parâmetros C e K são menores que a 40 °C.

Analisando os resultados para as isotermas de 30 °C pode ser observado o efeito do tratamento osmótico sobre os parâmetros de GAB. O conteúdo de umidade de monocamada aumenta e a constante C diminui. O aumento do °Brix aumenta esta tendência salvo com relação à constante C, cujo valor aumenta quando se comparam as amostras tratadas com 40 e 70° Brix.

Prothon & Ahrné (2004), no tratamento osmótico da maça, verificaram que a constante C aumenta com a temperatura. (Maroulis et al., 1988) na aplicação da regressão não-linear do modelo de GAB para uva passas, mantendo-se constante o conteúdo de umidade de monocamada para cada temperatura, observaram que a constante C diminui com o aumento da temperatura, aumentando o valor da constante K.

Tabela 1-Parâmetros da equação de GAB e coeficientes de regressão da acerola para diferentes tratamento e temperaturas

Tratamento	Temperatura (°C)	Parâmetro			
		Xm	C	K	R²
40°Brix – 24 horas	30	0,28599	0,49955	1,0213	0,9963
40°Brix – 24 horas	50	0,12385	4,20637	1,0362	0,9936
70°Brix – 24 horas	30	0,43499	0,66130	0,9975	0,9955
70°Brix – 24 horas	40	0,25306	10,8760	1,0272	0,9750
In natura	30	0,28114	1,77577	1,0304	0,9859
In natura	40	0,16563	5,53055	1,0382	0,9906
In natura	50	0,17052	0,66998	1,0208	0,9978

CONCLUSÃO

A partir da discussão apresentada e da análise dos resultados obtidos, é possível concluir que:

1. O modelo de GAB é adequado para representar as isotermas de sorção das acerolas, ajustando-se muito bem aos dados experimentais, com coeficiente de correlação elevado.
2. A constante C aumenta com o aumento da temperatura e a umidade de monocamada X_m diminui com exceção da amostra *in natura* a 50°C.
3. Pode-se afirmar que em geral o conteúdo de umidade de monocamada aumenta com o processo osmótico e com a concentração de sacarose com exceção da isoterma de 50 °C da amostra *in natura* que apresentou um comportamento oposto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de apoio CAPIS e PIBIC pelo auxílio financeiro ao projeto do qual se originou este artigo.

REFERENCIAS

Corrêa, P. C., Goneli, A. L. D.,Resende, O. e Ribeiro, D. M. Obtenção e modelagem das isotermas de dessorção e do calor isostérico de dessorção para grãos de trigo. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. Univ. Federal de campina Grande, Campina Grande-PB, v.7, n.1, p.39-48, 2005.

Corrêa, P. C., Goneli, A. L. D., Resende, O. Martinazzo, A. P., Botelho, F. M. Comparação entre os métodos estático e dinâmico na determinação do equilíbrio higroscópico das espigas de milho. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. Univ. Federal de campina Grande, Campina Grande-PB, v.7, n.2, p.141-149, 2005.

Gouveia, J.P.G. Avaliação da cinética de secagem de gengibre (*zingiber offinalle, Roscoe*) em um secador de leito fixo. Campinas: UNICAMP/FEA, 1999. 159p. (Tese Doutorado).

Lenart, A. Osmo-convective drying of fruits and vegetables: technology and application. Drying Technology, v.14, n.2, p.391-413, 1996.

Maroulis, Z.B.; Tsami, E.; Marinos-Kouris, D.; Saravacos, G.D. Application of the GAB model to the moisture sorption isotherms for dried fruits. Journal Food Engineering, v.7, p.63-78, 1988.

Netto, L.M. Acerola – A cereja tropical. São Paulo: Livraria Nobel S.A. 1986. 94p.

Park, K.J.; Yado, M.K.M.; Brod, F.P.R. Isotermas de sorção para a pêra bartlett (*Pyrus sp.*). Engenharia Rural, Piracicaba: ESALQ/USP, 2000.

Pena, R.S.; Ribeiro, C.C.; Grandi, J.G. Aplicação de modelos matemáticos bi e tri-paramétricos na predição de isotermas de adsorção de umidade do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó. Ciências Tecnologia Alimentos, Campinas, v.20, n.1, p.08-11, 2000.

Prothon, F.; Ahrné, L.M. Application of the Guggenheim, Anderson and De Boer model to correlate water activity and moisture content during osmotic dehydration of apples. Journal Food Engineering, v.61, p. 467-470, 2004.

Rahman, M.S.; Perera, C.D.; Thebaud, C. Desorption isotherm and heat pump drying kinetics of peas. Food Research International, v.30, n.7, p. 485-491, 1997.

Santin, A.P. Estudo da secagem e da inativação de leveduras. São Carlos: UFSC, 1996. 135p. (Dissertação Mestrado).

Saravacos, G.D.; Tsiourvas, D.A.; Tsami, E. Effect of temperature on the water adsorption isotherms of sultana raisins. Journal Food Sciences, v.51, p. 381, 1986.

Silva, V.A. Efeito de Pré-tratamentos químicos na taxa de secagem de acerola em monocamada. Campina Grande: UFPB, 1998. 92p. (Dissertação Mestrado).

Silva, V.A. Secagem osmo-convectiva da acerola. Campina Grande: UFCG, 2004. 176p. (Tese de Doutorado).

Silveira, A.M.; Alves, S.M. Tomates secos via processo combinado convecção-desidratação osmótica. In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2002, Anais... Natal: COBEQ, 2002, (CD Rom).

Telis, V.R.N.; Garbas, A.L.; Menegalli, F.C.; TELIS-ROMERO, J. Water sorption thermodynamic properties applied. Thermochimica Acta, 343, p.49-56, 2000.

Travaglini, D.A.; Aguirre, J.M.; Silveira, E.T. Desidratação de frutas e hortaliças. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1997, p.3.1-3.40.

Vazquez, G.; Chenlo, F.; Moreira, R.; Carballo, L. Desorption isotherms of *muscatel* and *aledo* grapes, and the influence of pretreatments on muscatel isotherms. Journal of Food Engineering, v.39, p.409-414, 1999.

Welti, J. CH.; Vergara F.B. Actividad de agua – Concepto y aplicación em alimentos com alto contenido de humedad. Temas en Tecnología de Alimentos, México, v.1, p.11-37, 1997.

^{1}H NMR STUDIES OF MOLECULAR MOBILITY IN POTATO STARCH

Nuria Cristina Acevedo; Carolina Schebor [(1)] and María del Pilar Buera [(1)]
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS.
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.
Ciudad Universitaria (1428). e-mail: nacevedo@di.fcen.uba.ar
CIUDAD DE BUENOS AIRES. ARGENTINA.
[(1)] Members of CONICET.

Key words: potato starch, molecular mobility, sorption properties, glass transition.

ABSTRACT

Pulsed ^{1}H NMR was used to determine molecular mobility of water and polymers in freeze-dried potato starch samples in relation to the sorption properties of the system in a range of 0.43-0.98 water activity (a_w).

Water sorption data were determined isopiestically at 25°C. Thermal transitions were determined by differential scanning calorimetry. Molecular mobility was related to protons relaxations, and it was analyzed by ^{1}H NMR measuring spin-spin relaxation times (T_2). The analysis of rapidly relaxing components following a single 90° pulse experiments (FID) was used to assess the mobility of polymers and water molecules strongly associated to the polymers. The slow relaxing component (related to the most mobile water molecules) was determined by CPMG method.

The FID analysis showed a single $T_{2\text{-FID}}$ which increased with the increase in RH and temperature; however a clear change in the $T_{2\text{-FID}}$ values could not be identified around the glass transition temperature (T_g).

The CPMG analysis gave a short component ($T_{2\text{-}1}$) in the order of milliseconds attributed to the "multilayer" water molecules and a long component ($T_{2\text{-}2}$) which value increased with increasing water content. This increase was independent on temperature and on the physical state of the sample. The proportion of protons of the long component, measured by the signal amplitude, ($A_{2\text{-}2}$), also increased with increasing water content, suggesting that it is directly related to the mobility of water. ^{1}H NMR could be employed to determine the water states of freeze-dried potato starch samples and relate them to the different regions of the sorption isotherm.

INTRODUCTION

The physical state of water is of interest to food scientists because of its importance in storage stability, textural and functional properties of foods. Water molecules in biological materials can be classified into several fractions according to their molecular mobility or the extent of their association with or "binding" to macromolecules within the material (Fullerton et al., 1988). In the so called monolayer water molecules are strongly interacting with solids, and remain almost immobilized, being its behavior as that of solids in many aspects. With the increase of water to macromolecules ratio, additional layers of water link to monolayer in order to form "multilayers" of water. In this region, both the attraction and the energy of water bonds decreases as the distance from macromolecules increases. The spectroscopic technique of pulsed nuclear magnetic resonance is a promising technique for investigating the behavior of water in foods (Brosio et al., 1983, 1984; Callagan et al., 1983a, 1983b; Leung et al., 1976, 1979, Ruan et al., 1997; etc). It provides a rapid, sensitive, noninvasive determination of not only the quantity of water present, but also the structure and dynamic characteristic of water in foods. The spin–spin relaxation time (T_2) can be used to indicate the mobility of these water layers, to identify each layer with different T_2 times (tightly bound, structured, and weakly). For example, monolayer of water molecules directly linked to macromolecules by hydrogen bonds usually presents a T_2 of dozens of microseconds, while the bulk water from the system multilayers shows a T_2 of dozens to hundreds of milliseconds. In food, it can be assumed that there are two, three or four components distinguished by the measurements. In fact, water molecules might exist in an endless number of states in food systems, although there are a few dominant states governed by physical and chemical structures of the system (Pitombo and Lima, 2003). The objective of this work was to study the water-solids interactions in relation to the different states of water in native potato starch systems.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The native starch obtained from white potato (Spunta variety) was employed as a model system. Potatoes were grinded and starch was extracted from the juice after rinsing with distilled water. An aqueous suspension was freeze-dried to obtain the dried starch. Before freeze drying, aliquots of 2 mL were placed in 3 mL glass vials and immediately quenched with liquid nitrogen in order to avoid starch precipitation. Then, the samples were stored at
-20°C until freeze drying.

Methods

Freeze-drying

Aqueous suspensions were quenched with liquid nitrogen before freeze-drying. An Alpha 1-4 LD / 2-4 LD-2 freeze drier (Martin Christ, Gefriertrocknungsaniagen GmbH) was used; it operated at -84°C, at a chamber pressure of 0.04 mbar. The freeze-drying process lasted 48 hours.

Water content

After freeze-drying, potato starch was equilibrated over saturated salt solutions (in a range of 43-94% R.H.) in vacuum desiccators for 13 days to obtain the desired water contents (Greenspan, 1977). In order to analyze systems with high a_w, 2 mixtures stach:water were prepared by water addition: 70:30 and 50:50 having a_w 0.97 and 0.98 respectively. The water content was determined (in duplicate samples) gravimetrically, by difference in weight before and after vacuum drying over magnesium perchlorate at 96°C for 48 h.

Thermal transitions

Glass transitions were determined by differential scanning calorimetry (DSC) using a DSC 822^e Mettler Toledo calorimeter (Schwerzenbach, Switzerland). The instrument was calibrated with indium (156.6°C), lead (327.5°C) and zinc (419.6°C). All measurements were performed at a heating rate of 10°C/min. Hermetically sealed 40 µl medium pressure pans were used, (an empty pan served as reference). Thermograms were evaluated using Mettler Star^e program. An average value of at least two replicates was reported.

NMR experiments

A Bruker PC 120 Minispec pulsed nuclear magnetic resonance (NMR) instrument, with a 0.47 T magnetic field operating at resonance frequency of 20 MHz, was used for measurements. Equilibrated powdered samples were removed from the desiccators, placed into 10 mm diameter glass tubes and returned to the desiccators an additional 24 h prior to analysis.

The spin-spin relaxation time (T_2) associated to the fast relaxing protons (related to the solid matrix and to water interacting tightly with solids) was measured using a free induction decay analysis (FID) after a single 90° pulse. The decay envelopes were fitted to mono-exponential behavior with the following equation:

$$I = A \exp\left(-t/T_{2\text{-FID}}\right)$$

where I represents protons signal intensity. The term $T_{2\text{-FID}}$ corresponds to the protons in the polymeric chains of the sample and water molecules strongly associated to the polymer.

Since no 180° refocus pulse was used in the experiments, the spin-spin relaxation time constants are apparent relaxation time constants, i.e. $T_{2\text{-FID}}$*. However for solid samples (like ours), we can consider that the intrinsic $T_{2\text{-FID}}$ is very close to the $T_{2\text{-FID}}$* as reported previously by Fullerton and Cameron (1998). Therefore, $T_{2\text{-FID}}$ was used for convenience.

To investigate transverse relaxation behavior of the more mobile components associated with water; the relaxation data were also obtained using the Carr-Purcel-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence: 90x-(τ–180y–τ–echo)n. The 90-180 pulse spacing (τ) was set to 40 μs so as to exclude the fast decaying component found in the single-pulse experiments.

The decay envelopes were fitted to bi-exponential behavior with the following equation:

$$I = A_1 \exp(-t/T_{2\text{-}1}) + A_2 \exp(-t/T_{2\text{-}2})$$

where I represents protons signal intensity. The term with the lower relaxation time ($T_{2\text{-}1}$) corresponds to the protons in the less mobile water fraction. A_1 is the signal intensity of protons in $T_{2\text{-}1}$ state. The term with the larger relaxation time ($T_{2\text{-}2}$) corresponds to the more mobile water fraction. A_2 is the signal intensity of protons in $T_{2\text{-}2}$ state.

RESULTS

The FID analysis showed a single T_2 component which was associated to the mobility of the polymer chains and water molecules that are strongly associated by hydrogen bonding to the solid matrix (i.e. monolayer water) (Kalichevsky et al.,1992; Ruan et al., 1999; Le Botlan and Helie-Fourel, 1995; Rugraff, Desbois and Le Botlan, 1996; Choi and Kerr, 2006). There was an increase in $T_{2\text{-FID}}$ with the increase in a_w or in temperature; however a clear change in the $T_{2\text{-FID}}$ values could not be identified around T_g as expected (**Figure 1**).

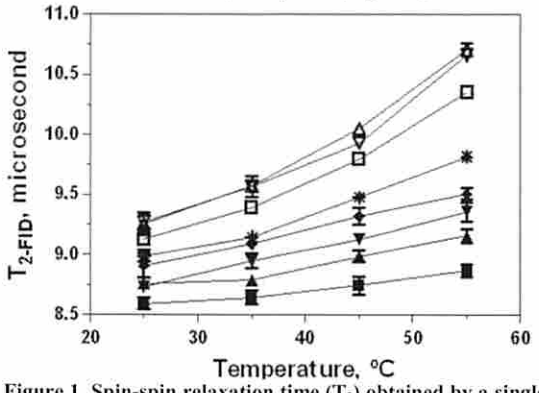


Figure 1. Spin-spin relaxation time (T_2) obtained by a single 90° pulse by ^{1}H NMR for potato starch as a function of temperature. a_w: 0.43 (■), 0.58 (▲), 0.70 (▼), 0.75 (◆), 0.80 (✳), 0.84 (□), 0.90 (/) and 0.94 (▽).

The analysis of CPMG gives a short component ($T_{2\text{-}1}$) of the order of 0.05 to 0.1 milliseconds attributed to the "multilayer" water molecules. The $T_{2\text{-}1}$ values did not change significantly along a_w scale and the temperatures analyzed. A long component ($T_{2\text{-}2}$) in the range of 0.5 to 3.5 milliseconds, which value linearly increased with the water content up to a_w= 0.84 was also observed (**Figure 2**). This increase was slightly dependent on temperature in the range between 25 and 55°C and a change of slope of T_2 vs T was observed, which was not coincident with the T_g value as determined by DSC.

The intensity of the signal corresponding to the T_{2L} component along with the relaxation time values also increased with the increase in water content suggesting that it is directly related to the mobility of water. This could be due to the increase in the amount of water protons that contribute to the slowly relaxing component in the region of the sorption isotherm at which water is as "multilayer".

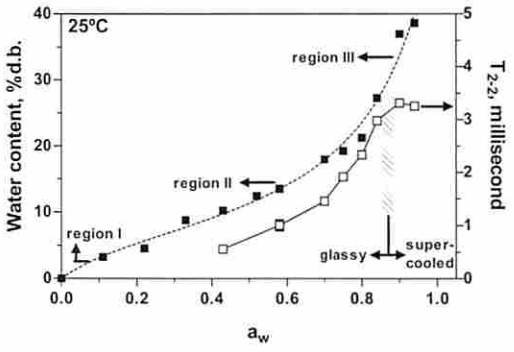


Figure 2. Sorption isotherm for potato starch (■) and spin-spin relaxation time ($T_{2\text{-}2}$; □) obtained by a CPMG sequence as a function of a_w at 25°C. Similar results were obtained at 35, 45 and 55°C.

At a_w values higher than 0.84 the long component $T_{2\text{-}2}$ remains "constant". This samples correspond to the third region of the sorption isotherm, and also are in the supercooled state. Up to a_w= 0.94 there was no presence of freezable water as observed by DSC analysis. Above a_w=0.94 the $T_{2\text{-}2}$ component increases markedly (above 7.7 ms) and freezable water was detected by DSC.

CONCLUSIONS

This study has demonstrated that NMR technique is quite conclusive in determining the mobilities of water molecules displaying different interactions with their environments in heterogeneous systems. The changes in transversal relaxation times are directly associated to the mobility of the different populations of water molecules in the sample. ^{1}H NMR could be employed to determine the water states of freeze-dried potato starch samples and relate them to the different regions of the sorption isotherm and the corresponding water-solid interactions.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge financial support from U de Buenos Aires (UBACYT X226), ANPCYT (PICT 20545) and CONICET (PIP 5977).

REFERENCES

-Brosio, E.; Altobelli, G. and Di Nola, A. 1984. A pulsed low res. NMR study of water binding to milk proteins. J. Food Technol., 19:103-108.

-Callagan, P., Jolley, K.W. and Humprey, R.S. 1983a. Diffusion of fat and water cheese as studied by pulsed field gradient NMR. J. Colloid Interface Sci. 93:521-529.

-Callagan, P., Jolley, K.W.; Lelievre, J. and Wong, R.B.K. 1983b. Nuclear magnetic resonance studies of wheat starch pastes. J. Colloid Interface Sci. 92:332-337.

-Fullenton, G. D. and Cameron, I. L. 1988. Relaxation of biological tissues. In Biomedical MRI: Principles, Methodology, and Application. F. W. Wehrli, D. Shaw, and J. B. Kneeland, ed. VCH Publishers, Inc., New York, NY. Page 115.

-Kalichevsky, M.T.; Jaroszkiewicz E.M. and Blanshard, J.M.V. 1992. Glass transition of gluten, Int. J. Biol. Macromol. 14: 257–266.

-Le Botlan, D. and Helie-Fourel, I. 1995. Asessment of the intermediate phase in milk fat by low-resolution NMR. Anal. Chem. Acta 311: 217-223.

-Leung, H.K., Steinberg, M.P., Nelson, A.I. and Wei, L.W. 1976. Water binding of macromolecules determined by pulsed NMR. J. Food Sci. 41: 297-300.

-Leung, H.K., Magnuson, J.A. and Bruinsma, B.L. 1979. Pulsed NMR study of water mobility in flour doughs. J. Food Sci. 44: 1408-1411.

-Pitombo, R. N. M. and Lima, G. A. M. R 2003. NMR and aw in measuring the water mobility in Pintado (Pseudoplatystoma corruscans) fish. J. of Food Eng. 58: 59-66.

-Ruan, R.R. and Chen, P.L. 2000. NMR techniques and their application in food quality analysis. In Nondestructive Food Evaluation: Techniques to Analyze Properties and Quality. S. Gunasekaran, ed. Marcel Dekker Inc., New York.

-Rugraff, Y.L.; Desbois, P. and Le Botlan, D.J. 1996. Quantitative analysis of wheat starch-water suspensions by pulsed NMR spectroscopy measurements. Carbohydr. Res. 295:185-194.

-Tang, H.R.; Godward J. and Hills, B. 2000. The distribution of water in native starch granules—a multinuclear NMR study. Carbohydr. Polym. 43: 375-387.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA Y SOLUBILIDAD DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES DE QUITOSANO OBTENIDAS DE CAPARAZONES DE CAMARÓN

Vásconez, María Belén[1]; Campos, Cármen[2,3]; Flores, Silvia[2,3] , Juan de Dios Alvarado[1] y Gerschenson, Lía[2,3].

[1]UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Casilla 18-01-0334. e-mail.: fcial@uta.edu.ec
AMBATO – ECUADOR
[2]UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina. e-mail: lia@di.fcen.uba.ar
[3]CONICET

Palabras clave: películas biodegradables, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, quitosano.

RESUMEN

El presente trabajo, tiene por objeto conocer la permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua de películas biodegradables a base de quitosano y almidón de mandioca. El quitosano utilizado fue obtenido por deacetilación de quitina, extraída de caparazones de camarón. El estudio de estas propiedades permitió establecer que la presencia de quitosano en la formulación de las películas disminuye la permeabilidad y la solubilidad de las películas con base en almidón de tapioca.

INTRODUCCIÓN

Kirk y Othmer (1970) destacaron que las aplicaciones promisorias del quitosano para constituir películas y recubrimientos para alimentos, permitirían encontrar nuevos mercados y reemplazar materiales sintéticos no biodegradables.

Miranda y colaboradores (2004) señalaron que el quitosano (β-1,4-D-glucosamina) es un polisacárido lineal, obtenido de la deacetilación de quitina β-(1-4)-(N-acetilglucosamina), principal constituyente de los caparazones de los crustáceos. Este polímero abundante, con capacidad de formación de películas y otras muchas aplicaciones a nivel industrial, se utiliza en textiles, cosméticos, productos químicos y medicinas así como también en el tratamiento de aguas. Es un material que posee grandes aplicaciones por su carácter catiónico, biodegradabilidad, no toxicidad y actividad biocida con aplicaciones en empaques y recubrimientos de alimentos, como una barrera contra los agentes contaminantes, microorganismos y vapor de agua y gases.

Según Pérez-Gago y colaboradores (1999), las películas comestibles son de importancia en aplicaciones relacionadas con alimentos por su habilidad para ser una barrera para la transferencia de masa, proteger a los ingredientes y mejorar la integridad mecánica de los productos envasados.

Un importante parámetro de dichas películas es la permeabilidad al vapor de agua [P]. Wiles y colaboradores (2000) demostraron que el porcentaje de deacetilación del quitosano y la viscosidad de las soluciones para elaborar películas por moldeo, no tuvieron efecto sobre las propiedades de transferencia al vapor de agua. Buonocore y colaboradores (2005) establecieron que las películas de quitosano presentaron una menor permeabilidad al vapor de agua con relación a las películas hechas con caseína y con alginato, señalando que lo anterior se debe a la baja afinidad por el agua y a una menor movilidad macromolecular en presencia de quitosano.

El espesor de las películas influye en las propiedades de transferencia de masa y mecánicas de las películas hidrofílicas. La velocidad de transferencia al vapor de agua (VTVA) a través de las películas está directamente relacionada con la permeabilidad (McHugh y colaboradores, 1993).

La solubilidad, la cual proporciona un parámetro de la afinidad del material por el agua, determina las posibles aplicaciones tecnológicas de las películas. Zutara y col. (1999) establecieron que es posible modificar el grado de solubilidad de películas a base de proteínas según el grado de desnaturalización o la adición de ingredientes como lípidos y distintos plastificantes y, por lo tanto, satisfacer variadas aplicaciones.

El propósito fundamental del presente trabajo es conocer las características de permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua de películas biodegradables elaboradas con quitosano y/o almidón de mandioca así como el efecto de la presencia del antimicrobiano sorbato de potasio en las mismas. La comparación con otras películas empleadas en alimentos permitirá caracterizar su comportamiento y evaluar su potencial aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de quitina y quitosano

De acuerdo a la tecnología indicada por Almeida y Arancibia (2005), la quitina fue obtenida a partir de caparazones de camarón. La desproteinización se realizó con una solución 0.5% (p/p) de hidróxido de sodio a 80° C por 10 minutos. La desmineralización se realizó con ácido clorhídrico 2N por 60 minutos a temperaturas próximas a 20° C. La quitina obtenida fue deacetilada para obtener quitosano por tratamiento químico, utilizando solución 50% (p/p) de hidróxido de sodio a 100° C por 60 minutos.

Preparación de suspensiones de quitosano

Se preparó ácido acético 1% (p/p) en el cual se suspendió el quitosano. A fin de eliminar el material insoluble, se procedió al filtrado de la suspensión.

Preparación de suspensiones de almidón de mandioca

Se suspendió almidón de mandioca (Berasa S.A., Argentina) en una mezcla de glicerol (Mallickrodt, Argentina) y agua destilada. Dicha suspensión se sometió a tratamiento térmico sobre platina calefactora y agitación a fin de gelatinizar el almidón. También se elaboró una suspensión de almidón de mandioca en una mezcla de sorbato de potasio (Sigma, St Louis, Missouri, USA), glicerol y agua destilada, a fin de estudiar la influencia del preservador.

Preparación de las soluciones mezcla de quitosano y almidón

Una vez gelatinizado el almidón se adicionó una solución de quitosano en ácido acético 1% p/p y se homogenizó utilizando un equipo Ultraturrax. Se aplicó vacío para eliminar las burbujas de aire.

Preparación de las Películas (Casteo)

Las concentraciones finales de las soluciones utilizadas para la elaboración de las películas fueron: 1% (p/p) quitosano - 2% (p/p) almidón, 1% (p/p) quitosano - 2% (p/p) almidón - 0,5% (p/p) sorbato de potasio y 2% (p/p) de almidón (testigo). En todos las formulaciones la concentración de glicerol fue del 0,64% (p/p). Todas las soluciones se desgasificaron aplicando

vacío y se distribuyeron 20 g de los sistemas en cajas de Petri plásticas de 10 cm de diámetro. Se llevaron a cámaras de secado a temperatura de 20° C, por 48 horas; al término de ese tiempo fueron desmoldadas con extrema precaución, en forma manual.

Espesor de las Películas

El espesor de las películas fue medido, con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania), en tres posiciones diferente de cada espécimen y con una precisión de 0,01 mm.

Permeabilidad al Vapor de Agua

La permeabilidad al vapor de agua de las películas fue determinada gravimétricamente, adaptando el procedimiento recomendado por la norma ASTM E96-00 (2000).

Se emplearon celdas acrílicas de 4,4 cm de diámetro dentro de las cuales se dispuso cloruro de calcio. Las películas de quitosano y/o almidón preparadas fueron soportadas entre la base y el aro superior de la celda. Las celdas adecuadamente cerradas, se colocaron en una cámara a 32ºC y 65% de humedad relativa (H.R.) y fueron pesadas durante el transcurso de la experiencia para evaluar su incremento del peso con el tiempo. Para cada formulación se trabajó por triplicado.

De acuerdo a la norma ASTM E96-00 (2000), a partir de los datos registrados del aumento del peso de las celdas con el tiempo, se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) según:

$$VTVA = \frac{G}{t\,A}$$

Donde G/t es la pendiente de la recta obtenida graficando el cambio de peso de las celdas (g) versus el tiempo transcurrido (h) y A es el área expuesta de las películas (m^2).

A continuación se calculó la permeanza (P') de la película:

$$P' = \frac{VTVA}{\Delta p}$$

Siendo Δp la diferencia de presión de vapor de agua entre el interior de la celda y el exterior (cámara de humedad controlada).

Finalmente, la permeabilidad (P) se calculó multiplicando el valor de permeanza por el espesor de la película (e).

$$P = P' * e$$

Solubilidad en agua

La solubilidad es definida (Gontard y col., 1992) como el porcentaje de masa seca de la película, solubilizada luego de 24 horas de inmersión en agua destilada. El porcentaje inicial de materia seca fue determinado por secado de discos de 2 cm de diámetro en una estufa de vacío a 100ºC, durante 24 horas. Paralelamente, otros discos fueron cortados, pesados y sumergidos en 50 mL de agua destilada, durante 24 horas a 25ºC. Las películas remanentes fueron retiradas del agua y secadas (100ºC en estufa de vacío, durante 24 horas) a fin de determinar la masa seca. La solubilidad es reportada como la relación entre la diferencia entre la masa seca inicial y la final (luego del tratamiento) con respecto a la masa seca inicial, expresada en porcentaje.

Análisis estadístico

Las diferencias significativas se determinaron a través de un ANOVA y el test LSD, con un nivel de significancia del 5% (α:0,05). Se utilizó el programa Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, 1997 (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, U.S.A).

RESULTADOS

Para todas las formulaciones estudiadas se obtuvieron películas uniformes, carentes de grumos o burbujas y transparentes.

De acuerdo con los resultados reportados en la **Tabla 1**, se aprecia que el valor más alto de permeabilidad se observa para las formulación testigo de almidón en tanto que, los valores más bajos corresponden a las formulaciones conteniendo quitosano. Evidentemente, la adición de quitosano produce una disminución de la permeabilidad al vapor de agua. Esta observación está en concordancia con lo reportado por Bangyekan y colaboradores (2006) quienes atribuyeron esta propiedad a la mayor hidrofobicidad introducida por el quitosano. También, la aparición de interacciones entre el quitosano y el almidón de mandioca (del tipo puente de hidrógeno) reduciría la cantidad de grupos hidrofílicos disponibles para interactuar con el agua, reduciendo la velocidad de transmisión (Xu et al, 2005).

Tabla 1. Valores de permeabilidad al vapor de agua (P) calculadas de acuerdo al tipo de formulación (se informan valores promedio y su desvío estándar) y espesores (e) correspondientes.

Formulación	**P** (g / m Pa s)	**e** (m)
1% (p/p) quitosano y 2% (p/p) almidón	$(6,68 \pm 0,96).10^{-10}$	$1,96.10^{-4}$
1% (p/p) quitosano y 2 % (p/p) almidón y 0,5 % (p/p) sorbato de potasio	$(2,76 \pm 0,27).10^{-10}$	$7,83.10^{-5}$
2 % (p/p) almidón (testigo)	$(1,21 \pm 0,10).10^{-09}$	$1,65.10^{-4}$

Se puede observar en la **Tabla 1** que la presencia del antimicrobiano sorbato de potasio determina un menor espesor de las películas y, por lo tanto, un menor valor de permeabilidad. Esta diferencia fue significativa respecto de las películas libres de preservador. Flores y colaboradores (2007) observaron que el agregado de sorbato de potasio no afectaba significativamente el espesor y la permeabilidad de películas constituidas en base a almidón de tapioca. Probablemente los cambios observados en este trabajo, en dichos parámetros, por el agregado del antimicrobiano, se deban a la presencia de quitosano.

Caner y colaboradores (1998) informaron que la permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles conteniendo quitosano, toma valores de $6,11.10^{-11}$ [g /mPa s] hasta $1,51.10^{-10}$ [g /m Pa s]. Estos valores son inferiores a los hallados en este trabajo. De acuerdo con Buonocuore y colaboradores (2005), las películas elaboradas con suspensiones de quitosano presentan una permeabilidad al vapor de agua inferior al de otras películas biodegradables, actuando, en consecuencia, como mejores barreras al vapor de agua. Sin embargo, cuando estos valores se comparan con los de películas flexibles convencionales, se establece que son notablemente superiores y limitan el campo de aplicación de las películas comestibles como barrera al vapor de agua.

En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para el ensayo de solubilidad en agua.

Tabla 2. Solubilidad en agua (S) calculada de acuerdo al tipo de formulación. Se informan valores promedio y su desvío estándar. Resultados con igual letra no difieren significativamente (α: 0,05).

Formulación	S (%)
1% (p/p) quitosano y 2% (p/p) almidón	25 ± 6^a
1% (p/p) quitosano y 2 % (p/p) almidón y 0,5 % (p/p) sorbato de potasio	24 ± 1^a
2 % (p/p) almidón (testigo)	35 ± 2

Puede observarse que la presencia de quitosano en la formulación de las películas disminuye la solubilidad en agua. Como se mencionó antes, este hecho puede atribuirse a la mayor hidrofocidad de este biopolímero. Por otro lado, la presencia de sorbato de potasio no introdujo cambios significativos. Las películas constituidas solo en base a almidón mostraron mayor interacción con el solvente, resultando un valor de solubilidad más alto. Este resultado es de interés ya que un incremento en la solubilidad puede conllevar a problemas de integridad de la película en algunas situaciones tecnológicas.

CONCLUSIONES

Las suspensiones de quitosano, en conjunto con almidón de tapioca, materiales plastificantes y el antimicrobiano sorbato de potasio permiten la formación de películas uniformes, carentes de grumos o burbujas, y transparentes. La presencia de quitosano provocó una disminución tanto de la permeabilidad al vapor de agua como de la solubilidad en agua. Estos resultados indican que el biopolímero quitosano mejora las propiedades de barrera al vapor de agua y genera una matriz más resistente a la disolución en agua, hechos que permiten sugerir el empleo de quitosano para actuar como recubrimiento o envase de alimentos.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto CYTED XI.20 por hacer posible y facilitar la realización de la pasantía de M.B. Vásconez en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, Argentina bajo la tutoria de la Dra. Gerschenson. A la Universidad Técnica de Ambato por el apoyo a través del Proyecto UTA-CENI-FCIAL-BIOFILMS. A ANPCyT, UBA, CONICET (Argentina) por el apoyo financiero.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

Almeida, A y Arancibia, M. Desarrollo de tecnología para la obtención de quitina y quitosano a partir del caparazón del camarón (*Penaeus vannamei*). Tesis de grado para optar por el Título de Ingeniero en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato - Ecuador. 110 pp y Anexos. (2005).

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. standard designation. E96-00 (2000).

Bangyekan, C. Aht-Ong, D., Srikulkit, K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers* 63, 61-71. (2006).

Buonocore, G.G., Conte, A., Del Nobile, M.A. *J. Food Sci.*, 70(2):E142-E147 (2005).

Caner, C. Vergano, P.J. and Wiles, J.L. *J. Food Sci.*, 63(6):1049-1053. (1998).

Flores, S., Fama, L., Rojas, A., Goyanes, S. Y Gerschenson, L. *Food Res. Int.*, 40: 257-265. (2007).

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,* 57(1), 190-199. (1992).

Kirk, R y Othmer. Enciclopedia de Tecnología Química. Volumen 13. Primera Edición en Español. Editorial Hispano Americana. México 1970. pp 423-428.

McHugh, T.H. Avena-Bustillos, R. and Krochta, J.M. *J.Food Sci.*, 58(4):899-903. (1993).

Miranda P.S., Garnica, O. Lara - Sagahon, V. and Cardenas, G. *J. Chil. Chem Soc*: 49: 173-178 (2004).

Pérez-Gago, M.B. Nadaud, P. and Krochta, J.M. *J. Food Sci*, 64 (6): 1034 1037 (1999).

Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A., Nag, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21, 185-192. (2005).

Zutara, M.S., Chen, H., Li, J. Water solubility of whey protein-based edible films affected by protein sources, denaturation extent, lipids, plasticizers and UV treatment. Technical oral session: Dairy Foods Presentations I, 16-7. IFT Annual Meeting, Chicago, USA. (1999).

EFFECT OF MILK COMPOSITION AND MANUFACTURING PARAMETERS ON RHEOLOGY OF MEXICAN AÑEJO CHEESE

Hernández-Morales, C., Aguirre-Mandujano, E., Hernández-Montes, A. and Villegas-de Gante, A.

Universidad Autónoma Chapingo. km. 38.5 carretera México-Veracruz, 56230. Chapingo, Mexico

Key words: Añejo cheese, viscoelastic properties, rheology.

ABSTRACT

The effect of milk composition and several manufacturing parameters on the storage (G') and loss (G'') moduli of Añejo cheese from four dairies of the county of Zacazonapan were studied. Cheese elaborated with milk of greatest fat and protein content, and with the use of commercial rennet, opposed to the natural extract used in the other three dairies, showed slightly higher values of G' and G'' with increasing frequency. No significant differences were observed in the values of G' and G'' at a constant strain of 0.01 % and frequency of 1 Hz.

INTRODUCTION

Cheese texture is a complex and important quality attribute that affects consumer acceptance. Various instrumental techniques have been used to assess cheese texture and its relation to cheese composition (Tunick *et al.*, 2007; Madsen and Ardö, 2001). Large strain tests such as texture profile analysis, uniaxial compression, and torsion analysis are generally used to relate the physical properties of cheese with its sensory texture, however they not provide data regarding the construction and structure of the casein, fat and water network at a molecular level (Shoemaker *et al.*, 1992). Dynamic tests provide information on the conformation, structure and interactions of viscoelastic materials (Tunick, 2000). Rheological characterization of cheese is also important to determine how composition, processing techniques and storage conditions affect the viscoelastic behavior of cheese (Konstance and Holsinger, 1992). Hence, the increasing interest in the study of the dynamic properties of cheese (Ak and Gunasekaran, 1996).

The influence curd acidification, type of rennet and heat treatment of milk, on the rheological properties of Mozzarella cheese have been studied (Thaker *et al.*, 1991). Bugaud *et al.* (2001) found that milk composition and pH, along with cheesemaking process parameters such as clotting time, duration of curd whey stirring and rennet concentration affected the texture of Abondance cheese. The viscoelastic properties of cheese may also be influenced by rennet concentration (Madadlou *et al.* 2005), coagulation temperature (Madadlou *et al.*, 2006), and the season of the year in which cheese is elaborated (Tunick *et al.*, 2007). Despite the importance of these parameters, there is no information regarding their effect on the viscoelastic properties of Añejo cheese. The purpose of this study was to investigate the influence of milk composition and manufacturing procedures on the viscoelastic properties of Añejo cheese.

MATERIALS AND METHODS

Manufacturing parameters

The study was conducted in four dairies from the county of Zacazonapan. The following manufacturing parameters were measured: volume of milk processed, type of rennet, coagulation temperature, milk setting time from arrival until cheese manufacture, rennet dosage, coagulation time, times de curd was cut and drained, duration of curd whey stirring, and kneading time. A block of fresh cheese was obtained from each dairy for its rheological evaluation after 14 days of storage.

Physicochemical analysis of milk

Physicochemical analyses were performed on milk from the four dairies before its use in the manufacture of cheese. A HI 98128 pH meter (Hanna Instruments, Italy) was used to measure pH. Titratable acidity was determined by the titrimetric method (method 947.05; AOAC, 1995). Solids non fat (SNF), fat, protein and density were measured using an Ekomilk-M milk analyzer (Bultheh 2000 Ltd., Bulgaria). Two repeated measures were performed on each of the four batches of milk.

Rheological analysis of cheese

Dynamic rheological measurements were performed with a Paar Physica MCR 301 rheometer (Physica Messtechnik, Stuttgart, Germany) with a parallel plate geometry of 50 mm in diameter. Cheese samples were placed on a sand paper disc glued to the peltier to avoid slippage. In order to control contact between cheese samples and the geometry, the normal force was adjusted to a value of approximately 0.35 N. Strain sweeps, with strain values ranging from 0.0001 to 100 % at a frequency of 1 Hz, were conducted to determine the linear viscoelastic region.

The viscoelastic properties of Añejo cheese were studied by conducting frequency sweeps from 0.01 to 100 Hz, at a constant strain within the linear viscoelastic region (0.01 %). The rheological parameters studied were the elastic modulus (G') and the storage modulus (G''). Two repeated measures were performed on each of the four cheese blocks.

Statistical analysis

ANOVA was performed on fat, SNF, density, protein, pH and titratable acidity results of milk, and on G' and G'' data to identify statistical differences ($p \leq 0.05$). Fisher's LSD was used for means comparisons. Data were analyzed using SAS version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 resumes the manufacturing parameters of Añejo cheese. The volume of milk processed daily varied from 100 to 500 L. Dairy D, in contrast to dairies A, B and C used commercial rennet. Rennet dosage varied in all dairies. Dairy B presented the lowest time for milk setting from arrival until cheese manufacture, and dairy C presented the shortest coagulation time. All other parameters did not present important differences between dairies.

The physicochemical characteristics of milk used for the manufacture of Añejo cheese are presented in Table 2. All dairies used milk with different composition, pH and acidity. Milk A presented the greatest fat content. Milk samples with greater protein content showed a greater proportion of SNF and higher densities. Although differences in pH and titratable acidity of milk were significant, they were very small and within the normal range for fresh raw milk.

Curves of G' and G'' vs. frequency were obtained for cheese (Figures 1 and 2), and values of G' and G'' were determined within the viscoelastic region, at a strain of 0.01. Both the storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were dependent on frequency, and showed similar tendencies, they presented an almost linear dependence on frequency in the range of 1-100 Hz, as reported for mozzarella cheese by Ak and Gunasekaran (1996). Values of G' were greater than values of G'' within this range of frequencies, this indicated the dominance of the elastic component of cheese, and reflected the typical behavior of a solid viscoelastic material (Ustunol *et al.*, 1995).

Table 1. Manufacturing parameters measured in four dairies during the manufacture of Añejo cheese.

	Dairy			
	A	B	C	D
Volume processed	250 L	100 L	500 L	200 L
Type of rennet	Natural extract	Natural extract	Natural extract	Commercial
Coagulation temperature	29-33 °C	29-32 °C	30 °C	29-30 °C
Milk setting time from arrival until cheese manufacture	1-3 h	15-20 min	3 h	3 h
Rennet dosage	3.7 % (v/v)	1 % (v/v)	4 % (v/v)	2 g/125 L milk
Coagulation time	30-60 min	40-45 min	15 min	45-60 min
Times the curd is cut and drained	2	2	3	3
Duration of curd whey stirring	15 min	15 min	15-20 min	10 min
Kneading time	2-5 min	2-5 min	2-5 min	2-5 min

The dependence of G' and G'' reflects the relaxation of more bonds when the timescale of the applied stress increases (Walstra, 1993). The reduction and destruction, at high frequencies, of the viscous component of the material, dissipating energy in the form of heat; and the deformation of the elastic component, creating highly energetic conformations, presented an almost linear behavior, conferring cheese a predominantly elastic behavior in the range of 1 to 100 Hz. A small inflection was observed in the curves of G' and G'' of cheeses A and C in the range of 20 to 60 Hz, this was probably due to low angular velocities of the molecular adjustments that caused the viscous dissipation and the elastic storage (Ak and Gunasekaran, 1996). Cheese D presented slightly greater values of G' and G'' at higher frequencies, which could be associated to the type of coagulant used, dairy D uses commercial rennet, opposed to the natural and manually prepared rennet used in the other three dairies, the concentration of coagulant enzyme varies among commercial and natural rennet. Differences in G' of cheese have been observed for varying rennet concentrations, higher concentrations influence the rate of proteolysis and confer cheeses with lower G' values (Madadlou *et al.* 2005). Cheese D, elaborated with milk of greatest fat and protein content showed slightly higher values of G' and G'' with increasing frequency. Zhou and Mulvaney (1998) found that higher milk fat contents at temperatures $\leq$ 20 °C increased the complex modulus of rennet casein gels. This was associated to the solid behavior of milk fat at low temperatures, which corresponds to the extensive crosslinking of the casein matrix, allowing it to act as a rigid filler.

Table 2. Composition of milk used for the elaboration of Añejo cheese.

Dairy	A	B	C	D
Fat (%)	2.79^{b}	1.49^{d}	2.51^{c}	3.36^{a}
SNF (%)	8.44^{a}	8.34^{b}	8.23^{c}	8.38^{b}
Density	1.0295^{b}	1.0303^{a}	1.0295^{b}	1.0288^{c}
Protein (%)	3.10^{a}	3.05^{b}	3.02^{c}	3.09^{a}
pH	6.6^{b}	6.7^{a}	6.6^{b}	6.5^{c}
Acidity*	1.60^{c}	1.70^{b}	1.80^{a}	1.70^{b}

SNF = Solids non fat

* mg lactic acid mL^{-1} milk

Means in rows with different superscripts were significantly different ($p \leq 0.05$)

The viscoelastic properties of cheese not only depend on the quantity of casein present, but on the number and force of the bonds between casein particles, the particle structure and the spatial distribution between them (Tunick *et al.*, 2007). These differences may be due to differences in the manufacturing process of Añejo cheese, cheese curd is grinded and kneaded before cheese molding, which does not permit particle fusion and the formation of nets in the same way as non grinded curd and cheddarized curd cheeses, where particles are fused again after cutting of the curd. Additionally, the type of grinder used, which can be manual, electric or a 'metate', influences grain size; and the force used to mold cheese creates a heterogeneous quantity and size of air spaces.

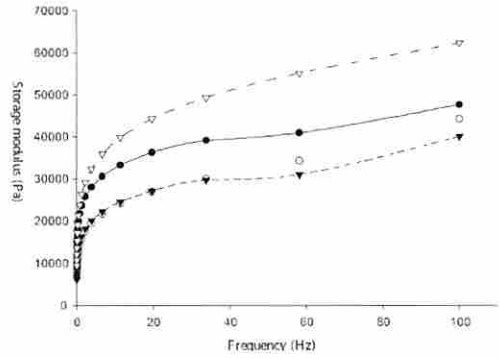


Figure 2. Storage modulus of Añejo cheese: cheese A (●), cheese B (○), cheese C (▼), cheese D (▽).

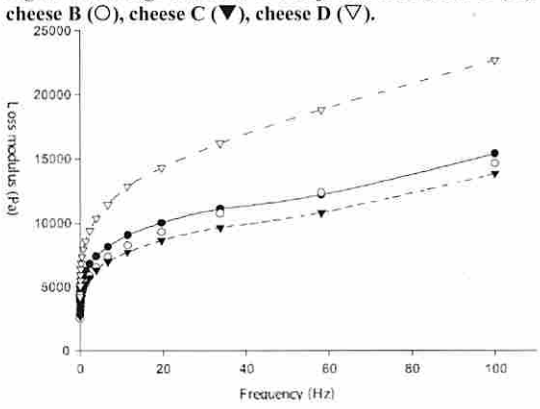


Figure 3. Loss modulus of Añejo cheese: cheese A (●), cheese B (○), cheese C (▼), cheese D (▽).

No significant differences were observed in the values of G' and G'' at a constant strain of 0.01 % and frequency of 1 Hz. Values of G' varied from 14.9 to 24.8 kPa, and values of G'' were in the range of 5.0 to 8.2 kPa. Both G' and G'' of Añejo cheese, presented lower values than those observed for other cheese varieties such as Brick and Cheddar (Tunick and Van Hekken, 2002).

CONCLUSIONS

This work showed that milk composition and manufacturing parameters affected the mechanical spectra of Añejo cheese. Greater contents of milk fat were associated to higher storage and loss moduli values at increasing frequencies. Cheese form dairy D elaborated with commercial rennet showed higher storage modulus values than cheese from dairies A, B and C elaborated with a natural rennet extract. Grinding of cheese curd was associated to the formation of weak nets and poor particle fusion, accounting for differences in the viscoelastic properties of cheese at high frequency values.

REFERENCES

Ak, M.M. and Gunasekaran, S. 1996. Dynamic rheological properties of mozzarella cheese during refrigerated storage. J Food Sci. 61: 566-569.

Bowland, E.L. and Foegeding, E.A. 2001. Small strain oscillatory shear and microstructural analyses of a model processed cheese. J Dairy Sci. 84: 2372-2380.

Brown, J.A., Foegeding, E.A., Daubert, C.R., Drake, M.A., Gumpertz, M. 2003. Relationships among rheological and sensorial properties of cheeses. J Dairy Sci. 86: 3054-3067.

Bugaud, C., Buchin, S., Noël, Y., Tessier, L., Pochet, S., Martin, B., Chamba, J.F. 2001. Relationships between Abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. Lait. 81: 593-607.

Konstance R.P. and Holsinger, V.H. 1992. Development of rheological test methods for cheese. Food Technol. 105-109.

Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, M.E. 2005. Rheology, microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. J Dairy Sci. 88: 3052-3062.

Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, S.M. Djome, Z.E. 2006. Microstructure and rheological properties of Iranian white cheese coagulated at various temperatures. J Dairy Sci. 89: 2359-2364.

Madsen, J.S. and Ardö, Y. 2001. Exploratory study of proteolysis, rheology and sensory properties of Danbo cheese with different fat contents. Int Dairy J. 11: 423-431.

Shoemaker, C.F., Nantz, J., Bonnans, S., Noble, A.C. 1992. Rheological characterization of dairy products. Food Technol. 46: 98-103.

Thaker, P.N., Gangopandhyay, S.K., Miyani, R.V. 1991. Influence of manufacturing parameters on rheology of mozzarella cheese made from buffalo milk. Aust J Dairy Technol. 46: 53-56.

Tunick, M.H. 2000. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. J Dairy Sci. 83: 1892-1898.

Tunick, M.H. and Van Hekken, D.L. 2002. Torsion gelometry of cheese. J Dairy Sci. 85: 2743-2749.

Tunick, M.H., Van Hekken, D., Call, J., Molina-Corral, F.J., Gardea A.A. 2007. Queso Chihuahua: effects of seasonality of cheesemilk on rheology. Int J Dairy Technol. 60: 13-21.

Ustunol, Z., Kawachi, K., Steffe, J. 1995. Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. J Food Sci. 60: 1208-1210.

Walstra, P. 1993. The synerisis of curd. Pages 141-191 In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. General Aspects. 2nd. Edition. Fox, P.F. Chapman and Hall. London.

Zhou, N. and Mulvaney, S.J. 1998. The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. J Dairy Sci. 81: 2561-2571.

LA RELACION TEOBROMINA /CAFEINA ASOCIADA A LA CALIDAD DEL CACAO ECUATORIANO

Espín, Susana; Samaniego, Iván; Wakao, Harue; Jiménez, Juan Carlos
INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD

Casilla 17-01-340. E. mail frrivera@ uio.satnet.net

Palabras claves : cacao, parámetros químicos, metilxantinas, fermentación, teobromina, cafeína

RESUMEN

La finalidad del presente estudio fue la de establecer el contenido y comportamiento de las Metilxantinas: Teobromina y Cafeína en genotipos de cacao ecuatoriano durante la fermentación. Estos componentes dependen del genotipo y están asociados con la formación de los precursores del sabor y aroma durante la fermentación del cacao.
La relación Teobromina vs Cafeína (T/C), evidenció su asociación con el origen genético y geográfico de los cacaos, siendo un importante parámetro de calidad para diferenciar cacao fino del ordinario, factible al comparar los valores obtenidos en materiales Criollos de Venezuela y Forastero procedente de Ghana, utilizados como materiales de referencia.
La identificación y cuantificación simultánea de los compuestos, se realizó utilizando Cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC), en muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación (1 a 6 días)
El proceso de fermentación se realizó bajo condiciones similares para todos los materiales estudiados.

INTRODUCCIÓN

El cacao desde hace más de un siglo, es uno de los productos de consumo más importantes negociado en los mercados internacionales, siendo los países industrializados de las regiones templadas los mayores consumidores. Actualmente existen mercados en desarrollo en otras regiones, particularmente en Asia, Europa Oriental y Latinoamérica.
Desde hace varias décadas, el mercado internacional del cacao ha establecido distinción entre dos amplias categorías de almendras de cacao: las de "Sabor Fino" y "Corriente u Ordinario". Las almendras de cacao de Sabor Fino provienen de los tipos del árbol de cacao Criollo o Trinitario, mientras las segundas se derivan del cacao Forastero. Aún así, hay excepciones a esta generalización. Esto ha hecho que en los últimos años y especialmente en Europa, la demanda industrial de cacao se haya desplazado parcialmente hacia lotes de calidad aromática superior. Sin embargo, obtener cacao de alta calidad exige que se cumpla con una serie de requisitos que se inician con la selección del lugar de siembra y los suelos que lo caracterizan, hasta la aplicación de una tecnología post cosecha adecuada y precisa. Esta calidad se manifiesta a través de las características físicas, organolépticas y químicas de las almendras, siendo estas últimas atributos propios del tipo de cacao o desarrolladas fundamentalmente durante el proceso de fermentación, secado y torrefacción. Dichas características químicas proporcionan información cuantitativa que permiten evaluar el beneficio post cosecha del cacao y caracterizar los diferentes tipos de cacao, pudiendo ser utilizadas como un criterio para evaluar su calidad y diferenciar entre cacaos. De este modo, cada vez se disponen de más criterios objetivos aceptados de calidad para la clasificación del cacao, con la perspectiva futura de seleccionar estándares, diseñar sistemas de control de la calidad del cacao, y transparentar el mercado internacional.

La teobromina y la cafeína constituyen más del 99% del contenido de purinas en la especie Theobroma cacao, casi todo el remanente son trazas de teofilina y salsolinol. Estos alcaloides no revelan transformaciones químicas durante la fermentación, pero pierden alrededor del 20 % de la teobromina presente en los cotiledones frescos en el curso de la fermentación por difusión en los tejidos y migración a los tegumentos de las almendras cuyo contenido aumenta considerablemente. Esta pérdida de teobromina es en gran parte responsable de la disminución del amargor de las almendras "bien fermentadas" y es por tanto, responsable del sabor relativamente menos amargo del cacao Criollo que presenta un contenido menor de esta base púrica. (Wakao, 2002). El genotipo y la madurez de la semilla afectan el contenido de alcaloides del cacao.

Biehl y Voight, (1996) aseveran que la astringencia en los granos de cacao es causada por polifenoles y que el sabor amargo es causado por la sinergia de las reacciones entre la teobromina, cafeína y las dicetopiperazinas. Además, la teobromina (3-7-dimetilxantina) y la cafeína (1-3-7-trimetilxantina) estarían más o menos ligadas a los taninos para formar en los cotiledones frescos compuestos complejos relacionados con los atributos de sabor del cacao (Wakao, 2002).

Chevalley en 1976, dio los primeros indicios de que la relación Teobromina / Cafeína (T/C), puede variar de una especie a otra y discriminar el cacao por su origen. Cacaos procedentes de Africa presentaron menores contenidos de cafeína en relación a los cacaos finos originarios de América con valores de la relación T/C de 39 y de aproximadamente 6 para cacaos producidos en Venezuela, Trinidad y Ecuador.

El presente estudio, a través de la determinación del contenido de teobromina y cafeína, así como mediante el establecimiento de la relación Teobromina/Cafeína (T/C), ha caracterizado varios genotipos de cacao producido en el Ecuador, y determinado un rango de 3,2 a 6,9 de la relación T/C La relación de estos valores respecto a las muestras referenciales de cacao forastero procedente de Ghana que alcanzó valores de la relación T/C superiores a 10, y de los cacaos criollos producidos en Venezuela que presentaron valores iguales o inferiores a 2 ubican al cacao ecuatoriano dentro del grupo de los cacaos Trinitarios.

Se registran valores expresados en porcentaje de 2,16 ± 0,24 para teobromina y 0,38 ± 0,04 de cafeína en cacaos procedente de fincas comerciales, mientras que 2,25 ± 0,22 de teobromina y 0,44 ± 0,06 de cafeína corresponden a los clones locales de cacao fino. La muestra referencial de Ghana enviada por la Guittard Chocolate Company de USA, durante tres años consecutivos, registró un valor medio de 2,45% de teobromina, 0,25% de cafeína y 9,91 como valor de la relación teobromina /cafeína.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales en estudio se agruparon de la siguiente manera:

a) Muestras de cacao Nacional, provenientes de fincas comerciales: Voluntad de Dios (Provincia del Guayas), Santa Lucía (Provincia de Bolívar), La Gloria y las Brisas (Provincia de Manabí)

b) Genotipos de cacao fino de las colectas existentes en la Estación Experimental Tropical de Pichilingue del INIAP (Provincia de los Rios): EET-62, EET103, EET95, CCAT 1119, CCAT 4675, CCAT 2664

c) Otros clones de cacao: EET400, IMC 67, ICS-95 y el CCN51

d) Muestras referenciales: Cacao Ordinario procedente de Ghana y proporcionada por la Guittard Chocolate Company de USA y de Cacao Guasare Criollo Venezolano

Todas las muestras fueron sometidas al proceso de fermentación, en la planta de beneficio de la Estación Experimental Tropical de Pichilingue. Se aplicó la técnica de microfermentaciones realizadas en cajas de laurel de 60x60x60 cm de alto, ancho y profundidad respectivamente, con una remoción a las 48 horas. Los días de fermentación establecidos fueron 5 días para el cacao fino y 6 días para los otros clones. Se tomaron muestras cada 24 horas durante el proceso de fermentación aplicable para todos los materiales en estudio. El secado se realizó de manera natural al sol, hasta obtener una humedad de aproximadamente 7 %.

Posteriormente estas muestras fueron remitidas a los laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Santa Catalina en Quito para la ejecución de los análisis químicos respectivos

Preparación de muestras.- Aproximadamente 500g de muestras de almendras de cacao fermentadas, no fermentadas y secas receptadas en el laboratorio, fueron codificadas, homogenizadas y aplicando la técnica del cuarteo se obtuvo una submuestra de 250 g a ser utilizada para los análisis químicos respectivos. El resto de la muestra se la almacenó en recipientes herméticos en un congelador a -18°C.

Posteriormente, las submuestras obtenidas, siguieron el siguiente proceso:

- Separación manual de la cascarilla.
- Molienda de las almendras en un molino de café de doble hélice, utilizando nitrógeno líquido.
- Separación de partículas de 42 y 100 mesh, utilizando un tamiz.
- Desengrasado de muestras.
- Almacenamiento de muestras molidas y desengrasadas en recipientes plásticos y de vidrio respectivamente muy herméticos en un congelador a -18°C, cuando los análisis no fueron posibles ejecutarlos de manera inmediata.

El análisis de la cafeína y teobromina, se realizó extrayendo en medio acuoso los alcaloides de una muestra de cacao previamente molida y desengrasada, posteriormente estos alcaloides fueron separados, identificados y cuantificados a través de un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución Agilent 1100, provisto de una columna de fase reversa C_{18} ODS II (150 x 4,6 mm I.D) precolumna del mismo material (10x 4,6 mm I.D) detector UV/VIS a 273 nm. Una solución del 25% de metanol en agua (v/v) con un flujo de 1 ml / minuto fue utilizada como fase móvil bajo condiciones isocráticas de elusión.
El método utilizado fue previamente estandarizado y validado, con base en los procedimientos descritos en el Método Oficial 980.14 de la AOAC, su modificación realizada por Janick y Paiva, así como en el método definido por Caperos y Girad, del laboratorio Cantonal de Neuchatel –Suiza.

RESULTADOS

Las Figuras 1 y 2 muestran el comportamiento de la cafeína y teobromina durante la fermentación por grupos de cacao. Se observó que existe una disminución del contenido inicial independiente del tipo de cacao estudiado, determinando que los genotipos considerados dentro de la categoría de los clones de cacao fino y los otros clones pierden un 17 % de la concentración de teobromina, mientras que las muestras de cacao provenientes de las fincas comerciales disminuyen un 15%

Respecto a la cafeína se identificó una disminución del 12,69, 14 y 18 % para clones locales de cacao fino, procedentes de fincas comerciales y otros clones.

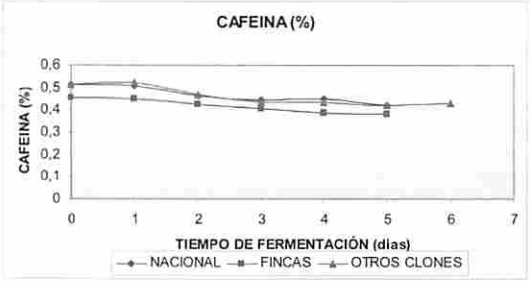


Figura 1. Comportamiento de la cafeína durante la fermentación en cacaos ecuatoriano

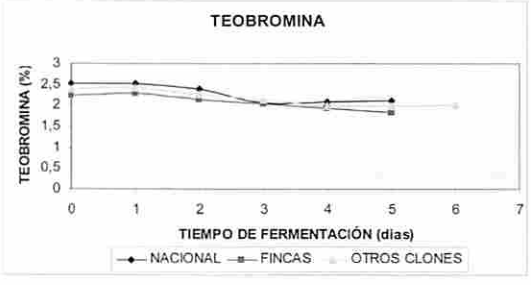


Figura 2. Curvas de evolución de la teobromina durante la fermentación en cacaos ecuatoriano

No se visualiza un patrón de comportamiento que permita discriminar entre tipos de cacao a través de estas variables de manera independiente. El menor contenido de cafeína antes y después de la fermentación registra el clon CCN-51 (0,326%) lo cual es característico de los cacaos Forasteros, mientras que la mayor concentración muestra el clon ICS-95 (0,556%)

Relación Teobromina / Cafeína .

Al establecer el análisis de variancia para la relación Teobromina / Cafeína, (T/C) se identificó que los genotipos se diferenciaron al nivel del 1%, no detectando diferencias estadísticas entre genotipos y tiempos de fermentación. El promedio general de la relación T/C fue de 5,06, con un coeficiente de variación de 14,58%.

Tabla 1. Valores de la relación Teobromina / Cafeína (T/C) en 14 genotipos de cacao ecuatoriano durante la fermentación

Genotipo	Días de fermentación						
	0	1	2	3	4	5	6
EET 95	5,1	5,2	5,2	5,3	5,2	5,2	
EET 103	5,4	5,3	6,1	5,2	5,0	6,0	
EET 62	4,6	4,9	4,9	4,5	4,4	4,4	
CCAT 1119	4,7	5,1	4,8	4,5	5,2	4,9	
CCAT 2664	3,9	4,0	4,0	3,8	3,6	3,6	
CAT 4675	5,7	6,0	6,0	6,1	5,9	5,7	
La Gloria	5,3	5,0	5,0	4,7	4,9	4,9	
Las Brisas	4,5	4,6	4,6	4,7	4,4	4,4	
Vol.de Dios	4,7	5,1	4,9	4,9	4,9	5,0	
Santa Lucía	5,4	5,6	5,8	5,7	5,6	5,6	
IMC 67	5,5	5,0	5,1	5,3	5,1	5,3	5,2
ICS 95	3,2	3,3	3,5	3,7	3,4	3,4	3,5
EET 400	4,5	4,4	4,7	4,7	4,5	4,7	4,6
CCN 51	6,7	7,0	7,2	6,8	6,7	6,7	6,9

Los valores registrados en el Cuadro 1, indican que la relación T/C de los materiales cultivados en el Ecuador, se distribuyen en el rango de 3,2 a 6,9 cuyos valores extremos corresponden a los cacaos ICS 95 y CCN51 respectivamente. Al relacionar los orígenes de estos materiales, se conoce que el primero dispone de una base genética que le acerca a los cacaos Criollos mientras que el segundo muestra sus orígenes de cacao Forastero; esta particularidad constituye la base de la importancia de los valores de la relación T/C como un instrumento para diferenciar cacaos por el origen y factible entre cacao fino del ordinario. De igual manera, los valores referenciales de la relación T/C obtenidos en el desarrollo del presente estudio en cacaos ordinarios procedentes de Ghana cercanos a 10 y de cacaos criollos procedentes de Venezuela iguales o menores a 2, indican que la mayor parte del cacao ecuatoriano se ubica dentro de un grupo intermedio, como resultado de la mezcla o hibridación del cacao Nacional con otros materiales genéticos.

Según Davrieux y Cros 2004, acorde al rango determinado de la T/C en cacaos ecuatorianos, estos se ubican en el grupo de los cacaos Trinitarios .

La Figura 3, incorpora datos correspondientes a cacao criollo venezolano y la muestra de referencia proveniente de Ghana, observando claramente la dispersión de los valores de la relación T/C de estos materiales, respecto al conjunto de materiales provenientes del Ecuador, también se advierte como la concentración de la cafeína es determinante en la definición del valor de la relación T/C,

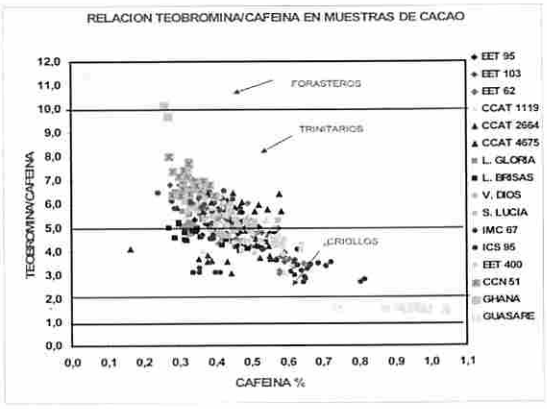


Figura 3. Distribución de los genotipos de cacao en relación al contenido de metil xantinas

CONCLUSIONES

En vista de que las concentraciones de las metilxantinas, teobromina y cafeína no permiten diferenciar entre tipos de cacaos, se determinó la relación Teobromina/Cafeína (T/C) cuyos valores se muestran constantes durante el proceso de fermentación, lo que permite hacer uso de la misma en cualquier etapa del proceso post cosecha del cacao. Además es útil para discrimar cacao por su origen, teniendo como base el contenido de cafeína que varía de acuerdo al genotipo, siendo alto en cacaos criollos, 1,58% determinado en cacao Guasare de Venezuela, y bajo para el caso del cacao ordinario proveniente de Ghana con 0,26% mientras que los cacaos ecuatorianos presentan un valor medio de 0,41% de cafeína; esto determina que los cacaos criollos presenten valores bajos de la relación T/C a diferencia de los cacaos ordinarios o forasteros que presentan valores iguales o superiores a 10.

El cacao ecuatoriano despliega valores de la relación T/C en un rango de 3 a 7 aproximadamente, dependiendo del grado de hibridación o mezcla que presente. El cacao CCN51 presentó el valor más alto (6,9) particular que le diferencia de los clones de cacao fino de aroma

AGRADECIMIENTOS.

Nuestros reconocimientos al Common Fund for Comodities de la Unión Europea, por el financiamiento de esta actividad parte del Proyecto CFC/ICCO/006. Al Dr. Edwars Segwine de la Guittard Chocolate Company de USA y al Lcdo. Alexis Zambrano del INIA, Mérida, Venezuela, por el envío de muestras referenciales.

BIBLIOGRAFÍA

-Biehl, B., Voigt, J. 1996. Biochemistry of chocolate flavour precursors. International Cocoa Research Conference, 2thBahia november 17-23. 1996. (proceedings). Pp. 929-938.

-Bucheli, P, Rosseau, G., Alvarez, M., Laloi., Mccarthy, J. 2001. Development Variation of Sugars, Carboxylic Acids, Purine Alkaloids, fatty Acids, and Endoproteinase Activity during maturation of *Theobroma* cacao L. Seeds. Journal of Agriculture Food Chemical. Francia. 49 (10): 5046-5051.

Caperos, J, et Girard, J. 2000. Manuel assurance qualité, "Dosage des sucres par HPLC , Laboratoire Cantonal Neuchatel, Suiza

-Cros, E.2000. Factores condicionantes de la calidad del cacao. Congreso Venezolano del Cacao y su industria, 1er. Maracay,. (memoria). Pp. 301-310.

-Chevalley, J; 1991. Theobromine and caffeine content of cocoa beans from different botanical and geographical origins,Second Internacional Congreso on cocoa and chocolat. Munich.Nestea LTD. Agricultural Services. p.31-32

-Davrieux, F; Assemat, S; Boulanger, R; Cros, E. 2004. Determinación of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. XIV International conference of investigation of cocoa. Ghana , Poster presentation

-Espín, S. y Wakao, H. 2001. Analysis of caffeine, theobromine and theophyline in cocoa beans by HPLC UV detector. Procedures for chemical analysis homologation. Procedimiento Normalizado.Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad. Quito, Ecuador

-Enriquez, G. 1982. La cura o beneficio del cacao. Boletín Divulgativo del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Ecuador Pp. 96.

- Jean Jean,N. "Influence du genotype, de la fermentation et de la torrefaction duo le developpment de l'arome cacao" These pour obtener le diplome de Doctorat. Universite Mompellier II Sciencies et Technicus du languedoc, , p. 144.

- Wakao, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma* cacao L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio, Tesis: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito.

APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES AL ACEITE DE MAÍZ Y SUS EMULSIONES EN AGUA

Maureira Gómez Yael, Janczuk Lidia, Della Rocca Patricia*

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA FACULTAD REGIONAL BUENOS AIRES DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL.

Medrano 951, (C1179AAQ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

****patriciadellarocca@hotmail.com***

Palabras claves: propiedades químicas y bioquímicas, antioxidantes naturales, extracto de ajo, oxidación lipídica, aceites y emulsiones

RESUMEN

El propósito del trabajo fue determinar la acción antioxidante del extracto etanólico de ajo en la oxidación de un aceite comestible (aceite de maíz) y sus emulsiones en agua. Se llevaron a cabo ensayos de oxidación que consistieron en el almacenamiento en condiciones estáticas de las muestras en estufa a una temperatura de 60 ± 0.5°C. A distintos intervalos de tiempo se evaluó el grado de oxidación mediante la determinación del índice de peróxido, según AOCS (1997). Se comparó el comportamiento del antioxidante natural con un antioxidante sintético, el 2,6-di-ter-butil-4-hidroxitolueno (BHT) y también se analizó la oxidación de las muestras de aceite y sus emulsiones sin la adición de antioxidantes. Asimismo, se caracterizó el aceite utilizado al que se le determinó su composición en ácidos grasos por cromatografía gaseosa y se determinó si tenía el agregado de algún antioxidante por HPLC. Varios componentes del extracto de ajo son los responsables de su capacidad antioxidante, entre ellos los compuestos fenólicos. Éstos se midieron por métodos espectrofotométricos.

El aceite de maíz se oxida más rápidamente que sus emulsiones en agua. Al analizar la oxidación del aceite de maíz, el extracto de ajo resultó ser más efectivo como antioxidante que el BHT. El extracto etanólico de ajo que posee componentes con actividad antioxidante de naturaleza hidrofílica como los compuestos fenólicos y algunos compuestos sulfurados se concentran en la superficie interfasial aire-aceite actuando como barrera ante el oxígeno. Sin embargo, en las emulsiones del aceite en agua se puede apreciar que los antioxidantes de naturaleza más lipofílica como el BHT son más efectivos frente a la oxidación lipídica y esta eficiencia denota ser superior en emulsiones con concentraciones de aceite en agua inferiores. En este caso el antioxidante lipofílico se sitúa en la interfase aceite-agua protegiendo los glóbulos de grasa de la emulsión.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la oxidación de los aceites comestibles y de las emulsiones de estos aceites en agua que constituyen alimentos tales como leches, mayonesas, sopas, salsas y aliños para ensaladas tiene como principal objetivo evitar el desarrollo de rancidez (olores y sabores desagradables) y la disminución en la calidad nutricional del producto por formación de productos secundarios indeseables. La oxidación se lleva a cabo a través de una serie de reacciones en cadena que generan la formación de radicales libres y pueden tener lugar durante el almacenamiento, la cocción o el procesado. Estas reacciones que intervienen en la oxidación de los lípidos son extremadamente complejas (Chan, 1987). Para su estudio se pueden subdividir en tres etapas, conocidas cada una de ellas como: iniciación, propagación y terminación. Por la acción del calor, la luz o la presencia de cationes metálicos, en la etapa de iniciación se produce la ruptura homolítica de la molécula de un ácido graso no saturado o su éster dando origen a la formación de un radical libre alquílico, R•. En la fase de propagación, este radical reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peroxi, ROO•, el cuál a su vez reacciona con otras moléculas de lípidos no saturados para formar hidroperóxidos, ROOH y más radicales lipídicos, R•. Los hidroperóxidos pueden descomponerse en otros radicales peroxi, ROO• y radicales alcoxi, RO• que luego darán lugar a la generación de nuevos radicales libres lipídicos, R• y más hidroperóxidos. Cabe resaltar que la descomposición de los hidroperóxidos puede ser catalizada por metales presentes en el medio, M^{n+}, $M^{(n+1)+}$. Durante la fase de terminación se unen los radicales libres entre sí. Como la velocidad de reacción entre un radical alquílico y el oxígeno es muy rápida, la mayoría de los radicales libres son radicales peroxi, ROO•. Entonces, el principal producto obtenido en la etapa de terminación es el obtenido a partir de la unión de dos radicales peroxi (reacción 10).

Etapa de iniciación:

(1) RH $\rightarrow$ R• + H• (luz, calor, cationes metálicos)

(2) 2 ROOH $\rightarrow$ ROO• +RO• + H_2O

(3) ROOH + M^{n+} $\rightarrow$ RO• + $M^{(n+1)+}$ + OH•

(4) ROOH + $M^{(n-1)+}$ $\rightarrow$ ROO• + M^{n+} + H^+

Etapa de propagación

(5) R • + O_2 $\rightarrow$ ROO•

(6) ROO• + RH $\rightarrow$ ROOH + R•

(7) RO• + RH $\rightarrow$ ROH + R•

Etapa de terminación

(8) R• + R• $\rightarrow$ 2R

(9) R • + ROO• $\rightarrow$ ROOR

(10) ROO• + ROO• $\rightarrow$ ROOR + O_2

Uno de los métodos para controlar la oxidación es el agregado de sustancias antioxidantes. Estas retrasan o inhiben la aparición de los fenómenos de oxidación manteniendo intactas las características sensoriales y prolongando la vida útil del producto. Los antioxidantes pueden actuar de varias formas: capturando radicales libres, descomponiendo peróxidos o como agentes quelantes de metales. Algunos antioxidantes pueden actuar en más de una forma a la vez (Moure et al, 2000). Actualmente cada vez es mayor la preferencia por el uso de antioxidantes naturales aunque muchos de ellos han sido usados desde la antigüedad. Numerosos estudios recientes han comprobado que varios de estos antioxidantes naturales contribuyen también a la inhibición de las reacciones de oxidación que se producen en nuestro organismo y que suelen ser las responsables de enfermedades crónicas entre ellas cardiovasculares, inmunológicas, inflamatorias, alérgicas, neurodegenerativas, etc y de los procesos de envejecimiento. Muchos extractos de especies vegetales han demostrado un considerable efecto de estabilización de los lípidos ante las reacciones de oxidación y tienen un gran potencial comercial como fuente de nutraceúticos o ingredientes de alimentos funcionales (Shui G. y Leong L., 2006). Antioxidantes con importante actividad han sido encontrados en berries (Abuja et al., 1998; Heinomen et al., 1998; Prior et al., 1998), cerezas (Wang et al., 1999), cítricos (Saleh et al., 1998), kiwis (Dawes y Keene, 1999), olivos (Romani et al., 1999), chauchas de cacao (Sanbongi et al., 1998), papas (Al-Saikhan et al., 1995; Friedman, 1997), tomates (Abushita et al, 1997), espinaca (Gil et al., 1999), ajo (Auroma et al, 1997) y legumbres (Ganthavorn y Hughes, 1997; Tsuda et al., 1994). La mayoría de las especias como el pimentón (Markus et al., 1999), el orégano y el jengibre (Kikuzaki y Nakatani, 1989) así como también el romero (Hall y Cuppett, 1998) poseen importantes propiedades antioxidantes. La protección antioxidante proveniente de las frutas y los vegetales ha sido atribuida a numerosos y variados compuestos que las integran, entre ellos: vitaminas C y E, tocoferoles, carotenos y compuestos fenólicos (Abushita et al., 1997).

El ajo cuyo nombre botánico es Allium sativum L. es una de las hortalizas frescas de mayor exportación en la Argentina. El término allium procede de la palabra celta all, que significa ardiente o caliente y sativum es un término latino cuyo significado es cultivado. Las principales regiones productoras son Mendoza (aproximadamente 80 % de la producción nacional), San Juan, sur de la provincia de Buenos Aires y el Noroeste Argentino (NOA). San Juan y Mendoza poseen características agroecológicas óptimas para producir y secar ajo que facilitan la inserción del producto en el mercado de exportación (M.Barembaum y M. di Paola, 2006).

El propósito del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de ajo frente a un aceite comestible (aceite de maíz) y a sus emulsiones en agua (al 10 % m/m y al 50 % m/m). Los resultados obtenidos se compararon con los alcanzados utilizando un antioxidante sintético, el butilhidroxitolueno (BHT), de naturaleza lipofílica, en una concentración de 0.01%.

Los antioxidantes en los sistemas lipídicos multifásicos exhiben diferentes afinidades por las interfases aire-aceite y aceite-agua según la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los mismos (Frankel, 1994, 1996). Porter (1980, 1983) y Porter et al. (1989) observaron que en sistemas lipídicos donde la relación superficie volumen es pequeña como en el caso de los aceites los antioxidantes hidrofílicos (polares) son más efectivos que los antioxidantes lipofílicos (no polares). En contraste, estos últimos, en los alimentos con altas relaciones superficie volumen como en las emulsiones de aceite en agua resultan ser más efectivos. Según Frankel, este comportamiento se atribuye a que en los aceites los antioxidantes hidrofílicos se orientan en la interfase aire-aceite y protegen de la oxidación mejor que uno de naturaleza lipofílica que tiende a permanecer en el aceite. En el caso de las emulsiones de aceite en agua los antioxidantes lipofílicos son suficientemente tensioactivos para orientarse hacia la interfase aceite-agua y proteger al aceite emulsionado de su oxidación mejor que un antioxidante hidrofílico que se disolvería en la fase acuosa y estaría lo suficentemente diluído para no proteger eficazmente el aceite emulsionado. En la Figura 1 se esquematiza este fenómeno conocido como paradoja polar .

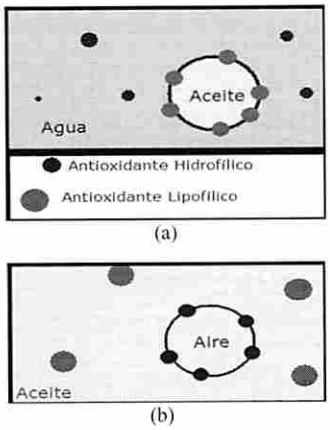


Figura 1. Fenómeno interfasial que explica la acción de los antioxidantes en sistemas lipídicos según su naturaleza hidrofílica o lipofílica a) emulsión aceite en agua b) aceite

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de ácidos grasos del aceite original

Se realizó la hidrólisis de los triglicéridos del aceite, y luego la metilación para finalizar con la extracción y el purificado según Norma IRAM 5652.

Los ésteres metílicos así obtenidos se analizaron en un cromatógrafo de gases marca Shimadzu con detector FID.

Determinación de antioxidantes en el aceite original empleado en los ensayos de oxidación

Se analizó si el aceite original poseía antioxidantes adicionados. Se llevó a cabo el análisis por HPLC (marca Hewlett Packard 1050) según AOCS Official Method Ce 6-86 empleando una columna LiChrosorb RP-18 y un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 280 nm.

Preparación del extracto: El ajo molido se tamizó hasta alcanzar un diámetro de partícula inferior a 400 µm. y posteriormente se secó en estufa a 55 °C. El solvente de extracción fue etanol al 96°. El extracto de ajo se preparó en una concentración inicial de 25% m/m, luego se llevó a cabo un almacenamiento en condiciones de agitación intermitente a una temperatura de 45° C durante una semana. Finalmente, se procedió a la filtración y concentración de la solución con una bomba de vacío, a temperatura ambiente, hasta alcanzar una concentración tres veces superior.

Preparación de las emulsiones: El agente emulsionante fue Tween 20, un monoéster de polioxietilensorbitano. Se prepararon dos emulsiones de aceite en agua, una al 10 % m/m y la otra al 50% m/m.

Ensayos de oxidación

Al aceite de maíz y a las emulsiones (10 % y 50% m/m) se agregó el extracto de ajo en una concentración 20 % m/m. Asimismo, se analizaron muestras control sin la adición de antioxidante y muestras conteniendo el antioxidante sintético, butilhidroxitolueno (BHT) en una concentración de 0.01 %, con fines comparativos.

Las muestras fueron almacenadas en frascos color caramelo en condiciones estáticas en estufa a una temperatura de 60 ± 0.5°C y a distintos intervalos de tiempo se evaluó su grado de oxidación mediante la determinación del índice de peróxido, según AOCS (1997). Los análisis se llevaron a cabo por duplicado y los resultados obtenidos corresponden al promedio de las determinaciones.

Determinación de compuestos fenólicos totales

Se tomó una alícuota de extracto de 20µl y se adicionó agua destilada hasta alcanzar 1 ml. Luego, 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteau se adicionó a los tubos y se agitaron. A continuación se agregó carbonato de sodio (Na_2CO_3) y los tubos fueron agitados nuevamente. Después de ser incubados a temperatura ambiente durante 35 min, los tubos fueron centrifugados y se midió la absorbancia contra un blanco a 725 nm utilizando un espectrofotómetro marca Metrolab. Los resultados se informaron con base al equivalente de fenol por gramo de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del aceite de maíz

Los resultados obtenidos al analizar la composición de los ácidos grasos en el aceite de maíz por cromatografía gaseosa se presentan en la Tabla 1.

Tabla1. Composición porcentual en ácidos grasos del aceite de maíz

ÁCIDO PALMÍTICO	10.5
ÁCIDO ESTEÁRICO	2.5
ÁCIDO OLEICO	32.5
ÁCIDO LINOLEICO	52.0
ÁCIDO LINOLÉNICO	1.0
ÁCIDO ARAQUÍDICO	0.5

El análisis por HPLC realizado al aceite original comprobó la ausencia de antioxidantes agregados al mismo.

Ensayos de oxidación

En los ensayos de oxidación del aceite de maíz, el extracto de ajo demostró poseer una capacidad antioxidante significativamente superior que el BHT en las concentraciones analizadas. Estos resultados se aprecian en la Figura 2. Varios constituyentes del ajo actúan como antioxidantes, entre ellos algunos compuestos sulfurados y compuestos fenólicos. El contenido de estos últimos en el extracto fue de 3099 ppm. Al comparar este resultado con el obtenido en otros extractos vegetales podemos afirmar que se trata de un valor muy significativo

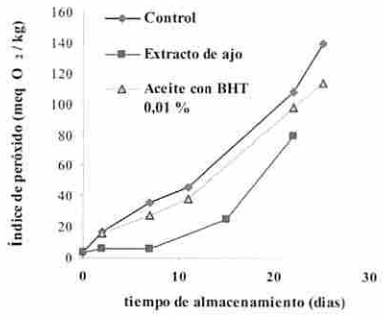


Figura 2. Índice de peróxido (miliequivalentes de oxígeno por kg de muestra, meq O_2/kg) del aceite de maíz, muestra control sin el agregado de antioxidantes, muestra con extracto etanólico de ajo y muestra con BHT al 0.01 %

En la Figura 3 correspondiente a los ensayos de oxidación con la emulsión de aceite en agua al 10 % m/m se puede inferir un comportamiento aproximadamente similar ante la oxidación de las muestras conteniendo el antioxidante natural (extracto de ajo) y el antioxidante sintético (BHT) ya que ambas curvas de oxidación se hallan prácticamente superpuestas hasta los 38 días. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos para la emulsión de aceite en agua al 50% m/m. Aproximadamente transcurridos 30 días de almacenamiento, la curva correspondiente a las muestra con extracto de ajo evidencia una capacidad antioxidante levemente superior a la del BHT.

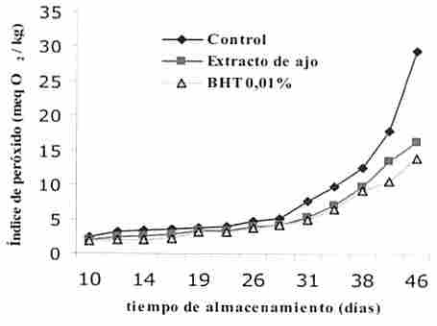


Figura 3. Índice de peróxido (miliequivalentes de oxígeno por kg de muestra, meq O_2/kg) de la emulsión de aceite de maíz en agua al 10 % m/m, muestra control: emulsión sin el agregado de antioxidantes, muestra con extracto etanólico de ajo y muestra con BHT al 0.01 %

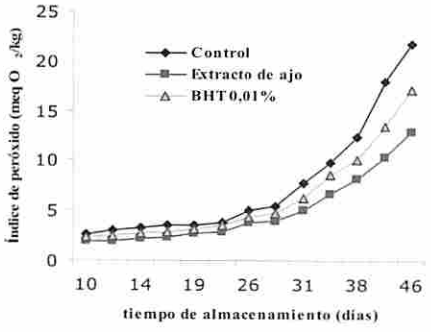


Figura 4. Índice de peróxido (miliequivalentes de oxígeno por kg de muestra, meq O_2/kg) de la emulsión de aceite de maíz en agua al 50 % m/m, muestra control: emulsión sin el agregado de antioxidantes, muestra con extracto etanólico de ajo y muestra con BHT al 0.01 %

Si se compara la oxidación del aceite y de las emulsiones en el tiempo se evidencia que el aceite se oxida más rápido que las emulsiones de aceite en agua ya que en estas últimas el oxígeno debe difundir en el agua para alcanzar los glóbulos de aceite además de difundir en el aire que queda en la cabeza superior del frasco. En los ensayos de oxidación con el aceite sólo tenemos que considerar esta última difusión. También hay que tener en cuenta que la difusión del oxígeno en el agua se lleva a cabo con más lentitud que en el aire. En consecuencia, la velocidad global del proceso de oxidación en la emulsión es más lenta que en el aceite. Tal como Marcuse y Fredriksson, 1968 lo habían resaltado, a baja presión de oxígeno la etapa limitante de la oxidación lipídica es la difusión del oxígeno a través de la fase acuosa. Asimismo, el que el oxígeno sea 3 veces más soluble en aceite que en agua contribuye a la mayor velocidad de oxidación del aceite

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede inferir que al analizar la oxidación del aceite de maíz, el extracto de ajo que posee componentes con actividad antioxidante de naturaleza hidrofílica como los compuestos fenólicos y algunos compuestos sulfurados se concentran en la superficie interfasial aire-aceite actuando como barrera ante el oxígeno. En cambio, en las emulsiones, los antioxidantes de naturaleza más lipofílica como el 2,6-di-ter-butil-4-hidroxitolueno (BHT) resultan ser más efectivos frente a la oxidación lipídica y esta eficiencia denota ser superior en emulsiones con concentraciones de aceite en agua inferiores. Además, tal como lo señala Huang et al., 1997, las bajas actividades de los antioxidantes hidrofílicos en las emulsiones puede atribuirse no sólo a su afinidad por la fase acuosa sino también a su afinidad por las micelas de Tween 20.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Ingeniería Química y a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Facultad Regional Buenos Aires de la Universidad Tecnológica Nacional por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS

Abuja, P.; Murkovic, M.; Pfanhauser, W. 1998. J. Agric.and Food Chem., 46,4091-96.
Abushita, A.., Hebshi, E., Biacs, P. 1997. Food Chem., 60, 207-212.
Al-Saikhan, M; Howard, L.; Miller, J. 1995. J. Food Science, 60, 341-343.
AOCS. 1997. American Oil Chemists' Society
Aruoma, O. I., Spencer, J., Warren, D., Jenner, P., Butler, J. y Halliwell, B., (1997). Food Chemistry, 60, 149-156.
Barembaum, M y di Paola, M. 2006. Apuntes Agroeconómicos, FAUBA.
Chan, H., 1987., In Autooxidation of Unsaturated Lipids; Chan H. Ed., Academic Press, London, U.K., 1-16
Dawes, H.; Keene, J., 1999. J. Agric. and Food Chem.,47, 2398-2403.
Frankel, E., Huang, S., Kanner, J., German. J., 1994., J. Agric. and Food Chem., 42, 1054-1059.
Frankel, E., Huang, S., Aeschbach, R. y Prior, E.,1996. J. Agric. Food Chem., 44, 131-135.
Frankel, E. 1996. Food Chemistry, 57, (1), 51-55
Friedman, M.,1997. J. Agric. and Food Chem., 45, 1523-1540.
Ganthavorn, C. y Hughes, J. 1997. J. Amer. Oil Chem. Soc., 74, 1025-1030.
Gil, M., Holcroft, D. y Kader, A. 1997. J. Agric. Food Chem., 45, 1662-1667.
Hall, C., Cuppett, S., Dussault, P.,1998. J. Am.Oil Chem. Soc., 75, 1147-1154.
Heinomen, M., Lehtonen, P, Hopia, A. 1998. J. Agric. Food Chem., 46, 25-31.
Huang, S. y Frankel, E. 1997. J. Agric. Food Chem, 45, 3033-3038.
Kikuzaki, H, Nakatami, N., 1993. J. Food Sci., 58, 1407-1410.
Marcuse, R., Fredriksson, P.1968 J.Amer.Oil Chem. Soc.,45, 400-407.
Markus, F., Daood, H., Kapitán, J., Biacs, P., 1999, J.Agric.Food Chem., 47, 100-107.
Moure, A., Cruz, J., Franco, D., Dominguez, J., Sineiro, J, Dominguez, H., Nuñez, M., Parajó, J. 2001. Food Chem. 72, 145-171.
Porter, W. 1980. Recent Trends in food applications of antioxidants, In Autoxidation in Food and Biological Systems, eds M.G. Simic & M. Karel. Plenum Press, New York, 295-365.
Porter, W. 1983. Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems, In Antioxidants: Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects, ed. G. Williams. Princeton Scientific, Princeton, New Jersey, 93-122.
Porter, W., Drolet, A.1989. J. Agric. and F. Chem., 37, 615-624.
Prior, L., Cao, G., Martin, A., soffic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C. 1998. J. Agric. Food Chem., 45, 2686-2693.
Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. y Cimato, A. 1999. J. Agric. Food Chem., 47, 964-967.
Saleh, M., Hashem, F., Glombitza, K.1998. Food Chemistry, 63, 397-400.
Sanbongi, C., OSakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., Osawa, T. 1998., J. Agric. Food Chem., 46, 454-457.
Shui G., Leong L.. 2006. Food Chem., 97, 277-284.
Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Yamamoto, A., Kawakishi, S., Osawa, T. 1994. J Agric and Food Chem., 42, 2671-2674.
Wang, H., Nair, M., Strasburg, G., Gray, J. 1999. J.Nat.Produc., 62, 294.

EVALUATION OF MULTIVARIATE CLASSIFICATION AND VARIABLE SELECTION FOR THE DISTINCTION OF CACHAÇA AND RUM SAMPLES

Todeschini, Roberto[1*]; Ballabio, Davide[1]; Rojas, Cristian[2]; Manganaro, Alberto[1]; Mauri, Andrea[1]; Consonni, Viviana[1] and Tripaldi, Piero[2]

[1] Milano Chemometrics and QSAR Research Group, University of Milano-Bicocca, Milano, Italy
http://www.disat.unimib.it/chm/

[2] Faculty of Science and Technology, University of Azuay, Cuenca, Ecuador

[*] Corresponding author: roberto.todeschini@unimib.it

Keywords: chemical properties, Wilks' lambda, multivariate classification, cachaça, rum

SUMMARY

Cachaça is produced from simple distillation of fermented sugarcane juice. Even if it is a typical Brazilian beverage, cachaça is sometime confused with rum, that is a sugarcane spirit obtained by the distillation of cooked fermented sugar cane juice and molasses. Since both beverages were expected to exhibit differences in their chemical composition, analytical data of cachaça and rum samples were analysed by Cardoso et. al. [1] by means of multivariate methods and provided a good discrimination between the two classes of beverages.

By considering the same dataset published by Cardoso et al. [1], we have applied new multivariate classification techniques in order to improve the classification performances and find the chemical parameters that better discriminate cachaça and rum. Wilks' lambda has been applied for the selection of optimal subset of chemical parameters and coupled with the following classification methods: Linear Discriminant Analysis (LDA), Quadratic Discriminant Analysis (QDA), Soft Independent Model of Class Analogy (SIMCA), Classification And Influence Matrix Analysis (CAIMAN) and Classification And Regression Trees (CART). Results confirmed the goodness of Wilks' lambda as selection method, since the two considered classes can be perfectly discriminated by just using two of the original variables.

INTRODUCTION

Cachaça is the most popular distilled beverage in Brazil and is produced from the distillation of fermented sugarcane juice. Despite this, due to the internationalization of cachaça, some confusion over rum and cachaça identities has arisen, even if rum is a sugarcane spirit obtained by the distillation of cooked fermented sugar cane juice and molasses. Great improvements have been made regarding the knowledge of cachaça's chemical composition [1] and, since both beverages were expected to exhibit differences in the chemical composition, analytical data of different compounds were obtained providing a good discrimination between the two classes of beverages by means of multivariate classification [1, 2].

Classification is one of the basic methodologies in chemometrics and consists in building a mathematical model able to evaluate the membership of a sample to its class. Once a classification model has been obtained, the membership of new objects can be predicted.

By using the data produced and published by Cardoso et al. [1], we have applied new multivariate classification methods, coupled with variable selection techniques, in order to improve the classification and discrimination results and select the chemical factors that better discriminate cachaça and rum. Among the chemometric methods applied in this work, there are: Linear Discriminant Analysis (LDA), Quadratic Discriminant Analysis (QDA), Soft Independent Model of Class Analogy (SIMCA), Classification And Influence Matrix Analysis (CAIMAN) and Classification And Regression Trees (CART), while the selection of optimal subsets of variables have been made by means of Wilks' lambda.

MATERIAL AND METHODS

Data.

In this study, the data produced by Cardoso et. al. [1] has been analysed: 22 samples of cachaça (18 in training set and 4 in test set), produced in Brazil, and 23 samples of rum (21 in training set and 2 in test set), produced in different countries, have been measured by means of seven chemical parameters (propanol, isobutanol, isopentanol, manganese, magnesium, copper and protocatechuic acid).

Variable selection.

The best subsets of variables for separating groups has been found by using Wilks' lambda, which is defined as:

$$\Lambda = \frac{|\mathbf{W}|}{|\mathbf{B}+\mathbf{W}|} = \frac{\left|\sum_{g=1}^{G}(n_g - 1)\cdot S_g\right|}{|(n-1)\cdot S|}$$

where **W** and **B** are the so-called within-covariance and between-covariance matrices, respectively; n is the number of samples, S is the covariance matrix of the data, G is the number of defined classes, n_g and S_g the number of samples and the covariance matrix of the g-th class, respectively [3, 4]. The variables can be ranked on the basis of Wilks' lambda value calculated on each variable (chemical parameter) of the data: low values of lambda characterize variables with good discrimination power, while high values highlight variables that do not discriminate classes. Therefore, the variables ranked by the Wilks' lambda can be retained in the classification model by means of a stepwise selection method, i.e. adding one variable at a time (from the best one to the worst one).

Multivariate Classification

The variables selected by means of Wilks' lambda have been used to build the following classification models: Linear and Quadratic Discriminant Analysis, Soft Independent Model of Class Analogy, Classification And Influence Matrix Analysis and Classification And Regression Trees.

Discriminant Analysis (DA) is one of the most popular classifiers [5]. The method is a probabilistic parametric classification technique: it maximizes the variance between categories and minimizes the variance within categories, by means of a data projection from a high dimensional space to a low dimensional space. Linear Discriminant Analysis (LDA) and Quadratic Discriminant Analysis (QDA) are used in turn depending on the linear/non-linear class separability and on the reliability of the class covariance matrices.

Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA) consists of a collection of G PCA models, where G is the number of defined classes [6]. PCA is separately calculated on the samples of each g-th class; then, a new sample can be projected in each subspace and compared to it in order to assess its distance from the class. Finally, the sample assignation is obtained by comparing the distances of the object from the class models.

Recently, a new classification method, called Classification And Influence Matrix Analysis (CAIMAN), has been proposed [7]. CAIMAN is based on the influence matrix (also called leverage matrix). CAIMAN has been developed with the aim of modelling each class by using the class influence matrix and calculating the leverage value of each object from each class influence matrix. Depending on the purposes of the classification analysis, CAIMAN can be used in different outlines: Discriminant-CAIMAN (D-CAIMAN) is a discriminant classification method, while Modelling-CAIMAN (M-CAIMAN) is a class modelling method able to identify outliers and confused objects.

Finally, classification and regression trees (CART) are a form of binary recursive partitioning [8]. The term "binary" implies that each group of objects, represented by a "node" in a decision tree, can only be split into two groups to form the child nodes. The term "recursive" refers to the fact that the binary partitioning process can be applied over and over again. CART identifies "splitting" variables based on an exhaustive search of all possibilities and, consequently, applies an implicit variable selection. For this reason, CART has been applied on all the chemical parameters, without the previous selection performed with the Wilks' lambda.

All the classification model have been considered on the basis of their predictive performances, by means of the error rate (percentage of not correctly assigned samples, ER_{LOO}) achieved in a leave-one-out procedure.

Calculations of LDA, QDA, CART and SIMCA were performed under package SCAN 6.0 (Minitab); the MATLAB 6.5 (Mathworks) was used to run CAIMAN. The in-house Matlab modules for CAIMAN application are free and available at http://www.disat.unimib.it/chm/.

RESULTS AND DISCUSSION

Wilks' lambda has been calculated in order to analyze the discrimination power of each chemical parameter, i.e. the ability of each parameter to separate the two classes of samples (cachaça and rum). Variables have been ranked (from the best ones to the worst ones) on the basis of Wilks' lambda values in Table 1.

Table 1. Wilks' lambda values obtained with each chemical parameter

Variable	Wilks' lambda
Isopentanol	0.1688
Isobutanol	0.5234
Propanol	0.5434
Cu	0.5998
Mn	0.6818
Mg	0.8922

The first three variables in the ranking are three alcohols (isopentanol, isobutanol and propanol), while metals (copper, manganesium and manganese) appear less discriminating. Protocatechuic acid has not been considered in this analysis, since it has not been detected in all the cachaça samples.

Afterwards, classification models have been built by considering at the beginning just the first two variables in the ranking of Table 1 (isopentanol and isobutanol) and then adding one variable at a time.

In Table 2, the best classification models, i.e. the classification models with the lowest error rate, are listed togheter with the variables retained in the models. As can be seen, isopentanol and isobutanol are the only retained variables in all the considered models and are enough to classify both the training and test samples. In fact, when other parameters are added in the models, error rates increase or remain equal. The best classification methods are LDA and CART, since they perfectly classify all the samples, both in the training and test sets. QDA, D-CAIMAN and M-CAIMAN recognizes a rum sample of the training set as cachaça, while SIMCA gives the worst results (two errors). Cardoso obtained the same results (no errors) on the test set samples by using all the chemical parameters, while the errors achieved on the training set are not reported in the paper [1].

Table 2. Resume of classification models: leave-one-out error rate (ER_{LOO}), number of errors on the training and test sets, variables retained in the models

Classification Method	ER_{LOO}	Training set errors		Test set errors		Variable	
		Cachaza	Rum	Cachaza	Rum		
LDA	0	0	0	0	0	Isopentanol	Isobutanol
QDA	2.6	0	1	0	0	Isopentanol	Isobutanol
SIMCA	5.1	1	1	0	0	Isopentanol	Isobutanol
D-CAIMAN	2.6	0	1	0	0	Isopentanol	Isobutanol
M-CAIMAN	2.6	0	1	0	0	Isopentanol	Isobutanol
CART	0	0	0	0	0	Isopentanol	--

Since two variables are enough to perfectly separate the classes, in Figure 1 the plot of isopentanol vs. isobutanol is shown, to better investigate how samples are characterized. As can be seen, the classes are completely separated: rum samples are placed close to the bottom left corner, while the cachaça samples are characterized by higher values of the two variables. The sample labeled as R15 (Jamaican rum) is misclassified by QDA, D-CAIMAN, M-CAIMAN and SIMCA and effectively it is far from its class space.

Moreover, isopentanol alcohol appears to be more discriminating than isobutanol and propanol. This result is highlighted by the classification tree achieved by means of CART (Figure 2); isopentanol is the unique chemical parameter retained in the CART classification tree and the detected threshold for the class distinction is 416 mg L^{-1}. This means that every sample with a value of isopentanol higher than this threshold is assigned to the cachaça class, otherwise to the rum class; this easy classification rule found by CART can correctly classify all the considered samples, as shown in Table 2.

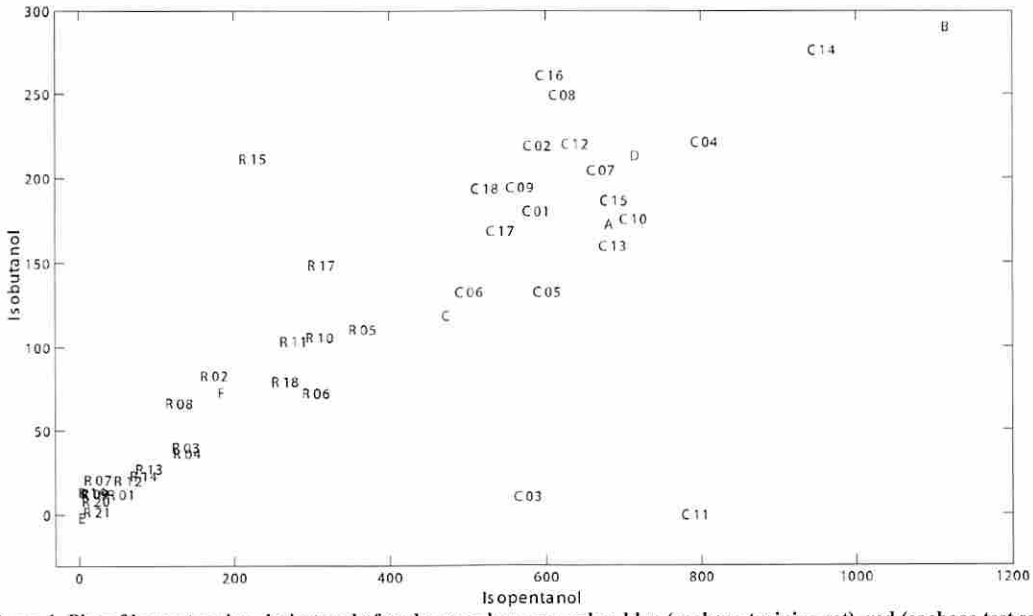


Figure 1. Plot of isopentanol vs. isobutanol of cachaça and rum samples: blue (cachaça training set), red (cachaça test set), black (rum training set), magenta (rum test set). The samples are labeled as in the original paper of Cardoso et al. [1].

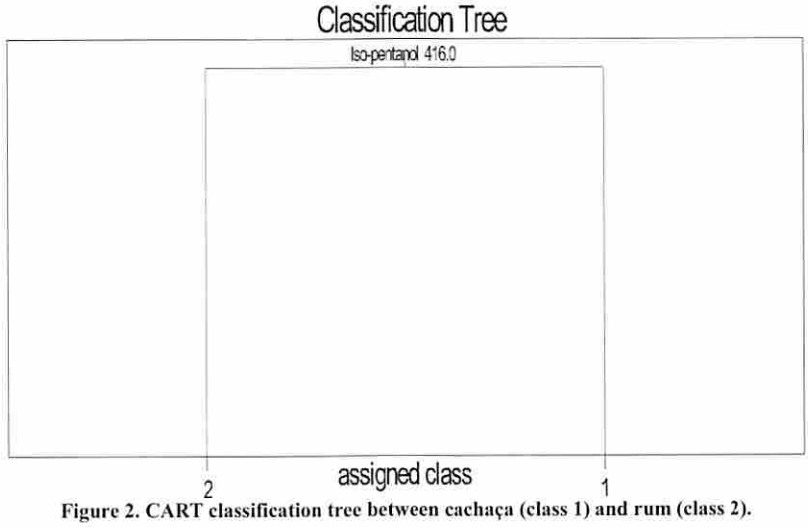


Figure 2. CART classification tree between cachaça (class 1) and rum (class 2).

CONCLUSIONS

The applied multivariate classification models confirmed the results achieved by Cardoso et al. [1]. The selection of subset of optimal discriminant variables by means of Wilks' lambda gave good classification results; moreover, by reducing the number of variables retained in a classification model, it is always possible to increase the classification performances, optimize the results and simplify the mathematical models. In fact, as shown in Figure 2, the two considered classes (rum and cachaça) can be perfectly discriminated by using just the variables (isopentanol and isobutanol) selected by means of a statistical selection method (Wilks' lambda).

REFERENCES

[1] Cardoso, D., Andrade-Sobrinho, L., Leite-Neto, A., Reche, R., Isique, W., Ferreira, M., Lima-Neto, B. and Franco, D., 2004, Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods, *J. Agric. Food Chem.*, 52: 3429-3433

[2] Vicente, M., Gomes, L., Castro, I., Gonçalves, A., Coutrim, M., Lopes, R., 2006, isolation of saccharomyces cerevisiae strains producing higher levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit, *International Journal of Food Microbiology*, 108: 51-59.

[3] Johnson, R.A. and Wichern D.W. 1992, "Applied multivariate statistical analysis", Third edition, Prentice-Hall International Editions, Inc., U.S.A., pp: 246-253.

[4] Rencher, A.C. 2002, "Methods of multivariate analysis", second edition, Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons, Inc. Publication, U.S.A.

[5] Friedman, J.H. 1989, Regularized Discriminant Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.*, 84: 165-175.

[6] Wold, S. 1976, Pattern recognition by means of disjoint principal components models, *Pattern Recognition*, 8: 127-139.

[7] Todeschini, R., Ballabio, D., Consonni, V., Mauri, A. and Pavan, M. 2007, CAIMAN (Classification And Influence Matrix Analysis): A new approach to the classification based on leverage-scaled functions, Chemom. Intell. Lab. Syst., 87: 3-17.

[8] Breiman, L.J., Friedman, J.H., Olsen, R. and Stone, C. 1984, Classification and Regression Trees. Wadsworth, Pacific Grove, C.A.

CONTENIDO DE BETALAÍNAS Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE DOS ESPECIES DEL FRUTO DE PITAYA (*Stenocereus griseus* H. y *Stenocereus stellatus* P.)

Ayala, Karla Cristal*; Oliva, Gabriela*; Beltrán, María del Carmen**
DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Prolongación de Carpio esquina Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás, Del. Miguel Hidalgo, CP. 11340
México, DF., Tel. 57-29-6000 Ext. 62328. kayala_1404@yahoo.com.mx, cbeltran@encb.ipn.mx
Becarios PIFI y CONACYT;*Becario COFAA, EDD**

Palabras clave: Propiedades químicas, pigmentos, caracterización, *Stenocereus griseus* H., *Stenocereus stellatus* P.

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar el contenido de pigmentos betalaínas presentes en la pitaya, se analizó el mesocarpio de dos especies las cuales son objeto de un activo comercio en la región Mixteca; *Stenocereus griseus* H. y *Stenocereus stellatus* P.

Frutos de *Stenocereus griseus* H., cultivados en el estado de Oaxaca y adquiridos en la central de abastos de la Ciudad de México, y de *Stenocereus stellatus* P., obtenidos en el municipio de Acatlán, Puebla, fueron almacenados a una temperatura de -20°C para su conservación previa al análisis. Los frutos fueron caracterizados físicamente considerando peso, índice de forma y color de pulpa. Se caracterizaron químicamente determinando pH., sólidos solubles, humedad, acidez titulable, azúcares reductores y ácido ascórbico, en el mesocarpio.

Posteriormente, se realizó la extracción de betalaínas, ya que se ha informado que algunos de estos compuestos presentan actividad antioxidante y son benéficos para la prevención de ciertas enfermedades crónicas degenerativas. Se realizaron barridos espectrofotométricos y se compararon con los obtenidos para extractos de betabel los cuales se utilizaron como referencia para la identificación de compuestos. El contenido de pigmentos se determinó por espectrofotometría.

De acuerdo al color de la pulpa para *Stenocereus griseus* H. se encontraron tres variedades de pitaya, roja, amarilla y anaranjada, y para *Stenocereus stellatus* P. pitayas de variedad roja, amarilla, guinda y blanca. .

La naturaleza de los pigmentos de *Stenocereus griseus* H. variedades roja, amarilla y anaranjada y de *Stenocereus stellatus* P., variedades roja y amarilla son principalmente betalaínas del tipo betaxantinas; en la variedad guinda de de *Stenocereus stellatus* P. predominan las betalaínas del tipo betacianinas.

INTRODUCCIÓN

México es considerado el lugar más importante de concentración y diversificación de las cactáceas, ya que en el se encuentran representadas cerca de 1500 de las 2000 especies conocidas hasta el momento, sin embargo algunas de ellas son poco conocidas y apreciadas, tal es el caso de la pitaya (López el al., 2000).

El pitayo, es una cactácea columnar que produce frutos comestibles conocidas como pitayas (Granados et al., 1999).

Es común encontrar la palabra "pitaya" o "pitahaya" sin que se señale la especie botánica. Bravo (1978) menciona que: "a los frutos de diversas cactáceas pertenecientes a las tribus *Hylocereae, Pachycereae* y *Echinocereae* se les designa con el nombre genérico de pitaya, término quechua (antillano) introducido por los conquistadores españoles (Granados et al., 1999).

"Pitaya" es un término de procedencia haitiana que significa "fruta escamosa" por lo que es probable que se refiera a frutos de *Hylocereus* aunque este fruto, en la actualidad, es identificado comúnmente con el nombre de pitahaya mientras que para nombrar a los frutos de *Stenocereus* se emplea el término de pitaya (Ortiz, 1999).

Las pitayas más populares en México son las producidas por las cactáceas columnares del género *Stenocereus* y se sabe de cuatro regiones principales donde estas frutas son objeto de un activo comercio, la Mixteca Baja y Valle de Tehuacan, Puebla, la región de Presa Infiernillo, la región Jalisco-Michoacán y zonas colindantes y la región del desierto de Sonora (Granados et al., 1999). En general la pulpa constituye un alimento fresco y dulce cuya importancia alimenticia radica en el alto contenido de azúcares y cantidades considerables de vitaminas B, C y E (Bravo, 1978).

En investigaciones recientes, se muestra la importancia que pueden presentar estas especies, en vista de que los pigmentos presentes en la pulpa, pueden presentar actividad antioxidantes (Pedreño y Escribano, 2001).

Los frutos de *Stenocereus stellatus* P. son frutos producidos por cactáceas columnares, estos frutos son importantes para la economía de muchas comunidades rurales de algunas zonas semiáridas de México, como son las de Oaxaca (López et al., 2000). *S. stellatus* P. es conocido como "pitaya de agosto" o "Xoconochtli", es un cacto endémico del Centro de México, de los estados de Puebla y Oaxaca. Sus frutos, flores y semillas se usan como alimento, las ramas como forraje y leña. La pulpa puede ser roja, blanca, rosa, púrpura, amarilla o anaranjada aunque el color que predomina en las poblaciones silvestres es el rojo (Bravo, 1978).

La pitaya *Stenocereus griseus* es una fruta deliciosa y exótica que crece en la Mixteca poblana y representa una fuente económica y nutricional para los productores rurales de zonas áridas de la Mixteca, tiene el nombre común de "Pitayo de mayo" por la época de su cosecha y por que aparecen en los mercados aproximadamente en el mes de mayo (Bravo, 1978). En la actualidad la pitaya de mayo esta teniendo un gran auge y en el estado de Oaxaca ya es sembrada como monocultivo, se comercializa hacia el D.F., y Huajuapan de León, Oaxaca. En la Mixteca, *Stenocereus griseus* H. se explota en huertos familiares, para aprovechar sus frutos, los cuales están adquiriendo gran importancia en la región, por su gran demanda en el mercado nacional y por su excelente adaptación a la zona (Martínez y Cruz, 1995).

La época de producción y cosecha de *S. stellatus* P. es en los meses de julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre, y para *Stenocereus griseus* H. se presenta en los meses de abril mayo y junio.

Los principales pigmentos en las cactáceas son las clorofilas, lpos carotenoides y las betalaínas. Se han encontrado que el color de las flores y frutos de este género se debe a la presencia de pigmentos nitrogenados del grupo de las llamadas betalaínas (Acosta, 2000). Las betalaínas son una clase de pigmentos que proveen los colores en una amplia variedad de flores y frutos, y actualmente son consideradas como compuestos antioxidantes. Incluyen dos clases de compuestos; betacianinas y betaxantinas (Kanner et al, 200), las cuales derivan del acido betalámico, que es la estructura base de estos compuestos.

Por medio de este trabajo se pretende generar información para un mayor conocimiento de los frutos de la pitaya *S. griseus* H. y *S. stellatus* P.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Se utilizaron frutos de *Stenocereus griseus* H. cultivados en el estado de Oaxaca y adquiridos en la central de abastos de la Ciudad de México, y frutos de *Stenocereus stellatus* P. obtenidos de huertos familiares ubicados en Acatlán de Osorio, Puebla, seleccionando aquellos frutos que presentaban una madurez comercial, esto aquellos frutos que son firmes y que comienzan a tirar las espinas.

Métodos.

Caracterización fisicoquímica de los frutos.

La caracterización fisicoquímica se realizó de acuerdo a los Métodos Oficiales informados por la AOAC.

Extracción y cuantificación de betalaínas.

Se realizó de acuerdo a lo informado por García et al, 1998.Se maceraron 10 g de muestra con ayuda de un mortero previamente enfriado, utilizando como disolvente etanol acuoso al 80%, se filtró el pigmento al vacío y se concentró en un evaporador rotatorio hasta tener un volumen final aproximado de 5 mL para posteriormente llevarlo a 25 mL. Se obtuvo el espectro de absorción en un intervalo de 200-700 nm. Para cuantificar betacianinas y betaxantinas se utilizaron como referencia a la betanina (λmax=538nm) y a la vulgaxantina (λmax=476nm) respectivamente.

Determinación de ácido ascórbico.

Se realizó de acuerdo al método de extracción con xileno, Ranganna, 1986. Obtención de la curva tipo. Preparar 6 tubos de ensaye con 0.0, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mL de una solución de acido ascórbico (0.1 mg/mL), se llevaron a 2 mL con una solución de H_3PO_3 al 3%. Se adicionan 2 mL de regulador de acetatos, 3 mL de diclorofenol indofenol y 15 mL de xileno en sucesión rápida, se tapa y agita por 10 s, se extrae la fase orgánica y se determina la absorbancia a 520 nm. Tratamiento de la muestra. Se maceran 10 g de muestra con 10 mL de H_3PO_3, se filtra y se lleva a 100 mL. Se toman 2 mL del filtrado, se adicionan de 2 mL de una solución reguladora de acetatos pH 4.0, 3 mL del colorante y 15 mL de xileno, agitar 15 s, extraer la fase orgánica y obtener la lectura a 520 nm.

RESULTADOS

Los frutos de *S. griseus* H. y *S. stellatus* P. presentaron forma oblonga, observando un diámetro ecuatorial menor que le diámetro polar.

De acuerdo al color del mesocarpio, los frutos de *S. griseus* H. se clasificaron en tres variedades, roja, amarilla y anaranjada, mientras que para *S. stellatus* P. se obtuvieron cuatro variedades, roja, amarilla, guinda y blanca.

En el caso de *S. griseus* H. el peso de los frutos se encontró en un intervalo de 67.9 a 185.8 g, correspondiéndole a la variedad amarilla el valor de peso promedio más alto de 133.74; para *S. stellatus* P. la variedad roja presentó el peso promedio de los frutos más alto 129.96 g.

En el Cuadro 1, se muestran algunas determinaciones químicas realizadas en cada variedad de las dos especies analizadas. El contenido de sólidos solubles se incrementa conforme avanza la madurez del fruto, lo mismo sucede con el pH. Los resultados obtenidos para sólidos solubles totales (°Brix) en las variedades de *S. griseus* H. muestran que la variedad amarilla supera a los demás tipos presentando un valor promedio de 10.8 °Bx y en el caso del pH, las variedades amarilla y anaranjada presentaron valores de 5.31 y 5.53 respectivamente, los cuales son similares a lo informado por Piña (1977) de 5.2 para frutos maduros, por lo que de acuerdo a los valores de pH obtenidos para las variedades amarilla y anaranjada podemos decir que, estos frutos se acercan o se encuentran ya al final del proceso de maduración; en el caso de *S. stellatus* P., se sabe que los frutos maduros presentan valores de pH cercanos a 4.5, Cruz et al (1985), observando que los valores de pH de las cuatro variedades son los característicos de un fruto que se acerca al final del proceso de maduración.

Los fruto de las dos especies de pitaya analizadas, Cuadro 1, presentan valores altos de contenido de humedad, en un intervalo de 83% a 87 %, por lo cual pueden considerarse como frutos perecederos, los cuales deben ser almacenados de forma adecuada para su conservación.

Cuadro 1. Valores de pH, sólidos solubles, humedad y acidez titulable obtenidos para las dos especies de pitaya analizadas.

Variedad analizada	pH	Sólidos solubles (°B)	Humedad (%)	Acidez titulable (% ác. Málico)
Stenocereus griseus H.				
Roja	4.92	8.13	83.80	0.18
Amarilla	5.31	10.8	83.94	0.11
Anaranjada	5.53	9.07	83.26	0.04
Stenocereus stellatus P.				
Roja	4.14	9.33	83.31	0.59
Amarilla	4.09	9.33	84.25	0.45
Guinda	4.30	9.67	83.91	0.87
Blanca	4.12	9.33	87.89	0.30

De acuerdo a los resultados observados en el Cuadro 2, se puede observar que los valores de reductores directos y totales, en el caso de las tres variedades de *S. griseus* H. son muy cercanos entre si, y para los frutos de *S. stellatus* P. son valores también similares entre si en el caso de las variedades roja, amarillo y guinda, siendo la variedad amarilla la que presentó los valores más bajos. En todos los casos, a excepción de la variedad blanca de *S. stellatus* P. se observaron valores similares, sin embargo todos fueron menores a los informados por Cruz (1985) para frutos de *S. stellatus* P. que varían desde 12.58-15.92%.

Cuadro 2. Contenido de azúcares reductores directos y totales, y de ácido ascórbico en las dos especies de pitaya analizadas.

Variedad analizada	Reductores directos (%)	Reductores totales (%)	Acido ascórbico (mg/100 g)
Stenocereus griseus H.			
Roja	7.25	7.91	8.46
Amarilla	7.71	8.00	13.96
Anaranjada	7.96	8.03	3.38
Stenocereus stellatus P.			
Roja	7.54	7.86	10.25
Amarilla	7.12	8.00	17.04
Guinda	7.71	8.43	8.49
Blanca	6.48	6.91	14.56

Del Cuadro 2, se puede apreciar que en *S. griseus* H. el contenido de ácido ascórbico fluctuó en el intervalo de 3-13mg/100g, mientras que para *S. stellatus* P. en un intervalo de 8-14 mg/100g, observando que en términos generales, esta última especie presentó un mayor contenido de ácido ascórbico.

La variedad amarilla, de *S. griseus* H. (Cuadro 2) fue la que presentó un mayor contenido de ácido ascórbico (13.96mg/100g), mientras que la variedad anaranjada presentó un contenido aproximadamente 4 veces menor que esta variedad. Entre la cuatro variedades estudiadas de *S. stellatus* P., la variedad amarilla es la que presentó una mayor contendido de acido ascórbico (10.25 mg/100 g), al igual que la variedad amarilla de *S. griseus* H., y la variedad guinda es la que aporta una menor cantidad de ácido ascórbico (10.25 mg/100g).

El análisis espectrofotométrico (UV/VIS) de las dos especies de pitaya analizadas y del betabel se llevó acabo a través de sus respectivos espectros de absorción (200-700 nm), Figuras no mostradas.

El espectro de absorción del betabel presentó tres bandas de absorción máximas, las cuales corresponden a los pigmentos contenidos en este fruto; una primera banda en el intervalo de 534-554 nm que corresponde a las betacianinas, un segundo máximo de absorción localizado entre 780-785 nm el cual corresponde a las betaxantinas, y una última banda de absorción localizada en 260 nm indicando que las betalaínas presentes en estos extractos son aciladas.

La variedad roja de ambas especias de pitaya analizadas, presentó en su espectro de absorción tres máximos de absorbancia entre 480-485 nm, 535-539 nm y 260-264 nm, lo que indica que en la pulpa de la variedad roja de estas dos especies se encuentran presentes betalaínas del tipo betacianinas, y betaxantinas las cuales son aciladas. La variedad amarilla y anaranjada de los frutos de *S. griseus* H., observaron dos máximos de absorción a 260 nm y entre 480-485 nm, indicando la presencia de betaxantinas las cuales son aciladas, y la ausencia o presencia en muy bajas cantidades, no detectables en el espectro de absorción, de betacianinas, mientras que la variedad amarilla de *S. stellatus* P. solo mostró una banda de absorción a 486 nm, indicando la presencia solo de betaxantinas no aciladas. En la variedad guinda de *S. stellatus* P. se observaron dos máximos de absorción a 486 nm y 539 nm, observando la ausencia de un pico de máxima absorción a 260 nm, indicando la presencia tanto de betacianinas como de betaxantinas no aciladas. Y finalmente la variedad blanca de *S. stellatus* P. no presentó bandas de máxima absorción lo que sugiere que en la pulpa de esta variedad se encuentran presentes pigmentos del tipo betalaínas en muy bajas concentraciones.

En el Cuadro 3, se muestra el contenido de betacianinas y betaxantinas en el extracto de betabel y en las dos especies de de pitaya analizadas, se expresa como porcentaje con respecto al contenido total de betalaínas en cada muestra para poder observar la distribución de betacianinas y betaxantinas en cada variedad. En la variedad roja de *S. griseus* H. las betaxantinas representan un 60.26% mientras que en la variedad roja de *S. stellatus* P. las betaxantinas representan 20 75.5 %, sin embargo en ambas muestras se observa que las betalaínas que predominan son betaxantinas. Las variedades amarilla y naranja de *S. griseus* H. y la amarilla de *S. stellatus* P., como era de esperarse por el color de la pulpa, presentan la mayor proporción de betalaínas del tipo betaxantinas, 95.19%, 91.73% y 93.5 % respectivamente, siendo la proporción de betacinaninas mucho menor. La variedad guinda de *S. stellatus* P. presentó una distribución de pigmentos betalaínas mucho más equilibrada que las otras variedades de la misma especie y que las variedades de *S. griseus* H., observando un 45.2 % de betaxantinas y un 54.8% de betacianinas. Finalmente la variedad blanca presentó un 100% de betaxantinas, además de que fue la variedad de pitaya que presentó el menor contenido de betalaínas.

Cuadro 3. Betalaínas totales y su distribución como betaxantinas y betacianinas en las dos especies de pitaya analizadas.

Variedad analizada	Betalaínas totales (mg/100g)	% de betacianinas	% de betaxantinas
Betabel	8764.99	60.09	39.91
***Stenocereus griseus* H.**			
Roja	1791.64	39.74	60.26
Amarilla	1038.29	4.81	95.19
Anaranjada	1385.46	8.27	91.73
***Stenocereus stellatus* P.**			
Roja	1622.2	24.5	75.5
Amarilla	306.8	6.5	93.5
Guinda	323	54.8	45.2
Blanca	14.91	-	100

CONCLUSIONES

Las propiedades químicas de las cuatro variedades de pitaya de *Stenocereus griseus* H., demostraron que los frutos de las variedades amarilla y anaranjada, se acercan o se encuentran ya al final de su proceso de maduración y que deben ser considerados como frutos perecederos, los cuales deben almacenarse de forma adecuada para su conservación, al igual que las cuatro variedades de *S. stellatus* P., las cuales también se encuentran ya al final de su proceso de maduración.

Los pigmentos de *S. griseus* H., variedades roja, amarilla y anaranjada, y los pigmentos de *S. stellatus* P., variedades roja y amarilla, son principalmente betalaínas del tipo betaxantinas y en la variedad guinda de de *S. stellatus* P. predominan las betalaínas del tipo betacianinas.

Las pitayas de variedad roja de ambas especies analizadas, resultaron ser las variedades que presentaron mayor concentración de betacianinas (711.9 mg/100g el fruto de *S. griseus* H, y 397 mg/100g el fruto de *S. stellatus* P.), pudiéndose considerar como una fuente de colorantes naturales, para la posible extracción de estos pigmentos y su posterior uso.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional en las Instalaciones del Laboratorio de Nutrición del Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del proyecto con clave CGPI 20070426 a cargo de la M. en C. María del Carmen Beltrán Orozco.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Association of Official Analytical Chemistry.1990. *Official Methods of Analysis*. A.O.A.C. Washington D.C.
- Acosta Gómez Luz María. 2000. Fermentación microbiana de la pulpa de la pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para la Liberación del Pigmento Hidrosoluble. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Bravo, H. H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Segunda Edición. UNAM. México Vol. 1., 53-55, 75, 140,578-580 pp.
- Cruz H. J. P. 1985. Caracterización del fruto en cuatro tipos de Pitaya *Stenocereus stellatus* R. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 53-79 pp.
- García, B.F., Reynoso, C.R., González de Mejía, E. 1998. Estabilidad de las Betalaínas Extraídas del Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Food Science and Technology International. 4(2): 115-120.
- Granados, S. D., Mercado, B.A., Florencia, L.R. 1999. Las Pitayas de México. Ciencia y desarrollo. 25(145):59-63.
- Kanner, J., Harel, S. and Granit, R., 2001. Betalains- A new Class of Dietary Cationized Antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(11):5178-5185
- López, G.R., Díaz, P.J., Flores, M.G. 2000. Propagación Vegetativa de tres Especies de Cactáceas: pitaya (*Stenocereus griseus*), tunillo (*Stenocereus stellatus*) y jiotilla (*Escontria chitilla*). Agrociencia. 34(3): 363-367
- Martínez, G. J., Cruz, H. J. 1995. Caracterización de Frutos de Pitaya *Stenocereus griseus* H., en la Mixteca. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 1(4):77-81
- Ortiz, H.Y. 1999. *Colección de textos Politécnicos: Pitahaya un Nuevo Cultivo para México*. Primera Edición. IPN. Editorial Limusa. México, D.F. 37 pp.
- Pedreño, M. A., Escribano, J. 2001. Correlation between antirradical activity and stability of betanine from Beta vulgaris L. roots under different pH, temperature and light conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81(7).627-631.
- Piña, L., 1977. Pitayas y otras cactáceas a fines del estado de Oaxaca. Cac. Suc. Mex., 22(1):3-13
- Ranganna, S. 1986. Handbook of Analisis and Quality Control for fruit and vegetable products. Segunda edición. Tata McGraw-Hill. Publishing Company Limited. New Delphi. 107-110 pp.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. 2001. Phytochemical and Nutritional Significance of Cactus Pear. European Food Research and Technology. 212(4) 396-407 pp.

FOTOESTABILIDAD DE PIGMENTOS PARDOS PROVENIENTES DE REACCIONES ENZIMÁTICAS Y NO ENZIMÁTICAS. INTERACCIÓN CON COLORANTE ROSA DE BENGALA.

Matiacevich, Silvia Beatriz[1], Borsarelli, Claudio Dario[2] y Buera, María del Pilar[1].
[1]Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160. Ciudad Universitaria C1428EGA, Buenos Aires, Argentina. [2]Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad de Santiago del Estero. Av. Belgrano (S) 1912, ABT4200, Santiago del Estero, Argentina. E. mail: silviam@di.fcen.uba.ar

Palabras claves: Propiedades químicas y bioquímicas. Pigmentos, pardeamiento enzimático, pardeamiento no enzimático, fotoestabilidad.

RESUMEN

Las reacciones de pardeamiento enzimático (formación de polifenoles oxidados) y no enzimático (reacción de Maillard) generan productos fluorescentes y pigmentos pardos, los cuales contribuyen a las características físico-químicas y sensoriales de los alimentos. En este trabajo, se analizó la fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y de pigmentos pardos provenientes del té y generados en la reacción de lisina con glucosa, y su interacción con el colorante rosa de bengala (RB). Se irradiaron los sistemas con radiación UV a la longitud de onda de máxima absorción de los compuestos fluorescentes y del colorante. Los resultados mostraron que frente a radiación UV-A, los compuestos provenientes de la reacción de Maillard son fotoestables. En cambio, para los polifenoles se observó su fotoblanqueo. Cuando los sistemas se colocan en presencia de RB y se irradia a la longitud de onda de máxima absorción del colorante (515nm), se observó que tanto la absorbancia de los compuestos de Maillard ó polifenoles como del colorante disminuyeron propocionalmente. Los resultados indican que los compuestos de Maillard interactúan con el colorante y los polifenoles no, indicando que los pigmentos pardos poseen diferente fotoestabilidad e interacción con el colorante dependiendo si provienen de reacciones enzimáticas o no enzimáticas.

INTRODUCCIÓN

La reacción de Maillard (condensación de aminoácidos con compuestos carbonílicos) es una reacción de pardeamiento no enzimática, la cual genera productos fluorescentes y pigmentos pardos (PM) muy estables (Matiacevich y Buera, 2006). Estos pigmentos son muy importantes en los estudios de degradación de suelos, alimentos y otros materiales biológicos. El efecto de radiaciones en el espectro ulravioleta-visible (UV-Vis) en sistemas modelos in vitro (glucosa-lisina) indican que la glicosilación no enzimática puede ser fotoquímicamente modulada (Sander and Larsen, 1994-95). Además existen evidencias que los productos de pardeo pueden ser susceptibles a fotooxidación por radiaciones ultravioleta cercano UV-A (Liang, 1991).

Los compuestos polifenólicos oxidados son generados a través de reacciones de pardeamiento enzimático. Además de contribuir a las características sensoriales de diversos alimentos, tales como aroma, astringencia y color, los compuestos polifenólicos poseen efectos benéficos para la salud asociados a sus propiedades antioxidantes. Trabajos previos indicaron que al aplicar tratamientos fotoquímicos (irradiación con luz UV-A) a sistemas modelos de polifenoles o a jugos de fruta, su absorbancia en el espectro visible disminuye (Aguer and Richard, 1996; Ibarz et al., 2005), indicando que se produce oxidación de los polifenoles mediada por luz UV (fotooxidación de los pigmentos). Por otro lado, la fotosensibilización (excitación a máxima longitud de onda de absorción, 550nm) del colorante rosa de bengala (RB) genera radicales, tales como oxigeno singulete, $^1O_2$, y anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$, (Lambert y Kochevar, 1996) especies reactivas que podrían participar en la fotooxidación de pigmentos.

El objetivo del trabajo fue analizar la fotoestabilidad de pigmentos provenientes de reacciones de pardeamiento enzimática y no enzimática por irradiación directa a la longitud de onda de excitación de los fluoróforos y por fotooxidación mediada por su interacción con el sensibilizador RB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Sistema Maillard: Los pigmentos provenientes de la reacción de pardeamiento no enzimática o pigmentos de Maillard (PM) fueron generados durante 40hs por el almacenamiento a 55°C mezclando lisina, 0.086M y glucosa, 0.28M en buffer fosfato 0.1M a pH 6.84. Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Sistema polifenoles oxidados: Se realizó la extracción de polifenoles (PF) provenientes de té comercial en hebras en agua en relación 1:10 g sólido:mL (Sava, 2001), con agitación constante y en oscuridad y luego centrifugando, recogiendo los sobrenadantes obtenidos.

Métodos

Irradiación

Soluciones con ambos tipos de pigmentos pardos en presencia y ausencia de RB se irradiaron a longitudes de onda de 340 ó 515nm en atmósfera de nitrógeno y de aire, con y sin agregado de 50mM de azida de sodio (NaN_3), que es un eficiente desactivador de $^1O_2$ (*quencher*), para analizar las posibles especies involucradas en la fotodestrucción. Los sistemas se irradiaron con lámpara de tungsteno de 150W acoplada a un filtro de banda de λ=340nm ó a un filtro de corte amarillo (λ>515nm). La potencia de la lámpara (constante durante todo el tiempo de irradiación) fue de 14,1±1,8 mW/cm^2 para 340 nm y 19,0±1,4 mW/cm^2 para 515 nm (Melles Griot Energy meter). Las cinéticas de fotoblanqueo de pigmentos o de compuestos fluorescentes fueron registradas simultáneamente utilizando un espectrofotómetro de arreglos de diodos (Ocean Optics2000) ó un espectrofluorímetro (Hitachi, F-2500), respectivamente.

Espectroscopía de transientes (*Laser Flash Photolysis*, LFP)

Para analizar la vida media de los estados triplete se analizaron espectros de absorción de transientes en atmósfera saturada de N_2 utilizando fotólisis de destello mediante un láser Nd-YAG que genera pulsos a 355nm ó 552nm (Luzchem m-LFP 112).

RESULTADOS

Fotoestabilidad de compuestos provenientes de la reacción de Maillard a la luz UV-A y mediada por su interacción con el colorante rosa de bengala.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en la fotólisis durante 60 min de los pigmentos provenientes de la reacción de Maillard (PM) en presencia y ausencia del colorante RB. Los PM fueron estables al UV-A, ya que al irradiar a 340nm (máximo de excitación de los fluoróforos) en atmósfera de aire tanto la disminución de la absorbancia como de fluorescencia no fue significativa (≈2%). Sin embargo en presencia de RB, y en condiciones de fotolisis con luz visible (515nm) se observó un fotoblanqueo significativo y similar tanto para RB como PM, en todas las condiciones estudiadas. La remoción de O_2 disuelto por purgado con N_2 disminuye el porcentaje de fotoblanqueo, pero no lo anula, indicando que existe una reacción entre el estado triplete del colorante ^{3}RB* y los PM. En presencia de aire el consumo de ambos compuestos es

mayor, pero en presencia de 50mM NaN_3 que induce un 98% de desactivación de $^1O_2$, se observó una leve reducción del fotoblanqueo, indicando además la participación de anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ (Lambert y Kochevar, 1996) en la degradación fotosensibilizada de los PM.

Tabla 1. Porcentaje de fotólisis de pigmentos de Maillard (PM) y del colorante RB, obtenidos por la disminución de absorbancia a 285 y 515nm, respectivamente, durante 60min de fotolisis UV-A (340nm) y Vis (520nm) en distintas condiciones.

Sistema	Irradiación 340nm			Irradiación 520 nm		
	λ_{sub} (nm)	Aire	Aire + NaN_3	Aire	Aire + NaN_3	N_2
PM	285	--	--	--	--	--
RB		5	--	50	37	37
PM+RB		1	2	**50**	**45**	**37**
PM	515	2	--	1	5	5
RB		--	--	10	--	--
PM+RB		1,3	1,4	**42**	**30**	**25**

$[NaN_3] = 50$ mM

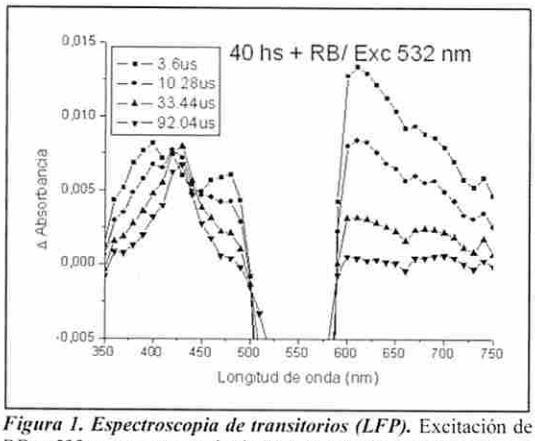


Figura 1. Espectroscopia de transitorios (LFP). Excitación de RB a 532 nm en presencia de PM de soluciones purgadas con N_2.

En la Figura 1 se muestra el espectro de transitorios obtenido por LFP, en el cual se observa la variación de absorbancia entre el estado fundamental y el estado triplete con la longitud de onda, a distintos tiempos luego del pulso de luz. El espectro de transitorios de la Figura 1 obtenido por excitación láser a 532nm de RB en soluciones saturadas con N_2 y el análisis de los decaimientos a 420 y 620 nm, demuestran que los PM desactivan el estado triplete de $^3RB^*$ (λ_{max}=620nm), generando la forma semioxidada $RB^{\bullet+}$ (absorbancia a 420nm). Un mecanismo propuesto de la interacción entre PM y RB es:

$$RB \xrightarrow{h\nu} {}^1RB^* \xrightarrow{k_{isc}} {}^3RB^* \xrightarrow{k_d} RB$$

$$^3RB^* + PM \xrightarrow{k_q} RB^{\bullet+} + PM^{\bullet-} \longrightarrow \text{Productos blanqueo}$$

En presencia de O_2 (soluciones saturadas con aire), las reacciones de fotosensibilización relevantes son:

$$RB \xrightarrow{h\nu} {}^1RB^* \xrightarrow{k_{isc}} {}^3RB^* \xrightarrow{k_d} RB$$

$$^3RB^* + {}^3O_2 \xrightarrow{k_{gT}} RB + {}^1O_2 \text{ (trans. energía)}$$

$$^3RB^* + {}^3O_2 \xrightarrow{k_e} RB^{\bullet+} + O_2^{\bullet-} \text{ (trans. electron)}$$

Tanto $^1O_2$ como los iones radicales $RB^{\bullet+}$, $PM^{\bullet-}$, y $O_2^{\bullet-}$ son los fotoproductos primarios iniciadores de las reacciones de blanqueo de los pigmentos PM y RB (Tabla 1).

Por otra parte, la fotolisis UVA de los PM no conduce a reacciones de fotoblanqueo, principalmente debido que los tiempos de vida de las especies transitorias de PM, tales como estados tripletes (los cuales absorben a 450nm) poseen un tiempo de vida muy corto (>30 ns) indicando que la energía absorbida se degradada rápidamente como calor, reduciendo las vías de degradación fotoquímica desde los estados excitados.

Este tipo de comportamiento selectivo entre fotólisis directa e indirecta (sensibilización) ofrece una posible alternativa para ejercer acciones de control en la estabilidad de pigmentos de Maillard.

Fotoestabilidad de polifenoles por irradiación directa.

La Figura 2 compara los cambios relativos de fluorescencia observados durante 60min. de fotolisis de soluciones de polifenoles. La absorbancia de los sistemas se ajustó a un valor menor que 0.1 a la longitud de onda de excitación (330nm) de manera tal de evitar efecto de filtro interno. Se observó que la fotolisis a 330nm produjo mayor disminución de los fluoróforos (12.2%) que las condiciones controles (2.6% para luz blanca y 0.4% para oscuridad). Los resultados obtenidos en fluorescencia se correlacionan con la disminución de absorbancia a 330nm luego de la irradiación (13±2%). El fotoblanqueo de los pigmentos sigue una ley cinética de primer orden con un tiempo de vida media (τ) de 28±12 min.

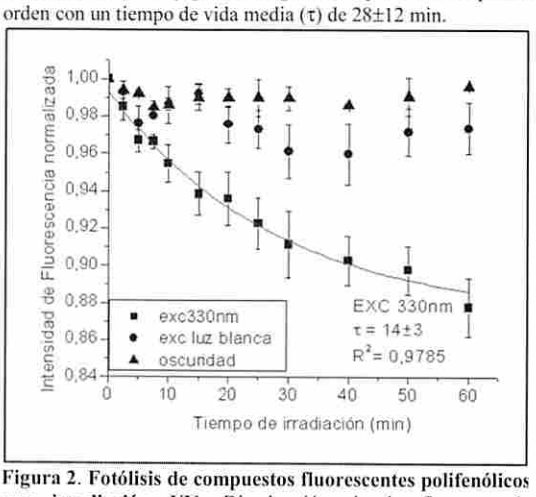


Figura 2. Fotólisis de compuestos fluorescentes polifenólicos por irradiación UV. Disminución de la fluorescencia (exc330/em440nm) por irradiación directa con luz UV (330nm) durante 60min de polifenoles extraídos con agua a 100°C. Controles: excitación con tubo de luz blanca u oscuridad.

Fotodegración de PF en presencia de RB.

La Figura 3 muestra los cambios relativos de fluorescencia observados para RB y los polifenoles (PF) durante la fotolisis a 330 nm. La absorbancia de PF fue aproximadamente 0.1 y para RB 0.4 para todas las condiciones estudiadas. Se siguió el cambio en la intensidad de fluorescencia de los polifenoles (exc330/em440nm) y del RB (exc550/em585nm). La disminución de la fluorescencia y de absorbancia de los controles (almacenados en oscuridad o irradiados con luz blanca artificial, con o sin colorante) no fue significativa (0.4 a 2.6%).

A partir del análisis de las Figuras 2 y 3 se puede observar que:

- En ausencia o presencia de RB el tiempo medio de degradación (τ) fue similar, ejem. 29±2 min. Sin embargo, el porcentaje final de fotodegradación de los PF en presencia del colorante fue del 5% comparado al 13% obtenido sin colorante.

Estos resultados sugieren que la degradación de PF es promovida por la generación de especies oxidantes producidas por la excitación de los PF,

$$PF \xrightarrow{h\nu} {}^1PF^* \xrightarrow{k_{isc}} {}^3PF^*$$

$$^3PF^* + O_2 \xrightarrow{k_q} \text{Especies reactivas de } O_2$$

Por otro lado, la fotolisis de RB con luz visible (520 nm) induce la destrucción tanto de los PF como de RB, Tabla 2, donde se muestra el porcentaje de disminución de la absorbancia de los pigmentos luego de 60min de fotolisis en las distintas condiciones. Se observó que RB y PF se degradan tanto en presencia de azida como en atmósfera de N_2, lo que indica que la fotosensibilización involucra procesos de transferencia de carga entre el RB y los PF.

Se realizó un control en soluciones equilibradas en atmósfera de aire de los PF sin colorante, los cuales fueron irradiados a la longitud de onda del colorante (λ>515nm). Se observó que se produjo un leve aumento de la absorbancia del 3% a 285nm. Este resultado indica que las variaciones de absorbancia observadas en presencia del colorante RB, se debieron a interacción entre ellos y no a un efecto intrínseco de la luz amarilla sobre los pigmentos polifenólicos.

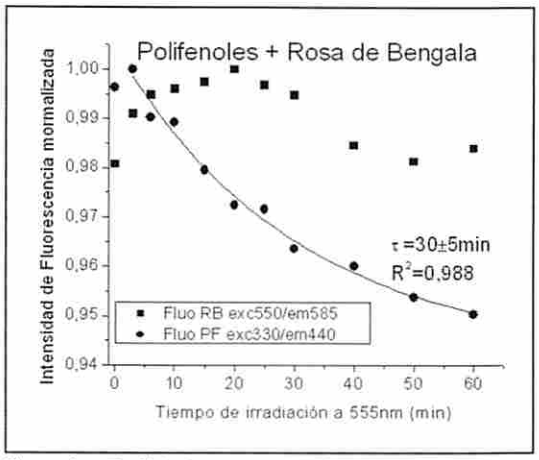


Figura 3. Fotólisis de compuestos fluorescentes mediado por irradiación del colorante rosa de bengala. Disminución de la fluorescencia de PF (exc330/em440nm) y de RB (exc550/em585) por irradiación del sensibilizante (555nm).

Tabla2. Porcentaje de fotólisis de pigmentos polifenólicos (PF) y del colorante RB, obtenidos por la disminución de absorbancia a 285 y 515nm, respectivamente, durante 60min de fotolisis UV-A (340nm) y Vis (520nm) en distintas condiciones

	Irradiación 340nm		Irradiación 520 nm		
sistema	**Abs**	**aire**	**aire**	**Aire+ NaN_3**	**N_2**
PF	RB	--	--	--	--
RB		5	50	38	38
PF +RB		1	**40**	**35**	**10**
PF	M	**13**	--	--	--
RB		--	10	--	--
PF +RB		**5**	**10**	**5**	--

$[NaN_3]$ = 50 mM

CONCLUSIONES

A partir de reacciones enzimáticas o no enzimáticas se forman compuestos pigmentados de características cromáticas similares. Paralelamente, los compuestos fluorescentes que se generan en ambos tipos de reacciones tienen máximos de excitación y emisión en la misma región de longitudes de onda: exc340/em450nm para los provenientes de la reacción de Maillard y exc330/em440nm para los polifenoles. El efecto de la luz sobre estos compuestos y la interacción de éstos con el sensibilizador RB depende de las condiciones de excitación:

*Los compuestos PM son mucho mas estables a la irradiación UV-A que los PF, debido principalmente a tiempos de vida muy cortos (<50 ns) de sus especies excitadas y por tanto incapaces de generar especies reactivas de oxígeno, ejem. $^1O_2$ y $O_2^{\bullet-}$.

* La excitación con luz visible (λ > 515 nm) de RB produce degradación tanto del colorante como de los PM en similar proporción, y en menor medida, de los PF. Esto es indicativo de reacciones de fotosensibilización por transferencia de carga (Tipo I) involucrando iones radicales producidos en la interacción del estado triplete de RB con los pigmentos.

Debido a la complejidad molecular de estos extractos de pigmentos pardos, actualmente se están llevando a cabo estudios con pigmentos modelos para una mejor comprensión de los mecanismos de interacción y fotosensibilización.

Dada la amplia presencia de pigmentos pardos en alimentos y sus múltiples propiedades, beneficiosa o no, el conocimiento del efecto de la luz y de la interacción de estos pigmentos con agentes sensibilizantes es muy importante para ejercer acciones de control en la estabilidad de materiales orgánicos, biomoléculas y/o alimentos que posean estos pigmentos y ofrecer alternativas para modular la cinética de su generación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBACyT X226), y de Santiago del Estero (CICyT-UNSE A23/084), Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología CONICET (PIP5977 y PIP6562), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 20545.y PICTO-UNT 764) por el financiamiento de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

-Aguer, J.-P. and Richard, C. 1996. "Reactive species produced on irradiation at 365nm of aqueous solutions of humic acids". J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 93:193-198.

-Ibarz, A., Pagán, J., Panadés, R. and Garza, S. 2005. "Photochemical destruction of color compounds in fruit juices". J. Food Eng. 69: 155-160.

-Lambert C.R. and Kochevar, I.E. 1996. "Does Rose Bengal triplet generate superoxide anion?". J. Am. Chem. Soc. 118:3297-3298.

-Liang J.N. 1991. "Photooxidation of the nonenzymatic browning products in calf lens α–cystallin". Ophtalmic. Res. 23: 259-64.

-Matiacevich S. and Buera M.P. 2006. "A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction". Food Chem., 95:423-430.

-Sander B. and Larsen M. 1994-95. "Photochemical bleaching of fluorescent glycation products". Int Ophthalmol. 18: 195-98.

ESTADO FISICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICOS DEL PESCADO SECO DISTRIBUIDO EN PERIODOS DE TEMPORADA

Salamanca Grosso Guillermo[1]; Osorio Tangarife Mónica Patrícia; Machado Arguelles Indira Natalli

[1] **GRUPO DE INVESTIGACIONES MELLITOPALINOLÓGICAS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ALIMENTOS.**
Facultad de Ciencias Departamento de Química. Universidad del Tolima.
***Barrio Santa Helena Parte Alta. Telefax: +57-8-2669162. Ibagué Colombia. gsalaman@ut.edu.co**

Palabras clave: Tecnología de Alimentos. Control de Calidad. Pescado seco.

RESUMEN

El pescado contiene proteínas de importante valor biológico, vitaminas, minerales y lípidos, fracción constituida por triglicéridos y fosfolípidos; el contenido de carbohidratos es bajo; en muchos países es la principal fuente de alimentación. Investigaciones recientes han demostrado que durante el proceso de degradación se generan bases nitrogenadas volátiles (BNV): Amoniaco, Monometilamina, Dimetilamina y Trimetilamina (TMA). En este trabajo, se abordan las condiciones fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas relativas al mercado del pescado seco en temporada. Se encuentra una correlación significativa entre el contenido de TMA y otras BNV. Los valores de TMA, que hacen indeseable al pescado seco son de 10 mg de N-TMA/100 g, que para el caso de las muestras comercializadas en Ibagué (Colombia) oscilaron entre 27.8 a 148.7 mg de N-TMA/100 g. El pH del pescado fresco oscila entre 6.0 a 6.5, la proximidad al límite para consumo es de 6.8, valores superiores a 7.0 son indicativos de pérdida de calidad. Se identifica la presencia de bacterias entéricas, que determina estar en contacto con heces fecales durante alguna de las etapas del procesado. El 15% de las muestras analizadas colectadas de manera aleatoria, demuestra la existencia de *E. coli*, que se desarrolla con protocolos microbiológicos.

INTRODUCCIÓN

El incremento constante de la población mundial, ha requerido que exista gran cantidad y variedad de alimentos disponibles en las centrales de abastecimiento, motivo por el cual la industria alimentaria en respuesta a las exigencias del mercado, ha implementado técnicas de procesamiento para fabricar de manera eficaz productos alimenticios de calidad [1]. El Consejo de Alimentación y Agricultura de la Organización Mundial de la Salud considera que las actuales y nacientes capacidades relativas a la producción y conservación de alimentos garantizarían el suministro suficiente de alimentos inocuos y nutritivos hasta el año 210, cuando esta previsto que la población mundial alcance una cifra de más de 7 mil millones. Es por esto que la carne de pescado que contiene proteínas de importante valor biológico, además de vitaminas, minerales, lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos de la serie ω) y carbohidratos, ha incrementado su consumo en los últimos años, desplazando otros tipos convencionales de carne. Es importante señalar que durante el año 2000, se movilizaron hacia el interior de Colombia por vía aérea 8.446 toneladas de pescado, correspondiendo a pescado fresco el 90.7% y el 9.3% a pescado seco, perteneciente a la variedad Bagre [3,9,15].

En estudios de trazabilidad alimentaria, se hace indispensable considerar el termino "intoxicación alimentaria" se utiliza para designar las enfermedades producidas por la ingestión de toxinas elaboradas por los microorganismos en un alimento o bebida contaminada. Las autoridades responsables de la Salud Pública de los Estados Unidos [17], han identificado los microorganismos causantes de la mayoría de enfermedades trasmitidas por alimentos, de acuerdo a la severidad de la enfermedad o por el número de casos que produce. Dentro de estos microorganismos se encuentran *Campylobacter jejuni sp., Escherichia coli* 0157:H7; *Staphylococcus aureus sp.*, la bacteria *Vibrio vulnificus sp., Listeria monocytogenes spp, Shigella sp., Clostridium botulinum sp.* y *Salmonella sp.*, responsable de millones de casos al año de enfermedades que se originan por manipulaciones deficientes y malos sistemas de procesado [5,7].

La carne de pescado bajo condiciones higiénico sanitarias de manipulación deficiente, ha generado severos problemas de contaminación. El pescado durante su vida, posee barreras que impiden el desarrollo de microorganismos y agentes patógenos capaces de vulnerar su estructura física [18]. Sin embargo durante y después de la recolección y sacrificio se genera el inicio de la descomposición albergando una flora comensal patógena que se localizará en las estructuras internas del músculo, generando enzimas que destruyen el tejido y que conllevan al incremento bacteriano [12].

La contaminación posterior a la captura y procesamiento del pescado para la obtención de un producto seco y salazonado, demanda una serie de etapas entre las cuales se destaca el almacenamiento, transporte, manipulación y venta a granel. Como consecuencia de su composición y la reacción poco ácida de su carne, el pescado se constituye en un alimento altamente perecedero, donde se generan procesos degradativos y actividad enzimática del tipo autolítico endógenas y crecimiento de flora microbiana diversa, que se asienta básicamente sobre la piel y el intestino, se extiende y multiplica en otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas, de bajo peso molecular entre ellos aminoácidos y aminas, acompañados de un pH relativamente alto que favorece su desarrollo. Según el tipo de germen implicado en los procesos, las consecuencias clínicas para la salud del consumidor pueden ser leves hasta altamente toxiinfecciosas por lo que se hace necesario realizar un estricto control de las características organolépticas y microbiológicas garantizando la salubridad e inocuidad de la materia prima.

Los factores que influyen en el desarrollo y sucesiones microbianas están clasificados en cuatro grupos: Factores intrínsecos (limitación del sustrato) como: disponibilidad de nutrientes, incidencia del pH, potencial redox, actividad de agua y componentes antimicrobianos; Factores extrínsecos (limitaciones ambientales) como: humedad relativa, temperatura y presión atmosférica, entre otros; Factores implícitos como la velocidad de crecimiento, sinergismo, antagonismo y comensalismo. Los factores de elaboración como: división, lavado, envasado, tratamiento térmico y radiaciones. Dependiendo de las condiciones predominantes para un grupo de agentes microbianos capaces de deteriorar la calidad de los alimentos se tienen: Aerobios estrictos (*Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus*) y facultativos (*Staphylococcus* y *Enterobacterias*), anarobios estrictos (*Clostridium, Bacteriodes, Pectococcus y Pripionibacterium*) y microaerófilos o aerotolerantes (*Lactobacillus, Streptococcus o Pediococcus*) [4].

Entre las intoxicaciones que suelen producirse por consumir pescado seco se encuentra la causada por histamina debida a la ingestión de escómbridos en mal estado como resultado de una inadecuada manipulación y preservación, generalmente almacenados en lugares poco higiénicos y temperaturas por encima de las de refrigeración. La histamina se produce por descarboxilación del aminoácido histidina, debido a la acción proteolítica de las catepsinas. Dentro de la flora existente se encuentra *Proteus, Klebsiella o Morganella*, que de acuerdo a las condiciones produce la enzima histidina-descarboxilasa. Los aminoácidos son importantes iniciadores de la degradación, se encuentra el ácido glutámico, arginina, lisina, tirosina e histidina.

Las bacterias encargadas de la formación de histamina están comprendidas para un amplio rango de temperaturas, *Photobacterium phosphoreum* se desarrolla significativamente a menos de 10°C; *Pseudomonas* I, II y III proliferan en pescados frescos inadecuadamente almacenados cerca de 5°C. Mientras que próximo a 30°C son dominantes especies de *Vibrio* y *Photobacterium*. Los posibles potenciadores de la toxicidad son trimetilamina (TMA), el óxido de trimetilamina y aminas biogénicas como putrescina, cadaverina, anserina, espermita, entre otras. La existencia de inhibidores de la diaminooxidasa y de la histamina metiltransferasa incrementaría también la toxicidad. La concentración de histamina en pescados determina que menor a 50 ppm es un pescado seguro para su consumo, de 50 a 200 ppm es un pescado maltratado y posiblemente tóxico y de 200 a 1000 ppm es un pescado no apto y altamente riesgoso [14].

Los países que comprenden la Comunidad Europea establecen un valor máximo promedio de histamina de 100 ppm; mientras que de acuerdo a la guía de la FDA (Food Drugs Administration) establece que los niveles para éste componente deben ser a lo más de 50 ppm para pescado fresco y de 200 ppm para pescado procesado. En el Perú, establecen niveles promedios máximos de histamina según el tipo de pescado: super prime (250 ppm), prime (600 ppm) y estándar (por encima de 600 ppm). Existe la posibilidad de producción de histamina en medio salado, almacenado a 5ºC, una vez presente la enzima histidina descarboxilasa, que continua con la formación de histamina en el pescado, aún cuando la bacteria deje de ser activa (muerta o con metabolismo mínimo) [16].

Algunos de los métodos mas utilizados en distintos tratamientos para cuantificar la alteración de los productos de la pesca debido a la variedad de rutas químicas a través de las cuales se puede causar deterioro de los peces son los físicos comprendidos por la medición en cambios de textura, resistencia eléctrica especifica y fluorescencia del músculo, índice de refracción del humor vítreo y químicos donde se determina la medida de nitrógeno básico volátil total o TMA, la determinación de histamina y el valor K (índice de descomposición enzimática de los nucleótidos) [6,8]. Los criterios de clasificación para pescados en general, incluyen características morfológicas entre las que se destacan la forma del cuerpo, aletas, escamas y número de las mismas; zona de captura según: aguas saladas o dulces y composición que se clasifica en tres grupos: Pescados magros o blancos, grasos o azules y semigrasos.

En el proceso de degradación del pescado, se generan bases nitrogenadas volátiles, que pueden ser expresados como nitrógeno volátil total (NVT) o como bases nitrogenadas y que representan al Amoniaco, Monometil amina (MMA), Dimetilamina (DMA) y Trimetilamina (TMA) [10,11]. La correlación efectiva entre NVT y TMA. Cuando el pescado supera valores de 25 mg N/100 g el pescado comienza su deterioro, a 30 mg N/ 100 g, puede ser considerado como indeseable y a 40 mg N/ 100 g como indeseable para el consumo humano. En el proceso de degradación del pescado se generan bases nitrogenadas volátiles (BNV) en particular: Amoniaco, Monometil amina (MMA), Dimetilamina (DMA) y trimetilamina (TMA). El oxido de trimetilamina se suele reducir durante la descomposición a TMA y el amoniaco es el producto de la descomposición de la proteína [13]. La cantidad de TMA y las (BNV), son dos indicativos de la calidad y estabilidad fisicoquímica del pescado. Se ha encontrado una correlación significativa entre el contenido de (TMA) y otras bases nitrogenadas volátiles. En otros productos de la pesca, se demostró que el almacenamiento a (-10°C) se producía (DMA) con deterioro de la textura y la calidad organoléptica del producto particularmente en merluzas, con deterioro de lípidos por efectos de oxidación.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se adelantó un estudio, de las condiciones higiénico-sanitarias de calidad fisicoquimica, microbiológica y atributos sensoriales relacionados con la textura, aroma, aspecto global y color en muestras de pescado seco distribuido en la ciudad de Ibagué. Se realizaron pruebas para detección de *Salmonella sp, Shiguella sp, Clostridium sp,* sulfito reductores, hongos y levaduras, siguiendo procedimientos descritos [9]. Los parámetros de estabilidad comprendieron las bases nitrogenadas básicas totales (BNVT) y trimetilamina (TMA), además se determinó el contenido de humedad, fracción grasa, pH, actividad de agua (a_w) y nivel de cloruros. Se realizó un muestreo aleatorio simple, para un total de 11 (once) muestras. En todos los casos se siguieron los métodos descritos por [2]. El producto de la referencia, se comercializa en Colombia durante las épocas de temporada de Cuaresma y en los meses de Febrero a Mayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En sistemas productivos el concepto de trazabilidad juega un papel significativo, siguiendo normativas ambientales sociales relativas a la inocuidad, calidad autenticidad y la confirmación de procedencia de los alimentos [11]. Las muestras de pescado colectadas y analizadas demostraron proceder del Magdalena, frontera con Brasil y los Llanos Orientales en cerca del 18%, Amazonas 9% y proveedores de supermercados de cadena debidamente registrados 19 %.

Las determinaciones de actividad de agua (a_w), presentaron niveles superiores a 0.70 (18% de humedad), condición necesaria para albergar el desarrollo microorganismos. El contenido de cloruros en las muestras fue variable presentándose un mínimo de 5.30 y un máximo de 14.9 % en un rango de 9.6 unidades, lo que indica falta de control en la cantidad adicionada durante el sistema de salazonado y secado en el lugar de origen, (Figura 1), la desviación estándar (DS) para las once muestras es de ± 2.81 y su coeficiente de variación (CV) de 26.5%, parámetro estadístico que confirma la variabilidad y la falta de control de proceso para los distintos lotes estudiados. De esta información se infiere que la (a_w) no se ve controlada por la adición de cloruro de sodio y por tanto permite el desarrollo de microorganismos.

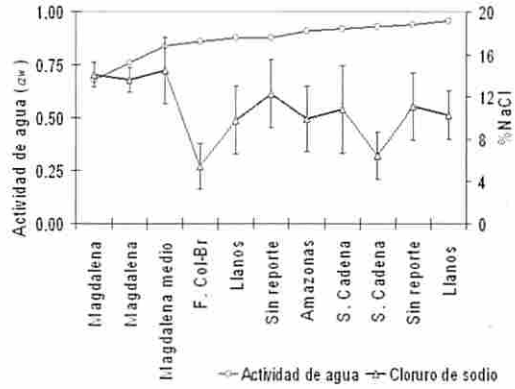


Figura 1. Perfil para el contenido de Cloruro de sodio y actividad de agua en muestras de pescado seco.

Los valores de pH para el pescado fresco esta entre 6.0 a 6.5, el límite para consumo es de 6.8, valores superiores a 7.0 son indicativos de alteración. En las muestras analizadas, el contenido de humedad y (a_w), no se han controlado suficientemente y han facilitado el inicio del proceso de hidrólisis de proteínas, con incremento del pH y evolución de las bases nitrogenadas volátiles totales, debido a la actividad enzimática. Las muestras analizadas exhibieron pH en un rango comprendido entre 6.25 y 7.74. Los perfiles para Nitrógeno en mg N/100 g, así como el %N-TMA se muestran en la (Figura 2). El 55.4% de las muestras presentaron niveles superiores a 40 mg N/100g. En el pescado fresco, se debe esperar remociones graduales de la humedad para evitar la evolución de bases nitrogenadas por acción de los microorganismos. Los valores de TMA, que hacen indeseable al pescado son del orden de 10 mg de N-TMA/100 g, que para el caso de las muestras estudiadas oscilaron entre 27.80 a 184.0 mg N-TMA/100 g, superiores a los valores guía. El 27.7% de las muestras presentaron niveles superiores a 40 mg de N/100g, un 27.7% adicional presentó valores de 30 mg N/100 g, es decir, cerca del 60% de las muestras resultaron no seguras desde el punto de vista del proceso.

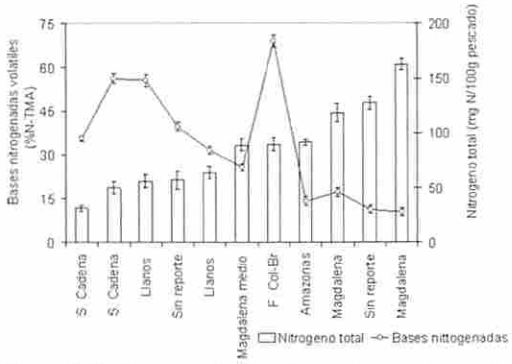


Figura 2. Perfiles para el contenido de nitrógeno total y las bases nitrogenadas totales en muestras de pescado seco

La fracción lipídica encontrada en las muestras oscilaron entre 1.40 y 34.6% (p/p). Los perfiles de pH y grasa total se muestran en la Figura 3.

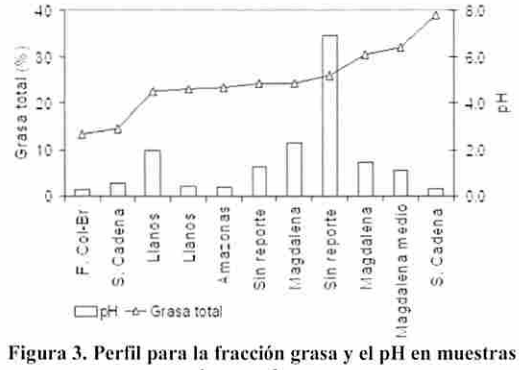


Figura 3. Perfil para la fracción grasa y el pH en muestras de pescado seco

En las caracterizaciones microbiológicas se identificó la presencia de bacterias entéricas. El 15% de las muestras analizadas demostró la presencia de *E. coli*, indicativo de contacto con heces fecales en algunas de las etapas en las que estuvo expuesta el producto, el 38% *Kleibsiella sp* y el 47% correspondió a *Enterobacter sp.* Las enterobacterias del genero *Proteus sp* y *Klebsiella sp.*, se caracterizan por la formación de histamina como producto secundario de su metabolismo, debido a la acción de su enzima histidina descarboxilasa. Ciertas bacterias no intestinales del pescado son también capaces de producir histamina en condiciones de anaerobiosis (*Clostridium perfringens*). Se ha demostrado que *Klebsiella pneumoniae* es capaz de producir histamina a menos de 7°C después de prolongados períodos de almacenamiento, este compuesto podría ser contributivo a la formación de BNVT. En todas las muestras analizadas se identificó la presencia de *Clostridium perfringens*, determinada por el medio selectivo utilizado que contiene sulfadiaxina y polimixina que inhibe el crecimiento de otros tipos de *Clostridium*. El 79% de las muestras de pescado seco presentó desarrollo de levaduras lo que describe la iniciación del proceso de fermentación lo que permite de igual forma corroborar el alto grado de humedad.

CONCLUSIONES

Del estudio se deduce que las condiciones higiénico-sanitarias del producto exhibieron actividad microbiológica en virtud a diversos factores que podrían ser clasificados en tres grupos: contaminación en la fuente debido a manipulación defectuosa, a procesos de salazanado y secados incompletos; a las condiciones de transporte necesarias para el manejo de materia prima a los expendios usualmente en camión con exposición de factores medioambientales y la voluntad de los transportadores y a contaminación en salas o unidades de almacenamientos durante la temporada. Por lo anterior, se puede afirmar que los agentes que influyen en el desarrollo y sucesiones microbianas relacionadas con la calidad y estabilidad del pescado seco, depende fundamentalmente de factores intrínsecos del producto que involucran el pH, el potencial redox y la (a_w), así como de las limitaciones ambientales establecidas para las muestras, las condiciones de manejo y envasado. La humedad relativa y su temperatura, son aspectos que definen la velocidad de crecimiento, sinergismo, antagonismo y comensalismo de agentes microbianos. Sin controles en los procesos de elaboración (BPM), división, lavado, envasado y tratamiento térmico, es imposible considerar al pescado seco como material seguro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar toda su gratitud al Instituto Colombiano Agropecuario -ICA- Seccional Tolima, al Comité Central de Investigaciones y al Departamento de Química de la Universidad del Tolima, por facilitar las condiciones necesarias en la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

[1] ABGRALL, B. Pescados y otros productos marinos. Bourgeois, C. M.; Mescle, J. F.; Zucca, **J. Microbiol. Alim.** 1994.

[2] AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington,D.C. 2000.

[3] Indicadores de coyuntura Nacional. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. 2000.

[4] ANDRE´S, A.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; BARAT, J. M.; FITO, P. Mass transfer kinetics during cod salting operation. **Food Science and Technology International**, 8, 309–314. 2002.

[5] BARAT, J. M.; GALLART-JORNET, L.; ANDRE´S, A.; AKSE, L.; CARLEHO˜ G, M.; SKJERDAL, O. T. Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. **Journal of Food Engineering**, 73, 9–19. 2006.

[6] BEUCHAT, L. Microbial stability as affected by water stability. **Cereal foods World** 26:345-349. 1981.

[7] CARDINAL, M., GUNNLAUGSDOTTIR, H., BJOERNEVIK, M., OUISSE, A., VALLET, J. L., LEROI, F. Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. **Food Research International**, 37, 181–193. 2004.

[8] FAID, M.; KARANI, H.; ELMARRAKCHI, A.; ACHKARI-BEGDOURI, A. A Biotechnological process for the valorization of fish waste. **Bioresourse technology** 49 Pp. 237-241. 1994.

[9] FORSYTHE, S. J. Alimentos seguros. **In: Microbiología**. (Ed) Acribia S.A. Zaragoza España. 2003.

[10] HUSS, H. Cambios Post-mortem en pescado. In: **El pescado fresco, su calidad y cambios de calidad**. FAO. Documento Técnico de Pesca Nº 348. 202 pp. 1998.

[11] KINSELLA, J. E. Fish and Seafoods: Nutritional implications and quality issues. **Food Tech.**, 42, 5. Pp 146-150. 1988.

[12] LARRAÑAGA, I. J.; CARABALLO, J. M.; et al. In: **Control e higiene de los alimentos**. (Ed) Interamericana S.A. Madrid España. 1999.

[13] LINDEN, G.; LORIENT, D. In: **Bioquímica Agroindustrial**. (Ed) Acribia S.A. Zaragoza España. 1994.

[14] LISBETB TRUELSTRUP HANSEN,"" TOM GILL,B SUSANNE DREWES RSNTVED' & HANS HENRIK HUSS. Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. ***Food Research International***, Vol. *29, No. 2*, pp. *181-188, 1996.*

[15] LOVE,R. M. Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. G. M. Hall. **Fish Proc. Tech.**, 2ª edition, (Ed) Blackie Academic and Professional, Londres. 1997.

[16] KIRK, R.; SAWYER, R.; EGAN, H. **In: Composición y análisis de los alimentos** de Pearson. (Ed) Continental S.A. 2da Ed. México. 1996.

[17] Servicio de salud pública de Estados Unidos. (on-line) http://www.foodsafety.gov/~fsg/bac/s10least.html. 05-02-05. Nota html.

[18] VALLS, J.; PAREDES, A.; GONZÁLEZ, D. Estabilidad de filetes de sardina (*Sardinella aurita*) en almacenamiento congelado a –18°C. **Revista Científica, FCV-LUZ** / Vol. XVI, Nº 2, 176 - 185, 2006.

EFECTO DEL TIEMPO DE COSECHA EN EL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE MURTA (*Ugni molinae* TURCZ).

Ihl Mónica , Motomura Yoshie, Wigand Mitzy, Bifani Valerio
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Casilla 54-D. E-mail: bifani@ufro.cl
TEMUCO - CHILE

Palabras clave: polifenoles, hojas, extracto, *Ugni molinae* Turcz, películas comestibles

RESUMEN

El extracto acuoso de hojas de murta (*Ugni molinae* Turcz) ha mostrado propiedades antioxidantes, debido a su contenido de polifenoles, el cual es dependiente del ecotipo de murta utilizado. Esta diferencia también afecta las propiedades físicas de las películas comestibles a las cuales se le incorpora el extracto. Se estudia el efecto del tiempo de recolección de las hojas en el contenido de polifenoles y en la actividad antioxidante con el fin de establecer la mejor fecha de obtención de las hojas y a la vez asegurar un contenido homogéneo de polifenoles en los extractos.

A lo largo de quince meses se cosechan hojas de una misma planta y se analiza el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante por DPPH y ácido ascórbico. Los resultados muestran un mayor el contenido de polifenoles totales en la época de mayor calor (verano) y decrece paulatinamente hasta el invierno para crecer nuevamente en primavera, en que aparecen las hojas nuevas, que tienen mayor contenido de polifenoles que las hojas viejas. Analizando la actividad antioxidante los resultados son similares a los obtenidos para los polifenoles totales. Se concluye que la mejor época de cosecha de las hojas es en verano, una vez que el contenido de polifenoles las hojas nuevas llega un valor máximo.

INTRODUCCIÓN

Los principales biopolímeros usados en la preparación de películas comestibles han sido polisacáridos y proteínas (Gontard, Guilbert y Cuq, 1992; Sobral, Menegalli, Hubinger y Roques, 2001; Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C. and Sensidoni, A. 2003; Mali, Grossmann, García, Martino y Zaritzky, 2006). Para mejorar las propiedades de geles de arabinoxilanos y pectinas, Oosterveld, Beldman y Voragen (2000) usan un derivado de ácido fenólico, el ácido ferúlico; este mismo compuesto es utilizado por Ou, Wang, Tang, Huang y Jackson (2005) para mejorar geles preparados con aislado proteico de soya. Esto sugiere que compuestos como el ácido ferúlico o polifenoles, podrían también actuar formando enlaces en preparaciones de películas basadas en otros polisacáridos, como almidones o derivados de la celulosa, u otras proteínas como gelatinas de diversos orígenes.

El extracto obtenido con agua caliente de las hojas de la planta nativa del sur de Chile denominada murta (*Ugni molinae* Turcz) se usa tradicionalmente en la medicina popular mapuche. Además, es muy común en el sur de Chile que se consuman sus frutos rojos, ya sea frescos o procesados (Montenegro, 2002). Se ha coleccionado y caracterizado germoplasma de murta (Seguel, Peñalosa, Gaete, Montenegro y Torres, 2000) y los extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de las hojas han sido analizados por HPLC-MS (Rubilar, Pinelo, Ihl, Scheuermann, Sineiro y Núñez, 2006), resultando ser ricos en actividad antioxidante y en polifenoles. Entre los polifenoles encontrados hay glucósidos de quercetina y miricetina. El ácido gálico sólo se obtuvo en el extracto acuoso. Las estructuras de estos polifenoles pueden apreciarse en la Figura 1.

Por el alto contenido en polifenoles hemos estado usando las hojas de murta en la preparación de películas comestibles, ya sea en base a carboximetilcelulosa (Bifani, Ramírez, Ihl, Rubilar, García y Zaritzky, 2007) o gelatina (Gómez-Guillén, Ihl, Bifani, Silva y Montero, 2007), y en ambos casos los polifenoles influyen en la trama de la película, modificando sus propiedades físicas reológicas y de permeabilidad a gases.

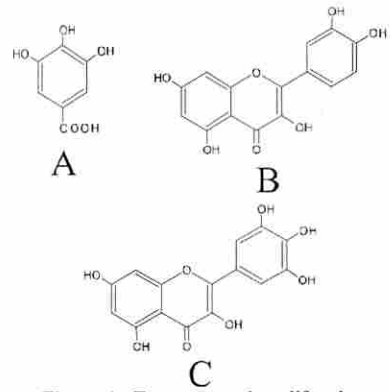


Figura 1.- Estructuras de polifenoles
A. Ácido gálico B. Quercitina C. Miricetina

Por el alto contenido en polifenoles hemos estado usando las hojas de murta en la preparación de películas comestibles, ya sea en base a carboximetilcelulosa (Bifani, Ramírez, Ihl, Rubilar, García y Zaritzky, 2007) o gelatina de piel de atún (Gómez-Guillén, Ihl, Bifani, Silva y Montero, 2007), y en ambos casos los polifenoles influyen en la trama de la película, modificando las propiedades reológicas de la solución filmogénica como también las propiedades físicas y de permeabilidad a gases y vapor de agua de las películas. Hemos observado diferencias en el contenido de ciertos polifenoles, los flavonoles quercetina y miricetina, en diferentes ecotipos de plantas, cosechadas simultáneamente. Pero siempre queda la duda de cuando cosechar las hojas, a fin de obtener extractos con contenido de polifenoles comparables. Es por eso que se decide estudiar la variación del contenido de polifenoles en el tiempo, de las hojas de murta de una misma planta, para poder establecer si hay diferencias en las diferentes épocas del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Las hojas, flores y frutas se recolectan, siempre de la misma planta, durante 15 meses y se mantienen congeladas a -18 °C hasta realizar los análisis. Para ello, cada muestra se descongela, se pesa, se seca y se analiza la concentración de polifenoles totales, y la actividad antioxidante por DPPH y ácido ascórbico.

Métodos.

Los polifenoles totales se miden por el método de Folin Ciocalteu, usando ácido gálico como patrón. Por muestra se emplean 0,2 mL de reactivo de Folin Ciocalteu, 1,6 mL de carbonato de sodio 7.5 %, 0,1 mL del extracto polifenólico (extracto de hoja de murta) y y 0,9 mL de agua. Se agita bien, la absorbancia se lee a 760 nm después de dejar las muestras 1 h a temperatura ambiente. Como blanco se usó agua en vez de extracto.

La actividad antioxidante se mide como capacidad para

a) atrapar los radicales libres del DPPH (Hatano, Kagawa, Yasuhara y Okuda, 1988), expresado como equivalente de trolox; se usa un volumen de 0,5 mL de DPPH 400 uM en metanol, la reacción comienza al agregar la muestra (0,05 - 0,1 mL) y se mide a 520 nm por 20 minutos a temperatura ambiente; la curva estándar se hace con 0 uL, 30uL, 60 uL, 120 uL, 180 uL, 240 uL de Trolox 0.2 M.

b) inhibir la oxidación de ácido ascórbico (10 mM en agua desionizada) en presencia de sulfato de cobre (1 mM) (Sarma, Sreelakshmi y Sharma, 1997). Se usa 0,08 mL de la solución de Cu con 0,06 mL de la solución de ácido ascórbico, 4 mL agua y 1 mL de muestra (el blanco lleva 5 mL de agua). La velocidad de oxidación del ácido ascórbico se monitorea durante 15 - 30 minutos para registrar la disminución de la absorbancia a 265 nm (longitud de onda máxima para el ácido ascórbico). De la diferencia entre dos lecturas (inicial y después de 15 o 30 minutes) (delta B), la actividad se calculó como sigue:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta B_M}{\Delta B_B}\right) \cdot 100$$

Donde I = Porcentaje de inhibición
ΔB_M = Diferencia de absorbancia en la muestra
ΔB_B = Diferencia de absorbancia en el blanco

RESULTADOS

En la figura 2 se puede observar que el contenido de polifenoles totales es máximo en la época de mayor calor en verano, disminuye gradualmente hacia el invierno y comienza a aumentar nuevamente en primavera, cuando brotan las hojas nuevas en octubre y noviembre; estas hojas nuevas presentan un mayor contenido de polifenoles que las viejas, en tanto que a fines de noviembre y diciembre las hojas nuevas han envejecido y el contenido en polifenoles es más parecido entre ellas, llegando de nuevo las hojas a su máximo contenido en polifenoles en los días de más calor de los meses de verano del año siguiente.

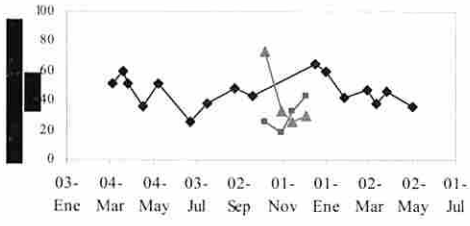


Figura 2. Contenido de polifenoles totales en extracto de hojas de murta

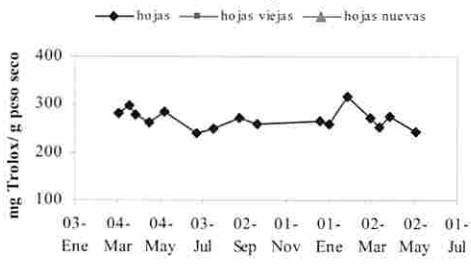


Figura 3. Capacidad de captación de radicales libres del DPPH de extracto de hojas de murta [mg Trolox/ g peso seco]

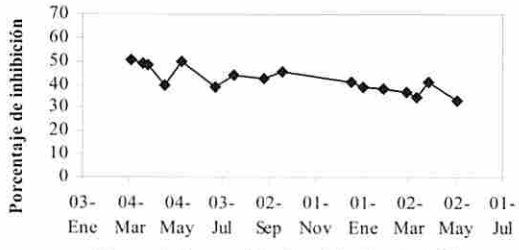


Figura 4. Prevención de oxidación de ácido ascórbico en presencia de ion Cu

La capacidad antioxidante, ya sea medida como capacidad equivalente de Trolox, para atrapar radicales libres (Figura 3) o como porcentaje de inhibición de la oxidación del ácido ascórbico en presencia de Cu^{+2} (Figura 4), también es mayor en la época de mayor calor, en verano, y decae lentamente a lo largo del resto del año. Se aprecia que estos resultados de la actividad antioxidante coinciden con la concentración de polifenoles totales en las hojas.

CONCLUSIONES

Para el clima de esta zona donde se realizó el estudio, que es un clima más bien templado, no se aconseja cosechar las hojas en primavera porque aparecen las hojas nuevas, salvo que se cosechen sólo de un tipo de ellas, de las cuales las nuevas son escasas en comparación a las viejas; la mejor época de cosecha de las hojas es el período de tiempo en que los polifenoles están a mayor concentración, que es muy corto, y coincide con los días de mayor calor en verano. Como depender del tiempo (calor máximo) para cosechar las hojas de plantas que muchas veces están a gran distancia del laboratorio, se puede optar por cosechar en otoño, con menor contenido de polifenoles pero también menor variación, lo cual debería permitir obtener resultados más repetitivos, no llegando al nivel óptimo en cuanto a formación de película. Estas son las condiciones de cosecha empleadas en los trabajos publicados en películas de CMC (Bifani et al., 2007) o de gelatina de pescado (Gómez-Guillén et al., 2007).

AGRADECIMIENTO

A la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, por financiar el trabajo a través del Proyecto DIUFRO 120617.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Bifani, V., Ramírez, C., Ihl, M., Rubilar, M., García, A. and Zaritzky, N. 2007. Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose based edible films. LWT-Food Science and Technology 40 (8): 1473-1481
- Gómez-Guillén, C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A. and Montero, P. 2007. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). Food Hydrocolloids 21: 1133-1143
- Gontard, N., Guilbert, S. and Cuq, J. L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. Journal of Food Science, 57 (1): 191-195,199.
- Mali, S., Grossmann, M.V., García, M. A., Martino, M.N. and Zaritzky, N. E. 2006. Effect of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films different starch sources. Journal of Food Engineering, 75 (4): 453-460.
- Montenegro G. 2002. *Ugni molinae Turcz*. En G. Montenegro y B. N. Timmermann, Chile nuestra flora útil. Guía de uso apícola, medicinal folclórica, artesanal y ornamental. 2th Ed. Santiago, Ediciones Universidad Católica de Chile. p: 241-242.
- Oosterveld, A., Beldman, G. and Voragen, A.G.J. 2000. Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar-beet pulp. Carbohydrate Research, 328 (2): 199-207.
-Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C. and Jackson, M.G. 2005. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. Journal of Food Engineering. 70 (2): 205-210.
- Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C. and Sensidoni, A. 2003. Starch-methylcellulose based edible films: Rheological properties of film-forming dispersions. Journal of Food Engineering, 59 (1): 25-32.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J. and Núñez, M.J. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (1): 59-64.
- Sarma, A.D., Sreelakshmi, Y., and Sharma, R. 1997. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. Phytochemistry 45(4): 671-674.
- Seguel, I., Peñalosa, E., Gaete, N., Montenegro, A. y Torres, A. 2000. Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile. Revista Agro Sur, 28 (2): 32-41.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D. and Roques, M. A. 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. Food Hydrocolloids, 15 (4-6): 423-432.

EVOLUCION DEL COLOR Y LA ACTIVIDAD ENZIMATICA (PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA) EN RODAJAS DE CARAMBOLO (*Averrhoa Carambola L.*) FRESCO CORTADO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN ATMOSFERA MODIFICADA

Blach, Diana; Donado, Johanna y Pinzón, Magda I.
UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES EN POSTCOSECHA (LIP)
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
Calle 12 N Carrera 15, E-mail: postcosecha@uniquindio.edu.co
ARMENIA – COLOMBIA

Palabras Claves: propiedades bioquímicas, carambolo, atmósfera modificada, peroxidasa, polifenol oxidasa, color,

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del empaque en atmósfera modificada sobre la evolución del color y la actividad enzimática peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO) en rodajas de carambolo fresco cortado, a diferentes tiempos de almacenamiento. Para este se usaron rodajas de 5 mm de espesor en estado de madurez 5, con aplicación de tratamiento químico previo, para posterior almacenamiento en atmósfera modificada y a granel, como contraste, durante 28 días a 7°C y 90% de HR. Se encontró que la evolución del color es directamente proporcional a la actividad enzimática la cual a su vez es visiblemente influenciada por la cantidad de oxigeno disponible en el empaque. El análisis enzimático se llevo a cabo mediante espectrofotometría Uv-Vis mostrando para la enzima POD su máxima concentración a los dias 7 para granel y 14 para atmósfera modificada, diferencia que no se aprecia en la enzima PPO la cual alcanza su máximo el día 14 para los dos empaques. En relación al proceso de pardeamiento enzimático se analizo el color y su uniformidad durante el almacenamiento. Mediante el uso de las coordenadas objetivas CIE: L*, a* y b* C* y h° se encontró, una variación significativa del color para el almacenamiento a granel donde su color inicial amarillo-verdoso se torna amarillo-rojo (colores pardeados) al transcurso del tiempo. En contraste a lo anterior, las rodajas de carambolo empacadas en atmósfera modificada presentan oscurecimiento pero su variación no es tan marcada, permitiendo así la aceptación visual del producto durante mayor tiempo de almacenamiento al retardar el pardeamiento y conservar una apariencia fresca y agradable al consumidor.

INTRODUCCION

Las frutas mínimamente procesadas son productos que se preparan y manejan para mantener su naturaleza fresca mientras proveen conveniencia al consumidor.

Su proceso incluye el pelado, rebanado, corte y empaque. El empaque en atmósferas modificadas es una técnica que utiliza materiales poliméricos que permiten el intercambio gaseoso y proporcionan una atmósfera diferente a la normal alrededor del producto celulosa (Lange, 2000).

El envasado en atmósfera modificada (EAM) extiende la vida útil de productos. Se basa en el empleo de nitrógeno sólo o mezclado con CO_2, y en la reducción del contenido en oxígeno hasta niveles normalmente inferiores al 1%. Las concentraciones de CO_2 han de estar comprendidas entre el 20 y 60%, siendo más efectiva su acción a bajas temperaturas. Esta técnica procura reducir al máximo el contenido en oxígeno para disminuir el deterioro de los productos por oxidación., se consigue realizando vacío y posterior reinyección de la mezcla adecuada de gases, de manera que la atmósfera que se consigue en el envase varia con el paso del tiempo en función de las necesidades y respuesta del producto (González-Aguilar et al., 2005).

El color café que se forma cuando se exponen al aire las superficies cortadas o maltratadas de frutas, verduras y mariscos, se conoce como *pardeamiento enzimático*

La peroxidasa y la polifenoloxidasa son enzimas que están implicadas en los procesos que conducen al desarrollo de las características organolépticas que determinan la calidad de las frutas

La POD es una oxidasa, interviene en la síntesis del etileno y por tanto en la actividad respiratoria, madurez, senescencia y cambios asociados a ella.

La enzima PPO juega un importante papel en la resistencia de los tejidos vegetales a los ataques microbianos, infección viral y a las temperaturas adversas.

Cinética Enzimática

Las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas específicas se llaman *actividades enzimáticas. Estas* pueden determinarse midiendo la velocidad de desaparición de los sustratos o la velocidad de aparición de los productos. Por lo tanto, podrían analizarse si se mide la absorción de oxígeno, la desaparición de compuestos fenólicos, la formación del color café o la formación de un intermediario en la reacción. (Miller, 2002).

Color

Es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de luz y que por lo tanto se puede medir físicamente en términos de su energía radiante o intensidad y por su longitud de onda.

El color es muy importante, ya que es el primer contacto que se tiene con los alimentos. La sensación que una persona experimenta al percibir el color influye sobre su reacción ante el alimento: puede rechazarlo o aceptarlo, pasando entonces a considerar la bondad de otras características. En términos formales, el color se considera como un factor de calidad, es decir, una característica del alimento que influye en la aceptación del mismo por el consumidor.

Su importancia tecnológica reside en la posibilidad de usar el color como índice de transformaciones naturales de los alimentos frescos o de cambios ocurridos en el proceso industrial.

El color es un resultado de la luz irradiando un objeto que luego es percibido por un observador. Pueden ser definidos tres atributos del color:

-. Su claridad y brillo o valor: Cantidad de claridad en el color, va de negro pasando por gris a blanco.

-. Su croma o saturación: Cuanta intensidad o debilidad del color.

-. Su tonalidad: En el punto donde el color reside en el espectro visible (rojo, verde, amarillo, o azul y así sucesivamente).

CIELAB. En este sistema se define un espacio en coordenadas rectangulares (L*, a*, b*) junto con otro en coordenadas cilíndricas (L*, h*, c*). Las coordenadas h* y c* se pueden determinar mediante las ecuaciones (1) y (2).

$$h^*_{ab} = arctg\frac{b^*}{a^*} \qquad (1)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \qquad (2)$$

Los modelos de color de la CIE utilizan estas coordenadas para localizar un color en el círculo cromático de color. (Figura 1)

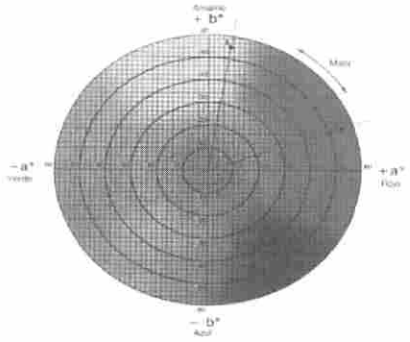


Figura 1. Circulo cromático de color

Los parámetros o valores cromáticos son: L* Eje vertical que presenta la luminosidad del color, teniendo en la parte inferior el negro que tiene un valor de cero, y en la superior el blanco con un valor de 100, a* Tendencia del verde (-) al rojo (+) o eje x, b* tendencia del azul (-) al amarillo (+) o eje y, c* indica el croma y es la distancia del centro al punto en cuestión. Y h* es el ángulo de matriz, es una medida angular (Correa, 2002).

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se usaron frutos de carambolo *(Averrhoa carambola L.)*, de los Almacenes Ley Armenia (Colombia) provistos por la distribuidora FRUVER; en estado de maduración 5 según la Tabla de color establecida por García y Mejia (2004).

Preparación de la muestra

El fruto limpio se lavó por inmersión en una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio, se cortó en rodajas de 0.5 cm de espesor, eliminando las puntas del fruto. Posteriormente el producto se sometió a tratamiento químico con 200 ppm de hipoclorito de sodio, solución de Cloruro de calcio al 2% como texturizante, solución de ácido ascórbico 500 ppm como antioxidante y solución de ácido cítrico 1000 ppm como preservante. Se escurrió, pesó (aproximadamente 250 g/bolsa) y se empacó en atmósfera modificada, utilizando MAPAX 210: CO_2 5 -40% Molar, O_2 5 – 25 %Molar, N_2 Balance (AGA, 02006), en bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD) de 70 micras. En contaste se realizo el mismo ensayo a granel manteniendo en ambos casos condiciones de 7°C y 90% de humedad relativa.

Preparación de extracto de enzimas: A 5 g de fruto fresco macerado se le adicionaron 25 mL de tampón fosfato 0.2 M a pH 6.5, 1 g de polivinilpirrolidona y 250 µL de tritón X-200. Se homogenizó en un homogenizador marca Hirosagua airon Works de 18000 rpm por 6 min (30 segundos homogenizando a 0°C en baño de hielo y 30 segundos en reposo), la mezcla se centrifugó en una centrífuga IEC – Centra modelo MP4R a 4400 rpm por 15 min y luego 12000 rpm por 30 min a 4°C, el sobrenadante se mantuvo a 0°C hasta el momento de reacción.

Actividad peroxidasa (POD): Se preparó un blanco que contenía 2.7 mL de tampón fosfato 0.2 M a pH 6.5, 0.2 mL de guayacol al 1%, 0.1 mL de H_2O destilada se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos Hewllet Packard modelo HP-8453 a una longitud de onda de 485 nm. Para la muestra, se agregaron 0.075 mL del extracto al blanco, remplazando el H_2O por 0.1 mL peróxido de hidrógeno al 1.5 %, y leyó la absorbancia cada 4 segundos por 6 minutos

Actividad Polifenoloxidasa (PPO): Se preparó un blanco que contenía 3.0 mL de catecol 0.07 M, se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos Hewlett Packard modelo HP-8453 a una longitud de onda de 420 nm. Para la muestra se usaron 0.035 mL del extracto, y leyó la absorbancia cada 5 segundos por 6 minutos. (Pinzón, 2000).

Color:

Se midió por reflectancia utilizando un espectrocolorímetro marca Minolta CM-10, con observador 10° e iluminante D65. Se midieron las coordenadas L*, a*, b* a los frutos en cada un de los empaques (Pinzón, 2000).

Diseño experimental: Se realizó un análisis de varianza utilizando el programa Statgraphics plus versión 5.1 con un diseño factorial con dos factores 2 y un nivel de significación de 0.05.

A: Tipo de Almacenamiento (1 Granel, 2 Atmósfera modificada)

B: Tiempo (día 0, 7, 14, 21 y 28)

RESULTADOS

La figura 2a y 2b muestra un patrón de comportamiento de las enzimas similar para los empaques, con diferencia significativa $p < 0.05$ entre sus valores, donde la actividad enzimática (absorbancia) aumenta en los primeros días de almacenamiento. En la POD este proceso acelerado inicial de oscurecimiento está relacionado probablemente con su acción en el último paso de polimerización de los alcoholes cinamílicos para formar ligninas, evidenciando la responsabilidad del proceso de lignificación en el oscurecimiento de tejidos sometidos a daño mecánico y almacenamiento durante periodos determinados (Imberty et al., 1985).

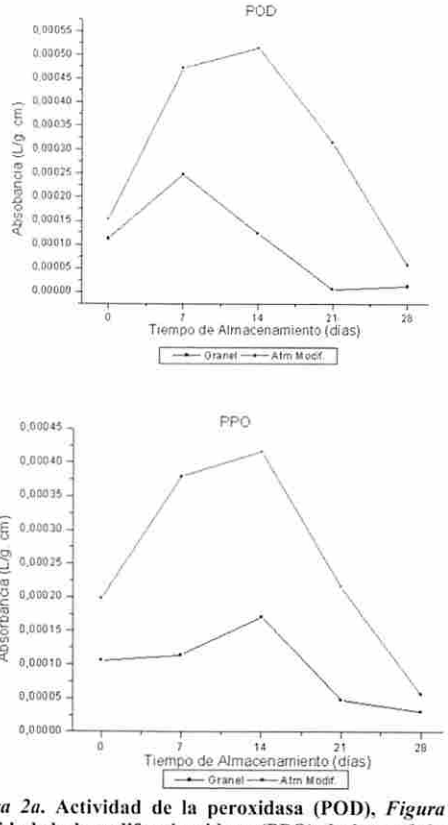


Figura 2a. **Actividad de la peroxidasa (POD),** ***Figura 2b.*** **Actividad de la polifenol oxidasa (PPO) de las rodajas de carambolo fresco cortado almacenado a granel y atmósfera modificada en función del tiempo de almacenamiento.**

El hecho que la actividad de la POD esta directamente relacionada con el oxigeno disponible del medio explica porque el producto almacenado a granel presenta colores pardos notorios a los 7 días, contrario a lo que ocurre en atmósfera modificada (día 14) evidenciado así la eficacia de esta técnica en la disminución del pardeamiento enzimático al minimizar el contacto del producto fresco cortado con el oxigeno.

La enzima PPO alcanza sus valores máximos el día 14 para los dos empaques, pero muestra una evidente diferencia entre sus valores. Este incremento inicial puede estar influenciado por los procesos de maduración y senescencia, relacionados con la respiración del producto en el empaque, durante los cuales se generan productos de degradación, que aumentan la concentración de sustratos generando productos de color oscuro (Nicolás et al. 1994).

En relación con este comportamiento otros autores han observado que niveles bajos de O_2 (inferiores al 5%) en combinación con concentraciones de 5 – 10 % de CO_2, retrasan el oscurecimiento y aumenta la vida en anaquel de lechuga y otros productos (Cantwell, 1992).

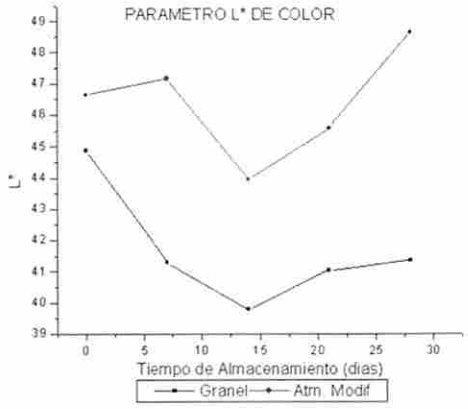


Figura 3. **Variación del parámetro L* de color de las rodajas de carambolo fresco cortado almacenadas a granel y atmósfera modificada en función del tiempo de almacenamiento.**

En el empaque a granel se muestra una tendencia marcada de disminución de luminosidad en comparación al empaque en atmósfera modificada, esto como consecuencia de la pérdida drástica de sólidos solubles con el consecuente cambio de coloración (de amarillo verdoso a café) de las rodajas posiblemente causado por procesos de pardeamiento enzimático que disminuyen la reflectancia haciendo el color más puro, menos luminoso.

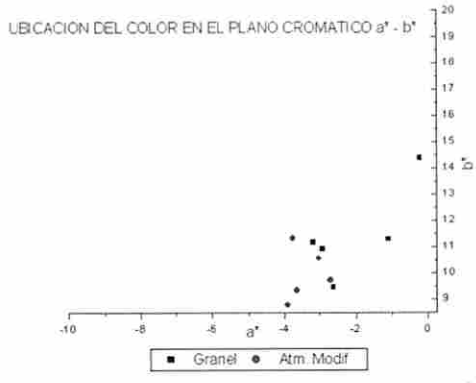


Figura 4. **Ubicación en el plano cromático a*-b* de la trayectoria del color de rodajas de carambolo fresco cortado almacenadas a granel y atmósfera modificada**

Las rodajas empacadas a granel, presentan ataques enzimáticos que generan una tendencia del color inicial hacia el amarillo - rojo generando colores pardos desagradables y caracteristicos del carambolo en deterioro. Teniendo en cuenta que el color se mantiene por mayor tiempo a medida que disminuye el contacto de las muestras con el aire, en el almacenamiento a atmósfera modificada donde la disposición de oxigeno es reducida, el deterioro es menor y el color tiende hacia el rojo a medida que transcurre el tiempo, generando al igual que en granel un oscurecimiento pero de manera paulatina y menos notable en el producto.

En relación con éste comportamiento, muchos autores han reportado la eficiencia del uso de atmósferas modificadas para mantener el color de varios productos. El uso de empaque en atmósfera modificada (EAM) pasivo (1.5-3.0% O_2 y 4.1-6.6 %CO_2) mantiene el color verde y la calidad comercial de cebollin fresco cortado, (Hong y Kim, 2004).

CONCLUSIONES

Para la actividad enzimática de PPO y POD se comprobó que en la medida en que el empaque evita el contacto directo de las rodajas de carambolo fresco cortado con el aire (oxígeno), se disminuyen los efectos de pardeamiento durante el tiempo de almacenamiento.

Al comparar tratamientos se puede inferir que el almacenamiento en atmósfera modificada es más eficaz al mantener el color aceptable por mayor tiempo, retardando así el pardeamiento y conservando una apariencia fresca y agradable al consumidor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Quindío (UQ), Facultad de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Agroindustriales, al Laboratorio de Investigaciones en Postcosecha (LIP), (Armenia, Colombia); a la Fundación INTAL (Medellín, Colombia).

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

- CantwelL M. 1992. Postharvest handling systems: Minimally processed fruits and vegetables. *In: Postharvest Technology oj Horticultural Crops.* 2nd ed. Division of Agricultural and Natural Resources. AA Kader. (Ed.) University of California Publication 3311. pp 277-281.
- Correa, MA. 2002. *Temas en Tecnología de alimentos* Vol. 1 Grupo Editorial Alfa omega. México DF. Pp. 21-22, 272-279.
- García, S., Mejía, G. 2004. Evolución de las propiedades físicas y bioquímicas durante la cinética de deshidratación osmótica del carambolo (*Averrhoa carambola L.*) var. Icambola. Trabajo de grado, Programa de Química, Facultad de ciencias básicas y tecnológicas, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. (Inédito)
- Gonzalez-Aguilar GA, Gardea AA, Cumenea N. F. 2005. *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados.* Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.). México.
- Hong SI, D Kim. 2004. The effect of packaging treatment on the storage quality of minimally processed bunched onions. *Int. J. of Food Sci. and Technol.* 39 (10): 1033-1041.
- Imberty, A, R Goldberg, AM Catesson. 1985. Isolation and characterization of populus isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta.* 164:221-226
- Lange DL. 2000. New Film technologies for horticultural products. *HorTechnol.* 10(3): 487-490.
- Miller D. D., 2002. *Química de Alimentos Manual de Laboratorio.* Departamento de Ciencia de los Alimentos. Cornell university. Ithaca, Nueva York.
- Nicolas J, F Richard-Forget, P Goupy, MJ Amito. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. CRC *Crit. Rev. Food. Sci. Nut.* 34(2): 109-157.
- Pinzon, M. I., 2000. *Química de Alimentos Manual Para el Laboratorio.* Programa de Química, Facultad de ciencias básicas y tecnológicas, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia

RELATIONSHIPS BETWEEN ZEIN PATTERN AND WET AND DRY MILLING CHARACTERISTICS OF CORN

Farroni Abel[1], Robutti José[1,2], Percibaldi Nora [1] and Borrás Francisco[1]
[1]Laboratorio de Calidad de Alimentos, INTA, Av. Frondizi, km 3,5, CC31, 2700 Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
[2]Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. E-mail: afarroni@pergamino.inta.gov.ar

Key words: science, maize, quality, zeins, RP-HPLC

SUMMARY

Seven corn hybrids grown at Pergamino Station, Argentina were selected to cover a wide range in kernel hardness which was estimated trough coarse/fine mill ratio (C/F), test weight (TW) and percent floaters (PF). Starch yield was expressed as percent of total grain weight (STY) or percent of total starch content (STEX). Compositional parameters analyzed were: protein (TP), moisture content and starch (ST). Zein characterization was performed by RP-HPLC. Correlation analyses were performed between the area of the peaks eluting at ca. 26 min and 46 min (p26 and p46). STY varied from 47.98 to 62.18. The most relevant regression coefficients found in this study were: C/F vs. p26 r^2=0.817, IF vs. p26 r^2=0.715, ST vs. p46 r^2=0.5377, C/F vs. p46 r^2=0.40995. The two first coefficients confirm previous findings. Multiple linear regression study showed significant association between TP and STY ($p<0.05$) which is in agreement with previous work.

The relationship of p46 with ST and TP with STY were in agreement with reports indicating a negative association between protein and starch or starch yield. The associations of STY and zein chromatograms were not high enough as to use the zeins as predictors of wet milling characteristics. Higher protein content is related to higher grain density. Although this is a desirable property in dry milling industry it could negatively affect wet-milling performance. It is possible that other zeins not detected in this study are associated with starch properties.

INTRODUCTION

Zeins are genotypic markers that can be used as predictors of quality traits in breeding selection process. Some specific zeins have been quantitatively associated with kernel hardness which is an important quality parameter for the maize dry-milling industry as well as for post-harvest management. Flint maize is preferred by this industry because of its high yield of hominy grits in the milling process (Watson, 1988). Mestres & Matencio (1996) showed association between 27 kDa γ-zein and flaking grits yield. Higher protein content is related to higher grain density. Although this is a desirable property in dry milling industry it could negatively affect wet milling performance. Robutti et al (1997) encountered differences in zein composition of coarse and fine endosperm milling fractions. Maize hybrids with higher starch content than normal are considered to have greater end-use values to wet-milling process. Soft corn is generally preferred for starch producing industries. Factors other than starch content of the grain, however, probably also relate to yields of starch and other high-value products from wet-milled maize. It was envisaged that other attributes of industrial interest might be associated with the zein pattern. Understanding these relations may lead to a means of evaluating corn milling potential for specific uses.

It also may help breeders to obtain hybrids yielding greater proportions of high-valued products. The objective of this work was to correlate zein pattern with corn characteristics of relevance in dry and wet milling.

MATHERIALS AND METHODS

Maize samples

Seven corn hybrids were grown at Pergamino Experimental Station, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Ears were harvested at physiological maturity and dried at 25 ºC until moisture content reached ~10 %. Samples were selected to cover a wide range in kernel hardness.

Methods

RP-HPLC Zein analysis

Zeins were analyzed as described by Robutti et al 2000. Kernels were ground in a MCII refrigerated mill and zeins were extracted with ethanol 70 %, 0.2 % dithiotreitol and sodium acetate 0.5 %. A Hewlett Packard 1050 HPLC with a quaternary pump and UV-Vis detector was used. The column used was a Vydac C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm particles and 300 Å pore diameter) at 60 ºC. Mobile phase used was; solvent A: water + 0.1% (v/v) trifluoracetic acid; solvent B: acetonitrile + 0.1% (v/v) trifluoracetic acid. Samples were eluted at 1 ml/min with a linear 50 min 28-60.5% solvent B gradient fllowed by 10 min isocratic elution at 60.5% solvent B. Absorbance was measured at 210 nm. Chromatogram analysis was performed using HP Chem Station 3.0 software. Area of the peaks eluting at ca. 26 min and 46 min (p26 and p46) were determined. These peaks had been previously shown to significantly correlate with kernel hardness. (Robutti et al 1994, 1997, 2005).

Kernel hardness

Dry milling characteristics were estimated trough kernel hardness. Flinter maize yields a mayor amount of coarse fractions (Pomeranz 1996). Corn was ground in a Stein Laboratory impact mill for 15 seconds and sifted at full speed for 1 minute in a Chopin Rotochoc mechanical sifter equipped with 1 mm and 0.5 mm sieves. Coarse/fine mill ratio (C/F) was calculated weighting retained material over 1 mm sieve and material passing 0.5 mm sieve (Robutti et al 1997).

Kernel hardness is associated to density (Pomeranz et al 1984, Peplinski et al 1992). According to this, percent of floaters (PF) were measured in a 1.305 g/cm^3 density kerosene-Cl_4C solution, (Robutti et al 1995). Higher number of floating kernels indicated a softer texture.

Test weigh (TW) was measured according to SENASA Act. XXVI Res. 1075/94 using a Tripette & Renaud TR 400 automatic instrument. Higher test weight values are generally associated with flintier maize (Watson 1984).

Wet milling properties

To asses wet milling properties a laboratory starch extraction method based on the procedure described by Ji. et al (2004) was used. 10 whole kernels were steeped in 15 mL of 10% sodium metabisulfite solution at 45°C for 72 hr, followed by manual removal of the pericarp and germ with forceps. The separated endosperm was placed in a 50-mL centrifuge tube with 10 mL of distilled water and homogenized using a vortex type tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25, 600W, Tekmar, Cincinnati, OH) at 1,600 rpm for 60 sec. The homogenized slurry was filtered by using a 30 µm nylon filter under vacuum with several washes, for a total wash water volume of 500 mL.

Coarse and fine fibres and part of the protein were removed during filtration. The starch-protein mixture from the filtrate was further separated after sedimentation at 4 °C for 2 hs. Each sample was separated three times, with 250 mL of distilled water used for each of the three separations. Starch was dried by air convection and yield was corrected for residual moisture content. All treatments were performed in replicates of six, and the results averaged. Starch yield was expressed as percent of total grain weight (STY) or percent of starch content (STEX).

Compositional properties.
Total protein (TP) was measured by the Kjeldahl method (AACC Method 46-129, 1995). Moisture content was determined following the AACC Method 44-16 (1995) standard procedure. Starch content (ST) was assessed in 90% dimethylsulfoxide solubilized samples as described by Knutson 1986. All values are expressed as percent on dry basis (%db).

Statistical analysis
Pearson correlation coefficients, single and multiple linear regression were performed using SPSS v 11.5 package, Lead Technologies Inc.

RESULTS AND DISCUSSION

Compositional and dry milling properties.
Table 1 summarizes results of kernel hardness estimators and compositional properties. Hybrid 4 had the lowest PF, highest TW and highest protein and it also showed the highest value of C/F ratio. Hybrid 2 had the lowest C/F ratio, the highest PF and the lowest TW indicating a soft endosperm. Protein content ranged from 7.4% to 10.8%, starch content varied between 65.4 % and 64.8% and amylose between 22.7% and 24.3%.

Table 1: proximate composition (%db) and kernel hardness estimators.

Hybrid	PF	TW (kg)	C/F	TP (g%)	ST (g%)
1	84	77,2	3,4	8,4	69,9
2	100	68,7	2,2	9,5	74,8
3	17	77,7	5,0	10,0	76,7
4	0	82,5	5,2	10,8	65,4
5	98	75,6	2,9	7,4	76,5
6	90	75,9	3,0	7,5	78,1
7	21	77,5	3,7	8,3	76

Wet milling characteristics.
Starch yields obtained from hybrids in this study are shown in Table 2. Standard deviation of six replicates was used as measure of reproducibility. Starch yield varied from 48.0 % to 62.2 % when expressed as percent of grain weight and from 72.2 % to 89 % when it was calculated as the fraction of total starch content. The method presented good reproducibility.

Table 2: Starch yield and % starch extraction obtained from laboratory wet milling procedure expressed as % dry basis (mean ± SD).

Hybrid	Starch yield	Starch extraction
1	62,2 ± 1.71	88,95 ± 2.44
2	59,67 ± 1.36	79,77 ± 1.81
3	55,34 ± 2.71	72,15 ± 3.54
4	47,98 ± 1.29	73,36 ± 1.97
5	61,95 ± 1.07	80,98 ± 1.40
6	59,69 ± 0.46	76,43 ± 0.58
7	59,22 ± 3.00	77,92 ± 3.95

Pearson correlation analysis showed significant coefficients for C/F vs. PF (-0.912) and C/F vs. TW (0.849) ($p<0.05$) as expected. When compared STY with compositional parameters the correlations found were: STY vs TP (-0.830), STY vs C/F (-0.806), STY vs PF (0.796); ($p<0.05$). When stepwise multiple regression analysis was run it showed significant between STY and TP according to the following equation:

$$STY = -3.24\ TP + 86.682 \qquad eq.\ 1$$

This negative association between STY and protein content is in agreement with previous work (Fox et al 1992, Sing et al 2001). Compositional parameters affect endosperm properties (Pomeranz et al. 1994, Mestres & Matencio 1996). Flinter corn tends to have more protein content (Mestres & Matencio 1996, Robutti et al 2005) and high density making it more difficult to mill. Besides, due to the close association of starch and protein in the endosperm it could be more difficult to extract starch of that type of maize. This explains the preference of wet milling industry for softer maize. In this study we did not find significant correlation of wet milling characteristics with starch content, and this is in agreement with Fox et al (1992). Singh (2001) found that correlation only for STY, but the coefficient was greater (absolute value) for total protein than for starch content (-0.547 and 0.424 respectively).

RP-HPLC analysis
Several authors have studied the relationships between zeins characteristics, physical properties and milling behaviour of maize endosperm (Mestres & Matencio 1996, Robutti et al 1994, 1997, 2005; Eyherabide et al 2005). Specifically in RP-HPLC studies two main peaks have shown association with kernel hardness: peaks eluting at ca. 26 min and 46 min (p26 and p46). Chromatograms were normalized to eliminate the influence of sample weight. A regression study was made between the area under those peaks and the measured parameters (Table 3). Associations of p26 and p46 with C/F and PF, the later negatively associated, reflect the relationship between zein chromatographic peaks and kernel hardness. ST association with p46 was negative. Although these correlation coefficiens are not high enough to conclusively employ zein chromatographic peaks as predictors of wet-milling properties they suggest a relationship between these parameters and the zein pattern.

Table 3: Determination coefficients (r^2) between areas of RP_HPLC peaks and quality prameters.

Parameter	26 min peak	46 min peak
C/F	0.817	0.409
PF	0.715	----
ST	----	0.538

CONCLUSIONS

Maize hybrids showed significant variations in composition and milling properties. Corn suitability for a given industry could be assessed measuring physical and biochemical quality parameters to determine the better industrial use for a material.

The starch extraction laboratory method showed good reproducibility, correlation with compositional parameters and the possibility of using ten kernels makes it an interesting technique for breeding when seed availability is an important factor. Although starch content is an important parameter for wet milling industy the easyness of its extraction that reflects the strength of starch binding to the protein matrix has to be taken into account when evaluating the corn suitability for wet milling. The association of zein chromatographic peaks and parameters related to milling behavior are not high enough to conclusively employ them as predictors of starch yield, but a relationship between these parameters and the zein pattern is suggested. It is also possible that other zeins not detected in this study are associated with starch properties. Nevertheless, this paper constitutes a first approach in a comprehensive study to establish the relationships between zeins and wet milling properties.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Dr. Guillermo Eyherabide and Dr. Alfredo Cirilo for providing the corn samples for this study, Dr. Pilar Buera for revising the manuscript. We also acknowledge Ms. Graciela Bienzobáz and Ms. Silvina Yanigro for technical assistance.

REFERENCES

-American Association of Cereal Chemists. 1995. Approved Methods of the AACC. The Association: St. Paul, MN.

-Fox, S. R., Jhonson, L. A., Hurburgh, Jr. C. R., Dorsey-Redding, C. and Bailey, T. B. 1992. "Relations of Grain Proximate Composition and Physical Properties to Wet-Milling Characteristics of Maize". Cereal Chem. 69(2): 191-197.

-Ji, Y., Seetharaman, K., White, P. J. 2004. "Optimizing a Small-Scale Corn-Starch Extraction Method for Use in the Laboratory". Cereal Chem. 81(1):55–58

-Knutson, C. A. 1986. "A simplified Colorimetric Procedure for Determination of Amylose in Maiz Starches". Cereal Chem. 63(2):89-92

-Mestres C. and Matencio F. 1996. "Biochemical Basis of Kernel Milling Characteristics and Endosperm Vitreousness of Maize". Journal of Cereal Science 24: 283-290.

-Peplinski, A. J., Paulsen, M. R., Bouzhajer, A. 1992. "Physical, Chemical, and Dry-Milling Properties of Corn of Varying Density and Breakage Susceptibility". 1992. Cereal Chem 69(4): 397-400.

-Pomeranz, Y., Hall, G. E., Czuchajowska, Z., Lai, F. S. 1986. "Test Weight, Harness and Breakage Susceptibility of Yellow Dent Corn Hybrids". Cereal Chem 63: 349-351.

-Pomeranz, Y., Martin, C. R., Traylor, D.D., Lai, F. S. 1984. "Corn Hardness Determination". Cereal Chem 61(2): 147-150.

-Robutti, J. L. 1995. "Maize kernel hardness estimation by near infrared transmission analysis". Cereal Chem. 72:632-636.

-Robutti, J. L. and Borrás, F. S., Ferrer M. E., Bietz, J. A. 2000. "Grouping and Identification of Argentine Maize Races by Principal Component Analysis of Zein Reverse-Phase HPLC Data". Cereal Chem. 77(2): 91-95.

-Robutti, J. L., Borrás, F. S., Colazo J. C. 1994. "Las zeinas de alto contenido de azufre y su relación con la textura endospérmica del maíz". Revista de Investigaciones agropecuarias, 25: 105-114.

-Robutti, J. L., Borrás, F. S., Eyherabide, G. H. 1997. "Zein Compositions of Mechanically Separated Coarse and Fine Portions of Maize Kernels". Cereal Chem 74(1): 75-78.

-Robutti, J. L., Farroni, A. E., Di Martino, A. A., Borrás, F. S., Eyherabide, G. H. 2005. "Estudio de la composición de las zeinas y glutelinas en híbridos comerciales de maíz en diferentes ambientes. Su asociación con la dureza del grano". In VII Congreso Nacional de Maíz. Rosario, Argentina.

-Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Norma XXVI, Res. 1075/94. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos del Ministerio de Economía y Producción. República Argentina.

-Singh, S. K., Jhonson, L. A., Pollak, L. M., Hurburgh, C. R. 2001. "Compositional, Physical and Wet-Milling Properties of Accessions Used in Germaplasm Enhancement of Maize Proyect". Cereal Chem. 78(3): 330-335.

-Watson, S. A. 1984. "Measurement and maintenance of quality". Pages 125-183 in: Corn: Chemistry and Technology. S. A. Watson and P. E. Ramstad, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.

-Watson, S. A. 1988. "Corn marketing, processing and utilization". Pages: 881-940. In: Corn and Corn Improvement. G. F. Sprague and J. W. Dudley (eds.). ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI.

PROPIEDADES TÉRMICAS Y MECÁNICAS EN COPOS DE MAÍZ. RELACIÓN CON EL CONTENIDO Y MOVILIDAD DEL AGUA.

Farroni, Abel. [1,2], Matiacevich, Silvia[1], Guerrero, Sandra[1], Alzamora, Stella.[1] y Buera, Pilar.[1]
[1]Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160. Ciudad Universitaria. C1428EGA. [2]Laboratorio de Calidad de Alimentos, EEA Pergamino, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Av. Frondizi, Km. 4,5, CC31, 2700. Pergamino. E-mail: pilar@di.fcen.uba.ar
BUENOS AIRES - ARGENTINA.

Palabras clave: Propiedades químicas y bioquímicas, copos de maíz, movilidad de agua, textura, transiciones térmicas.

RESUMEN

Las propiedades mecánicas y térmicas resultan de vital importancia a nivel industrial para evaluar el procesamiento, envasado y almacenaje de productos alimenticios. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en las propiedades mecánicas y térmicas de copos de maiz en función de la humedad y su relación con la movilidad del agua. Se utilizaron copos de maíz comunes comerciales equilibrados a distintas humedades relativas, correspondientes a un contenido de agua (c.a.) entre 2,8 y 22,5%bs. Se realizaron pruebas de compresión hasta un 30% de deformación registrando la fuerza máxima ($F_{máx}$) obtenida. La temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó por calorimetría de barrido diferencial (DSC). La movilidad de agua se determinó por resonancia magnética nuclear de H resuelta en el tiempo (^{1}H-NMR), evaluando los tiempos de relajación transversal espín-espín (T_2). A bajos c.a. las curvas de compresión presentaron un perfil aserrado típico de materiales quebradizos, mostrando pérdida de crocancia y perfiles de compresión más suaves al aumentar el c.a. A c.a.≤16%bs las propiedades mecánicas reflejaron un efecto antiplastificante del agua y la $F_{máx}$ presentó un máximo para sistemas con 16%bs. El estudio de movilidad molecular mostró, a partir de c.a cercanos a la humedad de monocapa (5%bs), dos poblaciones de agua con distintos tiempos de relajación (T_{2S} y T_{2L}). El T_{2L} aumentó al aumentar el c.a., a partir del c.a donde se alisaron las curvas de compresión hasta alcanzar un valor constante a un c.a. cercano al máximo de $F_{máx}$. La evaluación de las propiedades mecánicas, como la pérdida de crocancia por el aumento del contenido de agua, a través del estudio de la fuerza máxima de compresión, se relacionó tanto con el aumento de la movilidad molecular del agua como con la temperatura de transición vítrea. El alisamiento de las curvas de compresión estuvo vinculada a la transición vítrea y con el máximo alcanzado para T_{2L}.

INTRODUCCIÓN

Las características texturales de alimentos sólidos de baja humedad son de gran importancia en la definición de su calidad y su apreciación por el consumidor. La sensación agradable asociada a la desintegración del producto en la boca, está estrechamente relacionada a sus propiedades mecánicas. Dentro de los atributos que definen la elección de los productos de tipo "snack", la crocancia es uno de los más importantes. El agua, con su efecto plastificante, produce la pérdida de crocancia en los alimentos. La adsorción de agua por los biopolímeros reduce la posibilidad de fractura e incrementa la disipación de energía elástica por deformación y relajación de estrés (Poliszko y col. 1995). La evaluación de las propiedades mecánicas se basa en técnicas sensoriales e instrumentales. Dentro de las pruebas instrumentales, la de compresión es muy empleada debido a sus correlación con el proceso de masticación (Roudaut y col., 2002). Los productos quebradizos se mantienen crocantes mientras conserven su estado vítreo, el cual puede ser determinado por calorimetria diferencial de barrido (DSC) (Slade y Levine 1995). Varios autores (Ruan y col 1999, Sai Manohar 2002) han demostrado que la distribución del agua puede afectar la reología y las propiedades mecánicas de una masa. La técnica de resonancia magnética nuclear (NMR) puede ser de gran utilidad en el estudio de este tipo de transiciones ya que proporciona datos sobre el movimiento molecular y la distribución de las poblaciones de agua en función de su interacción con los sólidos. Los tiempos de relajación transversal espín-espín de H^1 (T_2) son muy pequeños para los sólidos, aumentan al aumentar la movilidad molecular, y constituyen una forma de analizar los estados del agua en relación con los sólidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en las propiedades mecánicas y térmicas de los copos de maíz en función de la humedad y su relación con la movilidad del agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima e isoterma de adsorción

Se utilizaron copos de maíz del tipo común comerciales (CMC) equilibrados a distintas humedades relativas (H.R.) a 25ºC en desecadores conteniendo soluciones salinas saturadas en el rango 11-84%. El contenido de agua fue determinado gravimétricamente por diferencia de masa antes y después del secado hasta peso constante de las muestras en una estufa a 105ºC y se expresó como porcentaje de materia seca (% bs). La isoterma de adsorción de agua (gráfico de contenido de agua vs. actividad de agua) fue obtenido y ajustado con la ecuación de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) (Lomauro, et.al, 1985). El modelo de GAB permitió calcular el contenido de agua de la monocapa (m_o), el cual representa la saturación con una molécula de agua en cada uno de los sitios polares activos del adsorbato La actividad de agua (a_w) se midió utilizando un Aqua Lab Serie 3, (Decagon Devices Inc.) a 25ºC.

Determinación de las propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se midieron realizando una prueba de compresión utilizando una máquina Instron (modelo 1011, Canton, Massachussets, USA) equipado con una celda de carga de 50kg. Los copos de maíz enteros equilibrados a diferentes H.R. fueron colocados en envases cilíndricos de 50mm de diámetro hasta una altura de 30mm. Se comprimieron utilizando un pistón de 30mm de diámetro a 50mm/min hasta alcanzar un 30% de compresión, con detención automática, a fin de lograr la misma compresión para cada muestra. Deformaciones de un 20 o un 30% han sido utilizadas para estudiar la resistencia mecánica en este tipo de muestras (Harris y Peleg, 1996). Se obtuvieron los gráficos de compresión (fuerza de deformación (F) vs distancia (d)) de un promedio de 5 replicados y se calculó la fuerza máxima promedio ($F_{máx}$). A fin de cuantificar las fluctuaciones en la curva de deformación, se ajustó un modelo polinomial de grado 3. Se obtuvieron los residuos de ajuste y su dispersión expresada como desviación estándar (DE).

Determinación de propiedades térmicas

Las muestras equilibradas a diferentes H.R. fueron pesadas (aprox. 10mg) y selladas herméticamente en crisoles de aluminio de 40µl de capacidad, los mismos se cargaron en un calorímetro diferencial de barrido (DSC 822, Mettler Toledo, Suiza). Un crisol vacío y pinchado fue utilizado como referencia. Los termogramas fueron obtenidos desde -50ºC a 150 °C a una velocidad de calentamiento de 10ºC/min. La temperatura de transición vítrea, T_g, fue determinada como el

valor medio al cual ocurre el cambio en el calor específico (valor "midpoint"), analizado utilizando el software Star^e v.6.0 (Mettler Termal Análisis).

Estudio de la movilidad del agua por RMN

La resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR) resuelta en el tiempo, permite medir los tiempos de relajación transversal espín- espín (T_2) del hidrógeno. La evaluación de la movilidad del agua se realizó midiendo T_2 mediante la técnica eco de espin, utilizando una secuencia de pulsos 90°-tau-180° (Hahn). Se utilizó un equipo Minispec mq 20 de 20 Mhz, (Bruker, Alemania). Los tiempos característicos se evaluaron utilizando el software provisto por el fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades mecánicas

Los perfiles de las curvas de compresión de los cereales analizados presentaron una fuerte dependencia con el contenido de agua (Figura 1). A bajos c.a. el incremento de la fuerza fue constante hasta el final de la compresión. Luego de un breve acomodamiento inicial de los copos de maíz comienza la ruptura de los mismos, el quebrado y reacomodamiento de los fragmentos, esto hace que los puntos de contacto cambien produciendo sucesivas y bruscas variaciones de la resistencia generando un perfil con forma aserrada debido a las fluctuaciones en el registro de la fuerza (Gondek, 2006). Las diferencias en los perfiles de las curvas de compresión han demostrado ser una buena medida del grado de fracturabilidad (Peleg, 1997). Los fragmentos producidos se van acumulando bajo el pistón y generan una masa compacta cada vez más difícil de comprimir. A c.a. superior al 15%bs se observa una curva sigmoidea, típico comportamiento mecánico de materiales tipo esponja, debido al desplazamiento del aire del seno de la muestra, y con un perfil menos discontinuo y aserrado.

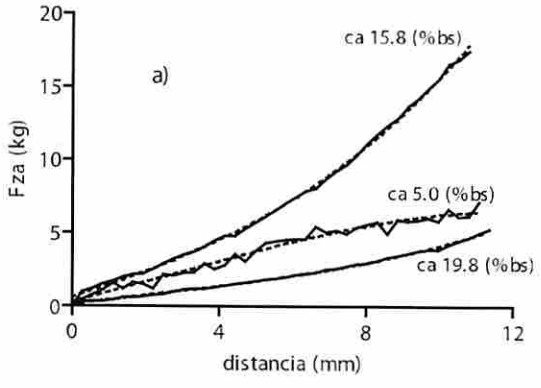


Figura 1. Curvas de compresión (fuerza máxima de deformación promedio vs distancia) (---) para algunos de los distintos contenidos de agua y curva de ajuste según polinomio de grado 3 (- - -).

El perfil aserrado correspondiente a las curvas de compresión es particular de cada muestra, y específicamente su alisamiento ha sido relacionado con el incremento en la actividad de agua del producto y la consecuente pérdida de crocancia (Harris y Peleg, 1996; Peleg, 2006). En la Figura 1 se observa que al aumentar el c.a el perfil de la curva experimental fue menos aserrado y con menos fluctuaciones presentando un mejor ajuste al modelo polinómico de tercer grado. En la Figura 2 puede observarse la disminución de la dispersión de los residuos con el aumento de c.a.. El coeficiente de ajuste (R^2) fue de un 95% para muestras hasta un 8,5%bs y un 99,9% para mayores c.a.. La variación de la desviación estándar promedio de los residuos (DE) en función del c.a. mostró una pronunciada disminución a partir de valores de c.a. mayores a 8,5%bs lo cual coincide con la obtención de curvas de deformación con menos fluctuaciones.

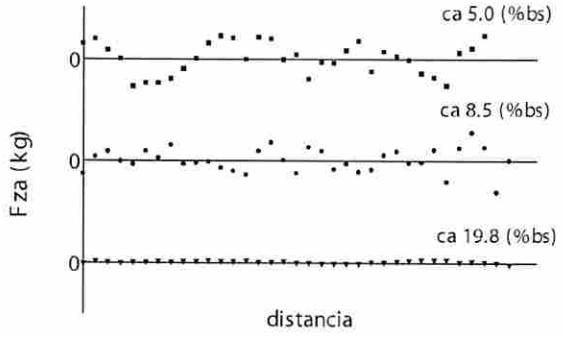


Figura 2: Variación de los residuos de ajuste de las curvas de compresión según el contenido de agua.

La Figura 3 muestra la evolución de la $F_{máx}$ promedio con el contenido de agua. A bajos c.a, la fuerza registrada fue pequeña, seguida de un incremento constante hasta valores de 16%bs de c.a. Luego la $F_{máx}$ decreció rápidamente con la humedad. El incremento de la $F_{máx}$ a valores intermedios de c.a. sugiere un efecto antiplastificante del agua en este rango de humedades que ha sido discutido por varios autores (Gondek y Lewicky., 2006). Una explicación para este fenómeno inesperado es que el agua adsorbida compacta la matriz, llenando huecos microscópicos (Harris y Peleg, 1996), dificultando de esta manera la propagación de las fisuras. Fontanet y col. (1997) sostienen que el comportamiento mecánico del pan extrudado está principalmente controlado por el almidón y propusieron un mecanismo de reorganización estructural de corto alcance facilitado por un incremento localizado en la movilidad molecular inducido por el agua. Chang y col. (2000) propusieron como explicación que el agua en pequeñas cantidades puede facilitar la reorientación de polímeros y llenar pequeñas cavidades en la matriz creadas por la deformación incrementando el orden estructural.

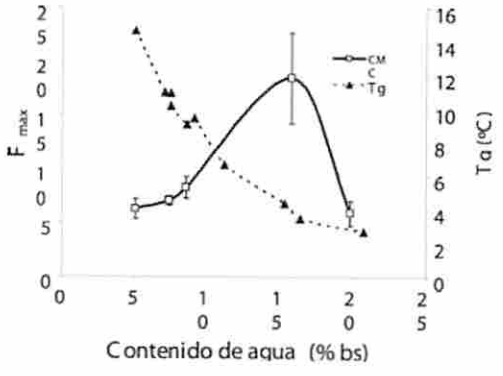


Figura 3. Variación de la fuerza de deformación máxima promedio (F_{max}) y de la temperatura (valor midpoint) de transición vítrea (T_g) obtenidos con diferentes contenidos de agua (± DE).

Propiedades térmicas.

Los termogramas analizados mostraron que la T_g obtenida disminuyó con el incremento en el contenido de agua (Figura 3). Se observó además, un evento endotérmico cercano a los 60°C poco modificable por el c.a. El origen del mismo aún es discutido en materiales con matriz de almidón (Chang y col., 2000), y reflejaría la pérdida de una red intramolecular de puentes de hidrógeno que aparentemente no repercute en las propiedades medidas en el presente trabajo. En los casos en que la T_g se superpuso con el mencionado evento endotérmico ésta fue determinada en un segundo barrido de temperatura (re-scan).

Movilidad del agua por RMN-H^1.
La Figura 4 muestra los tiempos de relajación T_2 en función del contenido de agua. El análisis mostró un componente de relajación rápida (T_{2S}) con valores de 0,025ms a 0,035ms. Esta población estaría determinada por la movilidad de protones pertenecientes a los sólidos y moléculas de agua asociadas al sólido. El valor de T_{2S} se incrementó a contenidos de agua (15%), correspondientes con valores de T_g cercanos a la temperatura de medición (40°C) sugiriendo un incremento en la movilidad debida a la plastificación de los sólidos por el agua. Cuando el contenido de agua superó los valores de m_o, se observó la aparición de un componente de relajación más lenta. El tiempo de relajación correspondiente (T_{2L}). se incrementó en un rango de 0,4ms a 1,3ms a medida que aumentó el c.a., poniendo de manifiesto la creciente movilidad de los protones del agua, y luego se mantuvo constante.

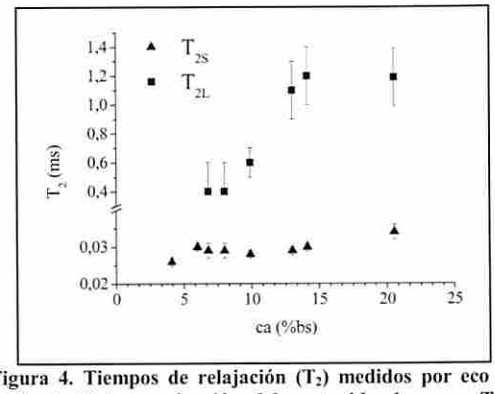


Figura 4. Tiempos de relajación (T_2) medidos por eco de espín de Hahn en función del contenido de agua. T_{2S}= componente de tiempo de relajación rápido; T_{2L} =componente de tiempo de relajación más lento.

Integración de los resultados.
El efecto plastificante del agua se evidencia en las pruebas mecánicas solamente a partir de un contenido de agua crítico como una disminución en la resistencia de la muestra mientras que en las propiedades térmicas se registra como una disminución progresiva de la T_g. La movilidad de pequeñas moléculas como el agua está determinada por la viscosidad local (a nivel molecular) en vez de la viscosidad global (relacionada a la transición vítrea) (Chinachotti, 1997). De esta manera, el agua puede rellenar huecos inter e intramoleculares actuando como antiplastificante, según lo manifestado por las propiedades mecánicas. A contenidos de agua mayores a 8,5%bs los perfiles de las curvas de compresión se presentaron con menores fluctuaciones, reflejando la ausencia de fracturas. Cerca de estas humedades aumentó la dependencia T_{2S} y T_{2L} con el c.a.. A medida que se aumenta el contenido de agua aumenta su movilidad y aparece una población de agua más libre y móvil que hace evidente su efecto plastificante. La disminución progresiva de la T_g produjo que las muestras pasen al estado gomoso a la temperatura de trabajo a partir de c.a. mayores al 17%bs. Comparando las curvas de T_g y $F_{máx}$ en función del c.a. en la Figura 3, se observa que el punto donde la fuerza comienza a disminuir en función del contenido de agua coincide con valores de T_g cercanos a la temperatura ambiente y donde los tiempos de relajación del componente más lento (T_{2L}) se hacen constantes. A partir del contenido de agua en que la T_g alcanza la temperatura de trabajo las propiedades térmicas y mecánicas muestran un comportamiento acoplado y los tiempos de relajación T_{2L} se vuelven constantes.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo indicaron que mientras la fuerza de compresión mostró un máximo en función del contenido de agua (efecto antiplastificante del agua), la temperatura de transición vítrea disminuyó progresivamente al aumentar el contenido y la movilidad del agua (caracterizada por los tiempos de relajación transversal de H). Si bien tanto las propiedades térmicas como las mecánicas corresponden a relajaciones a nivel supramolecular, la naturaleza de las mismas es distinta, como así también la frecuencia de las perturbaciones que las inducen.

De esta forma, las propiedades mecánicas de materiales complejos como los alimentos pueden tener un comportamiento muy distinto al de las propiedades térmicas en función del contenido de agua. El perfil de las curvas de compresión fue afectado por el contenido de agua indicando un cambio en la estructura y textura de la muestra.

El análisis del comportamiento de las propiedades mecánicas y térmicas de materiales complejos como los copos de maíz puede complementarse con el estudio de la movilidad molecular de los biopolímeros y del agua para permitir una interpretación adecuada y proveen herramientas para el diseño de procesos, formulación y almacenamiento de productos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a UBA (UBACyT X226), CONICET (PIP5977), ANPCyT (PICT 20545) e INTA por el financiamiento de este trabajo. También agradecen a la Dra Myriam Casanello por su aporte en la discusión de algunos resultados.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

-Chang, Y.P., Cheah, P.B. and Seow, C. C. 2000. "Plasticizing–antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state". J. Food Sci. 65, 445–451.
-Chinachotti, P. 1997. "Food storage stability". Boca Raton: CRC Press. p: 245–267.
-Fontanet, I., Davidou, S., Dacremont, C.and Le Meste, M. 1997. "Effect of water on the mechanical behavior of extruded flat bread". J. Cereal Sci. 25: 303–311.
-Gondek, E. and Lewicki, P. 2006. "Antiplasticization of cereal-based products by water. Part II: Breakfast cereals". J. Food Eng. 77: 644–652.
-Harris, M. and Peleg, M. 1996. "Patterns of textural changes in brittle cellular foods caused by moisture sorption". Cereal Chem. 73: 225–231.
-Lomauro, C. J.; Bakshi, A.S.; Labuza, T. P. 1985. "Evaluation of food sorption isotherms equations, I: Fruit, vegetable and meat products". Lebensmittel-Wissenschaft Technol. 18: 111
-Peleg, M. 1997. "Line jaggedness measures and their applications in textural evaluation of foods". Crit. Rev. Food Sci. Nut. 37: 491–518.
-Peleg, M. 2006. "On fundamental issues in texture evaluation and texturization—A view". Food Hydrocolloids 20: 405–414.
-Poliszko, S., Klimek, D. and Molinski, W. 1995. "Properties of water in foods". Warsaw. P: 25–30.
-Roudaut, G., Dacremont, C., Vallès Pâmies, B., Colas, B. and Le Meste, M. 2002. "Crispness: a critical review on sensory and material science approaches". Trends Food Sci. Techn. 13: 217–227.
-Ruan, R. R., Wang, X., Chen, P. L., Fulcher, R. G., Pesheck, P., and Chakrabati, S. 1999. "Study of water in dough using nuclear magnetic resonance". Cereal Chem. 76: 231-235.
-Sai Manohar, R. and Haridas Rao, P. 2002. "Interrelationships between rheologichal characteristics of dough and quality of biscuits; use of elastic recovery dough to predict biscuits quality". Food Res. Int. 35: 807-813.
-Slade, L. and Levine, H. 1995. "Water and the glass transition - dependence of the glass transition and chemical structure: Special implication for flour functionality on cookie baking". J. Food Eng. 22: 143–188.

PROTEOLISIS Y CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL QUESO DE OVEJA FABRICADO CON CUAJO DE TERNERA Y CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE COAGULANTE VEGETAL

Galán, Elena; Pino, Antonio; Prados, Francisco y Fernández-Salguero, José
Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edif. Darwin.
14071-Córdoba. E. mail: ao1fecaj@uco.es
CÓRDOBA - ESPAÑA

Palabras clave: queso de oveja, coagulantes, proteolisis, péptidos, sensorial.

RESUMEN

En quesos de leche de oveja pasteurizada elaborado con cuajo de ternera (CA), coagulante vegetal (CVP) y mezcla de cuajo animal/coagulante vegetal (CM) se ha seguido a lo largo de ocho meses de maduración la evolución de distintos componentes físico-químicos y se ha evaluado la proteolisis y las características sensoriales de los quesos. El contenido en NS y NNP es mucho mas alto en los quesos elaborados con coagulante vegetal respecto del cuajo animal, siendo los valores de los quesos de mezcla ligeramente más bajos a los del coagulante vegetal. El los quesos fabricados con CVP y CM se apreció mayor proporción de péptidos hidrófobos respecto a los elaborados con cuajo de ternera pero sin influencia significativa en las características organolépticas de los quesos madurados.

INTRODUCCIÓN

El coagulante vegetal procedente de las flores desecadas del cardo *Cynara cardunculus* L. es utilizado en la elaboración de distintas variedades de queso españoles y portugueses con Denominación de Origen Protegida (DOP) y en otras variedades de queso de oveja y de cabra (Macedo, et al., 1993, Fernández-Salguero, et al, 2002). La utilización de las enzimas vegetales permite la obtención de quesos tipo "torta", quesos con destino al mercado "lacto vegetariano" y las certificaciones Kosher y Halal.

Las enzimas coagulantes de las flores del cardo son capaces de hidrolizar el enlace peptídico Phe_{105}-Met_{106} de la *k*-caseína, al igual que lo hace la quimosina de ternera. De *C. cardunculus* se han aislado tres proteinasas, denominadas "ciprosinas" o "cinarasas", que han sido purificadas y caracterizadas. Se trata de tres proteinasas acídicas pertenecientes al tipo de las proteinasas aspárticas (Heimgartner et al., 1990; Campos et al., 1990). Los estudios sobre especificidad de las cinarasas indican que estas proteasas pueden actuar como endopeptidasas y como exopeptidasas. Estas enzimas vegetales, además del efecto coagulante, tienen un potente efecto proteolítico y todos los estudios sobre el uso de las enzimas del cardo *C. cardunculus* concuerdan en que producen una proteolísis más rápida que cuando se utiliza cuajo animal (Tejada y Fernández-Salguero, 2003; Prados et al., 2007). El coagulante vegetal se utiliza en forma de extracto acuoso crudo de las flores del cardo, como enzimas liofilizadas en forma de coagulante vegetal en polvo (CVP) que ha sido patentado (Fernández-Salguero, et al., 2003a) e incluso se ha obtenido como ciprosina recombinante (Planta et al., 2000) que ha sido ensayada en queso (Fernández-Salguero, et al., 2003b).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la significación de dos concentraciones del coagulante vegetal liofilizado respecto al cuajo de ternera sobre la proteolisis y las características sensoriales de quesos de oveja.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se elaboraron lotes de quesos con leche pasteurizada de oveja y adicionada de un cultivo iniciador comercial, empleando la tecnología de fabricación del queso Manchego (forma cilíndrica de unos 10-14 cm de alto, 18-22 cm de diámetro y unos 3,0 kg de peso). Cada uno de los lotes se coaguló con tres agentes diferentes: uno con cuajo animal (CA, 100%), otro con un coagulante vegetal en polvo (CVP, 100%) y el tercero con una mezcla de ambos coagulantes (CM; 50%/50%). Los quesos se maduraron a 12 °C y 80% de HR durante ocho meses, realizándose, a intervalos periódicos, los análisis siguientes: pH, a_w, humedad, proteína, nitrógeno soluble (NS) a pH 4,6; nitrógeno no proteico (NPN), soluble en ATC al 12% y nitrógeno aminoacídico (NAA, método Cd-ninhidrina) según se ha descrito previamente Carmona et al., (1999) y los péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción NS mediante RP-HPLC según González de Llanos *et al.* (1995) y Mallatou *et al.* (2004). También se analizaron las características sensoriales de los quesos: intensidad de olor, cremosidad, intensidad de sabor y sabor amargo (Tejada et al., 2007)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la maduración no se observaron diferencias significativas en las características físico-químicas entre quesos elaborados con los diferentes agentes coagulantes (Tabla 1).

Días	Cuajo	pH	Aw
30	CA	5,21±0,04^{a}	0,966±0,004^{c}
	CVP	5,19±0,06^{a}	0,972±0,012^{c}
	CM	5,24±0,01^{a}	0,970±0,009^{c}
90	CA	5,29±0,01^{a}	0,947±0,001^{b}
	CVP	5,28±0,01^{a}	0,941±0,001^{b}
	CM	5,34±0,,01^{a}	0,941±0,010^{b}
180	CA	5,29±0^{a}	0,930±0,004^{a}
	CVP	5,30±0^{a}	0,925±0,002^{a}
	CM	5,28±0^{a}	0,923±0,002^{a}
240	CA	5,29±0,01^{a}	0,931±0,006^{a}
	CVP	5,24±0,01^{a}	0,928±0,007^{a}
	CM	5,34±0^{a}	0,925±0,005^{a}

Días	Cuajo	Humedad	Proteína
30	CA	40,6±0,52^{ef}	21,49±0,02^{ab}
	CVP	40,36±0,65^{ef}	21,21±0,43^{ab}
	CM	40,90±1,35^{ef}	20,53±0,10^{ab}
90	CA	36,44±1,27^{cd}	22,92±0,49^{c}
	CVP	36,48±0,23^{cd}	22,58±0,39^{c}
	CM	35,99±1,76^{cd}	22,30±0,22^{c}
180	CA	34,79±1,25^{ab}	24,55±0,52^{c}
	CVP	32,88±1,07^{ab}	24,65±0,32^{c}
	CM	33,69±2,93^{ab}	24,59±0,01^{c}
240	CA	30,33±0,7^{a}	24,73±0,46^{c}
	CVP	31,53±0,62^{a}	25,06±0,57^{c}
	CM	32,29±0,01^{a}	24,84±0,26^{c}

Tabla 1. Evolución de la humedad, proteína (g por 100 g^{-1} de queso), pH y a_w de los quesos con los tres tipos de coagulante durante la maduración.

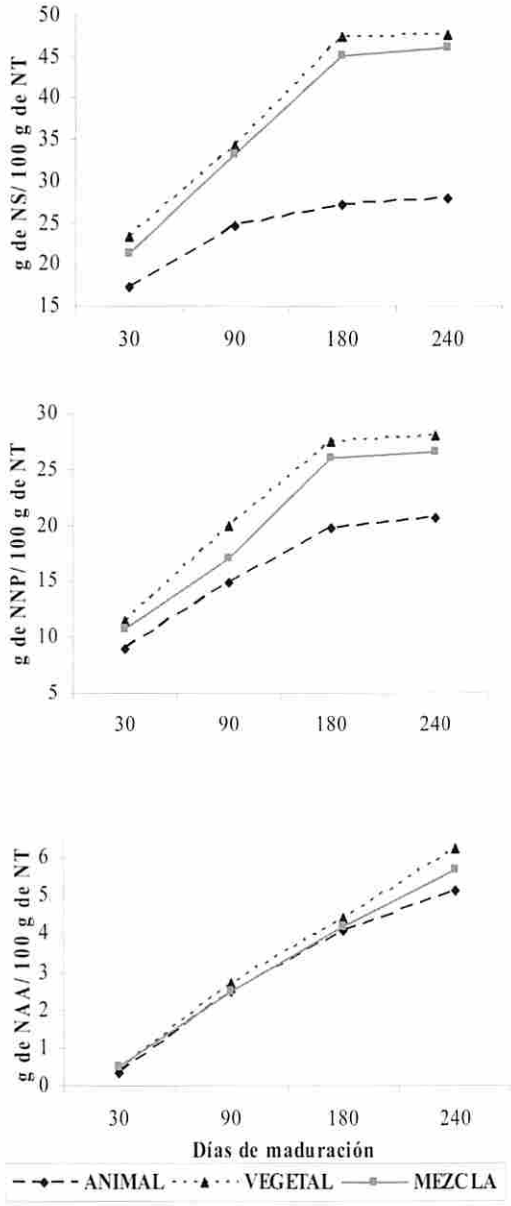


Figura 1. Evolución del NS, NNP y NAA (g por 100 g^{-1} NT) durante la maduración de los quesos fabricados con los tres tipos de coagulante.

En la Figura 1 se representa la evolución de las fracciones nitrogenadas NS, NNP y NAA (en g por 100 g^{-1} de nitrógeno total NT) de los quesos elaborado con los tres tipos de coagulante a los 1, 3, 6 y 8 meses de maduración. Como puede apreciarse a los 30 días el contenido en NS superó claramente el 20% del NT en los quesos elaborados con coagulante vegetal (CVP y CM) mientras que en los obtenidos con cuajo de ternera apenas rebasa el 15% del NT. La evolución tanto del NS como del NNP en quesos elaborados con CPV y CM fue mucho más rápida e intensa que en los fabricados con CA. También se aprecia cómo los valores obtenidos para los quesos de mezcla (CM) son sólo ligeramente inferiores a los de los quesos coagulados con CVP. En el nitrógeno amínico que es más dependiente de la participación de las enzimas microbianas no se aprecian diferencias entre los quesos elaborados con los tres tipos de coagulante.

En la figura 2 se representa los valores de unidades de área de los péptidos hidrófilos e hidrófobos así como la relación péptidos hidrófobos/péptidos hidrófilos de los quesos elaborados con los tres tipos de coagulante a lo largo de los 240 días de maduración. La producción de péptidos hidrófilos tiende en general a estabilizarse a partir de los tres meses de maduración en los tres coagulantes ensayado. Por su parte, la producción de péptidos hidrófobos es significativamente más alta en los quesos elaborados con coagulante vegetal (CVP y CM) respecto al cuajo animal. Al final del estudio va descendiendo el nivel de péptidos hidrófobos en los quesos obtenidos con coagulante vegetal. El índice péptidos hidrófobos/hidrófilos se mantiene bajo en los quesos coagulados con cuajo de ternera y en los elaborados con coagulante vegetal (CVP y CM), desde unos valores elevados hacia los 30 días, experimenta una evolución descendente a lo largo de los 8 meses de maduración.

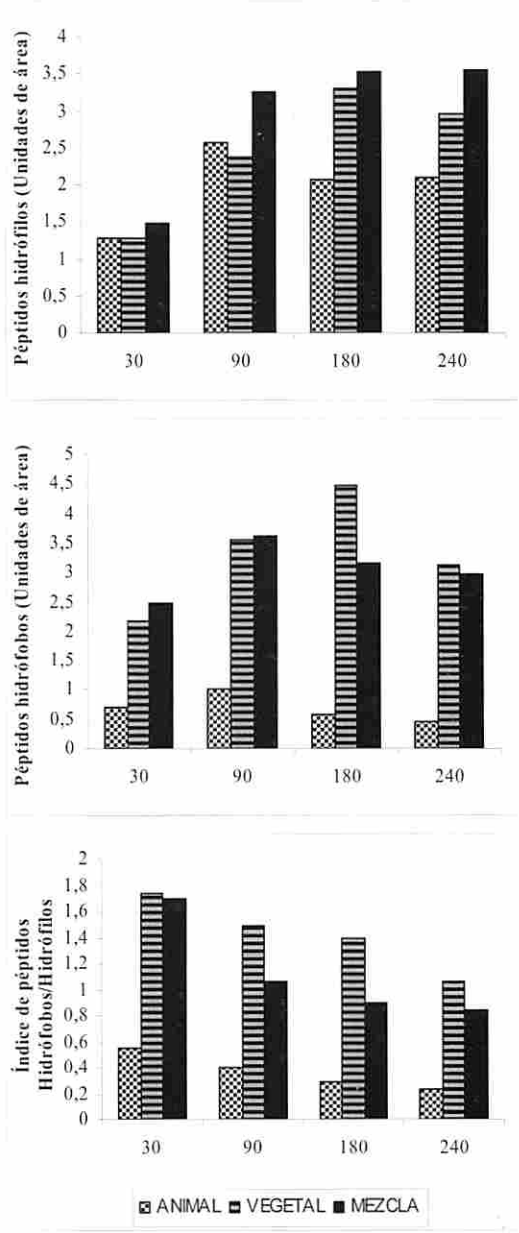


Figura 2. Evolución de los péptidos hidrófilos e hidrófobos así como el índice hidrófobos/hidrófilos de los quesos elaborados con los tres tipos de coagulante durante la maduración.

En la Tabla 2 se indican las puntuaciones medias otorgadas por los catadores a los quesos elaborados con los tres tipos de coagulante de olor, cremosidad, intensidad del sabor y sabor amargo a los 90, 180 y 240 días de maduración. Como puede apreciarse en aquellos quesos en los que se empleó coagulante vegetal liofilizado de forma única (CVP) o mezclado con cuajo de ternera (CA/CVP) son significativamente más cremosos que los coagulados con CA, sin presentar un sabor amargo significativamente más alto y que la intensidad del sabor en los quesos coagulados con CVP y CA/CVP se alcanza varios meses antes que en los coagulados con cuajo animal.

	Días de maduración		
	90	**180**	**240**
Olor			
CA	6,01	5,61	6,60
CV	5,17	6,81	6,90
CM	5,47	5,72	6,65
Cremosidad			
CA	3,89	3,11	3,4
CVP	7,11	7,80	7,9
CM	6,92	6,40	6,9
Sabor			
CA	5,97	6,39	6,7
CVP	6,28	7,28	8,8
CM	6,73	7,10	7,75
Amargor			
CA	4,28	5,15	3,25
CVP	5,32	5,38	5,00
CM	5,30	5,30	4,00

Tabla 2. Valoraciones de algunos parámetros sensoriales en los quesos elaborados con los tres tipos de coagulantes a lo largo del proceso de maduración.

CONCLUSIONES

La preparación del coagulante vegetal procedente *Cynara cardunculus* L. en forma de polvo liofilizado al 100 % o como mezcla con cuajo de ternera (50%/50%) se puede utilizar en quesos de leche de oveja pasteurizada de formato grande (de unos 3 kg. de peso) como alternativa al cuajo animal. La mayor actividad proteolítica de las ciprosinas en relación con la quimosina permite obtener, con sólo el 50 % de coagulante vegetal, más rápidamente las características sensoriales del queso madurado y por tanto poder utilizarse a esta dosis en la maduración acelerada de quesos.

REFERENCIAS

- Campos, R., Guerra, R., Aguilar, M., Ventura, O. and Camacho, L. 1990. Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus).* Food Chem., 35, 89-97.
- Carmona, M.A., Sanjuán, E., Gómez, R. and Fernández-Salguero, J. 1999. Effect of starter cultures on the physico-chemical and biochemical features in ewe cheese made with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* L. J. Sci. Food Agric., 79: 737-744
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., and Gómez, R. 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. J. Sci. Food Agric., 82:464-468.
- Fernández-Salguero, J., Gómez, R., Tejada, L. y Vioque, M. 2003a. Un coagulante vegetal liofilizado, procedimiento para su preparación y sus aplicaciones en la fabricación de quesos. Patente de Invención P200001593. Nº publicación: 2166719. Oficina Española de Patentes y Marcas. Madrid, España.
- Fernández-Salguero, J., Prados, F., Calisto, F., Vioque, M. Sampaio, P. and Tejada, L. 2003b. Use of recombinant cyprosir in the manufactured of ewe's milk cheese. J. Agric. Fooc Chem., 51:426-7.430.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P. Da Silva Figueiredo, A.C. and Pais, M.S. 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. Phytochemistry, 29:1.405-1.410.
- González de Llanos, D., Polo, M.C. and Ramos, M. 1995. Study of Proteolisis in Artisanal Cheeses: High Permonance Liquid Chromatography of Peptides. J. Dairy Sci., 78:1018-1024.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., and Oliveira, J.C. 1993. The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. J. Dairy Sci., 76: 1725-1738.
- Mallatou, H., Pappa, E.C. and Boumba, V. A. 2004. Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. Int. Dairy J., 14:977-987.
- Planta, R.J., Calixto, F., and Pais, M.S. 2000. Production by yeast of aspartic proteinases from plant origin with sheep's, cow's, goat's milk, etc. Clotting and proteolytic activity. Patent Number EP1196542 (WO0075283). Lisboa. Portugal.
- Prados, F., Pino, A. and Fernández-Salguero, J. 2007. Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. Int. J. Food Sci. Tech., 42:556-561.
- Tejada, L. and Fernández-Salguero, J. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. It. J. Food Sci., 15: 125-131.
- Tejada, L., Gómez, R. and Fernández-Salguero, J. 2007. Sensory characteristics of ewe milk cheeses made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus.* J. Food Qual., 30:91-103.

EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POLIFENOLOXIDASA (PPO) Y PEROXIDAS (POD) DE LULOLA SELVA *Solanum quitoense* Lam. DESHIDRATADO OSMOTICAMENTE, EMPACADO EM ATMÓSFERA MODIFICADA Y ALMACENADO BAJO TEMPERATURA DE CONGELACIÓN

López, Anna F.; Pinzón, Magda I.; Gómez Ana M.; Rojas Andrés M.
UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES EN POSTCOSECHA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROINDUSTRIALES
Calle 12 Norte Carrera 15. E. mail: postcosecha@uniquindio.edu.co
ARMENIA - COLOMBIA

Palabras clave: propiedades bioquímicas, lulo La Selva., actividad enzimática, deshidratación osmótica, atmósfera modifica,

RESUMEN

Se estudió la evolución de la actividad enzimática PPO y POD en trozos de lulo deshidratados osmóticamente, empacados en atmóferas modificadas y almacenados en congelación. La deshidratación osmótica (DO) se realizó con parámetros previamente establecidos (Pinzón, 2005) el almacenamiento se llevo a cabo en bolsas Flex Vac Transparente de 70 µm, la modificación de la atmósfera de cada empaque se realizó con la combinación de gases Nitrógeno, gas carbónico (Mapax® 210). y fue almacenado a una temperatura de -15°C durante 28 días, donde se realizó el seguimiento de este parámetro cada 7 días.

Se observó durante los diferentes tiempos de almacenamiento disminución significativa en los valores de actividad enzimática para frutos de lulo DO debido a que durante el proceso de DO se sumergió la fruta en solución de sacarosa donde se evita el contacto directo con el aire; además se favorece la pérdida del agua libre disponible y la disminución de oxígeno en el entorno de la enzima, además, el cambio de la atmósfera al interior del empaque con una concentración de oxígeno menor que la del aire normal, reduce la velocidad de reacción en varios procesos fisiológicos entre ellos la actividad de la enzimas al interior de los frutos.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de deshidratación osmótica, (DO) como pretratamiento de conservación, los trozos de lulo La Selva son puestos en contacto con una solución concentrada de sacarosa, estableciéndose una doble transferencia de materia: agua desde la fruta hacia la solución, junto con sustancias solubles tales como azúcares, vitaminas, pigmentos, etc – y, en sentido opuesto, solutos de la solución hacia la fruta. En consecuencia, los trozos de fruta pierden agua, ganan sólidos solubles y reducen su volumen. (Spiazzi–Mascheroni, 2001). El empaque de estos productos de humedad intermedia en atmósfera modificada y almacenados bajo temperatura de congelación, puede suministrar productos estables y con buena calidad nutricional y sensorial

Uno de los principales mecanismos de deterioro que afecta a las frutas elaboradas (rebanadas, cortadas, peladas, etc.) es el pardeamiento enzimático. El pardeamiento enzimático es el color café que se forma cuando se exponen al aire las superficies cortadas o maltratadas de frutas porque las reacciones iniciales que intervienen en este fenómeno están catalizadas por enzimas; cuando los tejidos vegetales están intactos y sus sustratos están separados por estructuras celulares el pardeamiento no se produce; sin embargo, al realizarse un corte la integridad de los tejidos vegetales se daña lo que provoca que la enzima y sus sustratos se pongan en contacto a expensas de aire circundante (Miller, 1985). El uso de atmósferas modificadas (AM) es un proceso sumamente efectivo para inhibir este mecanismo y además aumentar la vida útil durante almacenamiento.

La aplicación de atmósferas modificadas implica el uso de películas poliméricas de diferente permeabilidad al O_2, CO_2, C_2H_4 y vapor de agua. La composición del aire consiste en: oxígeno (O_2) 21%; dióxido de carbono (CO_2) 0.03%; nitrógeno (N_2) 78% y otros gases (argón, neón, etc) hasta completar 100%. Las atmósferas modificadas contienen en general un nivel más bajo de oxígeno (O_2) y mayores de dióxido de carbono (CO_2) que el aire. Mediante el uso de esta tecnología se consigue reducir la respiración de la fruta y por lo tanto, retrasar la maduración y deprimir el metabolismo en general, inclusive el de los microorganismos. (Yommi, et al., 2002). La atmósfera modificada se consigue realizando vacío y posterior inyección de una mezcla adecuada de gases, de tal manera que la atmósfera en el envase va variando con el paso del tiempo en función de las necesidades y respuesta del producto (Parry, et al 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los frutos de lulo La Selva fueron obtenidos de un cultivo tecnificado situado en el Municipio de Girardota (Antioquia, Colombia) ubicado a 1425 m.s.n.m, y con una temperatura anual promedio de 22°C, cultivo proveniente de replicación in-vitro, de clones vigilados y garantizados por Corpoica La Selva, centro de investigación localizado en el municipio de Rionegro (Antioquia, Colombia) Los frutos se recolectaron en estado de madurez 1 de acuerdo con la Tabla de color, establecida previamente (Pinzón, 2000), se transportaron hasta Medellín refrigerados y luego se enviaron vía aérea (35 minutos) hasta la ciudad de Armenia, donde se recogieron y se transportaron en condiciones de refrigeración hasta el Laboratorio de Investigaciones en Postcosecha de la Universidad del Quindío, donde se almacenaron a 7°C hasta obtener el estado de madurez establecido para su procesamiento.

Métodos

Deshidratación osmótica

De acuerdo a parámetros previamente establecidos (Pinzón, 2006) se realizó la deshidratación osmótica de los frutos en solución de sacarosa de 60°Brix, la cual contenía ácido cítrico como conservante, ácido ascórbico como antioxidante, sorbato de potasio como antimicrobiano y cloruro de calcio como estabilizante de firmeza.

Al finalizar el tiempo de deshidratación, 300 minutos, los trozos de lulo, fueron extraídos de la solución de sacarosa, posteriormente se retiró el exceso de jarabe superficial con papel absorbente e inmediatamente se realizó el análisis de la actividad enzimática polifenoloxida (PPO) y peroxidasa (POD) teniendo en cuenta éste como el tiempo cero del estudio.

Empaque

Se empacaron 300 g de fruta DO en cada bolsa Flex Vac Transparente de 70 µm y se procedió a realizar la modificación de la atmósfera de cada empaque, el cual se llevó a cabo con la combinación de gases (Nitrógeno, gas carbónico y oxígeno recomendada por Aga Fano, Colombia, para productos semisecos (Mapax® 210). La actividad enzimática se evaluó cada 7 días hasta completar 28 días de almacenamiento en congelación a -15 ° C.

Extracto de enzimas

A 10 g de muestra se le adicionan 25 mL de tampón fosfato 0.2 M a pH 6.5, 1 g de polivinilpirrolidona y 250 µL de tritón. Se

homogeniza en un homogenizador marca Hirosagua airon Works de 18000 rpm la mezcla se centrifugó en una centrífuga IEC – Centra modelo MP4R a 12000 rpm por 30 min a 4°C el sobrenadante se mantiene a 0°C hasta el momento de reacción. La unidad de actividad fue definida como el cambio en la absorbancia/minuto/gramo de pulpa.

Actividad POD

Se preparó un blanco que contiene 2.7 mL de tampón fosfato 0.2 M a pH 6.5, 0.2 mL de guayacol al 1% como donor de hidrógeno, 0.1 mL de peroxido de hidrogeno al 1.5 % como oxidante, se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos Hewllet Packard modelo HP-8453, a una longitud de onda de 485 nm. Para la muestra, se agregaron 0.075 mL del extracto al blanco, se agitó y se leyó la absorbancia cada 4 segundos por 6 minutos. La actividad de la enzima se midió determinando la pendiente de la línea de reacción a cero (velocidad inicial). La unidad de actividad fue definida como el cambio en la absorbancia/minuto/gramo de pulpa.

Actividad (PPO)

Se preparó un blanco que contiene 3.0 mL de catecol 0.07 M como oxidante en tampón fosfato pH 6.5, se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS con arreglo de diodos Hewllet Packard modelo HP-8453, a una longitud de onda de 420 nm. Para la muestra se agregaron 0.035 mL del extracto se agitó y se leyó la absorbancia cada 5 segundos por 6 minutos. La actividad de la enzima se definió como el cambio en la absorbancia/minuto/gramo de pulpa. Pinzón, 2000).

RESULTADOS

La actividad enzimática POD (figura 1) al tiempo cero para trozos de lulo DO sin empacar ni congelar, fue de 0,00019 $s^{-1}.g^{-1}$, en el dia 14 mostró un ligero aumento a valores de 0,0006 $s^{-1}.g^{-1}$ y decreció a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento, hasta los 28 días, a valores similares al del tiempo cero. Estas variaciones no fueron significativas por lo que se pudo establecer que la actividad POD permaneció casi constante durante los 28 días de almacenamiento congelado. La PPO del lulo DO antes de ser empacado y almacenado inició con una actividad de 0,345061 $s^{-1}.g^{-1}$ (Figura 2)y al transcurrir el tiempo de almacenamiento decreció a valores cercanos a cero 0,003770 $s^{-1}.g^{-1}$ lo que demuestra una alta inhibición de la enzima debido a la baja concentración de oxígeno en la atmósfera del empaque y al congelamiento.

La evolución de la actividad POD y PPO se podría explicar teniendo en cuenta que al sumergir la fruta en soluciones de sacarosa se evita el contacto directo con el aire; además se favorece la perdida del agua libre disponible y la disminución de oxígeno en el entorno de la enzima ya que ésta requiere de oxígeno para oxidar los sustratos fenólicos presentes en la fruta (Quiles et al., 2001; Cano, et al., 1990, Mc Donald, et al., 2000).

El cambio de la atmósfera al interior del empaque con una concentración de oxígeno menor que la del aire normal conduce a una maduración más lenta, observándose que niveles de este gas por debajo del 21% reducen la velocidad de reacción en varios procesos fisiológicos como la producción de etileno y la actividad de enzimas relacionadas con el ablandamiento celular (Peppelenbos,1997; Thompson, 1998).

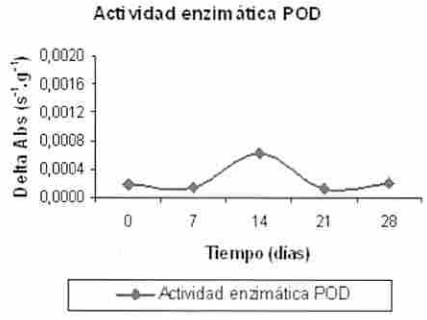


Figura 1. Evolución de la actividad POD de trozos de lulo DO, empacados en AM y congelados

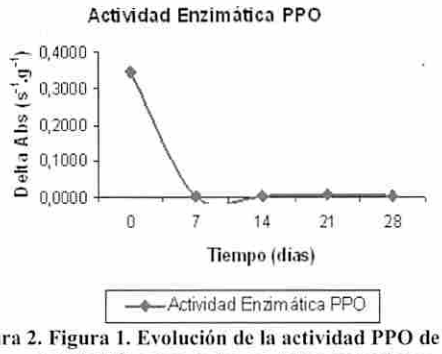


Figura 2. Figura 1. Evolución de la actividad PPO de trozos de lulo DO, empacados en AM y congelados

CONCLUSIONES

La actividad enzimática PPO y POD mostró una baja actividad durante los diferentes tiempos de almacenamiento de trozoss de lulo La Selva DO, comportamiento esperado ya que los frutos en el proceso de DO se encuentran sumergidos en la solución deshidratante sin contacto directo con el oxígeno, requerido para oxidar los sustratos fenólicos presentes en la fruta.

La conservación del color verde de los trozos de lulo DO, empacados en AM y congelados por lo menos durante 28 días se ve favorecida por la baja actividad enzimática PPO y POD

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Alico S.A. y el Instituto INTAL, de Medellín, Colombia. A la Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Agroindustriales, Laboratorio de Investigaciones en Postcosecha, Armenia, Colombia. Al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias, Colombia.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Cano, P.; Marín, M.A.; Fuster, C. (1990). "Freezing of banana slices. Influence of maturity level and thermal treatment prior to freezing". Journal of food science, 55(4)1070-1072.
- MacDonald, L.; Schaschke, C.J. (2000) "Combined effect of high pressure, temperature and holding time on polyphenoloxidase and peroxidase activity in banana (*Musa acuminata*)". J Csi Food Agric 80,719-724.
- Miller, D.D. (1985). "Química de los alimentos, Manuel de Laboratorio. Departamento de Ciencia de los Alimentos". Cornell University. Ithaca Nueva Cork. Ed Limusa. México. pp 29-31
- Parry, R.T. (1993). "Envasado de los alimentos en atmósfera modificada". Ed. A Madrid Vicente. Cap 1: 1-18
- Peppelenbos, H.W. (1997). "Gas exchange models and prediction of disorders in fruits. Workshop on Food Quality Modelling". Katholieke Universiteit Leuven.Belgium. http://www.scielo.br/pdf/hb/v20n1/14414.pdf.
- Pinzón M. I., (2000). "Evolución en la composición y propiedades físicas durante el crecimiento y maduración de híbridos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.)". Tesis doctoral, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Pinzón, M.I. (2006). "Evolución de componentes del aroma y del sabor durante la cinética de deshidratación osmótica de frutas tropicales lulo La Selva y uchuva". Facultad de ciencias Agroindustriales, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia.
- Quiles, A.; Gómez-Cáceres, S.; Pérez-Munuera, I.; Hernando, I.; Lluch, M.A. (2001). "Estudio de la actividad de polifenoloxidasa (ppo) en parénquima de manzana" *(malus communis, l.)*. III Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. I Congreso Español de ingeniería de Alimentos CIBIA. En: Ingeniería de alimentos nuevas fronteras en el siglo XXI. Tomo IV. Editores P. Fito, A. Mulet, A. Chiralt, A. Andres. Valencia, España. pp. 319-324.
- Spiazzi, E.A., Mascheroni, R.H. (2001). « Modelo de deshidratación osmótica de alimentos vegetales". Serie a, 4 pp 23 – 32. www.autral.edu.at/web/investigación/MAT-A-4/Spiazzi-Mascheroni-MAT-APDF.
- Thompson, A. (1998). "Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables". CAB International. London. pp 278.
- Yommi, A., Godoy, C. (2002). "Arándanos. Fisiología y tecnologías de postcosecha". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación experimental Agropecuaria Balcarce. Buenos Aires, Argentina. http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/fruyhort/arandano.htm

CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE FRUTOS DE KUMQUAT (*Fortunella Margarita* [Lour.] Swing) Y SU COMPOSICIÓN FENÓLICA

Razeto P., Claudia y Núñez K., Hugo
UNIVERSIDAD DE CHILE, FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA Y ENOLOGÍA
Santa Rosa 11315, La Pintana, SANTIAGO-CHILE
claudiarazeto@gmail.com, hnunez@uchile.cl

Palabras clave: *Fortunella Margarita* [Lour.] Swing, características físicas, compuestos fenólicos, narangina, naringenina

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo caracterizar física y químicamente frutos de kumquat Nagami (*Fortunella margarita* [Lour.] Swing), midiendo fenoles totales y fenoles de bajo peso molecular.

Se utilizó frutos de kumquat Nagami, a los que se les determinó resistencia a la presión y color de piel; sólidos solubles, pH y acidez al jugo de la fruta como al triturado de la fruta entera; fenoles totales y fenoles de bajo peso molecular a la piel y pulpa del fruto, por separado.

El fruto presentó una alta firmeza (595,2 gF mm^{-1}) y los parámetros de color de piel indican un tono rojo amarillento de alta saturación. El análisis de sólidos solubles confirmó que la piel del fruto es la que aporta el dulzor.

La concentración de fenoles totales fue de 6,27 gEN kg^{-1}, los que se distribuyeron en forma similar entre la piel y la pulpa. Además, se encontraron 28 compuestos de bajo peso molecular en pulpa principalmente. La mayoría de los compuestos corresponden a flavonas y se identificaron los compuestos diosmina, naringina y naringenina.

Se concluye que el fruto de kumquat posee una alta concentración de fenoles totales, la cual se distribuye en forma similar entre la piel y pulpa del fruto. Sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos de bajo peso molecular en el fruto, es baja. Aun así, la concentración de estos fenoles sigue siendo interesante.

INTRODUCCION

El kumquat, también llamado naranja enana o "golden orange", es un árbol frutal perteneciente a la familia de las Rutáceas (Orias, 1999; Saunt, 2000). Es originario del continente Asiático, siendo China el país de mayor producción y consumo (Orias, 1999). El fruto corresponde a un hesperidio, cuyas principales características son su pequeño tamaño y poseer una piel fina y dulce, lo que permite que se consuma entero (Davis y Albrigo, 1994; Swain, 1999; Agustí, 2000).

Contiene una cantidad interesante de compuestos bioactivos; antioxidantes como vitamina C (43,9 mg 100 g^{-1}) y vitamina E (0,15 mg 100 g^{-1}); carotenoides (β-caroteno: 180 µg 100 g^{-1}) y una cantidad significativa de fibra dietaria (6,5 g 100 g^{-1}). También presenta minerales como potasio (186 mg 100 g^{-1}), magnesio (20 mg 100 g^{-1}) y calcio (62 mg 100 g^{-1}) y, además, es rico en compuestos fenólicos, pectinas y aceites esenciales (Rodríguez-Amaya, 1999; United States Department of Agriculture (USDA), 2006.)

De los fenoles no flavonoides, los compuestos que se han encontrados en el fruto de kumquat son los ácidos fenólicos y, de los flavonoides, se han observado flavonas, flavanonas y flavonoles (Berhow *et al.*, 1998). En kumquat var. Marumi, los principales flavonoides presentes en el fruto son la naringina (300 mg/Kg), hesperidina (280 mg/Kg), eriocitrina (200 mg/Kg) y diosmina (178 mg/Kg) (Berhow *et al.*, 1998). Por todo esto, se dice que el kumquat forma parte de los alimentos saludables, proporcionando grandes beneficios para la salud humana.

Actualmente, existe un creciente interés por los compuestos fenólicos de los alimentos. Muchos de éstos han demostrado tener importantes acciones biológicas en el ser humano. Entre ellos, los flavonoides son conocidos por su acción antioxidante, efecto antiviral, antiinflamatorio y antialérgico (De Bruyne *et al.*, 1999; Lule y Xia, 2005). Además, en las últimas décadas, se ha demostrado que una dieta de alimentos ricos en polifenoles y, específicamente en flavonoides, está correlacionada con la reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras patologías. (Martínez-Flórez *et al.*, 2002 ; Jhonson, 2001; Manthey *et al.*, 2001; Virgili y Scaccini, 2001). Específiamente, se dice que la naringina y la naringenina, mejoran el metabolismo lipídico (García *et al.*, 2002 y Gil-Izquierdo et al., 2002).

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tuvo por objetivo caracterizar física y químicamente el fruto de kumquat, analizando el contenido fenólico total y pormenorizado de la pulpa y piel del fruto de esta especie.

MATERIALES Y METODO

Se utilizaron frutos de kumquat Nagami, provenientes de un huerto ubicado en la localidad La Aurora, perteneciente a la comuna de Curacaví, Región Metropolitana, Chile.

Los análisis físicos se realizaron a 10 frutos individualmente, determinando el peso en balanza analítica de 0,01 g de sensibilidad; largo y diámetro con pie de metro; color de piel (Minolta CR-200b) en 2 puntos de la zona ecuatorial, midiendo los parámetros L^*, a^* y b^* y se calculó C^* y H^* según McGuire (1992); y resistencia a la presión (Firmtech 2, Bioworks Inc., Oklahoma, USA).

Los análisis químicos se realizaron al jugo de la fruta y a un triturado de 10 frutos, con muestra y contra muestra, se les determinó sólidos solubles (Refractómetro Atago), pH y acidez por titulación (pHchímetro Fisher Accumed mod. 210) (A.O.A.C., 1984)

A la piel y a la pulpa (con semillas) del fruto, por separado, se le realizaron los análisis, en duplicado, de fenoles totales mediante análisis espectrofotométrico a D.O. 280 nm (García-Barceló, 1990). La concentración de los fenoles totales se determinó mediante la recta de calibrado calculada con naringina, la que se midió a 280 nm; y fenoles de bajo peso molecular mediante técnicas de individualización por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) (Peña *et al.*, 1999). Para lo cual, se utilizó el método de extracción propuesto y modificado por Peña (1998).

RESULTADOS

Análisis físicos y químicos

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de la caracterización física de los frutos de kumquat Nagami. Los valores de tamaño y peso se encuentran dentro del rango

establecido por Saunt (2000) para kumquat Nagami, descrito en su libro sobre las variedades de cítricos en el mundo. En cuanto al color, el fruto de kumquat presentó una claridad (L*) levemente alta y los valores positivos de a* y b* indican los aportes de colores rojos y amarillos, respectivamente, lo que se refleja en el valor de tono (H*), el cual corresponde a un tono rojo amarillento de alta saturación.

Cuadro 1. Características físicas del fruto de kumquat Nagami.

Característica	Valor
Peso (g)	11,87 ± 0,39[1/]
Largo (cm)	3,18 ± 0,08
Diámetro (cm)	2,56 ± 0,04
Firmeza (gF mm^{-1})	595,20 ± 0,32
Color	
L*	65,46 ± 0,32
a*	27,58 ± 0,81
b*	61,34 ± 0,41
C*	67,30 ± 0,47
H*	65,79 ± 0,67

[1/]: Valor promedio ± Error estándar

En el Cuadro 2, se presentan las características químicas del fruto de kumquat, donde se puede observar que el contenido de sólidos solubles fue mayor en el triturado de la fruta que en el jugo de ésta. Con esto, se puede confirmar el hecho que la piel de este fruto es la que le da el dulzor (Swain, 1999; Agustí, 2000).

Cuadro 2. Características químicas del fruto de kumquat Nagami.

Característica	Jugo	Triturado fruta
Sólidos solubles (°Brix)	8,49 ± 0,00[1/]	13,39 ± 0,00[1/]
pH	2,70 ± 0,00	3,20 ± 0,05
Acidez (% ácido cítrico)	3,95 ± 0,00	0,83 ± 0,19

[1/]: Valor promedio ± Error estándar.

Análisis de compuestos fenólicos

Fenoles totales

La concentración de fenoles totales obtenida en el fruto fresco de kumquat, en este ensayo, fue de 6,27 gEN (equivalentes de naringina) kg^{-1}, de los cuales 3,26 gEN kg^{-1} estaban presentes en la piel y 3,01 gEN kg^{-1} en la pulpa del fruto.

En un estudio realizado en Chile por Erazo (2004), en uva Vitis vinífera var. Red Globe y var. Sultanina, donde la cantidad de fenoles totales medidos fue de 0,5 y 0,2 gEAG (equivalente de ácido gálico) kg^{-1} de uva, respectivamente; y entre las variedades de uva vinífera, Sepúlveda (2003) y Del Río (2006), obtuvieron en Cabernet Sauvignon valores de fenoles totales de 1,5 y 1,3 gEAG kg^{-1} de uva al estado fresco, respectivamente, valores bastantes menores al medido en el fruto de kumquat.

Gorinstein *et al.* (2001) midieron contenido fenólico total en naranja *Citrus sinensis*, utilizando el método de Folin-Ciocalteu, obteniendo valores de 1,54 gEAC (equivalente de ácido clorogénico) kg^{-1} y 1,79 gEAC kg^{-1}, en pulpa y piel, respectivamente. El mismo método fue utilizado por Rapisarda *et al.* (1999) en jugo de naranja *Citrus sinensis*, donde, según la variedad, el contenido fenólico varió entre 0,36 a 0,49 gEAF (equivalente de ácido ferúlico) kg^{-1}.

Compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Se cuantificó la presencia de distintos compuestos fenólicos en la piel y en la pulpa del fruto fresco de kumquat (Figuras 1 y 2). Como se aprecia en la Figura 2, la pulpa del fruto es la que aportó mayor número de compuestos fenólicos de bajo peso molecular (24 compuestos). Por otro lado, la piel del fruto aportó sólo nueve compuestos, pero cabe señalar que cuatro de ellos no estaban presentes en la pulpa. Se logró identificar los compuestos diosmina, naringina glucósido, naringina y naringenina, que corresponde a los compuestos 20, 23, 24 y 29 respectivamente.

En una investigación realizada por Kondo *et al.* (2005), en frutos de kumquat Meiwa cultivados en Japón, se obtuvieron, por espectrofotometría a 420 nm, valores de $7*10^{-4}$ mg kg^{-1} y $2*10^{-3}$ mg kg^{-1} de naringina en pulpa y piel, respectivamente, valores muy por debajo de los medidos en kumquat Nagami en el presente ensayo; correspondientes a 0,5 y 0,26 mg kg^{-1} de naringina en pulpa y piel, respectivamente. Por otro lado, Berhow *et al.* (2002) reportaron datos en kumquat Marumi, donde la concentración de naringina en el fruto fue de 120 mg kg^{-1}, bastante superior al medido en el presente ensayo. Cabe mencionar que el contenido de compuestos fenólicos de un fruto es variable y depende de diversos factores, entre los cuales, la especie frutal de que se trate es determinante, así como también el lugar geográfico donde se cultiva y los manejos agrícolas que se realicen, entre otros. Además, el método de análisis empleado influye directamente en los resultados obtenidos.

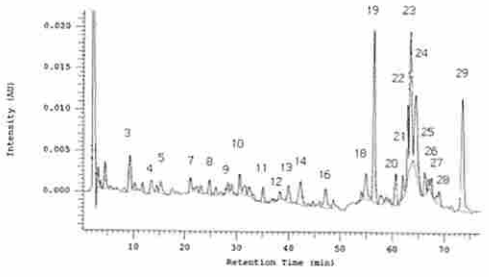


Figura 1. Cromatograma tipo por HPLC-DAD (280 nm) de extracto de pulpa del fruto kumquat Nagami.

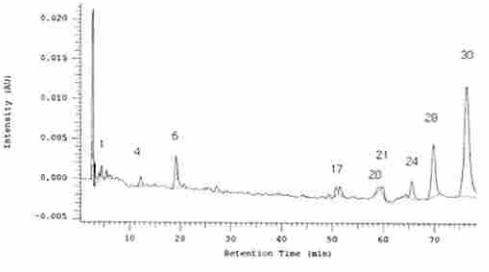


Figura 2. Cromatograma tipo por HPLC-DAD (280 nm) de extracto de piel del fruto kumquat Nagami.

La concentración total de compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en el fruto fresco, en este ensayo, fue de 5,59 mgEN (equivalentes de naringina) kg^{-1} de fruta, de los cuales el 43,3 % estaban presentes en la piel y el 56,7 % en la pulpa del fruto.

CONCLUSIONES

El fruto de kumquat posee una alta concentración de fenoles totales, la cual se distribuye en forma similar entre la piel y pulpa del fruto. Sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos de bajo peso molecular en el fruto, es baja. Aun así, la concentración de estos fenoles sigue siendo interesante.

LITERATURA CITADA

- Agustí, M. 2000. Citricultura. Ediciones Mundi-Prensa, España. 416 p.

- A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis of official agricultural chemists. Washington, D. C. 13ª ed. 1018 p.

- Berhow, M., B. Tisserat, K. Kanes and C. Vandercook. 2002. [On Line]. Survey of phenolic compound produced in citrus. Estados Unidos. USDA–ARS. Technical bulletin Nº 1856. Disponible en http://www.ars.usda.gov/is/no/phenolics/title.htm. Consultado: 10 de junio de 2007.

- Davis, F. and L. Albrigo. 1994. Citrus. CAB International, Oxon, England. 254 p.

- De Bruyne, T., L. Pieters, H. Deelstra and A. Vlietnick. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. Biochemical Systematics and Ecology 27: 445-459.

- Del Río, C. 2006. Efecto de tres manejos de follaje sobre el microclima de racimo y la composición física, química y sensorial de la baya y vino del cv. Cabernet Sauvignon proveniente de la comuna de Buin. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 106 p.

- Erazo, L. 2004. Caracterización física, química y sensorial de siete variedades de uva de mesa (Vitis vinífera L.), producidas en Los Andes V región. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias 70 p.

- García, M., D. Armenteros, M. Mahía, C. Coma, J. Carretero, A. Díaz y J. Fernández. 2002. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. Rev. Cubana Angiol. y Cir. Vascular 3(2)39-46.

- García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para el vino. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1710 p.

- Gil-Izquierdo, A., M. Gil and F. Ferreres. 2002. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(18): 5107-5114.

- Gorinstein, S., O. Martín-Belloso, Y. Park, A. Caspi, I. Libman and S. Trakhtenberg. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. Food Chemistry 74(3): 309-315.

- Johnson, I. 2001. Antioxidants and antitumor properties. pp.100-123. In: Pokorny, J, N. Ynishlieva and M. Gordon (Eds). Antioxidants in food. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. 380p.

- Kondo, S., R. Katayama and K. Uchino. 2005. Antioxidant activity in Meiwa kumquat as affected by environmental and growing factors. Environmental and Experimental Botany 54(1):60-68.

- Lule, S. and W. Xia. 2005. Food phenolics, pros and cons: a review. Food Reiews International 21(4): 367-388.

- Manthey, J. A.; Grohmann, K.; Guthrie, N., 2001: Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medical Chemistry 8, 135–153.

- Martínez-Flórez, S., J. Gonzáles-Gallego, J. Culebras y M. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición hospitalaria 17(6)271-278.

- McGuire, R. 1992. Reporting of Objective Color Measurements. HortScience 27(12):1254-1255.

- Orias, G. 1999. Prospección de nuevas especies a ser cultivadas en la zona central del país. Tesis Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Cs. Agrarias. Quillota, Chile. 146 p.

- Peña, A. 1998. Contribución al conocimiento del origen de problemas sensoriales en vinos. Su relación con los compuestos fenólicos y la presencia de compuestos organoclorados. Tesis Dr. Ing. Agrónomo, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. 345 p.

- Peña, A., T. Hernández, M. García-Vallejos, E. Cadahia, S. Fernández and J. Suárez. 1999. Low molecular weight phenolic compounds in cork stoppers. American Journal of Enology Viticulture 50(2):283-290.

- Rapisarda, P., A. Tornaino, R. Lo Cascio, F. Bonina, A. De Pasquale and A. Saija. 1999. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. Journal of Agricultural Food Chemistry 47(11):4718-4723.

- Rodríguez-Amaya, D. 1999. Carotenoides y preparación de alimentos: la retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. Office of Health and Nutrition, Bureau for Global Programs, Field Support and Research, U.S. Agency for International Development. 99 p.

- Saunt, J. 2000. Citrus varieties. Sinclair International Limited. Norwich, England, 156 p.

- Sepúlveda, C. 2003. Caracterización de la composición fenólica de las bayas del cv. Cabernet Sauvignon provenientes de dos zonas en los valles del Maipo y Cachapoal. Memoria Ing. Agrónomo. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 80 p.

- Swain, R. 1999. Kumquats. Horticulture 96(1):70-75.

- USDA. United States Department of Agriculture. 2006. [On Line]. National nutrient database for standard reference: Kumquats, raw. Disponible en http://riley.nal.usda.gov/NDL/cgi-bin/list_nut_edit.pl. Consultado: 10 de Junio de 2007.

- Virgili, F. and C. Scaccini. 2001. Cardiovascular disease and nutritional phenolics. pp.87-99. In: Pokorny, J, N. Ynishlieva and M. Gordon (Eds). Antioxidants in food. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. 380p.

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y DE REHIDRATACIÓN DE LECHE EN POLVO Y SU RELACIÓN CON SU MICROESTRUCTURA

Perea, Maria de Jesús[1]; Chanona, José Jorge[1]; Alamilla, Liliana[1]; Jiménez, Judith[2]; Gutiérrez, Gustavo Fidel[1].

[1]INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL. ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS. DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS. PLAN DE AYALA Y CARPIO S/N, COL. PLUTARCO ELIAS CALLES, MÉXICO DF., C.P. 11340. TELS. 5729-6000. EXTS. 62482 Y 62458, FAX 62463. E. mail: peflo_ma@hotmail.com, jchanona@ipn.mx

[2]UAM. UNIDAD IZTAPALAPA. DEPTO. DE BIOTECNOLOGÍA.

Palabras clave: leche en polvo, rehidratación, procesamiento de imágenes.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue analizar las propiedades fisicoquímicas y de rehidratación de dos diferentes muestras de leche en polvo, y establecer su relación con la microestructura de los aglomerados. Se determinaron diferentes propiedades fisicoquímicas y de rehidratación las cuales fueron: densidad empacada y a granel, humedad, ángulo de reposo, índice de uniformidad, humectabilidad, dispersabilidad y el índice de solubilidad. Seguido de un procesamiento de imágenes a los aglomerados del cual se extrajeron diferentes parámetros tales como: dimensiones fractales (Df, Dm, D_A, y D_P), compactación, factor de forma y tamaño de partícula. Se encontró que existe una relación entre las propiedades fisicoquímicas y de rehidratación con los parámetros obtenidos a través del procesamiento de imágenes, lo cual permite sugerir la utilidad de esta herramienta de cómputo para la evaluación de la calidad de este tipo de aglomerados.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la globalización de los mercados y la exigencia de los consumidores han ocasionado la necesidad de incrementar de la calidad de productos en polvo, por lo que la aplicación de nuevos métodos de análisis ha permitido obtener mayor información acerca de las características del proceso, componentes y el manejo de dichos materiales; los cuales se producen con una gran variedad de propiedades fisicoquímicas y de funcionalidad. La medición de estas propiedades ayudan a definir las características del polvo que afectan intrinsicamente los componentes durante su almacenamiento, manejo y procesamiento. (Teunou *et* al, 1999). Generalmente los aglomerados de materiales alimencios son porosos, lo cual tiene un efecto sobre sus propiedades mecánicas, tales como la fuerza de tensión, rigidez y deformación así como de las propiedades fisicoquímicas como la disolución, humectabilidad y conductividad térmica. La microestructura esta influenciada por las condiciones procesamiento y almacenamiento, tales como la temperatura y humedad, estas a su vez afecta la humectabilidad, dispersabilidad y solubilidad; las cuales son prerrequisitos para una óptima reconstitución de los polvos. (Reh *et* al, 2003, y Schoonman *et* al, 2001). El proceso de aglomeración de leche, tiene diferentes beneficios sobre el producto, tal como es la reducción de perdida de partículas, aumento de dispersión y humedecimiento, mejoramiento del color y apariencia, mejores propiedades de rehidratación y funcionales (Omobuwajo *et* al. 2000).

Las propiedades fisicoquímicas y de rehidratación pueden relacionarse con la microstructura y la morfología de los aglomerados, lo cual actualmente es posible evaluar cuantitativamente a través del uso de métodos de procesamiento de imágenes. Esta herramienta de análisis ha demostrado ser útil para evaluar los materiales con formas irregulares y presenta diferentes ventajas, al ser una técnica no destructiva, permitir hacer mediciones in situ, y es posible obtener una amplia información a partir de la toma de una sola medida. Asimismo, también provee información de la morfología irregular de los materiales, a través de la extracción de diferentes parámetros tal como son las dimensiones fracteles y otros descriptores morfológicos, los cuales pueden ser correlacionados con las propiedades de fisicoquímicas y de rehidratación (Isaza *et* al, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron 2 muestras de leche en polvo de marcas diferentes, las cuales fueron adquiridas en tiendas departamentales de la Ciudad de México. Las muestras de leche en polvo fueron escogidas en base a su precio, entre las cuales existía la mayor diferencia (la más económica y la más costosa).

Métodos

Propiedades Fisicoquímicas

El contenido de humedad fue determinado mediante el método de la AOAC 32.1.02 (AOAC, 1995).

La densidad a granel fue determinada siguiendo el procedimiento descrito por Sittu y Lawal (2006). La densidad empacada se analizó mediante el método descrito por Niro (2005). Ambas determinaciones fueron realizas por quintuplicado. El ángulo de reposo se realizó mediante el método descrito por Sittu y Lawal (2006); en donde el ángulo de reposo se determinó como el ángulo que forma el polvo con la horizontal.

$$IU = \left(\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - X_m)^2}{nX_m^2} \right)^{0.5}$$

El índice de uniformidad (IU) fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por Sittu y Lawal (2006), el cual se calcula con la siguiente formula:

Donde X_m es el promedio de la fracción masa; X_i es la fracción masa de cada una de las muestras y n es el número total de tamices utilizados. Ambas mediciones se realizaron por triplicado

Propiedades de rehidratación

La humectabilidad se evaluó pesando una muestra de 10g de cada una de las leches en polvo, colocándola en 100 mL de agua a 20°C registrando tiempo necesario para que la muestra se sumerja en el líquido (Niro, 2005).

El índice de solubilidad se determinó pesando 10 g de leche en polvo mezclándola con 100 mL de agua a 24°C en un agitador a 400 rpm durante 90 segundos. Se deja reposar durante 15 min. Posteriormente se agita con una espátula para homogenizar. Se colocan 50 mL de la solución en un tubo de centrifuga con fondo de cono graduado. Se centrifuga a 10000 rpm por 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado con 50 mL de agua. Se centrifuga a 10000 rpm por 5 min., posteriormente se lee el sedimento formado (Niro, 2005).

Para determinar la dispersabilidad se pesaron 25 g de polvo, se mezclan con 250g de agua a 25°C. Se agitó a 100 rpm durante 20 seg., posteriormente se filtra a través de una membrana de 100 micras. El residuo se pesa y por diferencia se obtiene la cantidad de polvo que se disperso en el líquido (Niro, 2005).Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Análisis de imágenes

Este método involucra cinco pasos esenciales de acuerdo con Castleman (1996) los cuales se llevaron a cabo de la siguiente manera:

1. Adquisición de imágenes. Se dispersa la muestra de manera homogénea sobre una placa de vidrio, con ayuda de un Tamiz de Pruebas Físicas N°.25, la cual se observó en el microscopio estereoscopio (Nikon SMZ1500) con iluminación trasmitida a la máxima apertura; el cual tenia acoplada una cámara digital (Nikon DS-2Mv) y que esta a su vez estaba conectada a una computadora personal (Intel Pentium R4, 2.666Hz, 2.679 Hz, 1.0GB y un hardware de 140GB.). Se capturaron alrededor de 60 campos (imágenes) para obtener 600 aglomerados. Con la ayuda del programa NIS-Elements F 2.30 se adquirió las fotografías necesarias para obtener el número de aglomerados representativos de cada muestra, con objetivo 10X y zoom de 6X. Anteriormente se realizaron barridos a los diferentes zooms de exploración del microscopio estereoscopio los cuales se procesaron al igual que esta metodología y se analizaron estadísticamente minimizando el error estándar de los diferentes parámetros calculados; iniciando el análisis desde 100 hasta 600 aglomerados con el objetivo de determinar el número de aglomerados representativos de la muestra, así como el zoom de exploración a utilizar. Las imágenes (campos) se capturaron en color tipo RGB de 24 bits y resolución de 800x600, fueron almacenadas en formato bmp.

2 y 3. Pre-procesamiento y Procesamiento. Los campos capturados se transformaron a escala de grises de 8 bits, procediendo a la selección del nivel de Threshold de manera manual con un intervalo de intensidad de 0-80, con el objetivo de definir el contorno de los aglomerados proporcionando una imagen binarizada, seguido de la función Binary: Fill Holes para rellenar los aglomerados delimitados; finalmente se guardaron las imágenes con la extensión bmp, con la ayuda del programa ImageJ.

4. Extracción de parámetros. Se utilizó el programa SigmaScan Pro 5.0, para obtener los parámetros se utilizó la función measure objects, en donde se determinó el número de aglomerados, área, compactación, máxima longitud, perímetro, factor de forma y máximo perímetro.

5. Clasificación y análisis. Los resultados trasladados a Excel XP se sometieron a análisis estadísticos (promedio, desviación estándar, error estándar y coeficiente de variación) con el objetivo de analizar el comportamiento de los diferentes parámetros. Así como estos fueron utilizados para calcular los siguientes parámetros:

- Dimensión Fractal (Df) la cual se calcula (Olsen *et* al. 1993):

$$Df = 2\frac{Ln A/4}{LnP}$$

- Dimensión Fractal de Perímetro (D_P) la cual se calcula de acuerdo a Kenkel *et* al, 1996.

$D_p = 2 \times m$, en donde m es la pendiente de la regresión lineal del Ln A vs. Ln max P.

- Dimensión Fractal de Área (D_A)

$D_f = m$, en donde m es la pendiente de la regresión lineal de el Ln máx. long vs. Ln A.

En base a la metodología que se realizó para determinar el índice de uniformidad, los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la dimensión fractal de masa (Dm), que de acuerdo a Ohoud, et.al. (1988) se calcula en base a la relación:

$$\rho_b \propto R^{D_m - D_s}, \text{ por lo que } D_m = D_a - m$$

En donde: ρ_b es la densidad empacada; D_a es 3; y m es la pendiente de la regresión lineal de el Ln ρ_b vs. Ln tm (medida de la malla del tamiz en µm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades fisicoquímicas

La tabla 1, muestra el contenido de humedad de las muestras de leche en polvo las cuales oscilan entre 3.4% - 3.6% estando dentro de la NOM-155-SCF1-2003 la cual indica el contenido de humedad de la leche en polvo debe ser de 4.0% máximo. Se observa en la Tabla 1, que la muestra 1 tiene una densidad tanto empacada como a granel menor a la muestra 2, esto es debido a que la muestra 2 necesita de mayor masa para llenar un cierto volumen, debido a que las partículas de la muestra 2 son mas esféricas y poco aglomeradas, mientras que la muestra 1 presenta aglomerados mejor formados, mas irregulares y de mayor tamaño.

El ángulo de reposo indica la fluidez de polvos, evaluado en función del ángulo que forma el flujo de polvo a la horizontal (Alvarado y Aguilera, 2001),a menor ángulo de reposo habrá mayor libertad en el flujo de polvo ya que la fuerza de fricción como la de cohesión entre partículas(aglomerados) afectan la formación del cono y a la segregación de partículas a través del impacto, de acuerdo a Sittu y Lawal (2006) si el ángulo de reposo es hasta 35° es fluido, cuando esta entre 35°-45° poco cohesivo, entre 45°-55° es cohesivo y si es >55° es muy cohesivo. De acuerdo a los resultados obtenidos, las muestras 1 y 2 presentan un ángulo de reposo menor a 35°, lo que indica que son materiales con alta fluidez, sin embargo la muestra 1 es menos fluida que la 2 debido a factores como la mayor irregularidad microestructutal de las partículas.

Tabla 1.Propiedades fisicoquímicas y de rehidratación de las dos muestras de leche en polvo comerciales (muestra 1 y 2)

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y DE REHIDRATACION	MUESTRA No.	
	1	2
Contenido de humedad (%)	3.4 ± 0.219	3.6 ± 0.219
Densidad a granel (g/mL)	0.381 ± 0.002	0.408 ± 0.003
Densidad empacada (g/mL)	0.559 ± 0.003	0.585 ± 0.005
Angulo de reposo (°)	32.99 ± 0.789	29.88 ± 1.116
Índice de uniformidad (adimensional)	1.503 ± 0.052	1.296 ± 0.017
Humectabilidad (s)	6.68 ± 0.160	28.64 ± 2.144
Dispersabilidad (%)	99.403 ± 0.008	98.467± 0.028
Solubilidad (mL)	0.325 ± 0.022	0.475 ± 0.042

Análisis de Imágenes

La Tabla 2, muestra los resultados del factor de forma, compactación, tamaño de partícula, Df, Dm, D_A y D_P obtenidos a partir del análisis de imágenes.

De acuerdo a la tabla 2, la muestra 1 presenta mayor tamaño de aglomerado en comparación con la muestra 2 en la cual el tamaño de aglomerado es menor, este parámetro se encuentra relacionado con las densidades, ya que la muestra 1 tiene menores densidades a granel y empacada, mientras que las densidades de las muestra 2 son mayores porque al ser aglomerados pequeños estas ocupan un menor espacio y por lo tanto se necesita de una mayor cantidad de masa (leche en polvo) para ocupar un volumen determinado, con la muestra 1 los aglomerados son de tamaño mayor y por lo tanto se necesita de menor cantidad de la muestra (leche en polvo) para ocupar un volumen determinado.

El factor de forma y la compactación de una partícula son tan importantes como su tamaño, sin embargo las formas no son fácilmente expresables de forma cuantitativa, pero representa lo cerca que está una partícula de una forma dada (Alvarado y Aguilera, 2001), estas son medidas de la circularidad de un objeto, el factor de forma para un circulo perfecto es de 1.0 y para una línea es 0.00; mientras la compactación de un circulo perfectamente es de 4xPi (±12.57) y de una línea tiende hacia infinito(SigmaSacan Pro 5.0). Por lo que la muestra 1 presenta un factor de forma de 0.469 y compactación de 37.360, lo cual indica que los aglomerados no tienden a ser de forma redonda; mientras que la muestra 2 tiene un factor de forma mas cercano a uno y una compactación menor, lo cual nos indica que los aglomerados de la muestra tienden a ser mas circulares.

Tabla 2. Parámetros obtenidos por medio del análisis de imágenes.

PARAMETRO	MUESTRA No.	
	1	2
Compactación (adimensional)	37.360 ± 1.126	31.404 ± 0.952
Factor de forma (adimensional)	0.469 ± 0.009	0.522 ± 0.009
Tamaño de partícula (µm)	341.737±12.392	269.105±10.244
Df	1.137 ± 0.002	1.127 ± 0.003
D_P	1.245	1.215
D_A	1.761	1.768
Dm	2.950	2.984

De acuerdo a la tabla 2, existe una relación entre la Df y Dp, ya que las dos incluyen implícitamente el Ln A y Ln max P, la diferencia es que la Df se calcula para cada un aglomerado mientras que la D_p se calcula para todos los aglomerados; para la muestra 1 la Df es de 1.137±0.002 y Dp de 1.245 en comparación para la muestra 2 en la cual el Df es de 1.127±0.003 y D_p de 1.215, menores que la muestra 1, esto indica que los aglomerados de la muestra 1 presentan mayor tortuosidad, mientras que las de la muestra 2 la tortuosidad es menor. Esto se puede observar en la imagen 1, en a) las partículas presentan una mayor tortuosidad debido a que se encuentran más aglomeradas, en b) se observan partículas menos aglomeradas y por tanto menos tortuosas.

Imagen 1. Imágenes binarias de estero-microscopio de luz de las muestras leche en polvo; a) muestra 1 y b) muestra 2.

Los parámetros D_A y la Dm muestran un comportamiento similar y contrario al de Df y Dp, la D_A están en función del área y la máxima longitud. La D_A de la muestra 1 es de 1.761 y la muestra 2 es mayor 1.768. Este valor entre mayor sea indica que los aglomerados son menos tortuosas (mas esféricas) y se puede sugerir que la muestra 2 tiene menor grado de aglomeración. Por otro lado, la D_A de la muestra es mas pequeño, indica que los aglomerados son mas tortuosas y llenan menos eficientemente el espacio métrico del plano bidimensional, lo que indica que su grado de aglomeración es mayor.

La Dm de la muestra 2 es mayor que la muestra 1, de acuerdo a la tabla 2; esta dimensión fractal de masa indica el empaque de las partículas (aglomerados), entre mayor sea este valor indica que las partículas son menos aglomeradas; en caso contrario cuando este valor es mas pequeño indica que las partículas son mas aglomeradas. Como ejemplo se observa en la imagen 2, a) es menor masa fractal debido a que presenta una mayor tortuosidad en comparación con b) en la que las partículas son más esféricas y por tanto presentan una mayor masa fractal.

Imagen 2.Ilustración del concepto de Dm a) la hoja de papel representa un aglomerado más irregular con menor masa fractal, b) papas empacadas, un aglomerado más esférico y en consecuencia una mayor masa fractal. (Tomada de Frame M. *et* al, 2007)

Propiedades de rehidratación o instantáneas

La muestra 1 presenta menor tiempo de humectabilidad (6.68s), mayor dispersabilidad (99.403%) y solubilidad (0.325mL); al realizar el análisis de estas propiedades se observa que están relacionadas con la microestructura de las muestras, ya que al humectarse, dispersarse y solubilizarse mas rápidamente significa que los aglomerados tiene mayor superficie libre y por tanto poros mas grandes que van a permitir un mejor contacto del agua con la superficie de las partículas, esto esta relacionado con las dimensiones fractales las cuales nos indican que la muestra 1 presenta mayor tamaño de partícula, tortuosidad, mejor aglomeración y que por tanto tiene mejores propiedades de rehidratación, a la vez estas también se relacionan con las densidades, ya que según la tabla 1, la muestra 1 tiene una menor densidad.

La muestra 2, tarda 28.64s en humectarse, su dispersabilidad es menor de 98.467% y la solubilidad es de 0.475mL. Al analizar los resultados de la muestra 2, al igual que la muestra 1 están relacionados con la microestructura de las partículas, que al contrario de la muestra 1, la muestra 2 tarda mayor tiempo en humectarse, es más baja la dispersabilidad y la solubilidad, esto se debe a que los aglomerados de esta muestra, son menos tortuosas y menos porosos; ya que tienden a ser circulares y que por tanto la superficie de contacto con el agua es menor (como ejemplo se puede observar la imagen 1b y 2b), esto esta relacionado con propiedades físicas tal es el caso de la densidad (como se observa en la tabla 1) y el ángulo de reposo el cual es menor que la muestra 1, ya que al ser menos aglomeradas y mas circulares van a presentar una mayor fluidez.

CONCLUSIONES

- A mayor rugosidad, mayor dimensión fractal, menor masa fractal, menor densidad, mayor cohesividad, más uniforme, mayor humectabilidad, mayor dispersabilidad y solubilidad.
- A menor rugosidad, menor dimensión fractal, mayor masa fractal, mayor densidad, menor cohesividad, menos uniformidad, menor humectabilidad, menor dispersabilidad y solubilidad.
- Las propiedades fisicoquímicas y de rehidratación están en función de la microestructura del alimento en polvo.
- El análisis de imágenes puede ser una herramienta de gran utilidad al analizar la microestructura de alimentos en polvo.

REFERENCIAS

-Alvarado, J. de D., Aguilera, J.M. 2001."Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos: tamaño y forma de partículas, Propiedades físicas de los alimentos en polvo". Zaragoza, España. P.p. 29-47, 135-147.

-AOAC. (1995). Official Methods of Analysis. 16th Edn. Arlington Virginia: Association of Official Analytical Chemists International. 32.1.02.

-Castelman K. (1996). Digital image processing. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall. p.667.

-Frame, M. Mandelbrot, B. Neger, Nial. 2000. Fractal Geometry. National Science Foundation under Grant No. 0203203. [En Línea] Disponible: http://classes.yale.edu/fractals/. 6 de Julio de 2007.

-Isaza E.C., Rodriguez, P.K., Arenas, O.M., Jiménez, J.C., Jiménez, A.A., 2006. Limitantes tecnológicas del cultivo de células vegetales en biorreactores para la obtención de pigmentos naturales: El análisis fractal de imágenes digitales, una nueva y potente herramienta analítica. Biótica, 3:19-41.

-Kenkel, N.C., Walker, D.J. Fractals in the biological sciences. 1996. [En Línea] Disponible: http://www.umanitoba.ca/faculties/science/botany/LABS/ECOLOGY/FRACTALS/fractal.html. 2 de julio de 2007.

-Niro, 2005. Method No. A2a, A2b, A3a, A5a, A7a y A6a. Niro Analytical Methods. [En Línea] Disponible: http://www.niro.com/ndk_website/niro/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkw6dknxs

-NOM-155-SCF1-2003. Leche, formula lácteas y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. [En Línea] Disponible: http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/NOM/nom155scfi.pdf. 2 de Julio de 2007.

-Olsen, E.R., Ramsey, R.D.,Winn D S, 1993. A modified fractal dimension as a measure of landscape diversity. Photogrammetric Engineering & Remote Sensing, 59:1517-1520.

-Ohoud, M.B., Obrecht, F., Gatineau, L., Levitz, P. & Damme, H.V. 1988. Surface area, mass fractal dimension and apparent density of powders. Journal of Colloid and Interface Science. 124,156-161.

-Omobuwajo, T.O., Busari, O.T., Osemwegie, A.A., 2000. Thermal agglomeration of chocolate drink powder. Journal of Food Engineering. 46, 73-81.

-Reh, C., Bhat, S.N., Berrut, S., 2004. Determination of water content in powdered milk. Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry. 86(3), 457-464.

-Schoonman, A., Mayor, G., Dillmann, M.L., Bisperink, C., Ubbink, J., 2001. The microstructure of foamed maltodextrin/sodium caseinate powders: a comparative study by microscopy and physical techniques. Food Research International. 34, 913-929.

-Shittu, T.A., Lawal, M.O., 2006. Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. Elsevier Food Chemistry: Article in Press.

-Teunou, E., Fitzpatrick, J.J., Synnott, E.C., 1999. Characterisation of food powder flowability. Journal of Food Engineering. 39,31-37.

CARACTERIZACIÓN DE UN PRODUCTO LÁCTEO FERMENTADO "SUERO COSTEÑO" OBTENIDO A PARTIR DE FERMENTACIÓN INDUCIDA CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Simanca, Mónica María; Arteaga, Margarita Rosa; Pérez, Yulieth del Carmen; Soto, María Eugenia y Salcedo, Jairo Guadalupe.

UNIVERSIDAD DE CORDOBA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
Carrera 6ª # 76-103. E. mail. msimanca@sinu.unicordoba.edu.co
MONTERIA – COLOMBIA

Palabras clave: Propiedades químicas, producto lácteo, fermentación, suero costeño, bacterias ácido lácticas.

RESUMEN

El propósito del trabajo fue caracterizar bromatológica, fisicoquímica y microbiológicamente el suero costeño (producto lácteo fermentado, elaborado tradicionalmente en la costa atlántica colombiana) obtenido mediante fermentación inducida con una cepa de *Lactobacillus brevis* y dos de *Enterococcus faecium*, aisladas a partir del suero costeño elaborado artesanalmente.

Se preparó el inóculo utilizando leche en polvo descremada reconstituida al 10% y esterilizada, sembrando las bacterias de interés a partir de un cultivo en caldo MRS incubado 24 horas antes. Para la elaboración del suero costeño se utilizó leche entera de vaca producida en el departamento de Córdoba-Colombia, pasteurizada a 80°C durante 20 minutos e inoculada con un recuento de $1x10^9$ UFC/mL de células viables del cultivo iniciador. La leche inoculada se incubó a 35 °C, midiendo el pH y la acidez cada 3 horas durante 24 horas; tiempo al final del cual se procedió al desuerado, incorporación de crema, salado y batido; posteriormente se envasó en recipientes con capacidad de 500 mL previamente desinfectados y se realizó la caracterización del producto.

En el proceso de elaboración de suero costeño cultivado con *Lactobacillus brevis* y *Enterococcus faecium*, el desuerado ocurrió a las 12 horas de fermentación, generando un ahorro de la mitad del tiempo empleado en el proceso tradicional. El pH y la acidez del producto final fue de 4,71 y 0,56% ácido láctico respectivamente, presentando diferencias con respecto al producto elaborado artesanalmente. Los resultados bromatológicos revelan un alto contenido de sólidos totales y valor nutritivo del producto de acuerdo a la cantidad de proteína y grasa, debido a la concentración de estos por la pérdida humedad durante el desuerado; y los resultados microbiológicos lo catalogan de buena calidad de acuerdo a la resolución 1804 de 1989 y la 11961 de 1989 del Ministerio de Salud de Colombia.

INTRODUCCION

El suero costeño, producto lácteo fermentado, se elabora tradicionalmente en la costa caribe colombiana, haciendo parte de la cultura gastronómica de sus habitantes. El producto se obtiene en forma artesanal a partir de la coagulación de leche de vaca y adición de sal, hasta alcanzar una consistencia viscosa debido a la concentración de sólidos totales, principalmente proteína y grasa. (ICTA, 1990).

El suero costeño se diferencia de las leches fermentadas por el hecho de que en estas no hay rotura del gel ni posterior desuerado, por lo que se le puede comparar con el proceso de elaboración de queso fresco (Bourgeois, 1991).

Dependiendo del contenido de materia grasa, según se utilice la crema separada espontáneamente durante la fermentación, se pueden distinguir tres tipos de suero costeño: de alto contenido graso, el cual está constituido por la crema retirada que lleva consigo parte del coágulo; de contenido medio en grasa, se obtiene al agregar nuevamente la crema al coágulo después de la sinéresis; y de contenido bajo en grasa, al que no se agrega crema y se obtiene sólo del coágulo formado (Pérez y Soto, 2004).

Los resultados del estudio de caracterización de suero costeño elaborado tradicionalmente en el departamento de Córdoba-Colombia, realizado por Pérez y Soto en el 2004, se observan en la tabla 1; notándose un contenido de sólidos solubles (23,97%) menor que el reportado por el ICTA en 1990 (32,01%); un porcentaje de grasa (11,65) mayor que los resultados del ICTA (9,3%), y el pH (3,94) y acidez (1,4) similares a los encontrados por el ICTA de 3,68 y 1,41 respectivamente.

Tabla 1. Caracterización de suero costeño elaborado por fermentación espontánea en el departamento de Córdoba-Colombia.

Análisis	Resultado
Humedad*	76.03
Proteína*	5.09
Extracto etéreo*	11.65
Cenizas *	2.88
Lactosa*	4.36
Cloruros*	2.34
pH	3.94
Acidez (% ácido láctico)	1.4

*Base seca

Las materias primas para la elaboración del suero costeño son leche entera de vaca, sal y en algunas ocasiones se adiciona lactosuero obtenido durante la elaboración de queso fresco.

El proceso de elaboración artesanal inicia con la filtración de la leche entera fresca, con el uso de mallas o cedazos para eliminar impurezas; posteriormente la leche es inoculada con un 2 a 3% de lactosuero ácido o en otros casos se usa la carga microbiana natural presente en la leche cruda proveniente de vacas sanas. La leche se deja acidificar espontáneamente por las bacterias lácticas en recipientes higiénicos y a temperatura ambiente en un periodo de aproximadamente 24 horas (Pérez y Soto, 2004).

La leche inoculada en reposo forma una capa de crema en su superficie, la cual se separa manualmente del coágulo con cucharas; y puede ser adicionada al producto final fermentado para obtener suero de contenido medio en grasa, o consumirse como suero costeño de alto contenido de materia grasa. Luego, el coágulo se rompe o corta manualmente, con lo que se facilita la sinéresis, permitiendo que el coágulo ascienda a la superficie debido a la presencia de gas (CO_2) producido durante la fermentación. El corte del coágulo debe ser grueso, seguido de una agitación suave para evitar que se formen partículas muy finas que se pierdan al separar el coágulo del lactosuero. La separación del coágulo puede arrojar rendimientos de 42,6% con base en el volumen inicial de leche (ICTA, 1990).

En algunos casos el coágulo se lava usando agua potable, haciéndola pasar por un lienzo donde esta suspendido el coágulo, con el fin de retirar la lactosa residual y evitar una excesiva acidificación del producto. Luego se ajusta el contenido graso, adicionando crema resultante de la separación espontánea durante la incubación, para obtener suero costeño de contenido medio en grasa. Posteriormente se bate el producto para dar una consistencia homogénea y se adiciona sal en razón

de 1,2 Kg por cada 100 L de leche destinada a fermentación. Finalmente el producto se refrigera con el fin de evitar su acidificación excesiva.

Pérez y Soto en el 2004 en su estudio "Evaluación de la etapa de fermentación espontánea del suero costeño y aislamiento de los microorganismos involucrados en dicha etapa", aislaron una cepa *Lactobacillus brevis* y dos de *Enterococcus faecium*, a los cuales se les han atribuido cualidades probióticas (González y Gómez, 2001) y (Salazar *et al*, 2005).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de caracterizar bromatológica, fisicoquímica y microbiológicamente el suero costeño obtenido mediante fermentación inducida con bacterias acido lácticas aisladas del proceso de elaboración artesanal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Se utilizó leche entera de vaca producida en el departamento de Córdoba-Colombia y como cultivo iniciador bacterias ácido lácticas de los géneros: *Lactobacillus brevis* y *Enterococcus faecium* (dos cepas), aisladas a partir de la fermentación espontánea en el proceso de elaboración tradicional del suero costeño (Pérez y Soto, 2004).

Métodos.

Preparación del inóculo.

Inicialmente se preparó el inóculo utilizando 400 mL de leche en polvo descremada reconstituida al 10% y esterilizada, sembrando 1mL de cada bacteria a partir de caldo MRS incubado 24 horas antes.

Inoculación.

Para la elaboración de suero costeño a partir del inóculo desarrollado los implementos, recipientes, equipos y superficies fueron desinfectados previamente.

Se inocularon por triplicado cuatro litros de leche entera previamente pasteurizada a 80°C durante 20 minutos, utilizando como cultivo iniciador, a partir del inoculo preparado previamente, recuentos de células viables de $1x10^9$ UFC/mL, cantidad que se encuentra en los cultivos comerciales, recomendada para asegurar un desarrollo adecuado de la fermentación (ICTA, 1995) .

Fermentación.

La leche inoculada se incubó a 35 °C, midiendo el pH y la acidez cada 3 horas durante 24 horas, tiempo al final del cual se procedió al desuerado, incorporación de crema, salado (2%) y batido; posteriormente se envasó en recipientes con capacidad de 500 mL previamente desinfectados y se realizó la caracterización del producto.

Caracterización del suero costeño.

Se llevó a cabo mediante la utilización de las técnicas de análisis bromatológico, fisicoquímico y microbiológico (carga microbiana alterante y patógena.

El análisis bromatológico comprendió la determinación de: humedad, método 930.15/90 de la A.O.A.C. adaptado; cenizas, método 942.05/90 de la A.O.A.C. Adaptado; extracto etéreo, método 920.39/90 de la AOAC adaptado y proteínas bruta, método 955.04/90 de la AOAC adaptado, determinación macro. (Citados por Bernal, 1993).

El análisis fisicoquímico consistió en la determinación de lactosa, método de la antrona (De Paula, 1995); determinación de cloruros (INVIMA, 1997); pH, método 945.10/90 de la A.O.A.C. adaptado, (citado por Bernal, 1993) y acidez total: método 950.07/90 de la A.O.A.C. adaptado, (citado por Bernal, 1993).

La caracterización microbiológica determinó el NMP de coliformes totales, fecales y el recuento de mohos y levadura de acuerdo a la disposición de la resolución 11961 de 1989 del Ministerio de Salud de Colombia para leches fermentadas; y el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y la Investigación de *Salmonella* de acuerdo a la resolución 1804 de 1989 del Ministerio de Salud de Colombia para quesos frescos (INVIMA, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 1 y 2 muestran el comportamiento del pH y la acidez durante las 24 horas de fermentación. El pH disminuyó hasta un valor de 4,71 y la acidez aumentó hasta 0,56% de ácido láctico, características que en el producto obtenido tradicionalmente por fermentación espontánea tiene valores de 3,9 y 1,4% respectivamente. La mayor acidez del suero tradicional se debe a la intervención de bacterias contaminantes que contribuyen a una sobreacidificación del producto tales como micrococos, coliformes, micobacterias, etc. (Pérez y Soto, 2004).

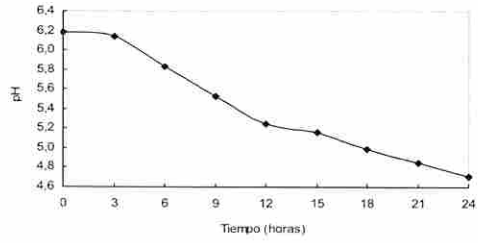


Figura 1. Evolución de la acidez durante la fermentación del suero costeño con BAL.

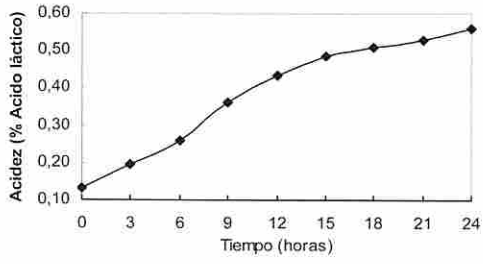


Figura 2. Evolución de la acidez durante la fermentación del suero costeño con BAL.

La separación de fases ocurrió a las 12 horas alcanzando un pH de 5,25 y una acidez de 0,43% A.L., fenómeno debido principalmente a la abundante producción de CO_2 que permite una ascensión más rápida del coágulo producido por acidificación.

El coágulo formado fue separado del lactosuero a las 24 horas; Sin embargo el rápido avance de la fermentación permite realizar el desuerado una vez formado el coágulo (12 horas) generando un ahorro de aproximadamente la mitad del tiempo de proceso tradicional.

Luego del batido y salado del producto se obtuvo un rendimiento del 49% respecto al volumen inicial de leche, valor ligeramente superior al reportado por el ICTA en 1990.

En los resultados de las características bromatológicas y fisicoquímicas que se muestran en la tabla 2, se observa un alto contenido de sólidos totales al compararlo con los reportados por Pérez y Soto (2004) en suero costeño obtenido por fermentación espontánea; posee además un alto valor nutritivo de acuerdo a la cantidad de proteína y grasa, debido a la concentración de estos por la pérdida humedad durante el desuerado.

Tabla 2. Características bromatológicas y fisicoquímicas del suero costeño elaborado con BAL.

Análisis	Resultado
Humedad*	72,87
Proteína bruta*	6,46
Extracto etéreo*	12,35
Cenizas*	2,94
Lactosa*	4,97
Cloruros*	1,92
pH	4,71
Acidez (ácido láctico)	0,56

*Base seca

Por otro lado la cantidad de lactosa en el suero queda como sustrato disponible para continuar fermentando, dándole al producto características adecuadas de maduración; dicha maduración puede resultar conveniente puesto que los valores de acidez y pH son menores a los observados en el producto fresco tradicional.

El porcentaje de cloruros (1,92) corresponde aproximadamente al adicionado en la elaboración del producto; y el de cenizas (2,94) permite suponer que las cenizas están representadas por la sal adicionada y los minerales aportados por la leche.

De acuerdo a los resultados del análisis microbiológico mostrados en la tabla 3, la carga de microorganismos contaminantes y patógenos investigados, es menor que los valores mínimos establecidos para leches fermentadas de acuerdo con la resolución 11961 de 1989 y los establecidos por la resolución 1804 de 1989 para quesos frescos del Ministerio de Salud de Colombia; por tanto su calidad higiénica es buena, confirmando que el uso del inóculo, la higienización de la leche y las buenas prácticas de manufactura disminuyen la contaminación bacteriana, logrando conseguir el nivel de calidad deseado en el producto pese a su proceso de elaboración artesanal.

Tabla 3. Características microbiológicas del suero costeño elaborado con BAL.

Indicador	n	Resultado
Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL)	3	<10
NMP Coliformes totales (Bacterias/mL)	3	<3
NMP Coliformes fecales (Bacterias/mL)	3	<3
Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (UFC/mL)	3	<100
Investigación de *Salmonella*/25 g	3	Ausente

n: número de muestras

CONCLUSIONES

El tratamiento térmico de la leche, las buenas prácticas de manufactura y el uso del cultivo de *Lactobacillus brevis* y *Enterococcus faecium*, en el proceso de elaboración de suero costeño permiten obtener un producto de buena calidad.

En el proceso de elaboración de suero costeño, el desuerado puede realizarse a las 12 horas de fermentación, generando un ahorro de la mitad del tiempo empleado en el proceso tradicional.

El pH del producto final fue de 4,71 y la acidez 0,56% ácido láctico, características que en el producto obtenido por fermentación espontánea tiene valores de 3,9 y 1,4% respectivamente.

La caracterización bromatológica reportó un alto contenido de sólidos totales, representado por proteína y materia grasa.

De acuerdo con el análisis microbiológico, el suero costeño elaborado a partir del inóculo desarrollado posee una buena calidad microbiológica con base en los valores mínimos establecidos para leches fermentadas de acuerdo a la resolución 11961 de 1989 y los establecidos por la resolución 1804 de 1989 para quesos frescos del Ministerio de Salud de Colombia, eliminando así cualquier riesgo para la salud y haciéndolo más estable frente al suero tradicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Córdoba, a la Facultad de Ciencias Agrícolas y al Programa de Ingeniería de Alimentos por su colaboración en el desarrollo del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

-A.O.A.C. (Association of oficial analytical chemists). 1990. Oficial methods of analysis. Volumen 2. Arlington-U.S.A. p 914 - 918.

-Bernal, I.R. 1993. Análisis de Alimentos. Editorial Guadalupe Ltda. Santa fe de Bogotá. p 47-53, 104, 107.

- Bourgeois, C. M. y Larpent, J. P. Microbiología alimentaría: fermentaciones alimentarias. Zaragoza (España): Acribia, 1991. V. 2. 366 p 211.

-De Paula, Claudia. 1995. Guía de prácticas de laboratorio. Universidad de Córdoba: Facultad de Ciencias Agrícolas. Ingeniería de Alimentos. Montería (Colombia), p 39, 58.

-González, B. E. y Gómez, M. 2001. Probióticos. Revista de Salud Pública y Nutrición. 2 (3). Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Autónoma de Nuevo León). En: http://www.respyn.uanl.mx/ii/3/ensayos/ensayos_probioticos.html; consulta: julio 2007.

-ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 1990. Programa andino de desarrollo tecnológico para el medio rural: Manual de elaboración de productos lácteos fermentados. Bogotá (Colombia). Universidad Nacional de Colombia, p 11.

-Invima (Instituto de vigilancia de medicamentos y alimentos). 1997. Manual de técnicas analíticas en el control de la sal para consumo humano. Bogotá, p 20, 79.

-Invima (Instituto de vigilancia de medicamentos y alimentos). 1998. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Santa fe Bogotá. p 17-20, 25, 26, 31, 32, 36-38.

-Ministerio de Salud. 1986. Resolución 1804 de 1986 de los quesos frescos. República de Colombia. p 2.

-Ministerio de Salud. 1989. Resolución 11961 de 1989 de las clases de leches fermentadas. República de Colombia. p 2.

-Pérez, Y. y Soto, M. 2004. Evaluación de la etapa de fermentación espontánea del suero costeño y aislamiento de los microorganismos involucrados en dicha etapa. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba. Montería (Colombia). p 63.

-Salazar, B. C., Montoya, O. I. y Sepúlveda, J. U. 2005. Viabilidad de un aislado nativo de Lactobacillus brevis en una bebida láctea fermentada. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 55 (4). En: http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-4/viabilidad_aislado_lactobacillus_brevis_bebida_lactea_fermentada.asp; consulta: julio 2007.

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ULTRASONIDO SOBRE LAS PROTEÍNAS SARCOPLASMICAS Y SU RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA Y LA TEXTURA DEL MUSCULO DE CAJARO (*Phractocephalus hemiliopterus*)

Belalcazar Velasco Felipe; Romero Nempeque Paola.; Rodríguez Peña Jenny; González Martinez Gerardo; Sotelo Díaz Indira.[1]

[1]Directora Programa Ingeniería de Producción Agroindustrial. Universidad de La Sabana. Campús universitario del puente del común. Km. 21 autopista norte de Bogotá. Chia- Colombia.

indira.sotelo@unisabana.edu.co

Palabras clave: Propiedades Bioquímicas, Ultrasonido, Proteína Sarcoplásmica, CRA, Cajaro

RESUMEN

La aplicación de procedimientos en los cuales se ve involucrado el uso de pulsos de ultrasonido, con el pasar de los años se ha convertido en un campo bastante amplio de investigación; en especial en los alimentos. En este caso, se aplicó ultrasonido a 35 kHz en 7 intervalos progresivos de 5 minutos durante 30 minutos, sobre trozos de Cajaro *(Phractocephalus hemiliopterus)*, para evaluar el efecto producido sobre la fracción de proteína sarcoplásmica contenida, capacidad de Retención de Agua (CRA) y textura. Se encontró un efecto significativo al aplicar los pulsos durante 30 minutos en la fracción de proteína sarcoplásmica ($p=0.0025$) tras lograr extraer 2.43 mg/ml. Se logró también un efecto considerable en la Capacidad de Retención de Agua (CRA) aumentando esta, de 49.9 a 55.03 g de Agua retenida por cada 100 g de músculo ($p=0.0382$). No fue posible estimar un efecto sobre la fuerza de corte o sobre la cohesividad del músculo, debido a la complejidad en la distribución de los tejidos del pescado.

INTRODUCCIÓN

El Cajaro (*Phractocephalus hemiliopterus*), es un bagre especie pesquera capturada en la Amazonía Colombiana, que por sus características proteicas hacen favorable su valorización en la obtención de productos tipo Surimi, cuyas características funcionales y de textura hacen que estos puedan ser utilizados en diferentes aplicaciones comestibles. El pescado por lo general contiene entre 15 a 20% de proteína total, de la cual las proteínas sarcoplásmicas se encuentran entre 20 y 30% (JICA, 1992). Una de las fuentes proteicas con mayor potencial de uso industrial en países con recursos pesqueros o acuícolas, es la proteína miofibrilar del pescado que ha sido tradicionalmente utilizada en la elaboración de productos secos, ahumados, y en la actualidad se ha potenciado el empleo para la obtención de productos sucedáneos de pescado tipo Surimi en mercados no tradicionales en países de Occidente. En el proceso tradicional de elaboración de Surimi, los filetes de pescado obtenidos se lavan y prensan. Luego son sometidos a tres lavados sucesivos con agua potable (Murphy *et al.*, 2003), en los cuales se remueven las proteínas sarcoplásmicas, restos de sangre, pigmento, enzimas y compuestos de derivados amoniacales responsables del olor, y así dejar prácticamente separada la fracción correspondiente a la proteína miofibrilar (Toldrá et al, 1987)

Los procedimientos con ultrasonido, se han estudiado en procesos como extracción, secado y emulsificación; sin embargo aún no se encuentran referenciados estudios que conduzcan hacia el conocimiento de los efectos particulares del ultrasonido sobre las proteínas miofibrilares ó sarcoplásmicas (Gülseren, 2004). Las burbujas producidas por la cavitación, al aplicar ultrasonido a frecuencias entre 20 KHz y 100 KHz, generan puntos calientes a temperaturas de aproximadamente 4000 K y presiones de 100 MPa, la tasa de enfriamiento de una burbuja puede estar sobre 10^{10} K/s (Floros, 1994). Esta actividad tan rápida de las burbujas, produce fuerzas en el medio lo suficientemente capaces de romper enlaces covalentes. La ruptura de la burbuja de cavitación tiene efectos mecánicos significantes en sistemas heterogéneos sólido-líquido produciendo flujos turbulentos con velocidades alrededor de 110 m/s (Mason *et al.*, 1996).

De esta forma, se encuentra en la aplicación de estos tratamientos una nueva tecnología altamente eficiente en la preservación y procesamiento de los alimentos.

Con este trabajo se busca aportar al proyecto "Estudio de los cambios fisicoquímicos y de la fracción proteica miofibrilar de Cajaro (*Phractocephalus hemiliopterus*), por efecto del tratamiento ultrasonido y su aplicabilidad en la obtención de Surimi". Se evaluó el efecto del tratamiento con ultrasonido a 35 kHz sobre la fracción de proteínas sarcoplásmicas, la CRA y textura de músculo de Cajaro; como una alternativa para reducir la proporción de agua necesaria en la lixiviación de las proteínas sarcoplásmicas para la obtención de Surimi. Por lo tanto, se cree que el uso de ultrasonido de alta intensidad y alta frecuencia, facilita la liberación de proteínas sarcoplásmicas del músculo de Cajaro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acondicionamiento de Materia Prima

Filetes de Cajaro congelados, fueron adquiridos en una comercializadora local autorizada, ubicada al norte de la ciudad de Bogotá, Colombia. Se obtuvieron trozos homogéneos paralelepípedos entre 4-5 gramos, se empacaron a vacío y se mantuvieron a 4 °C, para luego ser sometidos a una frecuencia de 35 kHz durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, en un baño de ultrasonido .

Condiciones del Equipo y aplicación de pulsos de Ultrasonido.

Se utilizó un equipo "ELMA Ultrasonic LC 30 H" a una frecuencia de 35 KHz. Para definir los tiempos de aplicación de Ultrasonido se determinó el tiempo máximo al cual fue posible someter el medio (Agua pura) a una temperatura no mayor a 10°C. Se puede apreciar en la *figura 2*, un incremento constante de 0.25 °C en promedio por minuto, se definió como tiempo de tratamiento máximo 30 minutos.

Figura 1. Disposición del equipo para determinación de intervalos de aplicación

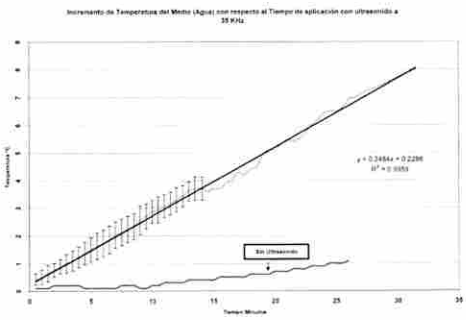


Figura 2. Incremento de temperatura del agua frente al tiempo de aplicación de ultrasonido a 35 kHz.

Determinación de perfil deTextura
Inmediatamente después de aplicar los pulsos de ultrasonido, se realizó un análisis TPA (Textura Profile Analyser) con un texturometro TA-XT2 Stable Microsystems, con las siguientes condiciones: Probeta P5, distancia: 8.0mm, Velocidad pre-ensayo y ensayo 2mm/s y velocidad post-ensayo 10mm/s.
Las muestras para ensayos de proteína, CRA y humedad, se mantuvieron a temperatura de 4°C hasta el momento del análisis.

Extracción de proteína sarcoplásmica soluble.
Se realizó la extracción de proteína sarcoplásmica soluble con solución de tampón de fosfato de potasio (0,03 M). Las muestras fueron homogenizadas en un Laboratory Blender Stomacher 400, durante 2 minutos. Luego, la mezcla se centrifugó en una Universal 32R Hettich Zentrifugen, durante 20 minutos a 4°C y 9000 r.p.m. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas sarcoplásmicas solubles, procedimiento modificado de (Toldrá et al., 1991; Sotelo, I. 2000).

Cuantificación de proteína soluble
Se realizó una curva patrón de BSA (Bovine Serum Albumin) en SDS al 0.2%, se determinó la absorbancia en espectrofotómetro CARY 100 a 280 nm. Las muestras de proteína se diluyeron 20 veces en SDS 0.2% y se midieron en las mismas condiciones de la curva patrón (M. Etienne *et al.* (2001).

Determinación de Capacidad de Retención de Agua (CRA).
Se empleó el método sugerido por Jáuregui *et al.* (1981) en el cual se envuelve una muestra de 1.5±0.001 gramos en papel de filtro # 3 previamente pesado para luego envolverlo nuevamente en papel # 50. Se centrifuga a 9000 r.p.m, por 20 minutos a 4°C. Se determinó la CRA por una ecuación de cálculo en donde se consideró el agua retenida paralelamente con el contenido de humedad de cada muestra.

Determinación de Humedad.
Se empleó el método de secado en estufa sugerido por la AOAC (985.14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los cambios de la fracción proteica soluble (Proteína Sarcoplásmica)
La curva patrón de albúmina con nueve concentraciones determinada a 280 nm arrojó la ecuación (Y=0.625X + 0.0026), en la cual se obtuvieron los valores de concentración de proteína sarcoplásmica soluble extraída a los diferentes tiempos de tratamiento tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración de Proteína Sarcoplásmica, CRA y Tiempos de Tratamiento

Tiempo Min	*Concentración Proteína Sarcoplásmica (mg/ml)*	*CRA g de agua retenida/100 g de músculo*
5	1,05±0,08	49,91 ± 3,53
10	1,21±0,06	49,1 ± 3,95
15	0,74±0,30	50,13 ± 2,20
20	0,97±0,19	56,17 ± 2,65
25	0,90±0,08	55,49 ± 6,81
30	1,98±0,08	55,04 ± 1,17

Para analizar el efecto de la aplicación de ultrasonido sobre la lixiviación de las proteínas sarcoplásmicas, fue necesario estimar su contenido dentro del músculo de pescado, para lo cual se realizó el cálculo teniendo en cuenta que en trabajos previos[1] se determinó que el Cajaro posee aproximadamente un 17.64 % de proteína total. Se tomó un valor promedio de 25 % para estimar la fracción de proteína sarcoplásmica presente (JICA 1992), con lo que se determinó que por cada 4 gramos de músculo hay 0.004 g de proteína sarcoplásmica/ml.
Los datos de la *tabla 1* ($p = 0.0025$) indican que a los 30 minutos de tratamiento (US 35 kHz), en el músculo queda un 44.93% de la proteína sarcoplásmica total. A partir del trabajo previo de obtención de surimi, se estableció que la pasta obtenida, luego de los 3 lavados con agua, queda con un contenido de 36.48 % de proteína sarcoplásmica; ideal para este tipo de productos. A los 15 minutos de tratamiento se conserva un 83% de dicha proteína, valor elevado para la preparación de surimi. De acuerdo con los datos de la *tabla 1*, y según el ANOVA, es importante establecer que existe una diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento y la concentración de proteína sarcoplásmica liberada ($p<0.05$). Sin embargo, se observa que el efecto de la aplicación no es creciente ni tiene un efecto constante sobre el músculo. Es decir, los cambios no son uniformes ni homogéneos esto puede deberse a que la liberación de la proteína sarcoplásmica se da por efecto de los cambios en la estructura del tejido miofibrilar, y que tal como ha sido publicado por Pohlman *et al.* (1996), quienes describen que por la forma y disposición no homogéneas de las miofibrillas en el músculo, al ser afectadas por métodos físicos o bioquímicos, los fenómenos de contracción y relajación de la carne no tienen un patrón constante de comportamiento.

Capacidad de Retención de Agua.
En la figura 3 se relaciona la capacidad de retención de agua con la concentración de proteína sarcoplásmica liberada y se observa un comportamiento paralelo en los tiempos de tratamiento. Como los estudios con pescado en cuanto a capacidad de retención de agua no tienen referenciado un método definido, se encontró experimentalmente que esta especie pesquera tiene una capacidad de retención de agua de 45,87±7,12g.

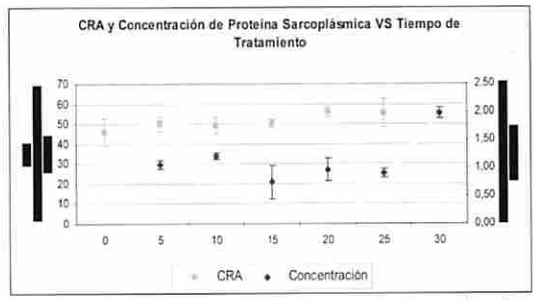


Figura 3. CRA y Concentración de Proteína Sarcoplásmica vs Tiempos de Tratamiento

Al igual que con la concentración de proteína, existen diferencias significativas entre los tiempos de tratamiento ($p = 0.0382$). Es decir, es posible afirmar que hay un efecto considerable sobre la CRA y el contenido de Proteína sarcoplásmica, al aplicar ultrasonido en los tiempos evaluados. evidenciando una mayor CRA a los 20 minutos con tendencia lineal hasta los 30 minutos de tratamiento.

Textura: Los análisis de varianza, para cada tiempo de tratamiento, arrojan que todos los grupos de muestras por réplica establecida en la fuerza de corte con (p= 0.0079), no son lo suficientemente homogéneos y existen diferencias significativas entre los datos. Esto indica que por la anisotropía del músculo, es muy difícil obtener un valor estadísticamente representativo de las condiciones de textura.

Análisis Estadístico. En la tabla 2 se puede apreciar que los grupos de réplicas para cada uno de los tratamientos establecidos, son lo suficientemente homogéneos, a excepción del grupo de fuerza de corte. Grupo en el cual existe una diferencia significativa entre muestra y muestra.

Tabla 2. ANOVAS para los factores analizados

Factores	p Réplicas	p Tiempos de Tratamiento
Concentración de Proteína	0,8324	0,0025
CRA	0,4487	0,0382
Fuerza de Corte	0,0079	0,5023
Cohesividad	0,16	0,4378

Con estos resultados se puede apreciar que tanto para la concentración de proteína como para la capacidad de retención de agua, es evidente una diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento, ayudando a comprobar el efecto positivo que sobre estas variables ejerce el uso de ultrasonido a 35 kHz.

CONCLUSIONES

Se logra un efecto significativo sobre la concentración de proteína sarcoplásmica tras haber liberado 2.4284 mg/ml, después de 30 minutos de tratamiento con Ultrasonido a 35 kHz. El 44.93% restante de la proteína inicial es un valor cercano al valor óptimo para la elaboración de Surimi (36,48%). También se puede establecer el efecto considerable que el tratamiento ejerce sobre la CRA tras lograr un valor de 55.04 g de agua retenida por cada 100 g de músculo comparado con la referencia 45.87g (Germain, 2004).

Es importante evidenciar que el baño de ultrasonido a 35 kHz disminuye los lavados necesarios para retirar proteínas sarcoplásmicas para el desarrollo del Surimi lo cual es importante para las industrias pesqueras, por la reducción de agua para este proceso. Se estima que la disminución equivale a cerca del 77%

En cuanto a textura, desde la preparación de réplicas, se hace imposible exponer alguna relación. Debido a la complejidad de los tejidos, la preparación de las muestras se hace bastante delicada y no permite que los grupos sean fácilmente replicables.

RECOMENDACIONES

Verificar el % extraído de Proteína Sarcoplásmica, después de 30 minutos de tratamiento con ultrasonido, y realizar surimi con tratamiento de ultrasonido para comprobar si es posible lograr la reducción hasta del 77 % en el agua empleada para los lavados.

Se deberá realizar análisis de tejidos por microscopia que permitan validar el cambio en la estructura miofibrilar para que suceda la extracción de proteína sarcoplásmica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Fondo patrimonial especial de la Universidad de La Sabana, por la financiación de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC (1990). Official methods of analysis. 14th edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington. D.C.
- Filomena, A. (2007) Evaluación de las principales propiedades físicas y químicas de Surimi y productos derivados obtenidos de Cajaro (*Phractocephalus hemiliopterus*). Universidad de La Sabana. Colombia.
- Floros J.D, Liang H. (1994). High Intensity Ultrasound accelerates difusion and can be used to improve food processes, Food Technology, 79.
- Gülseren I (2004), High-Intensity Ultrasound Mediated Structure – Function Changes of BSA as affected by pH. University of Tennessee, Knoxville.
- JICA (1992). Science of processing marine food products. Kanagawa International Fisheries training centre Japan International Cooperation Agency.
- Mason T.J, Panywnyk L, Lorimer J.P (1996) The uses of ultrasound in food technology. Ultrasonics Sonochemistry.
- Murphy S.C, Gilroy D, Kerry J.F, Buckley D.J, Kerry J.P (2003), Evaluation of surimi, fat and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface methodology. Meat Science, Vol 66 pg 689 – 701.
- M. Etienne et al, (2001), Food Chemistry 72 (2001) 105-112
- Pohlman F, Dikeman E, Zayas J (1997). The effects o f Low-Intensity Ultrasound Treatment on Shear Properties, Color Stability and Shelf-life of Vacuum-packaged Beef *semitendinous* and *biceps* Muscles. Meat Science.
- Pohlman F, Dikeman E, Zayas J (1997). Effects of High Intensity Ultrasound Treatment, Storage Time and Cooking Method on Shear, Sensory, Instrumental Color and Cooking Properties of Packaged and Unpackaged Beef *pectoralis* Muscle. Meat Science, Vol 46 pg 89-100.
- Sotelo I, 2000. Cambios químicos y microestructurales en el proceso post-mortem de la carne cubierta con *Pteridium aquilinum*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento Tecnología de Alimentos.
- Toldrá, F. and Etherington, D. (1991). The solubilization of myofibrillar proteins by calcium ions. Meat Science, 23. 1-7.
- Toldrá-Villalobos L (1987). El Surimi; Una alternativa en productos pesqueros. Fonaiap Divulga Nº 24 Abril-Junio.

ANTIOXIDANTES EN ACEITE DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) OBTENIDO MEDIANTE PRENSADO

Ixtaina, Vanesa Y.[1, 3]; Martínez, Marcela[4]; Maestri Damián[4]; Spotorno, Viviana[5]; Mateo, Carmen[3]; Nolasco, Susana M.[3]; Tomás Mabel C.[1, 2]

[1] UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA – CONICET. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. 47 y 116 (1900), La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. E-mail: mabtom@hotmail.com

[2] UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS. 47 y 116 (1900), La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

[3] UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES. FACULTAD DE INGENIERÍA. DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA. TECSE. Av. Del Valle 5737 (B7400JWI), Olavarría, Provincia de Buenos Aires, Argentina

[4] UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA. INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA VEGETAL E INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. Av. Vélez Sarsfield 1611, (X5016GCA), Córdoba, Argentina.

[5] INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA. INSTITUTO TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. Casilla de Correo 77 (B1708WAB). Morón. Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Palabras clave: propiedades químicas, aceite de chía, tocoferoles, antioxidantes fenólicos, prensado en frío

RESUMEN

Las semillas de chía constituyen la fuente vegetal más rica en ácido alfa-linolénico (61–70%), con un 32-39% de aceite y antioxidantes naturales que inciden en su calidad nutricional y su preservación. El propósito del siguiente trabajo fue determinar la estabilidad oxidativa y la presencia de antioxidantes en el aceite de chía obtenido mediante prensado en frío. Para ello, se obtuvo el aceite de semillas comerciales procedentes de Argentina y Guatemala utilizando una prensa de tornillo helicoidal (velocidad de prensado 20 rpm, reducción 5mm, 10% humedad de semilla, temperatura ambiente). Se determinó la composición acídica, índice de acidez, fosfolípidos, tocoferoles, antioxidantes polifenólicos y estabilidad oxidativa según normas internacionales. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), índice de acidez, tocoferoles y antioxidantes polifenólicos totales fueron afectados por el lugar de origen de la semilla, mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el contenido de fosfolípidos y tiempos de inducción (t_i) obtenidos mediante un ensayo acelerado de oxidación. Como antioxidantes naturales, se registró la presencia de γ-tocoferol y trazas de α y δ-tocoferol. En cuanto a los antioxidantes polifenólicos, la miricetina, ácidos clorogénico y cafeico, fueron las principales sustancias detectadas, seguidas de kaempferol y trazas de quercetina. El balance de PUFA´s y sustancias antioxidantes presentes en los aceites de chía influye en su estabilidad oxidativa. En este caso, el alto tenor de PUFA's determina que los t_i registrados para este tipo de aceite sean muy bajos, aún en presencia de interesantes contenidos de tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos, cuya concentración además puede ser afectada por las condiciones agroecológicas del cultivo.

INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta herbácea anual de la familia de las *Lamiaceae* frecuentemente utilizada por las civilizaciones precolombinas con fines alimenticios, medicinales y en la elaboración de pinturas (Sahagún, 1579 citado por Ayerza y Coates, 2005). El aceite obtenido de sus semillas presenta el mayor contenido de ácido alfa-linolénico conocido hasta el momento (61-70%), el cual presenta variaciones según las condiciones agroclimáticas del cultivo (Ayerza, 1995). La presencia de este tipo de ácido graso, si bien le otorga importantes características desde el punto de vista nutricional, juega un rol fundamental en la estabilidad oxidativa del aceite.

La autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA´s) no sólo afecta negativamente la calidad nutricional de los alimentos (Farag y col., 1989) sino que también sus productos constituyen un importante factor de riesgo para la salud relacionado con el daño de membranas celulares, procesos de envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Duve y White, 1991).

Los antioxidantes protegen la calidad de los alimentos retardando el deterioro de los lípidos (Wanasundara y Shahidi, 1994). Así, existen compuestos vegetales que pueden actuar como antioxidantes tales como los flavonoides, lignanos, ligninas, ácidos fenólicos, taninos y tocoferoles, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en las especies oleaginosas (Shukla y col., 1997).

Los tocoferoles constituyen uno de los principales compuestos antioxidantes naturales encontrados en aceites vegetales, los cuales pueden intervenir en las etapas de iniciación o propagación de las reacciones en cadena del mecanismo de oxidación lipídica o actuar como "quencher" de oxígeno singulete (Cuppett y col., 1997).

Si bien se realizó un estudio en semilla de chía en el cual se encontró actividad antioxidante frente al β-caroteno por la presencia de flavonoles, ácido clorogénico y cafeico (Taga y col., 1984), existe escasa información sobre la estabilidad oxidativa y compuestos antioxidantes presentes en los aceites obtenidos de la misma.

El principal objetivo de este estudio fue determinar la estabilidad oxidativa e identificar los antioxidantes naturales presentes en el aceite de chía obtenido mediante prensado en frío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó semilla comercial de chía procedente de dos localizaciones geográficas distintas: Salta (Argentina) y Quetzaltenango (Guatemala). Luego de la limpieza manual a fin de eliminar el material extraño, se las almacenó herméticamente en recipientes de plástico a 5°C hasta su posterior uso.

El contenido de humedad de las muestras se determinó en estufa de vacío (AOAC, 1990).

Obtención de aceite mediante prensado en frío

Con el objeto de mejorar la plasticidad del material, reducir la resistencia friccional y evitar posibles obstrucciones a la salida de la prensa previo a la extracción del aceite, las semillas fueron hidratadas hasta alcanzar aproximadamente un 10% de humedad. La extracción del aceite se llevó a cabo en una prensa de tornillo helicoidal bajo las siguientes condiciones: velocidad de prensado

20 rpm, reducción (diámetro del orificio de salida) 5 mm, temperatura ambiente de prensado, rango de temperatura de salida del aceite 25 °C – 38 °C.
Posteriormente, los aceites extraídos fueron almacenados en frascos color caramelo a 5°C bajo atmósfera de nitrógeno hasta su posterior utilización.

Composición de ácidos grasos y Valor de acidez
El perfil de ácidos grasos fue determinado mediante cromatografía gaseosa (CG) utilizando un cromátografo Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama (FID detector), columna capilar DB-23 (J y W Scientific) y 175 – 220°C de temperatura (IUPAC 2.301 y 2.302, 1992). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron obtenidos por transmetilación de los triglicéridos por metanólisis alcalina y posterior esterificación de los ácidos grasos libres en medio ácido.
El valor de acidez se determinó según norma IUPAC 2.201 (1992).

Fósfolípidos
Se determinó el contenido de fósforo total, expresándolo como fosfolípidos según la siguiente relación (IRAM, 1970):

$$ppmP_{fosfolipidos} = 25{,}9 \times ppmP$$

Estabilidad oxidativa
Las muestras de aceite se sometieron a un ensayo de oxidación acelerada en un equipo Rancimat (679 Metrohm) (AOCS Cd 12b-92, 1993). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 5 g de aceite, 98°C, flujo de aire (20 l/h).

Tocoferoles
El contenido de tocoferoles en el aceite de chía fue determinado mediante una técnica cromatográfica basada en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce 8-89 (1998). Las muestras de aceite fueron disueltas en hexano para su posterior cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia (λ excitación: 290 nm, λ emisión: 330 nm). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Hewlett Packard Serie 1050, columna fase normal Lichrosob Si-60 (25 x 0,4 cm; 5 µm de tamaño de partícula) a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min y 20 µl de volumen de inyección.

Flavonoides y ácidos fenólicos
Se diluyeron 2 g de aceite en 5 ml de n-hexano y se extrajeron 3 veces con 2 ml de acetonitrilo:ácido acético 10% (50:50 v/v). El extracto fue concentrado bajo atmósfera de nitrógeno y analizado por HPLC-UV. Se utilizó una columna C18, 5µm (Vydac, 25 x 0,45 m), y un gradiente de acetonitrilo: acético 10% según: (90:10 v/v) 0 a 5 min; gradiente lineal hasta (60:40 v/v) a 15 min; y (80:20 v/v) de 16 a 18 min. Este gradiente de polaridad de la fase móvil, permitió la elución en primer lugar de los ácidos fenólicos y luego de los flavonoles. La detección se realizó por absorbancia a 255nm hasta los 5 minutos y luego a 375nm.

Análisis estadístico
Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado. Se aplicó test de Student para la comparación de medias. Se utilizó el programa informático Statgraphic Plus 4.0. Manugistics Inc., USA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los PUFA's predominaron en ambas muestras (83,7-84,8%), detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0{,}05$) para el contenido de ácido alfa-linolénico y linoleico entre los aceites provenientes de las semillas de Guatemala (66,7% de ácido alfa-linolénico y 17,5% de linoleico) y de Argentina (64,5% y 20,2%, respectivamente) (**Tabla 1**). Esto puede atribuirse a las diferencias en las condiciones ambientales de ambos lugares de cultivo, siendo la temperatura media anual en Guatemala (15,5°C) inferior a la de Argentina (17,3 °C). Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Ayerza (1995), quien encontró una correlación negativa entre el contenido de ácido alfa-linolénico y la temperatura, debido a la influencia de la misma sobre la actividad de la enzima desaturasa, responsable de la conversión de ácido linoleico a ácido alfa - linolénico.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de aceite de semillas de chía (*S. hispanica* L.) provenientes de Argentina y Guatemala, obtenido mediante prensado en frío.

Ácido graso (%)	Origen de la semilla		p
	Argentina	Guatemala	
Palmítico	3,1 ± 0,12	4,4 ± 0,95	0,203 $^{n.s.}$
Esteárico	6,6 ± 0,28	5,9 ± 0,11	0,083 $^{n.s.}$
Oleico	5,4 ± 0,37	5,5 ± 0,45	0,897 $^{n.s.}$
Linoleico	20,2 ± 0,19	17,5 ± 0,23	0,006 **
α-Linolénico	64,5 ± 0,23	66,7 ± 0,37	0,020 *

Se indica media y desvío standard de dos determinaciones y nivel de significancia (p) n.s.: no significativo; * significativo para $\alpha = 0{,}05$; ** significativo para $\alpha = 0{,}01$

El aceite extraído por prensado de las semillas provenientes de Salta (Argentina) presentó un índice de acidez significativamente mayor ($p \leq 0{,}05$) que el obtenido de las semillas de Guatemala (7,6±0,05 vs 6,0±0,03), mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el contenido de fosfolípidos.
El test de oxidación acelerada (Rancimat) exhibió valores de tiempo de inducción muy bajos (2,30 h – 2,75 h) para los aceites obtenidos de ambas procedencias, sin registrarse diferencias significativas ($p > 0{,}05$) entre ellos. Este hecho se relaciona con el elevado tenor de PUFA`s presentes en los mismos, los cuales son particularmente susceptibles a sufrir este tipo de deterioro oxidativo.
Por otra parte, fue posible determinar la presencia de γ-tocoferol, el cual resultó significativamente mayor ($p \leq 0{,}05$) en los aceites provenientes de las semillas de Guatemala. Asimismo, se observaron trazas de α y δ-tocoferol, los cuales además de incidir en la estabilidad del aceite revisten importancia desde el punto de vista nutricional y fisiológico (**Figura 1**).

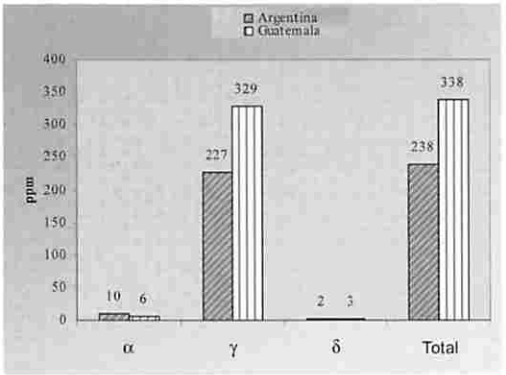


Figura 1. Tocoferoles presentes en aceite de semillas chía (*S. hispanica* L.) provenientes de Argentina y de Guatemala, obtenido mediante prensado en frío.

Los principales antioxidantes polifenólicos encontrados fueron miricetina, ácidos clorogénico y cafeico, seguido de kaempferol y trazas de quercetina (**Tabla 2**). Esta información es similar a la proporcionada por Taga y col. (1984) en semillas de chía, quienes detectaron la presencia de estos antioxidantes pero con mayores niveles de concentración (≈ 2 órdenes de magnitud superior al contenido en aceite), lo cual puede atribuirse a la naturaleza hidrofílica de estos compuestos que no favorece su solubilidad en el aceite.

En cuanto a los antioxidantes polifenólicos, se encontraron diferencias estadisticamente significativas ($p \leq 0,05$) excepto para ácido clorogénico (**Tabla 2**), siendo la concentración de miricetina mucho más elevada en el aceite de las semillas provenientes de Salta (Argentina), lo cual influye en el contenido total de este tipo de antioxidantes naturales.

Tabla 2. Composición de antioxidantes polifenólicos en aceite de semilla de chía (*S. hispanica* L.) proveniente de Argentina y Guatemala, obtenido mediante prensado en frío.

Antioxidante (mol/kg)	Origen de la semilla		p
	Argentina	Guatemala	
Ác. clorogénico	$1,7x10^{-6} \pm 1,7x10^{-7}$	$2,03x10^{-6} \pm 7,3x10^{-7}$	0,460 n.s
Ác. cafeico	$1,4x10^{-6} \pm 1,4x10^{-7}$	$2,3x10^{-6} \pm 4,9x10^{-7}$	0,001 *
Miricetina	$1,1x10^{-5} \pm 1,4x10^{-6}$	$8,0x10^{-6} \pm 1,4x10^{-6}$	0,002 *
Quercetina	n/d	$2,0x10^{-7} \pm 2,7x10^{-8}$	0,000 *
Kaempferol	n/d	$3,77x10^{-7} \pm 1,6x10^{-7}$	0,014 *
Total	$1,4x10^{-5} \pm 5,4x10^{-7}$	$1,3x10^{-5} \pm 3,2x10^{-7}$	0,015 *

Se indica media y desvío standard de tres determinaciones y nivel de significancia (p) n.s.: no significativo; * significativo para $\alpha = 0,05$; ** significativo para $\alpha = 0,01$; n/d = no detectado

CONCLUSIONES

El balance de ácidos grasos poliinsturados y sustancias antioxidantes presentes en los aceites de chía influye sobre su estabilidad oxidativa. Así, el alto tenor de PUFA's determina que los tiempos de inducción en este tipo de aceite sean muy bajos, aún con la presencia de interesantes contenidos de antioxidantes (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos).
Es necesario considerar además, que las concentraciones de estos compuestos son afectadas por las condiciones agroecológicas del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). PICT 2002-0910768 y UNLP (11/X390).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Dra. Margarita García (INIBIOLP – UNLP)
- Sres. Fernando Galli y Víctor García por la provisión de semillas de chía

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

AOAC 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA

AOCS (1998). Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists'Society, 15th Edition, *AOCS Press*, Champaing, Illinois.

Ayerza, R (h). 1995. Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica L.*) from Five Northwestern Locations in Argentina. J. Am. Oil Chem. Soc., 72: 1079-1081

Ayerza R y Coates W. 2005. Chia. Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs.University of Arizona. U.S.A.

Cuppett S., Schnepf M. y Hall C. 1997. Cap. II. Natural Antioxidants – Are they a Reality? En: Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects and Applications. F. Shahidi Editor, AOCS Press, Champaign, Illinois, U.S.A.

Duve, J.K. and White, P.Z. 1991. Extraction and identification of antioxidants in oats. J. Am. Oil Chem. Soc., 68: 365–369.

Farag, R.S., Badey, A.Z.M., Hewedi, F.M. and.El-Baroty, G.S.A. (1989). Antioxidant Activity of Some Spice Essential Oils on Linoleic Acid Oxidation in Aqueous Media. J. Am. Oil Chem. Soc., 66: 792-799.

Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (IRAM) (1970). Norma 5597/70. Aceites vegetales. Micrométodo de determinación de fósforo. Ed. IRAM.

IUPAC (1992). International Union of Pure and Applied Chemistry-Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates. 7th ed. Paquot,C. y Hautffene , A., Blackwell Scientfic Publications, Inc., Oxford

Sahagún, B. 1579. Historia general de las cosas de Nueva España (Codex Florentino). Ed. A.M. Garibay, 1989. Editorial Porrua. México City

Shukla, V., Wanasundara P. y Shahidi F. 1997. Cap. VII. Natural Antioxidants from Oilseeds. En: Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects and Applications. F. Shahidi Editor, AOCS Press, Champaign, Illinois, U.S.A.

Statgraphics Plus 4.0. Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, USA.

Taga M.S., Miller E.E., Pratt D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. J. Am. Oil. Chem. Soc., 61:928- 931

CARACTERIZACIÓN POLÍNICA Y FISICOQUÍMICA DE LAS MIELES DEL ESTADO DE TABASCO.

Josué Pascual González; Virginia Pérez Flores; Maricela Alor Chávez; Víctor Kuri; Emeterio Payro de la
Colegio de Posgraduados-Campus Tabasco
[5]Km 3.5 s/n Periférico Carlos A. Molina. Carretera Cárdenas-Huimanguillo.
H. Cárdenas, Tabasco. México. C.P. 86500
Tel y Fax: 01 (937) 37-2-23-86, e-mail: zaldivar@colpos.mx

Palabras clave: propiedades químicas, polen, miel, Tabasco

RESUMEN.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica y polínica de las mieles del estado de Tabasco. Estos corresponden a mieles de la tercera temporada de cosecha del 2006. Se encontró una gran diversidad de formas de granos de polen en las mieles que provienen de manglares y cocoteros (Región Pantanos del estado) y de la Región Sierra (Tacotalpa), encontrándose polen de mangle y de cítricos (Zona Chontalpa). Los resultados finales del proyecto serán utilizados para el diseño de las nuevas etiquetas de las mieles producidas en Tabasco, además de que servirán para clasificar las mieles en mono o multiflorales.

INTRODUCCIÓN.

La miel es un alimento natural elaborado a partir secreciones florales y extraflorales de las plantas que suele visitar la abeja *Apis mellifera*, de donde toma los elementos necesarios para su mantenimiento y el sustento de la colmena. La transformación del néctar en miel es un proceso complejo, involucra cambios físicos y químicos, como la concentración y la degradación enzimática de los azúcares, los cuales tienen lugar durante el acarreo del néctar en el estómago melario de las abejas, y después en el interior de la colmena, en celdas no operculadas de los panales (Moguel *et al.*, 2005). Se entiende por miel a la sustancia dulce natural producida por abejas obreras a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje. Se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente fructosa y glucosa. El color de la miel varía desde casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa o total o parcialmente cristalizada. El sabor y el aroma varían, pero se posee los de la planta de que procede. Las mieles varían en gran medida de una región a otra tanto en contenido polínico como en características fisicoquímicas. La melisopanología es una rama de la Palinología cuyo objetivo es estudiar el origen botánico y geográfico de las mieles, y cuya base fundamental reside en el análisis microscópico del sedimento, obtenido por centrifugación de los pólenes (Bogdanov y cols., 1997). El contenido polínico de la mayoría de las mieles florales puede verse influenciado por numerosos factores que, en un mayor o menor grado, guardan una estrecha relación con su riqueza polínica (Moguel *et al.*, 2005).

México produjo hasta 2003, un volumen de 57,045 toneladas de miel, que representan un valor de 1,208,825 miles de pesos (INEGI,2004a) aportando el estado de Tabasco 203 toneladas (INEGI, 2004b). Las 203 toneladas producidas en el estado tienen un valor de 6,641 miles de pesos y se producen principalmente en las zonas de la Chontalpa, La Sierra, Los Ríos y La Sabana; siendo los principales municipios productores de miel Balancan, Huimanguillo, Tacotalpa y Tenosique (Anuario Estadístico Tabasco, 2004). En México, los conocimientos sobre el origen botánico de las mieles están basados exclusivamente en observaciones apibotánicas, en el momento en que las abejas están pecoreando para colectar el néctar y/o los granos de polen, éste método empírico dificulta mucho la validación de que alguna miel pueda provenir de una planta o cultivo específico. El método más confiable para distinguir qué plantas están siendo sólo visitadas por las abejas, de aquellas que están siendo realmente explotadas como fuentes de néctar y polen de una manera significativa, es mediante el análisis melisopalinológico (Anónimo, 1999). En el caso de las mieles mexicanas, la mayoría de las especies de plantas de las cuales las abejas extraen el néctar son plantas nativas poco conocidas: no obstante, por medio del estudio del contenido de polen en estas mieles se pueden hacer contribuciones importantes al conocimiento de las fuentes de néctar, para caracterizar y clasificar la diversidad de las mismas (Reyes y Cervantes, 1991).

Tabasco un estado del sureste mexicano con clima calido húmedo, dispone de una amplia vegetación y variada flora optima para el desarrollo de la apicultura donde los productores desconocen o si bien tiene idea de la procedencia botánica de sus mieles, ésta no puede ser validada como multifloral o monoflorales además de no saber la procedencia floral en especifico por falta de los análisis melisopalinológicos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue el de caracterizar fisicoquímica y polínicamente la miel producida en diferentes ecosistemas del estado de Tabasco, representativos de las regiones fisiográficas que conforman la entidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 30 muestras de miel de cada región del estado de Tabasco durante la primera temporada de cosecha y se analizaron con base en la determinación de los siguientes factores:

Caracterización fisicoquímica: se determinaron a las muestras el pH, contenido de humedad, conductividad eléctrica y sólidos insolubles en agua (SI), de acuerdo a las técnicas analíticas propuestas por la Comisión Europea de la Miel (CEM) (Bogdanov y cols., 1997).

Georreferenciación de los sitios de colecta: se georreferenciaron los sitios de colecta con ayuda de un GPS (Modelo *e*trex, Marca GARMIN).

Abundancia de los recursos florales: La abundancia se estimó en una escala subjetiva como muy abundante (donde se incluyeron cultivos agrícolas), abundante y escasa. Adicionalmente, durante las épocas de máxima producción de miel, se recolectaron plantas en floración en cuyo procesamiento se utilizó una prensa botánica para procesar por lo menos seis muestras de flor, tallo, hojas, frutos y semillas de cada especie de referencia; dichas muestras se prensaron con cartón y periódico hasta lograr su deshidratación y su posterior identificación. De cada muestra se registró localización, hábitat, tamaño de la planta, nombre común, color de flor, color de fruto, número de muestra, nombre del recolector y fecha (La Serna y col., 1997).

Épocas de cosecha: Con base a una encuesta a productores se conocieron las diferentes épocas de muestreo y los volúmenes de cosecha.

Contenido polínico: se realizó en muestras de miel maduras. La cantidad absoluta de polen en 10 g de muestra se analizó según Moar (1985). Los conteos palinológicos se realizaron con microscopía óptica de 400X, usando objetivos de 1000x y contraste de interferencia cuando resultó necesario para la identificación de los tipos polínicos, el microscopio tenía acoplado una cámara digital HPPhotosmart R927 para la captura de fotografías de los gránulos de polen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Sitios de colecta.

Se seleccionaron los municipios de Tacotalpa, Paraíso, Frontera, Centro, Huimanguillo y Cárdenas. Los municipios fueron seleccionados con base a las características de clima, vegetación y orografía de las zonas donde se encuentran ubicados.

Colecta de muestras.

Se colectaron 30 muestras por municipio, las cuales fueron debidamente etiquetadas y clasificadas según los datos reportados por los productores (Cuadro 1). Las muestras fueron colectadas en frascos de plástico de 1000 ml, almacenadas en el laboratorio

hasta su posterior análisis y corresponden a la tercera cosecha del año (meses de agosto-noviembre del 2006).

Cuadro 1. Municipios, productores y tipos de miel según los productores.

LOCALIDAD	MUNICIPIO	TIPO DE MIEL
Estación Chontalpa	Huimanguillo	Cítricos
Ra. La Unión	Centla	Mangle y Coco
Yajalón, Río Seco	Tacotalpa	Multiflora
Ampliación Pueblo Nuevo	Tacotalpa	Multiflora
Km. 21	Cárdenas	Cacao y Coco
Guayal	Tacotalpa	Multiflora
Oxolotlan	Tacotalpa	Árnica
ISPROTAB	Tacotalpa	Multiflora
ISPROTAB	Paraíso	Mangle
ISPROTAB	Huimanguillo	Cítricos

Análisis de las muestras.

Se determinaron los °Brix, pH, y conductividad de las diferentes muestras (Datos no mostrados). La humedad en la miel es utilizada como un indicador de madurez y capacidad de permanecer estable durante el almacenamiento (Moguel, *et al.*, 2005). Además se ha encontrado que mieles obtenidas durante períodos de altas precipitaciones (época de lluvias) presentan un mayor contenido de humedad que las mieles producidas durante épocas de bajas precipitaciones (sequía) y que mieles cosechadas cuando los panales tiene cerca del 50% de panales operculados presentan alto contenido de humedad, de allí que probablemente el alto porcentaje de humedad encontrado en las mieles de Centla pudiera deberse a estos factores.

Análisis Polínico de las mieles.

El polen presente en las muestras de mieles de las diferentes regiones del estado de Tabasco sin acetolizar y el polen de referencia fueron observados bajo un microscopio LW Scientific Modelo Serie Labscope y fotografiados con una cámara digital HPPhotosmart R927 (Fig. 1). Además se ha cuantificado el número de granos de polen presente en las muestras de mieles (Datos no mostrados).

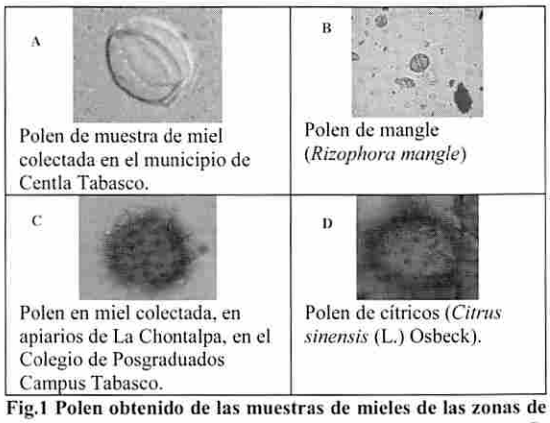


Fig.1 Polen obtenido de las muestras de mieles de las zonas de Pantanos (Centla) y La Chontalpa (Cárdenas). Panel A y C: Polen de muestras de mieles. Panel B: Polen de referencia.

CONCLUSIONES.

Los resultados encontrados hasta ahora indican que en las mieles de las zonas de La Chontalpa y la zona de Pantanos se encuentra presente polen de cítricos y mangle respectivamente (Cuadro:2). Aunque no se muestran los resultados, también se ha obtenido polen de coco en la zona de La Chontalpa y otros tipos de polen que falta identificar.

AGRADECIMIENTOS.

La Fundación Produce Tabasco, A.C financió este trabajo a través del proyecto FP06-01 "Clasificación del tipo de miel por floración, región y época del año en el estado de Tabasco". Los autores agradecen la ayuda prestada para la colecta de las muestras a los productores cooperantes Adán Broca Quevedo; Isaac Torres Luciano; Fernando Martínez Gómez; Margarita Ameca Manzanillo, ISPROTAB y Colegio de Posgraduados Campus Tabasco.

REFERENCIAS.

1. Anónimo. 1990. Estudio para calificar la calidad de las mieles mexicanas de abeja (su relación con la Norma Regional Europea) Colegio de Postgraduados. Chapingo, Estado de México. 84 pp.
2. Bogdanov, S.; Martin, P and Lullman, C. (1997). Harmonized Methods of the European Honey Comission. ***Apidollogie. Extra issue***. 1:59.
3. INEGI (2004) Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. pp. 343.
4. INEGI (2004) El Sector Alimentario en México. pp. 75.
5. INEGI (2004). Anuario Estadístico Tabasco. pp. 335-336.
6. La-Serna R., B. Méndez P., y C. Gómez F. 1997. Aplicación de nuevas tecnologías en mieles canarias para su tipificación y control de calidad. Producciones Gráficas. Madrid, España. 272 pp.
7. Moguel, Y.; Echazarreta, C. y Mora, R. (2005). Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. ***Tec. Pecu. Mex***. 43(3):323-334.
8. Reyes L., D. y T. Cervantes S. (1991). La flora apícola y su efecto sobre el desarrollo de la colmena en el área de Chapingo, México. ***Agrociencia*** 2:4:21-36.

EFECTO DEL SOLVENTE SOBRE LA SOLUBILIDAD DE LOS AZÚCARES XILOSA, GLUCOSA Y XILITOL

MARTINEZ, ERNESTO A. [1]; CANILHA, LARISSA[1]; ALVES, LOURDES A.[1]; ALMEIDA e SILVA, JOÃO B.[2]; GIULIETTI, MARCO[1,3]

[1]Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Divisão Química, CP 0141, CEP 01064-970, São Paulo – SP, Brasil

[2]Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, CP 116, CEP 12602-810, Lorena – SP, Brasil

[3]Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

ernesto.amartinez@yahoo.com.br; joaobatista@debiq.eel.usp.

Palabras claves: propiedades quimica, xilosa, xilitol, glucosa, solubilidad.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del solvente en la variación de la solubilidad de los azúcares xilosa, glucosa y xilitol en función de la temperatura, para posteriores estudios de cristalización. Los ensayos de solubilidad fueron realizados en reactor de 100 mL equipado con un termostato para el control de la temperatura. Se utilizou agua y agua-etanol (50-50 % p/p) como solventes, azúcares grado analítico y temperaturas variando entre 0 y 60 °C. Como resultado, fue constatado un aumento de la solubilidad de los azúcares en función del aumento de la temperatura y, también se observo que el uso de la mezcla agua-etanol como solvente produjo una disminución de la solubilidade de los azúcares, pudiendo facilitar la etapa de cristalización.

INTRODUCCIÓN

La xilosa ($C_5O_5H_{10}$) es fácilmente encontrada en la fracción hemicelulósica de las plantas, maderas, cascara de maíz, granos de café y en pajas, como de trigo y arroz. Esta pentosa no es metabolizada por el hombre, siendo principalmente eliminada por la orina, lo que permite su uso en el estudo de la adsorción de los carbohidratos (MERCK,1989). Puede ser utilizada como endulzante para diabéticos y, por ser anti-cariogénica, también puede ser utilizada en pastas dentales (AGUIRRE-ZERO *et al.*, 1993). La xilosa puede ser usada como substrato en las producciones de etanol, xilitol, ácidos acético y láctico, polímeros de plásticos biodegradables, resinas y levaduras cerveceras, entre outras (MUNDAY, 2003).

Existen dos vías para la obtención de xilosa: 1) extracción sólido-líquido de frutas y vegetales, 2) Separación de la fracción hemicelulósica en monosacaridos de los materiales lignocelulósicos. Dentro de este último método se encontran: hidrólisis ácida (MUSSATTO, ROBERTO, 2004), enzimática (BISARIA, GHOSE, 1981; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005), explosión a vapor (SUN *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2005) y extracción con soluciones alcalinas (du TOIT, 1984).

La D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$) es el azúcar encontrado en la sangue y constituye nuestra fuente primaria de energia. Sus diversas aplicaciones dependen de su baja velocidad de cristalización, del menor poder endulzante y de la formación de cristales diferentes. Es consumida por la indústria confiteira para prevenir la cristalización y tiene usos adicionales en la preservación de los alimentos, en los refrescos, confituras y helados. Es ampliamente empleada por médicos para la alimentación infantil y recetada en forma de siropes. Esta hexosa también es usada en el curtido de pieles, en el condicionamiento de tabacos y en la fermentación (SHREVE, BRINK Jr, 1977). Por ser una substancia no cristalizante es usada como auxiliar en la confección de chicles y chocolates (VANHEMELRIJK, HEUME, 1995).

El xilitol ($C_5O_5H_{12}$), alcohol pentahidroxilado de la xilosa, cuando es consumido en forma sólida o cristalina produce una sensación de frescor debido a su calor de solución negativo (-34,8 cal/g). Es metabolizado independientemente de la insulina y no causa fluctuaciones súbitas en los niveles de glucose en sangre. Es un azúcar no-cariogénico, pues no es metabolizado por microorganismos presentes en la flora bocal, como por ejemplo, *Streptococcus mutans*. Además, es capaz de inhibir el desarrollo de caries existentes, disminuir la gengivite y controlar el halito (EMODI, 1978 NOTHENBERG, 1994).

El xilitol puede ser producido por la extracción sólido-liquido de frutas y vegetales, y a partir de la D-xilosa obtenida por hidrólisis de materiales lignocelulósicos (MELAJA, HÄMÄLÄINEN, 1977). En el segundo caso se pueden emplear dos métodos: síntesis química, a través de la hidrogenación catalítica o reducción eletrolítica, y biosíntesis, empleando levaduras o bactérias fermentadoras de pentosas o enzimas como catalisadores del proceso de reducción (OJAMO *et al.*, 1988; PARAJÒ *et al.*, 1998; MIKKOLA, 1999).

Estas propiedades tornan estos azúcares productos de gran interés económico para las indústrias alimenticias, farmacéuticas, quimicas y odontológicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del solvente en la variación de la solubilidad de estos azúcares en función de la temperatura, visando posteriores estudios de cristalización.

MATERIALES E MÉTODOS:

Fueron utilizados xilosa (Sigma), glucosa (Sigma) y xilitol (Danisco) grado analítico, etanol 99,7 % de pureza y agua desionizada. Los ensayos de solubilidad fueron realizados en un cristalizador de escala de laboratório con 100 mL de volumen útil, enchaquetado, con agitador tipo hélice, ambos construídos en vidrio de borossilicato (Figura 1). El cristalizador tiene dos entradas: para alimentação y para medición de la temperatura. Las soluciones de los azúcares en agua y en agua-etanol (50-50% p/p) fueron agitadas a 450 rpm en la misma temperatura durante 72 horas. La temperatura fue controlada con un baño termostático tipo Julabo HP, Alemania.

La solubilidad da xilosa fue determinada mediante la determinación de su concentración en agua y en agua-etanol, después de alcanzado el equilibrio, en cada temperatura por HPLC (MARTINEZ *et al.*, 2007). La solubilidad de la glucosa y del xilitol fue determinada a través de la lectura del índice de refración de las soluciones en equilibrio en cada temperatura, la cual fue relacionada con el índice de refracción de las soluciones con concentraciones conocidas de glucosa y de xilitol en agua y en agua-etanol (50-50 % p/p). Las lecturas del índice de refracción fueron realizadas en refractómetro IR40, Mettler Toledo.

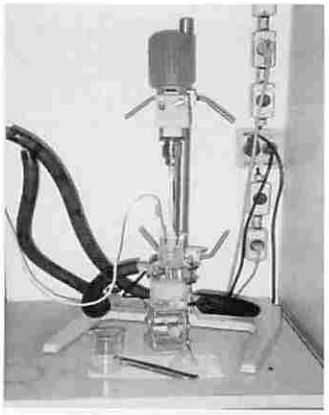


Figura 1. Sistema utilizado en el estudio de solubilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 2 y 3 presentan las curvas de solubilidad de xilosa en agua (ag) y en agua-etanol (ag-et) (50-50 % p/p) las cuales pueden ser descritas por las siguientes ecuaciones:

$$\%xilosa(ag)=0,0035*T^2+0,4434*T+50,298 \quad R^2 = 0,9758$$
$$\%xilosa(ag\text{-}et) = 0,0061*T^2 + 0,7603*T + 18,233 \quad R^2 = 0,9822$$

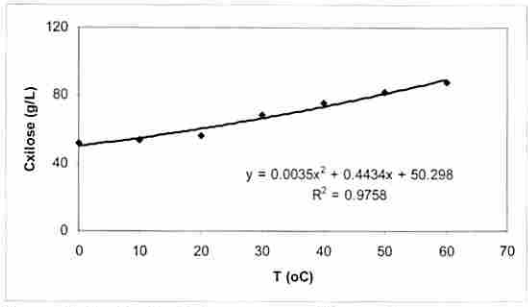


Figura 2. Variación de la concentración de xilosa en agua en función de la temperatura.

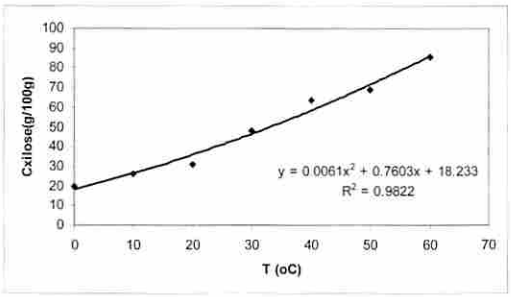


Figura 3. Variación de la concentración de xilosa en mezclas agua–etanol (50-50 % p/p) en función de la temperatura.

Como puede ser constatado, la solubilidad de la pentosa aumenta con el incremento de la temperatura. Resultados similares fueron reportados por JÓNSDÓTITIR *et al.* (2002). La solubilidad de la xilosa disminuye con el uso de etanol en la mezcla de solventes.

GABAS *et al.* (1988) observaron una disminución de la solubilidad de la xilosa con el aumento de la concentración de etanol en la mezcla de solventes agua-etanol desde 0 hasta 100 %. Estos autores reportaron valores de solubilidad de 55.04 y 24.87 gramos de xilosa por 100 gramos de solución en agua y agua-etanol, respectivamente.

Las Figuras 4 y 5 presentan los valores de índice de refracción (IR) correspondientes a las soluciones de xilitol y glucosa en agua y en agua-etanol, respectivamente. Se observa que la concentración masica de xilitol y el IR están correlacionados a través de polinómios de segundo y tercer grado, respectivamente:

$$\%xilitol(ag)=-552,85*IR^2+2123,2*IR-1843,3 \quad R^2 = 0,9997$$
$$\%xilitol(ag\text{-}et)=-9864,3*IR^3+39516*IR^2-51943*IR+22378 \quad R^2 = 0,9994$$

La correlación entre la concentración masica de glucosa y el IR están determinadas por polinomios de segundo y tercer grado, respectivamente:

$$\%glucosa(ag)= -747,03*IR^2+2616,8*IR-2156,2 \quad R^2=0,9996$$

$$\%glucosa(ag\text{-}et)= -64373*IR^3+268811*IR^2- 73394*IR+172558 \quad R^2=0,9996$$

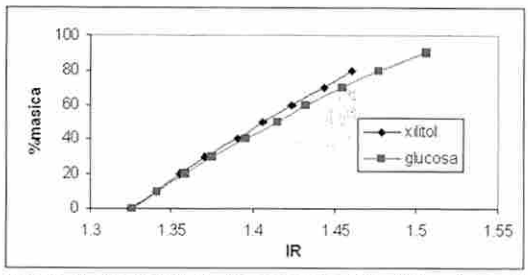


Figura 4. Variación de la concentración (%) másica de xilitol y glucosa en agua en función del índice de refracción (IR) a 60 °C.

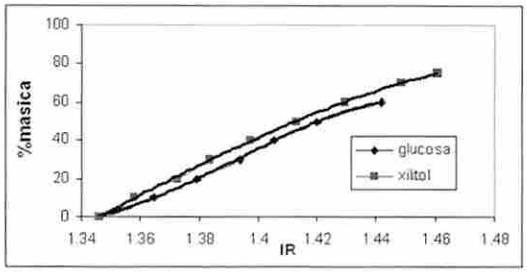


Figura 5. Variación de la concentración (%) másica de glucosa y xilitol en soluciones agua-etanol (50-50 % p/p) en función del índice de refración (IR) a 60 °C.

En la Figura 6 se presentan las curvas de solubilidad de glucosa y xilitol en función de la temperatura. Se observa que la solubilidad del xilitol en agua puede ser representada por un polinómio de segundo grado (1) con un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,9866. Por otro lado, la solubilidad del xilitol en agua-etanol puede ser correlacionada mediante un polinómio de tercer orden con un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,9996 (2). La solubilidad de la glucosa en agua aumenta de forma lineal con el aumento de la temperatura con un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,991 (3). Por outro lado, la solubilidad de la hexosa en agua-etanol puede ser correlacionada com un polinomio de segundo grado y R^2=0.991 (4):

$$\%xilitol=-0,0035*T^2+0,8126*T+45,857 \quad (1)$$
$$\%xilitol=-0,0005*T^3+0,0443*T^2-0,0109*T+21,006 \quad (2)$$
$$\%glucosa=0,6683*T+33,826 \quad (3)$$
$$\%glucosa=0.0103*T^2+0.3858*T+2.7845 \quad (4)$$

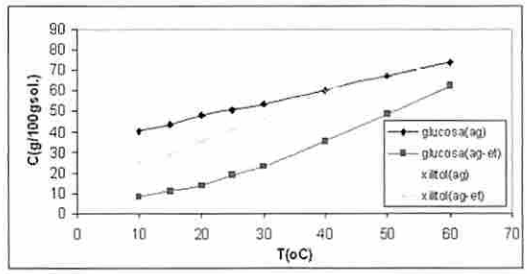


Figura 6. Solubilidad de glucosa y xilitol en agua (♦,) y en agua-etanol (■,), respectivamente en función de la temperatura.

Los valores de solubilidad obtenidos para el xilitol son similares a los reportados en la literatura (ULLMANN´S, 1988 VYGLAZOV, KHOL´KIN, 1984; ALFONS-APEL *et al.*, 1984). Las diferencias de solubilidad pueden ser atribuidas, entre otros factores, a la calidad de la materia prima utilizada así como a los métodos empleados en la determinación de sus propiedades.

CONCLUSIONES

La solubilidad de los azúcares aumenta en función de la temperatura. El uso de etanol produjo una disminución de la solubilidad de los azúcares con la temperatura. Los resultados obtenidos sirven como herramienta para posteriores estudios cinéticos de cristalización y para la cristalización de xilosa y glucosa obtenidos por hidrólisis de materiales hemicelulósicos y del xilitol producido por via fermentativa.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo financiero de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

BIBLIOGRAFIA

AGUIRRE-ZERO, D., ZERO, D.T., PROSKIN, H. M. 1993. Effect of chewing xylitol chewing gum on flow rate and the acidogenic potential of dental plaque. *Caries Research*, Basel, h. 27: 55-59.

ALFONS APEL, M-R., GEORG ROSSIER, M-K. 1959. Preparation of stable polyol solutions and the resulting product. *US Patent Office 2,917,390*. Dec. 15.

BISARIA, V. S., GHOSE, T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzyme and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v.3, p.90-104.

du TOIT, P. T., OLIVIER, S. P., van BILTON, P. L. 1984. Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates. I. Characterization of Bagasse with Regard to Monosaccharide. Hemicellulose and Amino Acid Composition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p.1071-1078.

EMODI, A. 1978. Xylitol its properties and food applications. Food Technology, jan:28-32.

GABAS, N., CARILLON, T., HIQUILY, N. 1988. Solubilities of D-xylose and D-mannose in water-ethanol mixtures at 25 °C. *Journal Chemical Engineering Data*, v.33, p.128-130.

JÓNSDÓTITIR, S. O., COOKE, S. A., MACEDO, E. A. 2002. Modeling and measurements of solid-liquid and vapor-liquid equilibria of polyols and carbohydrates in aqueous solution. *Carbohydrate Research,* v.337, p.1563-1571.

MARTINEZ, E. A. 2005. *Estudo do processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa.* FAENQUIL-DEBIQ, Lorena-SP 2005. 175p. (Tese de Doutorado).

MARTÍNEZ, E. A, ALMEIDA E SILVA, J. B., GIULIETTI, M., SOLENZAL, A. I. N. 2007. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. *Enzyme Microbial Technology*, 40: 1185-1189.

MELAJA, A. J., HÄMÄLÄINEN, L. 1977. Process for making xylitol. *US Patent 4.008.285.* Dep. 18/6/75. Publ. 15/02/77.

MERCK. 1989. *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs ana Biological.* Centennial Edition. Merck & Co. Inc. Rahway, N.Y.

MIKOLLA, J-P. 1999. *Hydrogenation of xylose to xylitol over Raney-Nickel catalyst- towards na improved production technology.* Faculty of Chemical Engineering, Abo Akademi.

MUNDAY, J. C. 2003. News about glyconutrition, general nutrition, and related health issues. Xylose-An Essential Nutrient. *Sweet Nutrition News*, 1 July, (4).

MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I. C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocelluloisc hydrolysates for use in fermentative process: a review. *Bioresourse technology*, 93, p.1-10.

NOTHENBERG, M. 1994. Polióis adoçam a boca e amarguram o bolso. *Química e Derivados*, Setembro.

OJAMO , H., YLINEN, L., LINKO, M. 1988. Process for the preparation of xylitol from xylose by cultaving *Candida guilliermondii. US Patent WO 88/05467.*

PARAJÒ PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J. M.1998. Biotechnological Production of Xylitol. Part 1: Interest of Xylitol and Fundamentals of its Biosynthesis. *Bioresourse Technology*, vol.65, p.191-201.

SHREVE, R.N., BRINK JR, J. A. 1977. *Indústrias de Processos Químicos*. Rio de janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 4ª ed.

SUN, J. X., SUN, X. F., ZHAO, H., SUN, R. C. 2004. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, v.84, p.331-339.

SUN, X. F., XU, F., SUN, R. C., FOWLER, P., BAIRD, M. S. 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Research*, v.340, p.97-106.

ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY, Sixth Edition. 1998. *SUGAR ALCOHOLS-Xylitol.* Electronic Release.

VANHEMELRIJK, , J., HEUME, M. 1995. Using Starch in Tabletting. *Agro Food Industry Hi-Tech*, v.6 (5), p.9-10.

VYGLAZOV, V. V., KHOL'KIN, Y. I. 1984. Solubility in the system xylitol-ethanol-water and certain properties of saturated solutions. Zhurnal Prikladnoi Khimi, 57(7):1651-1654.

CONTENIDO DE POLIFENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN BEBIDAS E INFUSIONES ELABORADAS EN ARGENTINA

Alvarez Alejandro, Manfredi Paola, Jorrat Sergio y Genta María
Dpto. de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial – Fac. de Ciencias Exactas y Tecnología – Universidad Nacional de Tucumán- Avda. Roca 1800 – Tucumán (4000)- Argentina- email: aalvarez@herrera.unt.edu.ar

Palabras clave: propiedades químicas, polifenoles, actividad antioxidante, bebidas e infusiones.

RESUMEN

Está ampliamente demostrado que bebidas e infusiones con elevado contenido en polifenoles pueden ser potencialmente beneficiosas para la salud humana, al ayudar a prevenir las enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y a retrasar el envejecimiento celular. La actividad antioxidante de estos compuestos sería la responsable de estas propiedades atribuidas a los polifenoles. El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de polifenoles totales en bebidas e infusiones elaboradas en Argentina, evaluar su actividad antioxidante y establecer una correlación entre ambas variables.
Se analizaron nueve muestras de vinos tintos varietales, seis muestras de té negro, cuatro muestras de té verde, y seis muestras de yerba mate, *Ilex paraguarienses*, (la yerba mate es una infusión muy empleada en Argentina, Paraguay y Uruguay), disponibles en el comercio en Argentina. La determinación de polifenoles totales fue realizada empleando el reactivo de Folin Ciocalteu. Para la medición de la actividad antioxidante se empleó el método del DPPH. Se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias estadísticas entre los valores determinados. Los resultados obtenidos muestran que el mayor contenido de polifenoles se observó en las muestras de vino (en primer lugar la cepa Syrah, seguido del Cabernet Saouvignon y por último el Malbec), seguido por la yerba mate, el té negro y el té verde. El contenido de polifenoles totales en vinos fue superior en un 30%, en té negro un 20% y en té verde un 20% a los valores publicados por Lee y col., empleando los mismos métodos analíticos. También se obtuvo un elevado coeficiente de correlación entre la actividad antioxidante de las muestras y el contenido de polifenoles totales. Puede concluirse que el vino tinto, seguido por la yerba mate serían las bebidas mas beneficiosas para la salud por su elevado contenido de polifenoles.

INTRODUCCIÓN

En la bibliografía se ha reportado una gran cantidad de trabajos que demuestran que la oxidación de moléculas biológicas, membranas celulares y tejidos, catalizada por radicales libres, está relacionada con un aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Hertog y col.), algunos tipos de cánceres, (Block y col.) y también el proceso de envejecimiento (Havsteen).
Algunos compuestos presentes naturalmente en alimentos y bebidas, como los polifenoles, tienen la capacidad de neutralizar a los radicales libres y reducir el stress oxidativo, y por lo tanto, ayudan a reducir el riesgo de las enfermedades antes mencionadas (Hertog y col.).
El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de polifenoles en bebidas (vinos varietales) e infusiones (té negro, té verde y yerba mate) elaboradas en Argentina, comparar con los valores publicados en la bibliografía, evaluar su capacidad antioxidante y verificar si puede establecerse una correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles de las mismas.

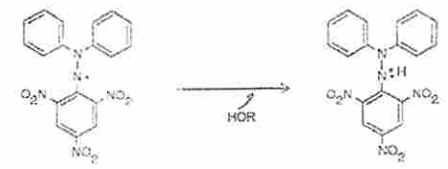
MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras
Se analizaron 9 muestras de vinos tintos elaborados en el Valle de Cafayate (Salta, Argentina), tres correspondientes a cada una de las siguientes cepas varietales: Cabernet Saugivnon, Malbec y Syrah.
También se analizaron seis muestras comerciales de té negro envasados en sacos de 2 g cada uno, cuatro muestras comerciales de té verde en sacos de 2 g cada uno y seis muestras comerciales de yerba mate (*Ilex paraguarienses*) envasado en sacos de 3 g cada uno, elaborados en Misiones (Argentina). El té y la yerba mate fueron preparados con 200 ml de agua a 100° C, dejando los sacos en su interior durante 5 minutos, tal como indican los fabricantes para su preparación.

Equipamiento analítico
Espectrofotómetro UV-Vis marca Metrolab 250, con cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico.

Reactivos
Se emplearon carbonato de sodio anhidro p.a. marca Merck, reactivo de Folin marca Merck, ácido gálico p.a. marca Merck, 2,2- difenil-1- picril hidrazil (DPPH) marca Sigma, metanol p.a. marca Merck.

Técnicas analíticas
La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu, que tiene la capacidad de reaccionar con grupos oxhidrilos unidos a un anillo bencénico, y originar una complejo de color azul que puede ser medido espectrofotométricamente a 765 nm. Alícuotas de 0,1 mL de cada una de las muestras fueron pipeteadas en un matraz de 25 ml, agregando 1 ml del reactivo de Folin y 4 ml de solución de carbonato de sodio al 15%, enrasando con agua destilada. Las muestras fueron calentadas durante 5 minutos en baño termostatizado a 50 °C, enfriadas a 20 °C durante 25 minutos, y se leyó la absorbancia a 765 nm, contra un blanco preparado con los mismos reactivos. La calibración fue realizada con soluciones de ácido gálico de 2, 4, 6, 8 y 10 mg.L-1, que fueron tratadas en las mismas condiciones que las muestras. El contenido de polifenoles totales de las muestras analizadas fue expresado en términos de ácido gálico equivalente.
La actividad antioxidante fue determinada empleando el radical estable DPPH (2,2 difenil -1-picril hidrazil), cuya decoloración fue seguida en forma espectrofotométrica midiendo la absorbancia a 517 nm.



2,2 Difenil - 1 - picrilhidrazil (DPPH) Violeta

(DPPH) H naranja pálido

En una cubeta se agregaron 0.4 mL de una solución metanólica de DPPH 0,05 M, 2.5 ml de metanol. Se midió la absorbancia inicial Ao y luego se agregó alícuotas de 0.1 ml de cada una de las bebidas e infusiones analizadas, y se determinó la absorbancia al cabo de 30 minutos A1,

antioxidante se expresó como la reducción porcentual de absorbancia de las muestras, es decir:

$$AAO = 100.(1- A1/Ao)$$

Para el análisis estadísticos de los resultados se empleó el software Minitab. Se realizó un análisis de varianza para evaluar si los resultados obtenidos eran estadísticamente diferentes, y se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey. Se correlacionaron en forma lineal las variables polifenoles totales y actividad antioxidante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1muestra el valor medio del contenido de polifenoles y la desviación estándar, expresados en $mg.L^{-1}$ de ácido gálico equivalente, para las distintas bebidas e infusiones analizadas.

Tabla 1: contenido de polifenoles totales y sus desviación estándar.

Bebida	Polifenoles totales ($mg.L^{-1}$)	Desviación estándar ($mg.L^{-1}$)
Té negro	806	66
Té Verde	1185	110
Yerba Mate	1578	57
Vino Malbec	2363	180
Vino Cabernet	2756	61
Vino Syrah	2944	200

El análisis de varianza indica que los resultados son significativamente diferentes ($p<0.05$).

La tabla 2 muestra la actividad antioxidante expresada en forma porcentual y la desviación estándar respectiva, para las distintas bebidas analizadas.

Tabla 2: actividad antioxidante y su desviación estándar.

Bebida	Acitividad Antioxidante en %	Desviación estándar (%)
Té negro	51,5	2,9
Té Verde	58,7	3,3
Yerba Mate	61,4	2,5
Vino Malbec	75,6	3,9
Vino Cabernet	79,3	4,1
Vino Syrah	86,5	5,8

El gráfico 1 correlaciona la actividad antioxidante con el contenido de polifenoles totales. El elevado coeficiente de correlación (0,98) indicaría que la actividad antioxidante estaría directamente relacionada con el contenido de polifenoles totales en las bebidas e infusiones analizadas.

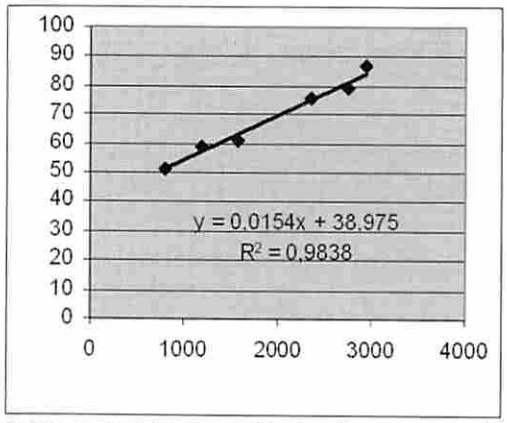


Gráfico 1: Actividad antioxidante (%) versus contenido de polifenoles totales ($(mg.L^{-1})$)

El contenido de polifenoles encontrado en las bebidas e infusiones elaborados en Argentina fueron superiores a los publicados en la bibliografía por Lee y col. para bebidas e infusiones encontrados en el comercio en Estados Unidos, 30% en el caso del té negro, 42% para el té verde, y 22% para el caso del vino.

CONCLUSIONES

Puede concluirse que el vino tinto, seguido por la yerba mate serían las bebidas potencialmente mas beneficiosas para la salud, desde el punto de vista de su capacidad antioxidante, por su elevado contenido de polifenoles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán por la financiación otorgada a este Proyecto de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Block G., Patterson B. Subar A. (1992) "Fruit, Vegetables, and Cáncer prevention: A review of the epidemiological evidence. Nutr. Cáncer 18:1-29.

Havsteen B.H. 2002, The biochemistry and medical significance of the flavonoids Pharmacology & Therapeutics 96, 67-202.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993 Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet. 342:1007-1011.

James C. S. (1995) Analytical Chemistry of Foods 1era. Edición, Chapinan S. Hall, London.

Lee K W, Kim Y.J., Lee H.J.; Lee C.Y. (2003) Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine J. Agric. Food Chem., 7292-7295.

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIASTÁSICA DE MALTA Y DE JORA SOBRE EL ALMIDÓN DE MOROCHO (*Zea mays*, variedad Morochón)

Navas Miño, Gladys; Del Pozo, Freddy. Valencia, Alex. y Alvarado, Juan de Dios.
Universidad Técnica de Ambato. Centro de Investigaciones.
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
Av. Los Shyris. Campus Huachi, Ambato-Ecuador
Casilla 18-01-334. email: glacenam@hotmail.com
PROYECTO: UTA-CENI

Palabras clave: propiedades bioquímicas, cinética, sacarificación, malta, jora, maíz.

RESUMEN

Varias industrias de alimentos como las panificadoras y las cerveceras, utilizan como fuente de enzimas crudas a granos de cereales germinados, secos y molidos, así la cebada conocida como malta y el maíz conocido como jora. El propósito del trabajo fue determinar constantes cinético enzimáticas de mezclas nativas de enzimas, provenientes de malta y jora, sobre un sustrato de almidón de morocho, como indicadores de su afinidad en búsqueda de una mejor utilización para la obtención de azúcares fermentables.

Se utilizó un diseño AxBxC con una réplica, siendo las variables el tipo de grano germinado con 2 niveles, la concentración de la harina como fuente de enzimas con 3 niveles y la temperatura con 2 niveles. Las respuestas experimentales analizadas fueron, la velocidad de reacción máxima y la constante de Michaelis-Menten.

La mayor afinidad por el sustrato, representada por el valor mínimo de K_m, se presentó en la mezcla de amilasas proveniente de jora, lo cual es plenamente explicable debido a que, sustrato y coctel enzimático provienen de la misma fito-especie.

El enfoque de cinética enzimática posibilita diferenciar la actividad de mezclas naturales como la malta y la jora, es una herramienta para diferenciar su afinidad con el sustrato y posibilita seleccionar condiciones adecuadas de trabajo en industrias que las utilizan.

INTRODUCCIÓN

La enzima diastasa se encuentra en algunos mohos y se forma abundantemente en las semillas en curso de germinación. (Reventós, 1962)

Las enzimas son macro catalizadores biológicos de secuencia primaria única y precisa agrupación tridimensional, que están constituidas por polímeros lineales condensados de α-aminoácidos. En cierto modo, las enzimas son catalizadores ideales, debido a su alta especificidad, alta eficiencia en la conversión sustrato-producto y elevada actividad en condiciones ambientales moderadas. Además, las enzimas muestran un comportamiento de un catalizador reciclable, por ende, la secuencia de reacción que lo justifica, es la siguiente:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\longleftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

donde E es enzima, S es sustrato, ES es el complejo enzima-sustrato y P es producto.

La primera fase de la reacción enzimática es considerada como reversible con una constante de reacción k_1 y una constante inversa k_{-1}. La segunda fase, esta definida por una reacción irreversible para la descomposición del complejo enzima sustrato, la cual muestra una constante de reacción k_2. Para la mayoría de reacciones enzimáticas, la concentración de la enzima es considerablemente inferior en comparación con la concentración del sustrato, esto se debe a la gran actividad catalítica que estas poseen. Entonces, a medida de que la reacción enzimática progresa, su velocidad decrece gradualmente debido al consumo de sustrato, y es debido a esto, que es necesario calcular la velocidad inicial de la reacción por medio del cómputo de la tangente de la curva de avance de reacción a tiempo cero.

La cinética de enzimas es representada por la ecuación de Michaleis-Menten, la cual muestra una naturaleza hiperbólica:

$$v = \frac{v_{max} S}{K_m + S}$$

donde v es la velocidad volumétrica de reacción, v_{max} la velocidad máxima de reacción a concentración infinita de reactante, K_m la constante de Michaelis-Menten y S la concentración de sustrato. Al graficar v versus S se muestra claramente la sección de una hipérbola de una sola rama, con asíntota horizontal equivalente a v_{max}. Las dimensiones de v_{max} son [concentración tiempo^{-1}]. La velocidad máxima de reacción se obtiene cuando toda la enzima es enlazada con el complejo enzima-sustrato, esto es, cuando la enzima fue saturada con el sustrato ($S >>> K_m$) , por ende, para el calculo de v_{max} no es necesario tener conocimiento sobre la concentración de la enzima.

La constante de Michaelis-Menten, dimensiones [concentración], en el grafico v versus S el valor de esta constante puede ser obtenida cuando $v_o = v_{max}/2$. Entonces, para el mecanismo propuesto por Michaelis-Menten, K_m es equivalente a la constante de disociación del complejo enzima sustrato. Debido a que la ecuación de Michaelis-Menten es un segmento de una hipérbola, la cual muestra cinética de saturación, es difícil determinar los parámetros cinético enzimáticos a través del análisis de dicho grafico con precisión, por lo cual es necesario realizar una transformación lineal, la cual proporcionara una medio más efectivo y preciso para evaluar los parámetros de Michaelis-Menten. Existen diversas transformaciones lineales para la ecuación de Michaelis-Menten, sin embargo, para el presente trabajo la transformación lineal usada es la propuesta por Lineweaver-Burk (1935),

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\frac{1}{S}$$

la ecuación anterior es comparable con la ecuación de una línea recta con corte en el eje de ordenadas b y pendiente m, así

$$y = b + mx$$

y al comparar ambas ecuaciones se tiene, que;

$$v_{max} = \frac{1}{b} \wedge K_m = m V_{max}$$

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizo harina de granos germinados (malta y jora) como fuente de enzimas y almidón de morocho (Zea mays variedad Morochón) como sustrato. Granos provenientes de los centros de comercio de cereales de la ciudad de Ambato en la provincia del Tungurahua.

Métodos

Para cuantificar la actividad diastásica de cocteles nativos enzimáticos provenientes tanto de malta como de jora, se ensaya distintas concentraciones de enzima a diferentes temperaturas, así; 8 %, 10 % y 12 % peso/peso para concentraciones de enzima y para temperatura los valores ensayados son: 50°C y 60°C, mientras que, las concentraciones de sustrato a tiempo cero son mantenidas constantes para cada tratamiento y se encuentran tabuladas en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones iniciales de sustrato

Concentración	[g/l]
1	60,83
2	51,43
3	42,81
4	37,21
5	27,04

Las soluciones de almidón de morocho, sustrato, se someten a un tratamiento calórico en autoclave a presión de 1.0 atm ± 0.2 atm durante 20 minutos, para provocar la gelatinización del almidón (Braverman, 1976). Inmediatamente, se procede a la separación de partículas extrañas, para mantener una mezcla homogénea. Luego, el sustrato previamente enfriado, a temperatura de 50°C para el primer tratamiento y 60°C para el segundo tratamiento, es inoculado con los cocteles enzimáticos. Dichas mezclas son mantenidas a 50°C y 60°C para el primer tratamiento y para el segundo tratamiento, respectivamente, en estufa por el periodo de 150minutos.

Cinética Enzimática

Se toman alícuotas de la mezcla enzima-sustrato, y a cada una de estas se las hacen reaccionar con solución de yodo, analizando en función del tiempo; 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos, durante estos periodos de tiempo se toman lecturas espectrofotométricas de absorbancia, las cuales se transforman a valores de concentración por medio de la ecuación (Del Pozo, F. y Valencia, A., 2004)

$$C = 263.520*A + 1.122$$

donde C es concentración de sustrato [g/l] y A es Absorbancia [ϕ]. Consecutivamente, los valores de concentración expresados en [g/l] fueron transformados a [M] usando el valor de 300 000 para el peso molecular del almidón (Choi y Okos, 1986) y conjuntamente los datos fueron convertidos de desaparición de sustrato a aparición de producto.

Cálculo de constantes cinéticas

A partir de los datos generados al analizar la aparición de sustrato en función del tiempo, se evalúan numéricamente las pendientes a tiempo cero de las curvas producidas por la aparición de sustrato, los coeficientes de regresión fluctúan en el rango de 0.80 y 0.99, lo cual indica una correlación adecuada, sin embargo, para concentraciones bajas de sustrato los datos son eliminados, debido a que son estos los cuales introducen el máximo error experimental en el análisis cinético enzimático (Lesckovac 2004).

RESULTADOS

La malta tradicional contiene α-amilasas, β-amilasas, otras glucanasas, proteinasas y muchas otras enzimas (Reed 1975), sin embargo al hacer la representación según la ecuación de Michaelis-Menten se obtienen hipérbolas bien definidas en los dos casos, tanto al trabajar con malta (Figura 1) como cuando se trabajó con jora (Figura 2). Al comparar las dos figuras se establece que la velocidad máxima y la constante cinética son mayores cuando se trabajó con malta, aproximadamente el doble que cuando se utilizó jora. Esto es un indicativo de una mayor afinidad de la jora con relación al sustrato morocho y que el rompimiento de las cadenas de almidón puede ser descrito mediante cinética enzimática, básicamente como una reacción de monosustrato con un complejo central, y con aproximación de estado estacionario para el sistema enzima-sustrato (Lesckovac 2004).

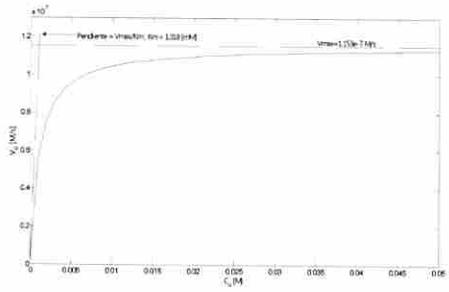


Figura 1. Representación de Michaelis-Menten para malta a 8% w/w y 60°C.

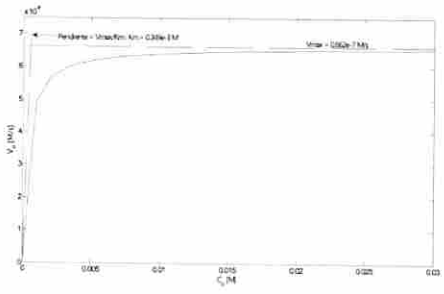


Figura 2. Representación de Michaelis-Menten para jora a 10% w/w y 50°C.

Las Figuras 3 y 4 representan la transformación lineal para la ecuación de Michaelis-Menten propuesta por Lineweaver-Burk para malta y jora como fuentes de enzimas sobre almidón de morocho como sustrato, a diferentes temperaturas (50°C y 60°C), y para distintas concentraciones del coctel enzimático (8%, 10% y 15% w/w). El valor mínimo alcanzado para K_m para malta es de 1,018 [mM] a 8% w/w de concentración y 60°C de temperatura, y para jora el valor mínimo alcanzado es de 0,349 [mM] a concentración 10% w/w y 50°C de temperatura. Estos valores indican que a dichas concentraciones y temperaturas las amilasas de malta y de jora muestran la máxima afinidad por el sustrato analizado, el valor menor de K_m registrado en jora nuevamente indica que es más efectiva en el trabajo de sacarificación de almidón de morocho.

En la Tabla 2 se presentan los valores de velocidad máxima y de la constante de Michaelis determinados en las pruebas utilizando malta como fuente de enzimas y los correspondientes a las pruebas hechas con jora. La gran variabilidad de los datos de las constantes cinéticas hace muy difícil la comparación de valores, en especial en el presente caso donde se utiliza una mezcla de enzimas; sin embargo y con el único propósito de tener una idea de la magnitud de valores, se señala que Reed (1975) reportó un gráfico con datos publicados por Jorgensen para α-glucosidasa de malta de cebada actuando sobre isomaltosa, según el cual $V_{max} = 0,35$ [M/s] y $K_m = 1,8 * 10^{-3}$ [M], valor que está en el mismo orden de los datos indicados en la tabla. Al mismo tiempo, según Atkinson y Mavituna (1991) los valores de Km para el sistema α-amilasa – almidón (enzima-sustrato) oscilan en un rango de 0.4-1.0 [mM], consecuentemente al analizar los datos obtenidos (óptimos), estos muestran congruencia con lo reportado en bibliografía, esto con finalidad de comparación cuantitativa – relativa mas no como comparación cuantitativa – pura, según lo expuesto anteriormente.

Tabla 2. Constantes cinéticas para malta y jora

		Malta		Jora	
Concentración	Temperatura	Vmax	Km	Vmax	Km
[% w/w]	[°C]	[M/s]x10^7	[M]x10^3	[M/s]x10^7	[M]x10^3
8	50	1,907	2,095	4,026	4,594
	60	1,153	1,018	0,692	0,513
10	50	1,586	1,683	0,662	0,349
	60	1,314	1,308	0,907	0,919
15	50	1,177	1,123	1,205	1,099
	60	3,563	2,165	1,959	1,509

Mediante análisis de varianza se estableció que existieron diferencias de significado estadístico debido a las tres variables analizadas, temperatura, concentración y origen de las enzimas, la mencionada variabilidad presente en los datos acaece en la gran dependencia de las enzimas en la temperatura, en su fuente de origen y en la concentración de las mismas para el sistema enzima sustrato, no obstante, los valores óptimos reportados en el presente estudio están enmarcados dentro del rango reportado por Atkinson y Mavituna (1991) para el sistema α-amilasa – almidón. Sin embargo, a sabiendas de que el coctel nativo tanto de malta como de jora, no están exentos de otras enzimas, y que estas pueden reaccionar independientemente y formar un sistema más complejo, en este estudio se asume que la máxima concentración es de α-amilasa y que únicamente esta actúa como motor de sacarificación. Entonces, en general, los valores de K_m correspondientes a jora fueron inferiores a los valores de malta, lo que indica que existe una mayor afinidad de las amilasas presentes en la jora por el almidón de morocho, con relación a las amilasas de malta.

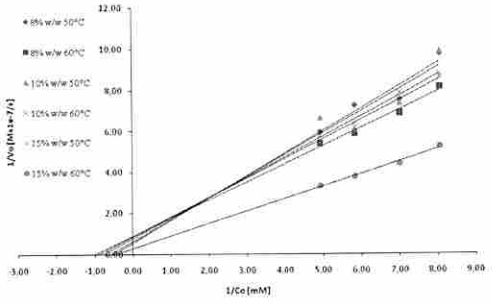


Figura 3. Representacion de Lineweaver-Burk para diastasas de malta sobre almidón de morocho como sustrato.

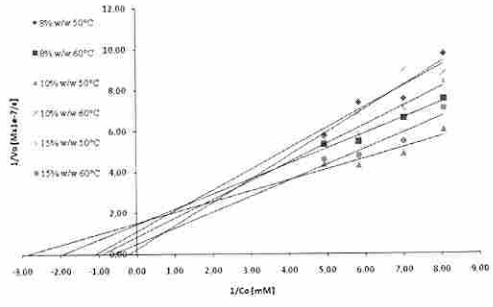


Figura 4. Representación de Lineweaver-Burk para diastasas de jora sobre almidón de morocho como sustrato.

CONCLUSIONES

El enfoque de cinética enzimática posibilita diferenciar la actividad de harinas de granos germinados y que son mezclas naturales de enzimas, como herramienta para diferenciarlas y seleccionar condiciones adecuadas de trabajo en industrias que las utilizan.

La alta dependencia de la actividad enzimática en la temperatura del sistema enzima-sustrato, en la fuente de origen de las enzimas y en la concentración de las enzimas, es más pronunciada para los ensayos con jora, esta dependencia debe ser controlada eficientemente al momento de los ensayos para evitar detrimento en los mismos; contrastando, los resultados obtenidos, y analizados como óptimos están dentro de lo reportado en bibliografía (Atkinson y Mavituna, 1991) para sistemas de α-amilasas – almidón (enzima-sustrato).

La mayor afinidad por el sustrato representada por el valor mínimo de K_m se presentó con el coctel enzimático proveniente de jora, lo cual es plenamente explicable debido a que, sustrato y coctel enzimático provienen de la misma fito-especie.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato (UTA). Centro de Investigaciones (CENI) y Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL) por financiar el trabajo a través de proyectos internos.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Atkinson, B. y Mavituna, F. 1991. "Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook". 2nd. Ed. Busingstoke, England. Editorial Macmillion. p: 1-210
- Braverman, J.B. 1976. "Introducción a la bioquímica de los alimentos". 2nd. Ed. México D.F., México. Editorial El Manual Moderno. p: 46-65
- Choi, Y. and Okos, M.R. 1986. Effects of temperatura and composition on the termal properties of foods. In: "Food Engineering and Process Applications. Transport Phenomena". V. 1. Le Maguer, M. and Jelen, P. (Eds.). Essex, England. Elsevier Applied Science Publisher Ltd. p: 93-101
- Del Pozo, F. y Valencia, A. 2004. "Establecer una Tecnología para la obtención de una Bebida Alcohólica a partir de Maíz (Zea mays variedad Morochon) usando tratamientos enzimáticos", Tesis de Ingeniero en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. FCIAL. p: 41-44
- Gacesa, P. y Hubble J. 1990. "Tecnología de las enzimas". 1ra. Ed. Zaragoza, España. Editorial Acribia. p: 1-14, 51-71, 183-186
- Lesckovac, V. 2004 "Comprehensive Enzyme Kinetics". 1ra. Ed. New York, USA. Editorial Kluwer Academia. p: 1-71, 391-419
- Reed, G. 1975. "Enzymes in Food Processing". 2nd. Ed. London. Academic Press Inc. p:9, 19.
- Renventós. P. 1962. "Destilación de alcoholes". 2da Ed. Barcelona, España. Editorial Síntes. p: 29-41,79

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE CINCO FRUTAS DE LA ZONA SUR DEL ECUADOR PARA SU INDUSTRIALIZACIÓN

Salazar, Rómulo[1]; Piedra, Diana[2] y Escarabay, Patricia[2]

[1] UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA
CENTRO DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA E INVESTIGACIÓN AGROINDUSTRIAL

[2]ESCUELA DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS DE LA UTPL

Palabras clave: ciencia, propiedades físico-químicas, frutos.

RESUMEN

Se realizó la caracterización físico-química de cinco frutas nativas de la zona sur del Ecuador, provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Chirimoya (*Annona cherimola Mill.*); Granadilla (*Pasiflora ligularis Juss.);* Tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*); Naranjilla (*Solanum quitoense Lam.);* y Membrillo del Oriente (*Eugenia stipitata Mcvaugh*).

En la chirimoya se estudiaron 3 variedades (mammillata, lisa e impressa). Se encontró que la variedad *"mammillata"* tuvo mayor cantidad de piel (72.31± 11.68g) y pulpa (177.07±37.96g) que las variedades *"lisa"* (56.73 ± 9.64g piel y 137.34 ± 35.86g pulpa) e *"impressa* (57.35 ± 18.78g piel y 144.05 ± 33.44g pulpa). La variedad *"impressa"* es la que tuvo mayor número de semillas (33.22 ± 8.7 semillas). En el peso de fruta, semillas, sólidos solubles, acidez, humedad, cenizas, pH, firmeza y pectina no existió diferencia significativa (P<0.05).

La variedad *"tradicional"* de granadilla fue comparada con la variedad comercial *"colombiana"*. Se encontró que la variedad *"colombiana"* tuvo un mayor peso de fruta (119.95 ± 5.14g), semilla (23.03±2.05g), piel (37.08±2.33g), pulpa (45.10±2.56g) y albedo (13.81±1.66g) que la variedad *"tradicional"* (71.15 ± 9.79g peso de fruta, 16.30± 2.31g semilla, 22.63 ± 2.45g piel, 24.31 ± 3.4g pulpa y 7.88 ± 1.58g de albedo). En la determinación de sólidos solubles y pectina de albedo no existió diferencia significativa (P<0.05), mientras que en propiedades como acidez, pH, humedad, cenizas y pectina de jugo existió diferencia significativa (P>0.05).

El *"membrillo del oriente"* o arazá fue comparado con los resultados de Bone (2005) y Samanez (1996) obtenidos en la misma variedad de membrillo, existiendo similitud entre los resultados.

Los resultados del análisis de la variedad de naranjilla *"agria"* fueron comparados con estudios que realizó Enríquez (2003) a la variedad de naranjilla *"paloreña"*, encontrando relación entre estas variedades.

La variedad *"puntón"* de tomate de árbol fue comparada con la variedad *"redondo"*. Se encontró que la variedad *"redondo"* tuvo mayor peso de fruta (116.74±20.54g), semillas (36.05±6.45g) y pulpa (63.93±14.43g) que la variedad *"puntón"* (91.65 ± 12.98 peso de fruta, 26.91 ± 4.01g de semilla, 49.68 ± 10.89g de pulpa), mientras que en la cantidad de piel no se encontró diferencia significativa (P<0.05). En la determinación de sólidos solubles, acidez, pH, humedad, cenizas, firmeza y pectina no existió diferencia significativa (P<0.05).

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas frescas son fuentes vitales de minerales, vitaminas y fibras dietéticas, pues contienen compuestos nutritivos importantes como las vitaminas, que no pueden ser sintetizadas y aportan algunos constituyentes que otros alimentos no pueden suministrar [1].

Dentro de las frutas que poseen estas características está la chirimoya, fruto de zona árida, que se consume fresco, cuando ha alcanzado la plena madurez y sus frutos son dulces y jugosos[2]. El *membrillo del oriente* que posee una alta acidez, un importante contenido de pectinas, un agradable sabor y aroma por lo que se lo utiliza especialmente en la elaboración de mermeladas, jaleas y enlatados [3]. De igual manera la granadilla, fruta que tiene un agradable sabor agridulce y desarrolla un atractivo color amarillo en la cáscara en la madurez, se consume principalmente en el mercado nacional, no obstante ya se comercializa en el mercado europeo con bastante éxito[4]. Otra de las frutas de interés es el tomate de árbol, fruta cultivada en toda la serranía ecuatoriana y perteneciente al grupo de las semiácidas es una de las frutas más difundidas y demandadas en todo el país[5]. La naranjilla, fruta consumida tradicionalmente en el Ecuador, se cultiva en la zona oriental del país, en especial para atender el mercado interno en fresco que la consume en jugos y pulpa[6].

Estas especies frutales, incluyendo su aprovechamiento y transformación, son objeto de estudio por parte del Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial de la Universidad Técnica Particular de Loja. Dichas frutas se producen en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, zona geográfica que se caracteriza por mantener factores ecológicos, climáticos e hídricos extremos [7], mismos que favorecen el desarrollo de las frutas ya mencionadas. Así pues, los objetivos de este estudio fueron identificar las variedades existentes de estas especies frutales en la zona de estudio, así como la época de cosecha, la taxonomía y la ubicación geográfica; analizar sus características físico-químicas (peso de fruta, pulpa, piel, semilla, el rendimiento, firmeza, color, pH, acidez, sólidos solubles, humedad, cenizas y pectina) y compararlas entre las variedades estudiadas para cada fruta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias Primas:
Las siguientes cinco frutas nativas de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe fueron seleccionadas para realizar su caracterización físico-química y tecnológica: Chirimoya (*Annona cherimolia Mill.*); Naranjilla (*Solanum quitense Lam.);* Tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*); Membrillo del Oriente (*Eugenia stipitata Mcvaugh*) y Granadilla (*Pasiflora ligularis Juss.).* Para cada especie frutal se establecieron las diferentes zonas de producción, su ubicación geográfica y la temporada de cosecha.

Las zonas de producción, la altitud y la situación geográfica fueron determinadas con el uso de mapas, altímetro y GPS para futuras investigaciones y una posterior colección de material vegetativo. Se tomó un número de 120 frutos maduros de cada árbol para la caracterización. La recolección de chirimoya (impressa, lisa, mammillata) se realizó en el cantón Espíndola de la provincia de Loja, a partir del mes de marzo, pues, en dicho cantón se dan estas variedades[8]. La variedad de membrillo fue

recolectada en la ciudad de Zamora de donde es originario[9]. En el barrio Tres Leguas de la parroquia Malacatos del cantón Loja, se efectuó la recolección de la granadilla la que se comparó con la variedad de granadilla colombiana. La recolección del tomate de árbol fue hecha en la parroquia Santiago del cantón Loja, en donde se tomaron muestras de dos variedades de tomate que corresponde al redondo y al puntón. La naranjilla se recolectó en la ciudad de Zamora.

Una muestra de cada planta con su respectivo fruto fue analizada por el Herbario de la Universidad Nacional de Loja para que sea identificada la taxonomía y variedad de cada una de ellas.

Las frutas fueron llevadas al Laboratorio del Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial de la U.T.P.L. para ser analizadas.

Propiedades Físicas:
Para el análisis de las propiedades físicas se tomaron 10 muestras de 12 frutas cada una [10]. Se registró el peso por fruta, el peso individual de las semilla, pulpa o jugo y piel presente en las frutas, lo cual fue determinado por separación manual y mediante el uso de una balanza marca OHAUS, con precisión de ± 0.2. Además se calculó el rendimiento. En las muestras tomadas, se evaluó el color mediante el uso de las cartas de color de The Royal Horticultural Society. De igual manera se midió la resistencia de las frutas enteras mediante el uso de un penetrómetro marca TR modelos FT 327 y FT 011.

Propiedades Químicas:
Se tomaron 6 muestras de 12 frutas cada una. Las muestras fueron peladas y la parte comestible fue homogenizada en una licuadora de cocina a máxima velocidad por un minuto y luego se sometieron a los diferentes análisis [10]. El pH fue determinado mediante el método de la norma ecuatoriana INEN 389, la acidez titulable mediante el método volumétrico de la AOAC 942.15 (A), los sólidos solubles expresados en °Brix se midieron utilizando un brixómetro escala de 0 – 32 °Brix marca Atago, dejando caer de 2 – 3 gotas del licuado filtrado en algodón; el contenido de cenizas fue determinado mediante el método descrito en la norma INEN 786 y el contenido de humedad fue determinado manteniendo las muestras en una estufa controlada a 105°C ± 1°C por 2 horas o hasta peso constante (AOAC 1984). La determinación de pectina se realizó mediante el método de Carre y Haynes [11].Todos los análisis se llevaron acabo por duplicado.

Análisis Estadísticos:
Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando un diseño experimental simple de un factor de una vía de clasificación y la desviación estándar para la chirimoya, granadilla y tomate de árbol, y para los casos que se presenta diferencia significativa, en el caso de la chirimoya, se realizó la prueba de Duncan con un nivel de significación de 0.05%. Para el membrillo del oriente y la naranjilla, que se estudiaron una variedad en cada especie, se calculó únicamente la desviación estándar para cada característica determinada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CHIRIMOYA

En el estudio realizado a las tres variedades de chirimoya (*impressa, lisa* y *mammillata*), se encontró que las características del fruto pueden variar dentro de cada variedad. Las propiedades en las que se encontró diferencia significativa (P>0.05) fueron el peso de pulpa y el peso de piel. Las razones pueden ser principalmente debido a factores genéticos, medio ambientales y agro culturales. La influencia del ambiente incluye las diferencias en las propiedades del suelo, clima, exposición al sol, patógenos, tiempo de cosecha, polinización[12].

Tabla 1. Propiedades Físico-Químicas de la Chirimoya.

Propiedades	Variedades		
	Impressa	Lisa	Mammillata
Peso fruta g	243.19 ± 58.94a	245.33 ± 45.65a	283.27 ± 41.64a
Peso semilla g (%)	22.48 ± 6.62 a (11.06)	16.90 ± 5 a (7.01)	20.75 ± 6.11a (7.28)
Peso piel g (%)	57.35 ± 18.78b (23.41)	56.73 ± 9.64 b (23.57)	72.32 ± 11.68a (26.1)
Peso pulpa g (%)	144.05 ± 33.44b (59.63)	137.34 ± 35.86b (62.47)	177.07 ± 37.96a (62.21)
Número de semillas	33.22± 8.7 a	20.95 ± 7.58b	26.6 ± 8.50b
°Brix	24.58 ± 5.7a	25.83 ± 3.89a	26.25 ± 4.60 a
*Acidez (ác. Málico)	0.42 ± 0.11a	0.45 ± 0.13a	0.37 ± 0.22 a
pH	4.73 ± 0.11a	4.81 ±0.09a	4.73 ± 0.08 a
Humedad (%)	73.91 ± 4.96 a	70.08 ± 2.02a	70.39 ± 2.96 a
Cenizas (%)	0.84 ± 0.1 a	0.87 ± 0.05a	0.79 ± 0.14 a
Pectina (%)	1.69 ± 0.53 a	1.94 ± 0.53a	1.56 ± 0.37 a
Firmeza (Kg/cm^2)	1.64± 0.49 a	1.5 ± 0.29a	1.4 ± 0.27 a
Color	137C Verde – 148A Amarillo Verde	137A Verde – 147B Amarillo Verde	133A Verde – 148A Amarillo Verde

GRANADILLA

Las diferencias que se presentan entre las variedades podrían explicarse principalmente al uso de fertilizantes y humedad del suelo, pues, estos producen en la planta una mayor absorción de nutrientes; a las condiciones agroecológicas y al manejo agronómico de las plantaciones que influyen en el crecimiento de la granadilla colombiana que es la que tiene mayores rendimientos [13].

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de la Granadilla

Propiedades	Variedades	
	Tradicional	*Colombiana*
Peso fruta g	71.15 ± 9.79 b	119.95 ± 5.14 a
Peso semilla g (%)	16.30 ± 2.31b (22.92)	23.03 ± 2.05 a (20.88)
Peso cáscara g (%)	22.63 ± 2.45b (31.81)	37.08 ± 2.33a (30.99)
Peso pulpa g (%)	24.31 ± 3.41b (34.09)	45.10 ± 2.56 a (33.55)
Peso de Albedo g (%)	7.88 ± 1.58b (11.08)	13.81 ± 1.66 a (11.52)
Sólidos Solubles (°Brix)	16.22 ± 2.17a	14.67 ± 0.52a
%Acidez (ac. Cítrico)	1.12 ± 0.07a	0.52 ± 0.08b
pH	4.1± 0.08 b	4.59 ± 0.06a
Humedad (%)	85.67±0.1b	87.53 ± 0.35 a
Cenizas (%)	0.64± 0.05b	0.89 ± 0.05 a
Pectina Albedo (%)	2.58 ± 0.46a	2.49 ± 0.26 a
Pectina Jugo (%)	0.48 ± 0.25a	0.24 ± 0.07b
Color	162A Amarillo Grisáceo – 163C Naranja Grisáceo	N163A Naranja Grisáceo – N163C Naranja Grisáceo

La granadilla tradicional, nativa de la provincia de Loja, presentó, a diferencia de la granadilla colombiana, una mayor calidad en jugo, ya que tiene más aroma y sabor más dulce.

La granadilla es una fruta climatérica, cosechada cuando desarrolla un 25% de color amarillo en su cáscara. En este momento algunas características como los sólidos solubles aumentan mientras que la acidez empieza a disminuir y continúa

una tendencia descendente hasta que está completamente amarilla [4]. Es importante conocer que en la plantación de granadilla se presenta la particularidad de que en un mismo momento se pueden encontrar flores y fruta de distintos estados de desarrollo y madurez (cele, pintona, madura y sobremadura) [14].

MEMBRILLO DEL ORIENTE

La variación que existe en las propiedades de sólidos solubles, acidez, humedad y cenizas se podrían explicar debido principalmente a la diferencias en los factores agro culturales, ecotipos y subespecies cultivadas.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del *Membrillo del Oriente*.

Propiedades	Variedades	
	M. del Oriente	*M. del Oriente* Datos bibliográficos
Peso fruta g	107.55±66.45	70-180*
Peso semilla g (%)	20.64±17.27 (16.29)	21. 54* (30)
Peso piel g (%)	11.19±4.31 (12.91)	
Peso pulpa g (%)	73.67±46.54 (67.65)	49-126* (70)
Sólidos Solubles (°Brix)	4.37±1.22	2 - 4*
%Acidez (ac. Málico)	2.26±0.28	2.88**
pH	2.73±0.08	2.57**
Humedad (%)	94.88±0.45	93.52**
Cenizas (%)	0.18±0.01	0.13**
Pectina (%)	0.62±0.06	0.27*
Firmeza (Kg/cm^2)	1.1±0.37	
Color	9A Amarillo – 17A Amarillo Naranja	

Fuente: *Villachica (1996), **Bone (2005).

El membrillo presenta características específicas para la industria por el alto porcentaje de pulpa, por su sabor y aroma [15] y por la existencia de tecnología agronómica y de industrialización. Los resultados de este estudio permiten establecer rendimientos en pulpa del 67.65%.

NARANJILLA

Tabla 4. Propiedades físico-químicas de la Naranjilla

Propiedades	Variedades	
	Agria	Paloreña*
Peso fruta g	78.18±6.46	82.73±17.7
Peso semillas g (%)	12.18±3.01 (15.77)	20,02 ± 2,07 (24,2)
Peso piel g (%)	12.76±2.28 (16.41)	
Peso pulpa g (%)	52.5±5.76 (66.86)	62.86± 2.52 (76)
Sólidos Solubles (°Brix)	11.33±0.52	7
%Acidez ac. Cítrico)	2.59±0.16	2.0
pH	3.03±0.05	3.1
Humedad (%)	91.63±0.45	92.02
Cenizas (%)	0.57±0.02	0.61-0.80*
Pectina (%)	0.78±0.08	
Firmeza (Kg/cm^2)	1.7±0.65	8.7
Color	160A Amarillo Grisáceo – 162B Amarillo Grisáceo	

*Fuente: Enríquez (2003).

El tamaño del fruto de naranjilla y algunas características de importancia como el peso de fruta, pH y %acidez presentan similitud con el estudio realizado por Enríquez (2003) en la variedad paloreña; sin embargo, características como peso de pulpa, piel, semilla, sólidos solubles, cenizas y firmeza no guardan relación con lo reportado en este estudio. Las principales causas de estas diferencias pueden ser los métodos utilizados, la variedad del fruto así como la procedencia del mismo, por lo tanto los factores agroecológicos como el suelo y el clima son diferentes y afectan considerablemente el crecimiento, rendimiento y la estructura del fruto. Con estos resultados se puede indicar que la variedad agria presenta frutos más dulces pero con un rendimiento bajo en pulpa y menor cantidad de minerales.

TOMATE DE ÁRBOL

Las propiedades físicas y tecnológicas como peso de fruta, peso de mucílago que recubre las semillas, peso de piel, peso de pulpa, firmeza y color varían significativamente entre ambas variedades, siendo la variedad de tomate de árbol redondo la que tiene mayores valores. Cabe resaltar que estos datos, sobre todo los pesos de fruta entera, son mayores a los reportados por León *et al* (2004) para ambas variedades, y esta característica es muy importante debido a que frutos de mayor tamaño tienen preferencia en el mercado nacional.

Tabla 5. Propiedades físico-químicas del Tomate de Árbol.

Propiedades	Variedades	
	Puntón	*Redondo*
Peso fruta g	91.65 ± 12.98b	116.74± 20.54 a
Peso de mucílago y semillas g (%)	26.91 ± 4.01b (30.98)	36.05 ± 6.45 a (31.02)
Peso piel g (%)	13.99 ± 1.6 a (16.36)	15.17 ± 1.94 a (13.23)
Peso pulpa g (%)	49.68± 10.89b (51.59)	63.93 ± 14.43 a (54.18)
Sólidos Solubles (°Brix)	12.33 ± 1.21a	13.08 ± 1.28 a
%Acidez (ác. Cítrico)	1.8 ±0.17a	1.87 ± 0.26 a
Ph	3.66 ±0.06a	3.62 ±0.09 a
Humedad (%)	87.34 ± 0.52a	89.69 ± 1 a
Cenizas (%)	0.84 ± 0.03 a	0.81 ± 0.04 a
Pectina (%)	1.46 ± 0.21a	1.36 ± 0.14 a
Firmeza (Kg/cm^2)	1.8 ± 0.21a	1.5 ±0.11b
Color	172A Naranja Grisáceo – 180A Rojo Grisáceo	163A Naranja Grisáceo – 183A Púrpura Grisáceo

Las propiedades químicas como sólidos solubles, % acidez, pH, humedad y cenizas no presentaron diferencia significativa entre ambas variedades, a diferencia de las cenizas, todos los valores obtenidos en esta investigación guardan relación con los reportados por León *et al* (2004) y por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (2001) en la ficha técnica de esta fruta.

CONCLUSIONES

Chirimoya

Entre las tres variedades de chirimoya estudiadas (lisa, impressa y mammillata) se pudo determinar que no existe diferencia significativa ($P<0.05$) en las características: peso total de la fruta, peso de semillas, sólidos solubles, acidez, pH, humedad, cenizas, pectina y firmeza, mientras que en características como el peso de piel, peso de pulpa existe diferencia significativa ($P>0.05$).

La variedad impressa tiene el mayor número de semillas (33.22±8.7) en comparación con las variedades lisa y mammillata, esto afecta significativamente la calidad del fruto.

Por su alto contenido en azúcares, pectina, minerales y rendimiento en pulpa, este fuente es ideal para el consumo ya sea como fruta fresca o para ser utilizado en la elaboración de mermeladas, confituras, jugos, helados, vinos, etc., aunque sus numerosas y grades semillas resultan un inconveniente a solucionar durante el procesamiento.

Granadilla
Las dos variedades de granadilla estudiadas (colombiana y tradicional), presentaron diferencia significativa (P>0.05) en las características: peso total de la fruta, peso de semillas, peso de piel, pulpa, peso del albedo, pH, humedad y cenizas.

En cuanto a la cantidad de sólidos solubles expresados en °Brix y pectina del albedo, entre las dos variedades de granadilla no existe diferencia significativa (P<0.05). La variedad tradicional presentó mayor porcentaje de acidez expresado como ácido cítrico (1.12 ± 0.067%) que la variedad colombiana (0.52 ± 0.075%).

Por su sabor característico y su alto contenido de sólidos solubles de 16.22 ± 2.17°Brix se la podría utilizar en la preparación de mermeladas, jaleas, confituras, etc. Por otro lado, se puede extraer la pectina del albedo para ser utilizada en la industria ya que esta parte de la granadilla tradicional tiene 2.58 ± 0.46% de pectina, que es un porcentaje considerable, en comparación con el obtenido en el jugo (0.48 ± 0.25%) y con el de la pulpa de frutas como la chirimoya que tiene 1.94 ± 0.53%. La granadilla colombiana resulta mucho más rentable en el momento de la industrialización por su alto contenido en jugo, puesto que este representa el 34.09% del peso total de la fruta.

Membrillo del Oriente
En las propiedades físicas como peso de fruto (107.55± 66.45g), peso de pulpa (73.67±46.54g), no existe variación con los valores reportados por Villachica (1996) en su estudio realizado a la variedad de membrillo del oriente, mientras que en el peso de piel y semilla en nuestro estudio es mayor al reportado por dicho autor.

En las propiedades químicas como: °Brix (4.37±1.22), pH (2.73±0.08) se determinó que los valores obtenidos en este estudio no concuerdan con los reportados por Bone (2005); mientras que los resultados de acidez (2.26± 0.28), humedad (94.88± 0.45%), cenizas (0.18± 0.01%), concuerdan con los reportados por Bone (2005).

La piel de la fruta de membrillo contiene aceites esenciales de gran aroma, con potenciales usos en la industria [9].

Naranjilla
Los resultados de las propiedades físicas obtenidos en este estudio de esta fruta como peso de la fruta (78.18± 6.46g), piel (12.76±2.28g), y semillas (12.18± 3.01g) son similares a los resultados reportado por Villachica (1996).

Las propiedades químicas como sólidos solubles expresados en sólidos solubles (11.33±0.52 °Brix), pH (3.03± 0.05), humedad (91.63± 0.45%), cenizas (0.57± 0.02) y acidez (2.59± 0.16%) de igual manera, son similares a los resultados reportados por Bone (2005).

La naranjilla se consume en jugos, helados, mermeladas, conservas en general y una variedad de postres y confites [9].

Tomate de árbol
Las características como el peso total de la fruta (116.74± 20.54g), peso de semillas (36.051± 6.45g) y peso de pulpa (63.929± 14.43g)de la variedad de tomate redondo varían significativamente (P>0.05) de la variedad de tomate puntón; mientras que en características como el peso de la piel (15.17± 1.94g), sólidos solubles (13.08±1.28 °Brix), acidez (1.87± 0.17%), pH (3.62± 0.09), humedad (89.69± 1%), cenizas (0.81± 0.04%) y pectina (1.36± 0.14%) no existe diferencia significativa (P<0.05) con la variedad de tomate puntón. En cuanto a la firmeza, existe diferencia significativa (P>0.05) entre la variedad de tomate puntón (1.84±0.21Kg/cm^2) y el tomate redondo (1.52± 0.11 Kg/cm^2).

Por su alto contenido en pectinas, acidez y rendimiento en pulpa se utiliza el tomate de árbol en la elaboración de mermeladas, jaleas, conservas, helados, fruta deshidratada, ají, etc. El tomate de árbol es una fruta muy versátil en cuanto a variedad de preparaciones; además, su utilización es fácil porque sus semillas son comestibles [5].

En general, los resultados de este estudio son útiles para estudios de caracterización de frutos, tecnología de alimentos, desarrollo de nuevos productos o nuevas alternativas de industrialización.

REFERENCIAS:

1. Salunkhe, D. (2004). Tratado de ciencia y tecnología de las hortalizas, Editorial Acribia, Zaragoza - España. 1-9.
2. Van Damme, P y Scheldeman, X. (1999). El Fomento del cultivo de la Chirimoya en América Latina. Revista Unasylva - No. 198 - Los Productos Forestales no Madereros y la Generación de Ingresos. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
3. Andrada, C.A. (2000). El Membrillo y su Dulce: con especial referencia a la región del Noroeste Argentino y aportes de México y Portugal, Buenos Aires. Editorial La Colmena.
4 Castro, J.J.; Cerdas, M.; Fernandez, K.; Moreno, F. y Rodriguez, J.J. (1997). Caracterización del manejo poscosecha de la granadilla (*Passiflora ligularis*) y sus cualidades físicas y químicas durante la madurez y almacenamiento. Convenio Poscosecha CNP-UCR, p. 45.
5. MAG/IICA. (2001) Tomate de Árbol Tamarillo / Tree Tomato / Sweet Tomato. Ficha Técnica, Quito-Ecuador.
6. MAG/IICA. (2001). Naranjilla: *Solanum quitoense Lam.*, Subprograma de Cooperación Técnica (Préstamos BID / MAG 831/OC y 832/OC – EC), Quito - Ecuador.
7. Bustos, T. (2006). Ecuador: Patria de Orquídeas, Loja y Zamora Chinchipe. Editorial de la Universidad Técnica Particular de Loja. Loja – Ecuador.
8. Proyecto Frutales, Subcomisión Ecuatoriana PREDESUR. Dirección de Recursos Naturales. Departamento de Desarrollo Agropecuario. Loja-Ecuador.
9. Bone, L. (2005). Fichas Técnicas y Sondeo Rápido de los Ciclos de Producción de las Principales Frutas de la Amazonia ecuatoriana. Quito: GTZ/Programa GESOREN. 2-13.
10. Olubukola Adedeji, K.A.T., Charles T. Akanbi y Ruth Ajan. (2005). Physicochemical Properties Of Four Tomato Cultivars Grown in Nigeria. Journal of Food Processing and Preservation. p. 79-86.
11. Kira, R., Sawyer, R. y Egan H. (2002). Composición y análisis de alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental.
12. Ureña, V., Romero J. & Scheldeman, X. (1999). Estudio del Cultivo de Chirimoya (Annona cherimola Mill) en la Provincia de Loja, Ecuador. Proceedings of the First International Symposium on Chermoya. Loja. p. 230-237.
13. Arenas de Moreno, L., Marín, M., Peña, D., Toyo E. y Sandoval, L. (1999) Contenido de humedad, materia seca y cenizas totales en guayabas (Psidium guajava L.) cosechadas en granjas del municipio Mara del estado Zulia. Rev. Fac. Agron. (LUZ).
14. Rodríguez, J. (1996). Manual práctico para la producción, cosecha y manejo post-cosecha del cultivo de granadilla. Laboratorio Post-Cosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.
15. Villachica, H. (1996). Frutales y Hortalizas Promisorios de la amazonía. Tratado de Cooperación Amazónica – Secretaría Pro Tempore. Lima, Perú.
16. Enríquez, M., Vázconez, C., (2003). Estudio del comportamiento postcosecha de la naranjilla (*Solanum quitoense*), variedad paloreña para estimar su tiempo de conservación. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
17. León, J., Viteri, P. y Cevallos, G. (2004).Manual del cultivo de tomate de árbol. Quito-Ecuador. 51p.

EXTRACCIÓN DE FICINA DEL HIGO (*Ficus carica L*) Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Alvarado Ruiz, Susana; Rojas Vélez, Vannesa; Toledo Vargas, Juan José

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial (CETTIA)
Escuela de Industrias Agropecuarias
San Cayetano alto, eiia@utpl.edu.ec
Loja-Ecuador

Palabras claves: Ficus carica L., ficina, extracción, actividad enzimática

RESUMEN

Se utiliza frutos de frutos de *Ficus carica L* (breva e higo), recolectados en huertos de cuatro sectores de la ciudad de Loja (Pradera, Valle, Época y Consacola) República del Ecuador. Se determina en los frutos tamaño, peso, pH y solidos solubles en el pH y solidos, y, en el látex y enzima sólidos solubles y pH.

La actividad ezimática se determina con el método epectrofotométrico AOAC 971.16 actividad proteolítica de la papaina; utilizando el espectrofotómetro UV visible a una longitud de onda de 280nm.

Los resultados muestran un rendimiento en látex de 1.38% en breva y 1.72% en higo cultivados en el sector de la Pradera. Por otra parte, la breva cultivada en la Pradera tuvo mayor rendimiento en enzima purificada de 51.60% (relación peso de la enzima para el peso del látex) así como también el higo cultivado en el Valle con un valor de 56.58% (relación peso de la enzima para el peso del látex). La actividad enzimática de la enzima purificada es mayor en la breva cultivada en el Valle con un valor de 21723,82 USP/mg y en el higo cultivado en la Pradera con un valor de 18771,68 USP/mg. Finalmente, la actividad enzimática de la enzima liofilizada obtenida de brevas cultivadas en el Valle e higos cultivados en la Pradera es de 28299.96 USP/mg y 19148.87 USP/mg, respectivamente.

El propósito de la investigación es la realizar una cuantificación del rendimiento de látex de frutos de los ecotipos de *Ficus carica L* cultivados en huertos de la ciudad de Loja en determinados estados de madure, y la determinación de la actividad enzimática de la ficina extraída, con la finalidad de contribuir al aprovechamiento de los recursos agrícolas de la ciudad de Loja.

INTRODUCCIÓN

Las brevas y los higos son las infrutescencias de la higuera, árbol que pertenece a la familia de las Moráceas. Esta familia consta de más de 1.500 especies de árboles y arbustos que producen látex, siendo la más conocida la higuera ordinaria (*Ficus carica L.* [1]

La higuera es un árbol típico en los países mediterráneos. Su rusticidad y su fácil multiplicación hacen de la higuera un frutal muy apropiado para el cultivo extensivo. Sus flores están distribuidas por la superficie interna de un receptáculo lobuloso abierto en un extremo; este receptáculo, tras la fecundación, se hincha y se vuelve carnoso, formando una masa rica en materias azucaradas: el conjunto es un fruto múltiple, la breva o el higo.

El denominado fruto de la higuera es blando, de gusto dulce, en cuyo interior, de color encarnado y blanco, se alojan lo que, aparentemente son semillas pequeñas, pero que en realidad son verdaderos frutos. Aparece cubierto exteriormente por una piel verdosa, negra o morada, según las diversas variedades.

La breva se caracteriza por sus hojas grandes y de forma palmada, su fruto es grande y redondo, cuando esta maduro es de color morado oscuro, muy dulce y con fuerte aroma En cambio, el higo presenta hojas más pequeñas que la breva y de forma palmada, su fruto es pequeño y alargado, cuando esta maduro es de color morado claro, es menos dulce y con ligero aroma.

El higo es una rica fuente de benzaldehido y un agente anticancerígeno. Contiene enzimas (esterasa, ficina, fucomarina) y flavonoides que ayudan en el proceso digestivo. Contiene además cantidades significativas de minerales (hierro, potasio, manganeso, magnesio, cobre, bromo, fósforo, calcio), vitaminas (beta-caroteno, ácido ascórbico), fibra y abundantes azúcares -principalmente glucosa, galactosa y fructosa- también aminoácidos (alanina, aspartina, arginina, cistina, glicina, lisina, lipasa, felinanina). [1], [2] y [18].

El presente estudio se realiza tomando como referencia la investigación **"Caracterización de nuevas enzimas proteolíticas de frutas maduras de *bromelia antiacanta.* (bromeliaceae)"** que en lo fundamental consiste en que los extractos crudos son purificados parcialmente por fraccionamiento de solventes orgánicos [20], por cuanto la bromelaina al igual que la ficina y la papaina son enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, actúan sobre enlaces peptídicos y son de naturaleza cisteina - endopeptidasa [9].

Este trabajo de investigación tiene el propósito establecer la cuantificación del rendimiento de látex de frutos de dos tipos de *Ficus carica L* (higo y breva) en determinados estados de madurez, y la determinación de la actividad enzimática de la ficina extraída.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrae látex de los frutos de dos ecotipos (*Picus carica L.*) cultivados en huertos de los sectores Época, Valle, Pradera y Consacola de la ciudad de Loja

De acuerdo a un estudio previo realizado por los autores, se selecciona el fruto verde cuya edad está entre comprendida entre 1 y 1.5 meses por cuanto es mayor la cantidad de látex por fruto.

Análisis físicos

Sólidos solubles.- Sólidos Solubles.- Se utilizó un Brixómetro de triple escalas de 0-99°Brix.

Peso y Tamaño.- El peso se lo determinó en una balanza analítica de un plato con precisión 0.05g marca OHAUS® y el tamaño de cada fruta (longitud y diámetro) se midió por medio de un calibrador.

Análisis químicos
pH.- Se determina con un pH-metro marca HANNA, serie 1120683 previamente calibrado según el Instructivo de manejo de equipos código I 5.5.1-23

Análisis organoléptico
Color.- El color se determina con la tabla calorimétrica The colour chart of The Royal Horticultural Society, abanicos 2,3,4

Actividad enzimática
La actividad enzimática de las enzimas extraídas de los dos ecotipos de *Ficus carica L* se basa en la técnica AOAC 971.16 Actividad proteolítica de la papaina. tomando como referencia Estándar de papaina, utilizando un espectrofotómetro UV visible marca Spectronic – Unicam, serie UVB091602 a una longitud de onda de 280nm

Extracción y conservación del látex.
Para extraer el látex se realiza cortes horizontales en la parte superior del fruto que va unida a la rama de 1 – 2 mm de espacio; se recoge en cajas petri previamente lavadas, esterilizadas y pesadas. El látex se congela para su conservación en una refrigeradora marca Westinghouse serie 185-996.

Separación y conservación de la enzima
Se descongela las muestras de látex, se agitan las placas para que el látex vuelvan a su estado inicial, se centrifuga a 13400 rpm por 30 minutos (centrifuga Mini spin marca Eppendorf, serie 1610700001); se filtra y se recoge el sobrenadante que contiene la enzima al que se adiciona bisulfito de sodio para su conservación.

Secado por liofilización
La enzima se seca en un liofilizador LABCONCO, serie 77610 a una presión 10 micrones de mercurio y temperatura de -60ºC.

Trituración
La ficina Liofilizada se la tritura manualmente, utilizando un mortero de laboratorio.

Envasado
La ficina liofilizada se la envasa en frascos ámbar con la finalidad de conservar su actividad enzimática.

Almacenamiento
La enzima liofilizada debidamente envasada con su respectiva etiqueta se la mantiene en refrigeración a 4ºC para su conservación.

Análisis estadístico
En la investigación se aplica el método analítico – experimental, utilizando el diseño factorial a x b, se realiza un análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05 y se aplica la prueba de significancia de Duncan con la finalidad de establecer las diferencias entre ecotipos. Para comprobar si existe diferencia significativa de la actividad enzimática de la ficina liofilizada obtenida de látex de higo y breva, se realiza una Prueba "t", ya que se trata de comparar valores promedios de dos muestras.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los análisis físico – químicos de los frutos verdes, se muestran en los cuadros 1

Cuadro 1. Análisis Físico-Químico de los frutos verdes

LUGAR	ESPECIE	pH	ºBrix	Tamaño (cm)
EPOCA	Ecotipo1(breva)	6,13	5,63	5,92 x 3,81
	Ecotipo 2(higo)	6,00	5,44	5,29 x 2,91
VALLE	Ecotipo1(breva)	5,13	3,85	5,55 x 3,87
	Ecotipo 2(higo)	5,88	3,20	5,24 x 3,59
CONSACOLA	Ecotipo1(breva)	6,18	3,39	6,47 x 3,63
	Ecotipo 2(higo)	6,08	4,09	7,24 x 2,36
PRADERA	Ecotipo1(breva)	6,33	3,19	6,62 x 4,02
	Ecotipo 2(higo)	5,75	3,03	5,49 x 3,36

Los valores antes señalados indican que el pH fluctúa entre 5.13 en brevas de El Valle y 6.33 para brevas de la Pradera; en tanto que, el contenido en sólidos solubles varía entre 3.03ºBrix en higos de la pradera y 5.63ºBrix en brevas de Época.

Respecto del análisis organoléptico se encuentra que la breva de tres sectores (Consacola, Valle y Pradera) es aromática mientras que el higo es aromático sólo la de dos sectores (Valle y Pradera), respecto del color se establece que la breva es Greyed – green group 193 mientras que el color del higo es Green group con tonalidades correspondientes a 143 B y C, 144 B y 193 C. Respecto del sabor de la pulpa de brea varia entre "sin sabor" (Valle y Pradera) y "amargo" (Consacola y Pradera), en tanto que para el higo el sabor es "amargo" (Valle y Época) y "semidulce" (Consacola y y Pradera).

Rendimiento en látex
El rendimiento en látex que se determina por la relación peso de látex extraído y el peso del fruto, resulta mayor en los ecotipos cultivados en la Pradera, con un valor de 1.38% para breva y un valor de 1.72 para el higo.

Rendimiento en enzima
Los mayores rendimientos de enzima se obtienen de higos del Valle con un valor de 56.58% y de brevas de la Pradera con un valor porcentual del 51.59%.

Actividad enzimática
La mayor actividad enzimçatica presenta la enzima obtenida de brevas del Valle con un valor de 21723,82 USP/mg e higo del sector la Pradera con un valor de 18771.68 USP/mg.

Rendimiento en enzima liofilizada.
Se determina en la enzima de los ecotipos con mayor actividad enzimática, estableciéndose un valor de 7% en breva del Valle y un valor de 6% en higo de la Pradera.

Actividad enzimática de enzima liofilizada
La actividad enzimática de ficina liofilizada obtenida del látex de los ecotipos Breva (Valle) e higo (Pradera) corresponden a valores promedios de 28299,96 (USP/mg) y 19148,87 (USP/mg), respectivamente.

CONCLUSIONES

Los ecotipos de *Ficus carica L* cultivados en huertos de la Pradera presentan *mayores* rendimientos en látex con valores de 1.38% para brevas y 1.72% para higos.

El rendimiento de ficina purificada es de de 56.58% en higos del Valle y 51.59%.en brevas de la Pradera.

La enzima purificada presenta las siguientes características: color amarillento, pH que oscila entre 5.2-6.6 en la de breva y valores de 6.3-6.9 en la de higos, valores comprendidos en el rango de 5.0-8.0 que es óptimo para la actividad enzimática. [9]

La mayor actividad enzimática de la ficina purificada de los ecotipos de *Ficus carica L* fueron: 21723.82 USP/mg de la Breva cultivada en el Valle y de 18771.68 USP/mg del Higo cultivado en la Pradera.

La actividad enzimática de la ficina liofilizada del ecotipo 2 (higo) cultivado en la Pradera de 19148.87 USP/mg resulta menor que la del ecotipo 1 (breva) cultivado en el valle con un valor de 28299.96 USP/mg.

BIBLIOGRAFIA:

1. DICCIONARIO ON LINE DE LAS PLANTAS MEDICINALES. Higuera - *Ficus Carica L.* Obtenida en junio 2006. Disponible en: http://personales.ya.com/plantasnet/h/higuera/higuera.htm.

2. HIPERnatural.COM. Higo - *Ficus Carica L.* Obtenida en junio 2006. Disponible en: www.hipernatural.com.

3. Enciclopedia Wikipedia. Enzima. Obtenida en julio 2006. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Enzima.

4. ALBERT, LEHNINGER. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1981. 189-222 p.

5. UHLIG HELMUT, Industrial enzymes. Industrial Enzymes and their applications. Primera Edición. 84p.

6. ENZIMAS. Obtenida en Julio del 2006. Disponible en: http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ3.htm#ae.

7. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. 2006. *"Bioquímica"*. ENZIMAS. Obtenida en Julio del 2006. Disponible en: http://www.angelfire.com/ult/bioquimicae07/intentocucs.html.

8. Arias Edison - Lastra Jorge. Publicado Wednesday 11 de February de 2004. BIOTECNOLOGÍA-TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA. Obtenida en Julio del 2006. Disponible en: http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpZyVkFplAsVKUuxgR.php

9. Fennema Owen R. Química de los alimentos. Ediciones ACRIBIA, S.A. 2000. Segunda Edición. 548p

11. BIOCHEM EUROPE. Refined Ficin – Microgranulate. Obtenida en julio 2006. Disponible en. http://www.biochem-europe.be/data05.htm

12. Enciclopedia Microsoft Encarta 2006. © 1993-2005 Microsoft Corporation. COMPOSICIÓN DE LATEX.

13. M.D Trevan, Boffey S, Goulding K. H, Stanbury P. Biotecnología: Principios Biológicos. Editorial Acribia S.A. 1990.

14. EMBI-EBI. EC. Integrated Enzyme Database (IntEnz). Obtenida en febrero 2007. Disponible en: http://www.google.com

15. PIERCE: The protein people. Immobilized Ficin. Obtenida en febrero 2007. Disponible en : http://www.google.com

16. METODOS DE INVESTIGACIÓN PECUARIA. RODRÍGUEZ DEL ÁNGEL Jaime Moisés. Editorial Trillas. 1991 Primera Edición. 120-123 p.

17. D. ARTHEY / P. R. ASHURST. Procesado de frutas. Editorial Acribia S.A Zaragoza España. 1997. 43-44 p.

18. El mundo de las plantas. Ficus carica L - higuera. Obtenida en abril del 2007. Disponible en: http://www.botanical-online.com/medicinalsfigueracastella.htm.

19. MARIA EMILIA CARRETERO ACCAME. Compuestos Nitrogenados. (*Panorama Actual Med* 2000). Obtenida en abril 2007. Disponible en: www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/

20. D. VALLÉS, S. FURTADO, A.M.B. CANTERA. Enzyme and Microbial Technology. Obtenida en abril 2007. Disponible en: https://hin-sweb.w

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL FRUTO DE TUNA

Aguirre, Andrea; Godoy, Maria Elena; Torres, María Paulina; Reyes, Jorge Felipe

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial (CETTIA)
Escuela de Industrias Agropecuarias
San Cayetano alto, eiia@utpl.edu.ec
Loja-Ecuador.

Palabras claves: propiedades físicas y químicas, rendimiento, *Opuntia ficus indica*, variedad blanca y amarilla.

RESUMEN

Se utilizaron tunas *(Opuntia ficus indica (L.) Miller)* variedad blanca y amarilla, provenientes de Cariamanga, Catamayo, Paltas y Malacatos, provincia de Loja. Se determinaron las características físico-químicas como altura, diámetro, peso, consistencia, rendimiento en pulpa, pH, sólidos solubles y acidez, así como la composición química del fruto.

Los resultados de los análisis físicos y químicos en la variedad blanca fueron: pH 6±0.5, porcentaje de sólidos solubles 10±1, acidez 0.048±0.02%, peso 98.2±11g, longitud 75.2±4mm, diámetro 51.4±3mm, consistencia 2.3±0.2Kgf; en la variedad amarilla: pH 6±0.3, porcentaje de sólidos solubles 10±2, acidez 0.061±0.02%, peso 143.4±10g, longitud 85.8±3mm, diámetro 56.8±2mm, consistencia 1.7±0.2Kgf.

Se obtuvo los siguientes rendimientos: 52±7% cáscara, 6±3% semillas, 21±3% pulpa variedad blanca, y 47±6% cáscara, 10±3% semillas, 36±4% pulpa variedad amarilla.

La determinación de la composición química de la variedad de tuna (blanca y amarilla) reportó los siguientes datos: humedad 87.1%, proteína 1.4%, grasa 0.126%, fibra 0%, pectina 0.412%, azúcares totales 13.5% y vitamina C 0.005mg/g para la variedad blanca. La variedad amarilla tiene la siguiente composición: humedad 87.8%, proteína 1.13%, grasa 0.112%, fibra 0.06%, pectina 0.297%, azúcares totales 12% y vitamina C 0.147mg/g.

INTRODUCCIÓN

La Tuna *(Opuntia ficus indica)* es fruta de zonas secas, áridas y apartadas de algunas provincias del Ecuador entre ellas la provincia de Loja. En nuestra provincia la producción de tuna se ubica en lugares como San Vicente del Río (Paltas), Nambacola (Gonzanamá), El Tambo (Catamayo), El Ingenio (Calvas), Las Limas (Espíndola), Malacatos (Loja), con una producción en el 2006 de aproximadamente 13500Kg de fruta fresca. Esta fruta se cosecha entre los meses de diciembre a marzo y es utilizada únicamente para consumo como fruta fresca, existiendo pérdida de la misma cuando no es expendida como tal, además que por tratarse de una fruta de temporada, los meses en los que no hay producción existe una total escasez. [1]

El fruto de tuna *(Opuntia ficus indica)* en las provincias del Ecuador presenta un tamaño promedio de 6.4 a 10cm de largo y un peso aproximado de 80g [2]. El momento óptimo para la recolección de la fruta lo marca la apariencia visual, el color de la piel se torna verde amarillento o verde anaranjado, en nuestro medio se la conoce como *Pintona*, inicia con el cambio de color de la pulpa y luego el pericarpio, su sabor es dulce agradable con un contenido de 13% de azúcares totales [1].

Este trabajo de investigación buscó establecer las características físico-químicas del fruto de tuna de la provincia de Loja variedad blanca y amarilla al momento de su comercialización, con la finalidad de estandarizar los parámetros de cosecha y obtener uniformidad en la calidad de las frutas tanto para su exportación como para su industrialización.

MATERIALES Y METODOS

Las frutas fueron obtenidas de plantaciones específicas (Cantón Calvas) y de plantaciones silvestres (Malacatos y cantones Paltas y Catamayo).
El muestreo se realizó en forma aleatoria, tomando diez frutas por caja; según normas INEN 378 [3] y Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense [4] para el muestreo de productos vegetales; cada caja contenía aproximadamente 12Kg y se llevó a cabo en los meses de febrero a junio, habiéndose analizado un total de 19 cajas por variedad.

Análisis físicos

Sólidos Solubles.- Se utilizó un Brixómetro de triple escalas de 0-99°Brix.
Consistencia.- Se utilizó un Penetrómetro (Fruit tester) de 0-13Kg con puntal de 11mm.
Peso y Tamaño.- El peso se lo determinó en una balanza analítica de un plato con precisión 0.05g marca OHAUS® y el tamaño de cada fruta (longitud y diámetro) se midió por medio de un calibrador.

Análisis químicos

Acidez.- Por titulación con NaOH (0.1N) y expresada como porcentaje de ácido cítrico. Método oficial: INEN 381 [5]
pH.- Para la caracterización se utilizó papel pH directamente en pulpa.

Métodos

Índice de Madurez.- La relación entre el contenido de azúcar (Brixómetro) y la acidez de la fruta (titulación) [6].
Rendimiento.- Los rendimientos de fruta, cáscara, pulpa y semillas, con respecto al fruto entero es la relación que existe entre cada uno de ellos y el peso de la fruta; de acuerdo a los residuos es la relación del peso de las semillas y de la cáscara con respecto al peso total de residuos que es la suma de los dos componentes. Los pesos se tomaron en una balanza de 15kg de capacidad total y con exactitud de 0,1g marca Andina Equipment®, Inc.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 1. Caracterización físico-química

VARIEDAD BLANCA			
pH	**°Brix**	**% Acidez***	**IM♦**
6±0.5	10±1	0.048 ± 0.02	219
VARIEDAD AMARILLA			
6 ± 0.3	10 ± 2	0.062 ± 0.02	178

FUENTE: La investigación
* Promedio de veinte repeticiones ± desviación estándar
• Expresados en g de acido cítrico por 100g de pulpa
♦IM: índice de madurez

Los valores determinados en esta investigación y presentados en el cuadro 1 están dentro de los rangos reportados por Kader, 2005 *[7]* para especies del género *Opuntia,* acidez titulable (0.03-0.12), pH(6.0-6.6) y sólidos solubles totales(12-17%), con excepción en sólidos solubles de la variedad blanca, esto se debió a que no todas las tunas analizadas tenían una madurez óptima, es decir no presentaban en su cáscara un color verde amarillo claro que cubra como mínimo el 25% de su superficie [8].

La caracterización física de la variedad de tuna blanca y amarilla comparadas con los datos establecidos por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) [9], longitud de 6.4 a 10cm y un peso aproximado de 80g para la fruta ecuatoriana, nos muestra que las tunas variedad blanca y amarilla están dentro de las especificaciones de exportación para fruta fresca. Las tunas variedad blanca con una longitud de 7.5±0.4cm, peso de 98.21±1g y una consistencia de 2.3±0.2Kgf La variedad amarilla con una longitud de 8.6±0.3cm, peso 143.4±10g y una consistencia de 1.7±0.2Kgf.

Cuadro 2. Composición química de tuna

Análisis	Variedad		Métodos
	Blanca	Amarilla	
Humedad (%)	87.1	87.8	AOAC 930.15
Proteína (%)	1.40	1.13	AOAC 954.01
Grasa (%)	0.126	0.112	AOAC 920.39
Fibra (%)	0.0	0.06	AOAC 978.10
Pectina (%)	0.412	0.297	Gravimétrico
Azucares totales (%)	13.5	12	INEN 380
Vitamina C (mg/g)	0.005	0.147	AOAC 967.21

Fuente: Laboratorio CETTIA-UTPL. Reporte 128.1 y 128.2
% Referido a 100g muestra

Al comparar la composición química de la variedad blanca y amarilla (cuadro 2) estudiadas en esta investigación se pudo observar que la variedad blanca contiene 1.5% más carbohidratos, 0.12% más pectina y 0.142mg/g menos vitamina C.

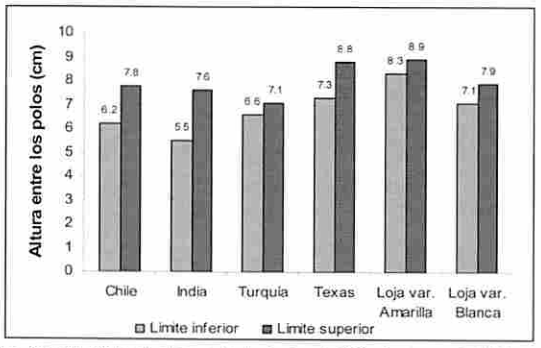
Cuadro 3. Rendimiento de la tuna (*Opuntia ficus indica*)

Variedad	Fruta entera			residuos		Fruta pelada	
	% C	% S	% P	% C	% S	% S	% P
Amarilla*	51±6	11±3	38±4	83±5	17±5	24±6	76±10
Blanca+	63±7	8±3	29±3	89±3	11±3	23±7	77±8

C.- cáscara; S.- semillas; P.- pulpa
FUENTE: La investigación
* Promedio de diez y nueve cajas de doce kg analizadas
+ Promedio de veinte y uno cajas de doce kg analizadas

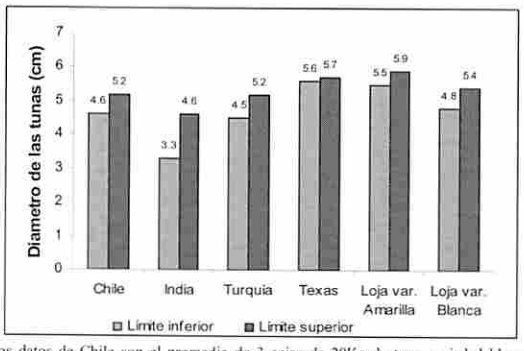
Los valores de rendimiento (cuadro 3) en esta investigación comparados con datos reportados por Cerezal y Duarte (2005) para especies de género *Opuntia [10]* pulpa (37%), cáscara (56.7%) y semillas (6.3%), determina que la variedad amarilla contiene 4.7% más semillas, 1% más pulpa y 5.7% menos cáscara, mientras que la variedad blanca posee 8% menos pulpa, 6.3% más cáscara y 1.7% más semillas, esto debido a que el rendimiento en pulpa puede ser relativamente oscilante, dependiendo de la variedad, condiciones climáticas y suelos, informándose cifras que van desde el 35% hasta el 55% [11].

Los frutos de tuna variedad blanca y amarilla se encuentran en un excelente nivel internacional en cuanto a altura, diámetro y peso (Fig. 1-3), la comparación se realizó con datos reportados por Cerezal y Duarte (2005) [10], ratificándose las categorías dadas en las normas mexicanas (NMX-FF-008 y NMX-FF-009) para las frutas analizadas, "primera" para la variedad amarilla y "segunda" para la variedad blanca con respecto a su peso. Considerando su diámetro ecuatorial las variedades están dentro de la categoría "primera" [12].



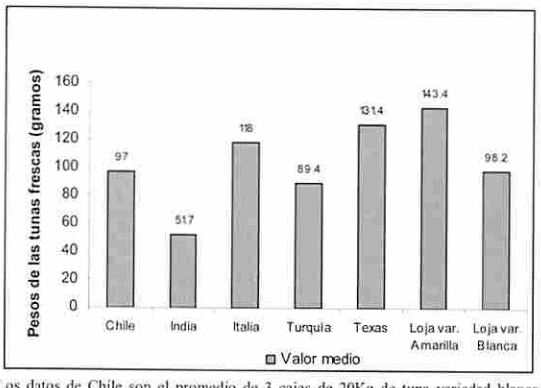
Los datos de Chile son el promedio de 3 cajas de 20Kg de tuna variedad blanca, tomando 20 unidades al azar de cada caja. No se reportan datos sobre muestreo y variedad de tuna de los demás países [10].

Figura 1. Comparación de alturas de tuna de la provincia de Loja y cultivares de otras partes del mundo.



Los datos de Chile son el promedio de 3 cajas de 20Kg de tuna variedad blanca, tomando 20 unidades al azar de cada caja. No se reportan datos sobre muestreo y variedad de tuna de los demás países [10].

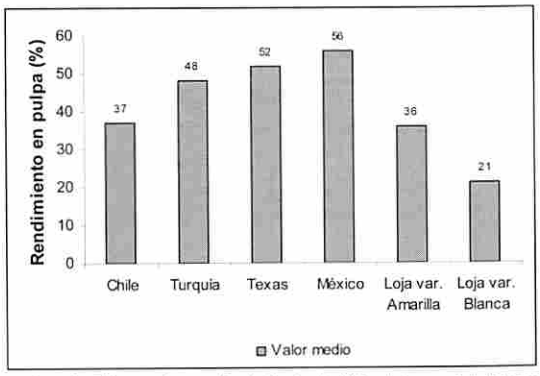
Figura 2. Comparación de diámetros de tunas de la provincia de Loja con otros cultivares del mundo



Los datos de Chile son el promedio de 3 cajas de 20Kg de tuna variedad blanca, tomando 20 unidades al azar de cada caja. No se reportan datos sobre muestreo y variedad de tuna de los demás países [10].

Figura 3. Comparación de pesos de tunas de la provincia de Loja con otros cultivares del mundo

Se estableció que el fruto nacional tiene un bajo rendimiento en pulpa (figura 4). La variedad blanca tiene 16% menos pulpa que los frutos de Chile, 27% menos que Turquía, 31% menos que Texas, 35% menos que México. La variedad amarilla tiene 1% menos pulpa que los frutos de Chile, 12% menos que Turquía, 16% menos que Texas, y 20% menos que México. Este bajo rendimiento se debe al sistema de riego ineficiente en las zonas de cultivo que se complica en la época de verano (1000 a 2000mm de precipitaciones fluviales) [13]. Cerezal y Duarte, 2005 en su investigación reportan una relación semilla/pulpa de 0.24 y además indican que la relación máxima debe ser 0.12; en la presente investigación la relación semilla/pulpa fue 0.28 para la variedad blanca y 0.29 para la variedad amarilla catalogándose al igual que los frutos analizados en el norte de Chile como un tipo de tuna de alta concentración de semillas y como consecuencia el rendimiento en pulpa disminuye [10].



Los datos de Chile son el promedio de 3 cajas de 20Kg de tuna variedad blanca, tomando 20 unidades al azar de cada caja. No se reportan datos sobre muestreo y variedad de tuna de los demás países [10].

Figura 4.- Comparación de rendimientos en pulpa de tunas de la provincia de Loja con otros cultivares del mundo

CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran que los frutos de tuna de la provincia de Loja se encuentran en una categoría de comercialización de "primera" y "segunda" con respecto a su peso, longitud y diámetro, bajo rendimiento en pulpa y alta concentración de semillas.

BIBLIOGRAFIA

1. NARVÁEZ, F. and C.I. ESPINOSA, *El Cultivo de la Tuna Cochinilla*. 2005, PROCOE-ARCOIRIS

2. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. *Tuna (Opuntia quitensis, Opuntia ficus indica)* [Documento Adobe Acrobat] 2001 May [cited 2006 February 4]; p. 3-7.

3. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN, *Conservas Vegetales Muestreo*, in *NTE INEN 378*. 1978. p. 3.

4. COMISIÓN NACIONAL DE NORMALIZACIÓN TÉCNICA Y CALIDAD, *Norma técnica obligatoria nicaragüense para el muestreo de productos vegetales*, in *norma técnica nicaragüense 17 002 -02* Comité técnico de norma, Editor. 2000. p. 3-7.

5. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN, *Determinación de acidez titulable método potenciométrico de referencia*, in *NTE INEN 381*. 1985.

6. ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICO, *Régimen de la OCDE para la aplicación de normas internacionales relacionadas con frutas y hortalizas.*, Secretaría general de la OCDE, Editor. 1992.

7. KADER, A.A., *Tuna. Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha*, in *Department of Plant Sciences*. 2005, University of California: California. p. 2.

8. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS MEXICANAS. *Productos Alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca-tuna (opuntia spp)- fruta fresca- Especificaciones*. NMX-FF-030 [Website] 1995 [cited 2006 July 05]; Available from: www.colpos.mx/bencodenormas/index.

9. M.A.G, *Tuna* Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2001(Opuntia quitensis, Opuntia ficus indica): p. 8.

10. CEREZAL, P. and G. DUARTE, *Algunas características de tunas (Opuntia ficus índica (L.) Miller) cosechadas en el altiplano andino de la 2da Región de Chile*, in *Departamento de Alimentos. Facultad de Recursos del Mar*. 2005, Universidad de Antofagasta: Antofagasta, Chile. p. 42-47.

11. CEREZAL, P. and G. DUARTE, *Utilización de cáscaras en la elaboración de productos concentrados de tuna (Opuntia ficus indica (L.) Miller)*, in *Departamento de Alimentos. Facultad de Recursos del Mar*. 2005, Universidad de Antofagasta.: Antofagasta, Chile. p. 62.

12. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS MEXICANAS. *Productos Alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca-tuna (opuntia spp)- fruta fresca- determinación del tamaño en base al peso unitario.* . NMX-FF-008 [Website] 1995 [cited 2006 July 05]; Available from: www.colpos.mx/bencodenormas/index.

13. CONSORCIO ATA - UNP - UNL. *Caracterización hídrica y adecuación entre la oferta y la demanda. Caracterización territorial y documentación básica.* [website] 2005 [cited 2006 December]; Available from: http://www.catamayochira.org/documentos/cbiofisica.pdf.

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES QUÍMICAS ENTRE UNA MATRIZ GELIFICANTE DE ALGINATO DE SODIO Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO PARA LA FORMACIÓN DE UNA PELÍCULA BIODEGRADABLE

Arias-Cruzado E.Y.[1], Torres-Bojórquez A.E.[1], Villaseñor-Ortega, F.[1], Luna-Barcenas G.[2] y Pérez-Pérez C.[1]

[(1)]Instituto Tecnológico de Celaya, Dpto. Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N
38040. Celaya, Gto. Tel. 01 (461) 6117575 Ext. 329, 209. Fax. 01(461) 6117575 Ext. 402.
[(2)] CINVESTAV-Qro. Libramiento Norponiente 2000, Frac. Real de Juriquilla CP 76230, Santiago de Queretaro. Tel 01(442)4414900 Fax 01(442)4414939

Palabras Clave: empaques activos, alginato de sodio, aceite esencial de orégano.

RESUMEN.

Los empaques antimicrobianos que forman parte del campo de los empaques activos, han ganado importancia en las últimas décadas por su biodegradabilidad y compatibilidad por el ambiente. Existen compuestos naturales provenientes de aceites esenciales de plantas o especias ricas en compuestos biológicamente activos como flavonoides y ácidos fenólicos que poseen un amplio rango de propiedades antimicrobianas para el control del crecimiento de bacterias. La incorporación de éstos compuestos antimicrobianos naturales dentro de cubiertas comestibles es un nuevo método para el control del crecimiento de patógenos en las superficies de los alimentos. La importancia del conocimiento de las interacciones químicas presentes en el sistema de la película es una base para proponer mecanismos de acción del agente antimicrobiano a través de la matriz. El objetivo de este trabajo fue producir una película biodegradable y comestible; evaluando las interacciones químicas entre la matriz gelificante de alginato de sodio y el aceite esencial de orégano, como agente activo, mediante Espectroscopia de Infrarrojo, Difracción de Rayos X y Microscopia Electrónica de barrido. Los resultados obtenidos de los análisis estructurales indicaron buena miscibilidad de todos los componentes de la película mediante uniones de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre el aceite esencial de orégano y la matriz de alginato de sodio, mediante microscopia electrónica de barrido se encontró que el agente activo esta siendo retenido por la matriz gelificante; mientras que con la difracción de Rayos X se observó que las películas sin sales de calcio eran 100% amorfas.

INTRODUCCIÓN.

El crecimiento microbiano sobre las superficies de alimentos cárnicos es la mayor causa de deterioro, en particular la contaminación bacteriana en productos listos para comer. Debido a esto, controlar el contenido de microorganismos patógenos en los alimentos continúa siendo un importante objetivo para la industria alimenticia. Los empaques comestibles y biodegradables pueden servir como "acarreadores" de un amplio grupo de aditivos, incluyendo antimicrobianos y antioxidantes provenientes de fuentes naturales haciéndolas una herramienta cada vez mas utilizada. Los agentes antimicrobianos usados en aplicaciones alimenticias incluyen ácidos orgánicos, bacteriocinas y especias ricas en compuestos antimicrobianos como el aceite esencial de orégano. El modo de actuar de las cubiertas comestibles y biodegradables con la incorporación de agentes antimicrobianos se localiza en la superficie del alimento, donde los agentes antimicrobianos son liberados lentamente y de este modo permanecen a altas concentraciones por largos periodos de tiempo permitiendo extender la vida útil del alimento.

Los cambios que se llevan a cabo a nivel químico entre las estructuras de los componentes de la película son los que van a determinar la actividad antimicrobiana de la misma, proveniente del aceite esencial de orégano, siendo importante conocer la formación de enlaces y estructuras formadas entra la matriz gelificante de alginato de sodio con el aceite esencial de orégano.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Las películas a base de alginato de sodio (Sigma-Aldrich. viscosidad: 20,000 - 40,000 cps) se producen de acuerdo a la técnica de Pavlath y col., 1999 con algunas modificaciones; se preparó una suspensión filmogénica formada por 2 % (p/v) de alginato de sodio disuelto en 100 mL de agua destilada con agitación magnética a temperatura de 70° C durante 30 minutos, para después agregar 1 % (p/v) de glicerol como plastificante (Fermont 06441PA), manteniendo un pH entre 7 y 7.5 en la solución, se disminuyó la temperatura hasta 40° C de manera natural y se agregó el 2% (v/v) de aceite esencial de orégano como agente activo agitando en el Ultra-Turrax IKA-T25 a 6500 rpm, y una cantidad de 0.02% (v/v) de Tween 80 (HYCEL de Mex., CAS9005-656) como agente emulsificante y tensoactivo para ayudar a incorporar completamente el aceite esencial de orégano en la matriz de alginato de sodio. Al final se agregó una solución de 0.2 % y 0.5 % de $CaCO_3$ y gluconato de calcio respectivamente en las películas que indicó el diseño experimental factorial fraccionado 2^3; agitando a 7000 rpm durante 5 min más obtenemos una perfecta incorporación de todos los componentes de la película.
La solución filmogénica completamente homogénea se vierte en cajas petri de plástico y se secan a temperatura ambiente de 24 a 36 hrs. y se almacenan a temperatura ambiente en papel aluminio. Se empleó un diseño experimental factorial fraccionado2^3, obteniendo 8 ensayos y como control se agregó un noveno ensayo formado por 2% (p/v) de alginato de sodio sin glicerol.

Interacciones Químicas en las Estructuras de las películas.

Espectroscopia de Infrarrojo.

Las películas obtenidas fueron estudiadas con espectroscopia de infrarrojo utilizando un equipo espectrofotómetro Spectrum One, (Perkin Elmer) equipado con reflectancia total atenuada y un detector de alta linearidad, dentro de la región espectral 4000-500 cm^{-1}. Se analizó el alginato de sodio de manera sólida y formando la matriz gelificante con glicerol, la película con y sin aceite esencial de orégano además de glicerol y tween 80, y la película con y sin adición de sales de calcio. Los resultados fueron comparados con el fin de evaluar el efecto de la adición de cada compuesto y las uniones formadas de acuerdo a la intensidad y los cambios en las bandas de infrarrojo relacionadas a las interacciones moleculares.

Difracción de Rayos X.

Las películas se analizaron en un Difractómetro de Rayos X (Rigacuza DMAX/ 2100), sometiéndose a una radiación de Cu-Kα con un voltaje de 30 kV y una corriente de 16 mA, las corridas se realizaron en un intervalo de 2 θ desde 4 hasta 90°, con la finalidad de conocer la naturaleza química cristalina o amorfa de las películas obtenidas.

Microscopia Electrónica de Barrido.

Las muestras de película se cortaron en cuadros de aproximadamente 1 cm de lado y se depositaron en una placa de metal para introducirlos en un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30 ESEM), se realizaron micrografías a 100x, 500x y 1500x aumentos a temperatura ambiente, la distancia de trabajo se mantuvo entre 15.4 y 16.4 mm y el voltaje de aceleración usado fue de 5 kV, para caracterizar visualmente la superficie de las películas que contenían sales de calcio y las películas con y sin aceite esencial de orégano.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados de la espectroscopia de infrarrojo del alginato sólido y matriz con glicerol se muestran en la figura 1. Se presentan los picos característicos de los compuestos O –H asociados a una longitud de onda de 3000-3600 cm^{-1}, intensificándose en la matriz con alginato y glicerol, lo que se debe al cambio de grupos hidroxilo libres a hidroxilos en polímero, además de los enlaces C –H a longitudes de 2850-2950cm^{-1}, el pico asimétrico de COO^- en una longitud de onda de 1600cm^{-1}, se identificó igualmente un pico a longitud de onda de 1410cm^{-1} que representa a los grupos COO- y O –H, además de enlaces C –O y C –O –C a longitudes de onda de 1180cm^{-1} y 1030cm^{-1} respectivamente.

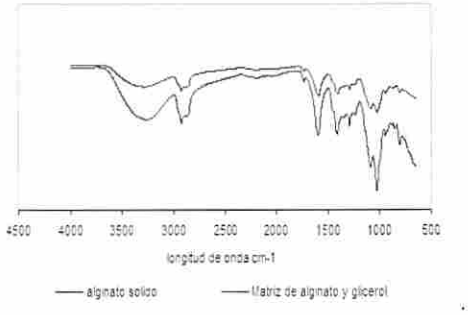


Figura 1. Espectros de infrarrojo del alginato en forma sólida y en suspensión filmogénica

En la figura 2 se comparan los espectros de infrarrojo del aceite esencial de orégano y la película conformada por alginato de sodio, glicerol, aceite esencial y tween 80, se observan bandas de absorción diferentes y aumento de intensidad de los mismos que indican los cambios a nivel estructural y las interacciones electrostáticas que se están realizando entre la matriz gelificante y el aceite esencial de orégano en la película. Las regiones características para los anillos aromáticos di-sustituidos presentes el aceite esencial de orégano a longitudes de onda de 1600 – 2000 cm^{-1} y 840 – 1000 cm^{-1}, se ven disminuidos al formar parte de la película como en la banda a longitud de 1200 cm^{-1}.

En la figura 3 se comparan dos películas formuladas por alginato de sodio, glicerol, aceite esencial de orégano y T80; con y sin la adición de sales de calcio, se observó que no se producen cambios significativos a nivel estructural, únicamente la disminución de intensidad de las bandas, esto debido a que las sales de Calcio incrementan la fuerza intramolecular dándole a la película un grado de cristalinidad.

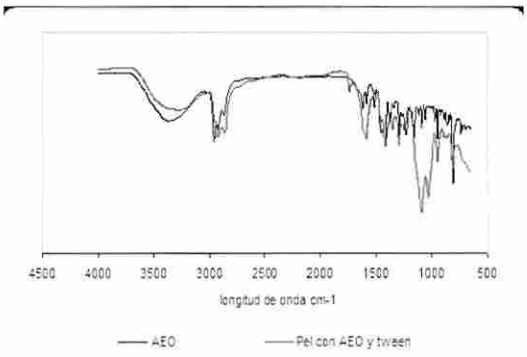


Figura 2. Espectros de infrarrojo del aceite esencial de orégano individual y en matriz gelificante.

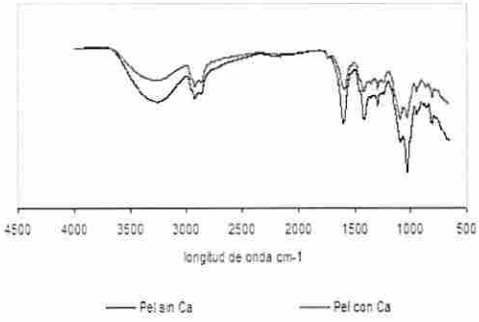


Figura 3. Espectros de infrarrojo de la película con aceite esencial de orégano, con y sin sales de calcio

Difracción de rayos X.

Por medio de la difracción de rayos X (Figura 4) se observó que tanto las películas de alginato de sodio y glicerol, como las que contenían aceite esencial de orégano (AEO) y tween 80 (T80) fueron totalmente amorfas, sin presencia de ningún pico cristalino distinguible.

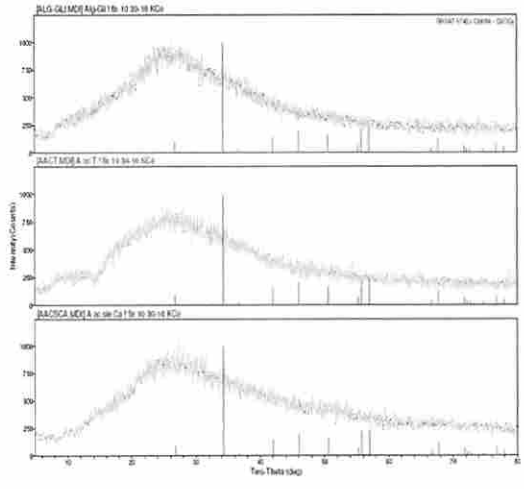


Figura 4. Difractograma de rayos X de la matriz gelificante de alginato de sodio y glicerol; alginato de sodio, glicerol, AEO; alginato de sodio, glicerol, AEO, T80.

En la figuras 5 se muestra el difractograma de la película formada por alginato de sodio, glicerol, AEO, tween 80 (T80) y sales de calcio, donde se obtuvo un pico cristalino de mayor intensidad en 2 θ = 33° correspondiente a la calcita que se tiene en su estructura.

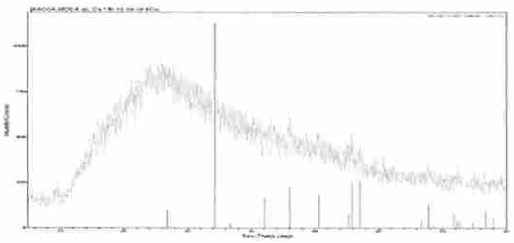
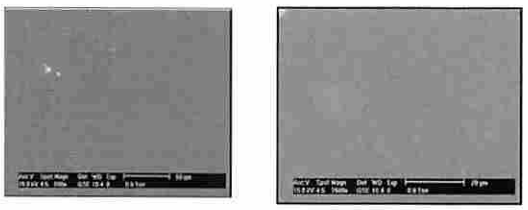


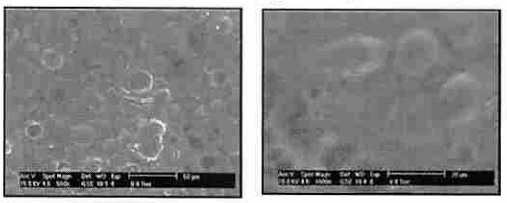
Figura 5. Difractograma de Rayos X de la película con aceite de orégano y sales de calcio.

Microscopia Electrónica de Barrido.

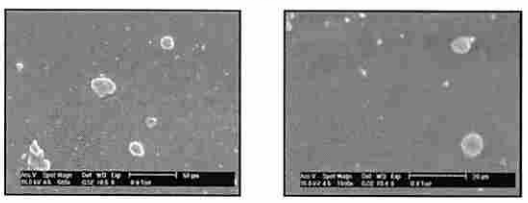
Los resultados de la microscopia electrónica de barrido de una película formada por alginato de sodio y glicerol en la figura 6 (a) presentan una superficie lisa, mientras que la película formada por algún alginato, glicerol, aceite esencial de orégano (AEO), y tween 80 (T80) en la micrografía (6b) demuestra que el aceite esencial de orégano se retiene en la matriz gelificante lo que permite su retención en la matriz de alginato, mientras que la película con sales de calcio forma cristales en la superficie gelificante (6c).



a) Alginato de sodio y glicerol (500x, 1500x)



b) Alginato de sodio, glicerol, AEO, Tween 80 (500x, 1500x)



c) Alginato de sodio, glicerol, AEO, T80, Ca

Figura 6. Microscopia electrónica de Barrido de las películas de alginato, con y sin AEO, con y sin cales de calcio.

CONCLUSIONES.

Las propiedades químicas de las películas a base de alginato de sodio, varían al agregar glicerol incrementándose los espacios en la red gelificante lo que provoca un incremento de intensidad en los picos característicos del alginato de sodio sólido; la adición de aceite esencial si presentó cambios de intensidad de bandas debido a las interacciones electrostáticas y químicas entre los componentes aromáticos y fenólicos del aceite esencial de orégano localizados entre 1200 - 1460 cm^{-1} y la matriz de alginato, las sales de calcio en conjunto con el aceite esencial de orégano aumentan la cristalinidad en la película, incrementando las fuerzas electrostáticas de la matriz de alginato por lo que la intensidad de la banda de la película conteniendo sales de calcio se ve reducida.

A través de la técnica de difracción de rayos X se encontró que el patrón de difracción de las películas es 100 % amorfo, y las películas que contienen sales de calcio pueden considerarse con un 98 % amorfo y 2 % de naturaleza cristalina.

El análisis de las interacciones químicas permite concluir que los componentes que conforman la película interactúan entre sí para formar una matriz con buenas propiedades mecánicas y con la capacidad de retener el agente antimicrobiano activo.

AGRADECIMIENTOS.

Al CONACYT y al CONCYTEG por la beca otorgada a los estudiantes para la realización de la presente investigación. Al M. C. Salvador Lecona Uribe de la Universidad Politécnica de Guanajuato por el donativo del agente activo. A la M. C. Araceli Mauricio, Q. A. Martin Landaverde y al M. C. Eleazar Urbina del CINVESTAV Querétaro por su apoyo técnico en las pruebas de caracterización química.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Pavlath A.E., Wong D., Gregorski K., Hudson J. 1999. Calcium Alginate Films: Thermal Properties and Permeability to Sorbate and Ascorbate. *J. Food Sci.* 61(2): 337-341.

Salmieri S., Lacroix M. 2006. Physicochemical Properties of Alginate/ Polycaprolactone-Based Films Containing Essential Oils. J. *Agric. Food Chem.* 54, 10205-10214.

DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE OREGANO MEXICANO (*Lippia spp.*) SECO Y FRESCO.

Arroyo, Izlia Jazheel; Hernandez, Haydee Yazmin; Cruz, Maria Teresa.
DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Prolongación de Carpio esquina Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás, Del. Miguel Hidalgo, CP. 11340
México, DF., Tel. 57-29-6000 Ext. 62464, izlia27@yahoo.com.mx

Palabras clave: Actividad antioxidante, compuestos fenolicos, *lippia sp.*

RESUMEN

La actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales de extractos de orégano mexicano (*Lippia spp*) seco y fresco fueron determinados. El contenido de fenólicos totales, determinado de acuerdo al método de Folin-Cicalteu, fue de 0.39 y 0.97 g /100 g de sólidos secos para extractos de orégano seco y fresco. La Actividad Antioxidante de los extractos etanólicos se evaluó de acuerdo al método de blanqueamiento de β-caroteno se expreso como AOX (Δ log A_{470}/min), AA (porcentaje de inhibición comparada con el control), OOR (proporción de oxidación), AAC (coeficiente de actividad antioxidante) y fue de 0.106, 92.9, 0.071, 971.1 y 0.115, 88.3, 0.117, 570.9 para extractos de orégano seco y fresco respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Con el nombre de orégano se conocen en la República Mexicana aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas, las cuales son: vervenaceas, labiadas, compuestas y leguminosas (Escobar,1991; Huerta, 2002).

La característica que distingue a la mayoría de estas especies es su extraordinario poder saborizante, fácil de percibir cuando se añaden sus hojas frescas o secas, o sus extractos y concentrados acuosos, a un sinnúmero de productos alimenticios frescos, procesados y envasados. El aroma y sabor que los diversos tipos de orégano proporcionan a los alimentos los hacen agradables al olfato, al paladar y favorecen su digestión (Huerta, 2002).

La mayoría de las especies de orégano poseen notables propiedades medicinales, que se explican por la extraordinaria y compleja composición química que tienen estas plantas. El creciente interés por el uso de extractos obtenidos de plantas como alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades ha revelado un importante potencial del orégano. Se ha demostrado que el orégano contiene sustancias antioxidantes, por lo que no solo es benéfico para la salud humana, sino que además se puede utilizar para sustituir a los aditivos sintéticos de los alimentos. El orégano comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios, y para éste fin los especies mas comunes son: el *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México. Los componentes principales de las especies de *Origanum* son el limoneno, el β-cariofileno, el p-cimol, el linalol, el canfor, el α-pineno, el carvacrol y el timol, en el género *Lippia* pueden encontrarse estos compuestos. Especialmente, el fenol monotérpenico carvacrol, el cuál es el mayor constituyente del orégano comercial recibe especial énfasis debido a su baja toxicidad y al amplio intervalo de actividad biológica (antibacterial, antifúngica, antioxidante, etc.) que presenta esta molécula. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y la etapa de crecimiento. Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas a consecuencia del creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos por una opción natural (Arcila-Lozano, y cols., 2004; Baricevik, D., Bartol, T., 2002).

Los resultados de experimentos con orégano confirman el potencial de esta planta y motivan para su mejor aprovechamiento, además se debe tener en cuenta la importancia de explorar más los beneficios del orégano y entender a fondo los procesos que le dan funcionalidad a sus propiedades biológicas tan diversas y atractivas (Arcila-Lozano y cols., 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Orégano fresco proveniente del estado de Morelos, Mexico, adquirido en el Mercado de Jamaica en lotes de 1 kg, cada lote se seleccionó, se limpió y se seco a la sombra por 5 días, los lotes de orégano se adquirieron con el mismo proveedor y se analizaron en el departamento de botánica para determinar su especie.

Métodos.

Extracción

Para la obtención del extracto alcohólico (etanol) de orégano: a 5 g de orégano fresco/seco se trataron en un equipo Soxhlet con alcohol como disolvente durante 4 horas. El volumen final de extracto fue de 150 mL.

Determinación de Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos de orégano y el estándar (BHT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fue determinado de acuerdo al método de blanqueamiento de β-caroteno siguiendo una modificación del procedimiento descrita por Marco (1968). Para la determinación, a un matraz de 50 mL conteniendo 0.02 mL de ácido linoléico, 0.2 mL de Tween 20, se le adicionó 1 mL de la solución de β-caroteno (0.2 mg/mL en cloroformo), se mezcló bien y se le agregó 0.2 mL del extracto de orégano. Después de evaporarlo hasta la sequedad se le adicionaron 30 mL de agua oxigenada al 5%, se agitó y se sometió a autooxidación térmica a 50 °C por 2 horas. La absorbancia de la solución se midió en un espectrofotómetro a 470 nm tomando lecturas de las muestras cada 10 minutos (Velioglu y cols., 1998). Las lecturas se realizaron por triplicado. Se realizó un control (con metanol al 80%, con hexano al 80% y con agua) y un estándar (BHT), además de un blanco de reactivos.

Determinación de Fenoles Totales

El total de fenolicos se determinaron usando el reactivo Folin-Cicalteu (Rangana, 1986). Para la curva estándar se tomaron alícuotas de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4 mL de solución de ácido tánico (1 mL = 0.1 mg de ácido tánico) en tubos conteniendo 7.5 mL de agua, se añadieron 0.5 mL de reactivo Folin-Cicalteu y 1 mL de solución de carbonato de sodio saturada al 35% completando a 10 mL con agua. Se mezcló bien y midió el color después de 30 minutos a 760 nm contra el blanco experimental ajustando la absorbancia a cero. Se trazó absorbancia contra concentración para obtener la curva estándar.

Para la muestra se procedió igual que en la curva estándar, tomando alícuotas de los extractos de oregano.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se observa que el contenido de fenoles totales en base seca es mayor en el extracto de orégano fresco, ya que este valor aumenta al hacer la corrección de humedad, puesto que el orégano fresco tiene un 71.1 % de contenido de humedad y el orégano seco tiene un 7.16 %.

CUADRO 1. Contenido de fenolicos totales en los extractos de orégano seco y fresco.

Muestra	Condiciones Soxhlet	Contenido de fenoles (g/100g) bs
Orégano seco	Alcohol (5g/150 mL), 4h	0.39 ± 0.02
Orégano fresco	Alcohol (5g/150 mL), 4h	0. 97 ± 0.01

En la Figura1 e observa que el extracto de orégano seco en alcohol muestra actividad antioxidante muy parecida al estándar (BHT) y dicha actividad se va manteniendo a lo largo del tiempo que dura la determinación. En la Figura 2 se puede observar que el extracto de orégano fresco también muestra actividad antioxidante, aunque en menor grado, no obstante el contenido de fenoles presentes en el extracto es mayor.

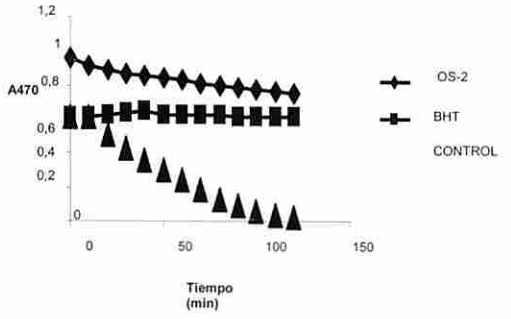


Figura 1. Actividad Antioxidante del Extracto de orégano seco en alcohol (20.83 mg de orégano, 0.081 mg de fenoles) comparada con BHT (0.3mg/mL) y con un control (metanol 80%).

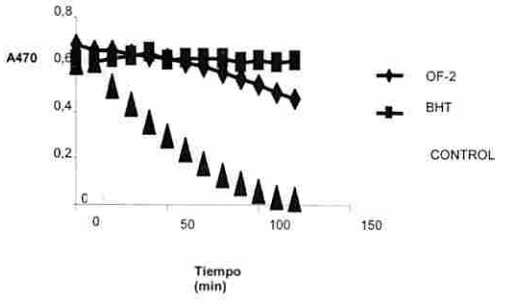


Figura 2. Actividad Antioxidante del Extracto de orégano fresco en alcohol (19.23 mg de orégano, 0.187 mg de fenoles) comparada con BHT (0.3mg/mL) y con un control (metanol 80%).

En el Cuadro 2 se observa la relación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante.

Cuadro 2. Relación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante.

Muestra	AOX (A/h)	AA (%)	ORR	AAC	Fenoles totales (g/100 g) bs
Orégano seco	0.106	92.9	0.071	971.1	0.39 ± 0.02
Orégano fresco	0.115	88.3	0.177	570.9	0. 97 ± 0.01

Como se menciona arriba, un alto contenido de fenoles no necesariamente indica que el extracto tendrá una mayor actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

Con la determinación de Actividad Antioxidante se pudo demostrar que tanto los compuestos de orégano fresco y orégano seco presentaron actividad antioxidante muy cercana a la del estándar BHT (300 mg) como lo es para el extracto de orégano seco en alcohol (20.83 mg) , para el extracto de orégano fresco en alcohol (19.23 mg), cuya AA fue de 92.9 y 88.3 % respectivamente. Lo anterior se puede deber a que uno de los compuestos con mayor AA encontrados en el orégano es el carvacrol y este compuesto es soluble en alcohol.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó dentro del Programa de Formación de Investigadores (PIFI) con clave CGPI 2007 a cargo de la M. en C. Haydee Yazmin Hernandez Unzon.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

-Aligiannis , N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. J. Agric. Food Chem. 49: 4168-4170.

-Alvarez, G.P., 1963. Hierbas medicinales: como curarse con plantas. Editorial El libro español, México. P. 372.

-Anónimo, 2003. Infoagro. El cultivo del orégano.

-Arcila, C.; Loarca-Piña; Lecona-Uribe, S.; Gonzalez, E., 2004. Biological activity and composition of essential oil from Mexican oregano. Botanical and dietary supplements for woman's Health: Frontiers in Research. Functional Foods for Health Program 12th Annual Conference. Schaumburg, Il.

-Azuma, K.; Ippoushi, K.; Ito, H.; Terao, J., 1999. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipids bilayers. J. Sci. Food and Agric. 79: 2010-2016-

-Badui, D.S., 1984. Química de los alimentos. Editorial Alambra Mexicana. P. 29-35, 259-265.

-Baratta, M.T.; Dorman H.J.D.; Deans, S.J.; Biondi, D.M.; Ruberto, G., 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. J. Essent. Oil Res. 10(6):618-627.

-Baratta, M.T.; Dorman H.J.D.; Deans, S.J.; figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Ruberto, G., 1998. Antimicrobial and antioxidants properties of some commercial essential oils. Flavour Fragance J. 13:235-244.

-Baricevik, D.; Bartol, T., 2002. In: Oregano.The genera Origamun and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Edited by Spiridon E. Kintzios, Athens Greece. Taylor and Francis. London and New York. Chap. 8. P. 177-213.

-Bayo, I.F., 2003. Ciencia y tecnología, Madrid. Edita Alberto Aguilera. Diario directo.

-Belitz, W.G., 1999. Food Chemistry. Editorial Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. P. 905-908.

-Escobar, R., 1991. Enciclopedia agrícola y alimentos afines. Tomo II F-O, México. P. 974.

-Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; L. Gao and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fuits, vegetables and grain products. Journal Agricultural Food Chemistry 46:4113-4117.

CARACTERIZACION DE ALMIDÓN ACETILADO DE PLÁTANO CON ALTO GRADO DE SUSTITUCIÓN.

Denisse Guerra-Della Valle, Mayra Rivas-González, Rosalía A. González-Soto, Javier Solorza-Feria, Luís A. Bello-Pérez*. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos CeProBi-IPN. Carr. Yautepec-Jojutla Km. 8.5, Col. San Isidro, C.P. 62730 Yautepec, Mor. *Email: labellop@ipn.mx

Palabras clave: Propiedades químicas, *Musa paradisiaca* L, CDB, MEB, Acetilación.

RESUMEN

El almidón es ampliamente utilizado en el sector industrial, en estado nativo presenta buenas propiedades funcionales sin embargo, no resiste los esfuerzos de corte, temperatura y pH's extremos; esto se puede solucionar con la modificación química del almidón, siendo la acetilación la de mayor utilización. Se han señalado a diferentes especies de plátano como una buena fuente para la obtención de almidón, ya que esté polisacárido es el principal componente del plátano antes de llegar a su maduración. El objetivo del presente estudio fue obtener almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) modificado por acetilación con alto grado de sustitución (GS) y comparar los rendimientos obtenidos con almidón de maíz (Zea mays) acetilado con alto grado de sustitución, así como evaluar algunas de sus propiedades (propiedades térmicas por calorimetría diferencial de barrido, microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier). La eficiencia de la reacción de acetilación fue baja sin embargo, se obtuvieron almidones acetilados con alto GS, con valores de grupos acetilos de 44.9% en maíz y 41.1% en plátano; lo cual equivale a un GS de 3 y 2.6 respectivamente. Estos valores muestran que el almidón de maíz se acetila en mayor proporción que el almidón de plátano. Con los resultados del FTIR se corroboraron estos resultados. Los resultados de microscopía muestran que los gránulos de plátano presentan un daño menor que los gránulos de almidón de maíz. La temperatura (Tp) y entalpía (ΔH) de gelatinización se vieron afectadas por la reacción de acetilación de los almidones.

INTRODUCCIÓN

El almidón se sintetiza en plantas como polisacárido de almacenamiento, se obtiene de varias fuentes como son las semillas de cereales, (maíz, trigo, arroz) y de algunas raíces y tubérculos, (papa, camote y tapioca); en los últimos años a tomado gran importancia la obtención del almidón de frutos que aun no llegan a su estado de madurez (verdes), ya que los frutos en este estado tienen un alto contenido de almidón. Una de las fuentes más utilizadas para la obtención de almidón es el maíz ya que este cereal presenta un alto contenido de este polisacárido, debido a la amplia utilización del maíz, y al déficit de este grano en nuestro país, en la actualidad se buscan fuentes alternativas para la obtención de almidón. Zhang et al. (2005) señalan a diferentes especies de plátano como una buena materia prima para la obtención de harina o almidón, ya que éste polisacárido es el principal componente del plátano antes de llegar a su maduración del 70 – 80% en base seca. El almidón en estado nativo es ampliamente utilizado en el sector industrial, como excipiente en tabletas, agente de relleno, floculante y adhesivo; como materia prima presenta buenas propiedades funcionales sin embargo los almidones nativos no resisten los esfuerzos de corte, temperatura y pH's extremos; lo que puede solucionarse modificando el almidón. El tipo más común de modificación del almidón es el tratamiento con pequeñas cantidades de reactivos químicos, debido a su alta eficiencia y a que brinda la posibilidad de controlar parámetros que influyen en las propiedades del material. Una de las modificaciones químicas de mayor utilización es la acetilación, debido a que aumenta la estabilidad de las pastas que se forman con el almidón acetilado. Los almidones acetilados con bajo GS son comúnmente utilizados en la industria de alimentos ya que les imparte consistencia, textura y estabilidad; y los almidones con alto GS han sido utilizados como termoplásticos, sustitutos de acetato de celulosa (de Graaf et al. 1995, Xu et al. 2004, Saartrat et al. 2005).

El objetivo de este trabajo fue obtener almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) modificado por acetilación con alto grado de sustitución y comparar los rendimientos obtenidos con el almidón de maíz (Zea mays) acetilado con alto grado de sustitución, así como evaluar algunas propiedades de los almidones acetilados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó almidón de maíz comercial donado por Corn Products International y el almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L) se aisló a nivel planta piloto siguiendo la metodología propuesta por Flores-Gorosquera et al. 2004, utilizando plátanos en estado verde fisiológico.

Acetilación del almidón

La modificación por acetilación de los almidones se realizó siguiendo la metodología de Mark y Mehltretter (1972) con algunas modificaciones; el almidón de ambas fuentes se mezcla con 120 mL de anhídrido acético (Reasol, MR) dentro de un matraz de reacción con 2 bocas agitando a 200 rpm con un mezclador (Ika-Werke, Cincinnati, Oh.), después de homogenizar por 5 min, se añadieron 0.15 g de NaOH al 50% por gramo de almidón. La temperatura se incrementó a 123° C, aproximadamente en 15 min, al llegar a esta temperatura se contabilizó el tiempo de reacción (5 h). Al finalizar el tiempo establecido, se retira la reacción del calor para disminuir la temperatura a 70° C y el almidón se recuperó mediante la suspensión del almidón en 100 mL de alcohol etílico 96°, se centrifugó lavando el residuo con alcohol y posteriormente con agua hasta eliminar el anhídrido. Después de los lavados la pasta de almidón que se obtuvo se secó en la estufa a una temperatura de 50° C durante 24 h.

Determinación del porcentaje de grupos acetilos (CH_3-C=O) (Wuzburg, 1964)

La medida del contenido de acetilo se basa en la titulación de los residuos acetilo después de someter la muestra a un tratamiento alcalino. Se pesó 1 g de almidón acetilado (base seca) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se añadieron 50 mL de solución de etanol al 75%, tapando ligeramente el frasco se colocó en baño de agua a 50° C con agitación por 30 min. Se dejó enfriar y se le adicionaron 40 mL de KOH 0.5 N y unas gotas de fenolftaleína mientras se agitaba. Se tapó el frasco y se dejó por 72 h con agitación eventual. Transcurridas las 72 h, la muestra saponificada se tituló con HCl 0.5 N usando fenolftaleína como indicador se dejó reposar por 2 h luego de lo cual se tituló el álcali adicional que pudo haber lixiviado de la muestra. El mismo procedimiento se realizó en el almidón nativo para utilizarlo como referencia.

Determinación del grado de sustitución (GS) y de la eficiencia (E) de la reacción de acetilación (Wuzburg, 1964)

Posteriormente se determinó el GS en el almidón acetilado que equivale al número promedio de grupos OH que se reemplazaron por grupos CH_3-C=O en la UAG. Con los gramos de anhídrido acético utilizados por 100 g de almidón se calculó el porcentaje de acetilo teórico.La eficiencia de la reacción se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{\% \text{ Acetilo real}}{\% \text{ Acetilo teórico}} \times 100$$

Calorimetría diferencial de barrido (CDB).
Las propiedades térmicas de los almidones nativos y modificados fueron evaluadas con un Calorímetro Diferencial de Barrido (CDB, TA Instruments, modelo 2010, New Castle, USA) previamente calibrado con indio. Se utilizó el método propuesto por Paredes-López y col. (1994). Se pesaron 2 mg de muestra (base seca) directamente en charolas de aluminio y se adicionaron 7 µL de agua desionizada dejando reposar 30 min. Las charolas de aluminio se sellaron herméticamente y se dejaron estabilizar otros 30 min antes de realizar el análisis. Como referencia, se utilizó una charola de aluminio vacía. Las muestras se sometieron a un programa de calentamiento en un intervalo de temperatura de 10 a 120 ° C, con incrementos de 10 ° C/min. La temperatura de pico ó de gelatinización (Tg), así como la entalpía de transición (ΔH), fueron obtenidas directamente a partir del análisis de los termogramas.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).
La microscopía electrónica de barrido provee una mayor perspectiva de la superficie del gránulo de almidón así como de su morfología. Se utilizó el método reportado por Paredes-López et al. (1989). La muestra de almidón se espolvorea sobre una cinta conductora de cobre de doble adhesión, la cual se fija previamente en un porta especies de aluminio del microscopio electrónico de barrido JEOL (modelo JSEM 35CX, Japan electronic optical limited, Japón). Las muestras se colocaron en el ionizador de metales JEOL y se recubrió con una capa de oro de 60 nm. Las muestras fueron observadas al microscopio electrónico de barrido a un voltaje de 8 KV y se tomaron las fotografías.

Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).
Los espectros de FTIR de los almidones nativos y acetilados se realizaron con el método de KBr (Pushpamalar et al. 2006), se molieron y mezclaron KBr y las muestras de almidón en una relación 4:1 hasta obtener partículas finas y homogéneas; posteriormente, se formó la pastilla por prensado y esta se analizó en un espectrómetro marca MIDAC modelo prospect serie 269, utilizando 16 escaneos en la región de 400 a 4000 cm^{-1}.

Análisis estadístico.
Se realizó un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de t de student, con un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$) en el programa estadístico Sigma-stat, en caso de haber diferencias significativas entre las medias se aplicó un método de comparación múltiple de Tukey al mismo nivel de significancia (Walpole y col., 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La eficiencia de la reacción de acetilación para almidón de maíz fue de 57% y 52% para almidón de plátano. Estos datos son similares a los que obtuvieron Xu et al. (2004) a la mismas condiciones de reacción. El porcentaje de grupos acetilos que se obtuvo fue de 44.9 en almidón de maíz y 41.1 en almidón de plátano, esto equivale a grados de sustitución (GS) de 3 y 2.6 respectivamente. Los valores obtenidos para el almidón de maíz son similares a los reportados por otros autores (Mark y Mehltretter 1972; Khalil et al. 1995; Xu et al. 2004), sin embargo en el caso del almidón de plátano, no se llegó al GS máximo, esto se puede atribuir a que durante el proceso de obtención del almidón nativo de plátano, quedan residuos de algunas impurezas que pueden impedir la difusión y adsorción de los grupos acetilos en la molécula de almidón.

Caracterización de los almidones acetilados.
Las propiedades térmicas de los almidones nativos y modificados se muestran en el Cuadro 1, la temperatura (Tp) y entalpía (ΔH) de gelatinización de los almidones acetilados con bajo GS son menores que las de los almidones nativos, esto se atribuye a que durante la modificación ocurre un daño físico del gránulo, lo cual provoca que disminuya la cantidad de energía necesaria para realizarse la transición de fase; sin embargo, los almidones acetilados con alto GS aumentan su Tp, (enfatizándose en el caso del almidón de plátano) donde probablemente debido a la introducción de los grupos acetilos, aumenta la estabilidad de la moléculas de almidón y se requiere de mayor temperatura para realizar la transición de fase, llevándose a cabo con un menor gasto de energía, lo cual se observa en el gradiente de los valores de ΔH donde al aumentar el GS disminuye la ΔH.

Cuadro 1. Temperatura (Tp) y entalpía (ΔH) de gelatinización de los almidones nativos y acetilados (Ac).

	Plátano		Maíz	
Muestra	Tp (° C)	ΔH (J/g)	Tp (° C)	ΔH (J/g)
Nativo	74.81± 0.45	12.89 ± 0.33	71.37 ± 0.02	9.41 ± 0.08
Ac bajo GS	71.35 ± 0.12	9.76 ± 0.15	65.39 ± 0.30	5.02 ± 0.98
Ac alto GS	80.23 ± 0.11	1.22 ± 0.35	66.86 ± 0.36	0.40 ± 0.22

La morfología y estructura del gránulo se evaluó mediante MEB, en las microfotografías de los almidones nativos (figura 3 A, B) se pueden observar las diferencias morfológicas y estructurales de los almidones, enfatizando la característica de canales o poros en la superficie del almidón de maíz, lo cual no se observa en los gránulos de almidón de plátano, esta característica puede contribuir en la difusión y adsorción del anhídrido acético al realizar la modificación (Huber y BeMiller, 2000); en las microfotografías de los almidones acetilados (figura 3 C, D, E, F) se observa el daño progresivo de los gránulos, el cual depende del tipo de almidón y del tiempo de reacción; los almidones de maíz presentan una degradación mayor que el almidón de plátano, perdiendo su estructura a las 5 h de reacción, esto es debido a las características propias del almidón de maíz principalmente por los canales que se aprecian en la superficie de los gránulos nativos.

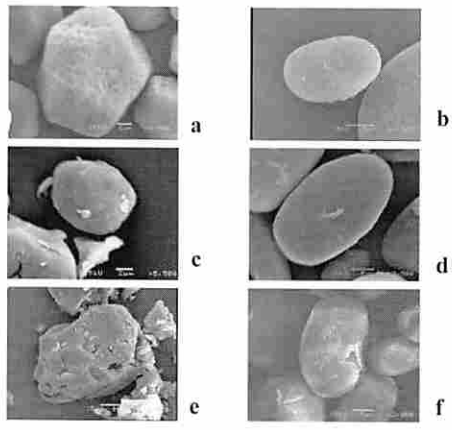


Figura 1. Microfotografías electrónicas de barrido de almidones: A. Maíz nativo, B. Plátano nativo, C. Maíz bajo GS, D. Plátano bajo GS, E. Maíz alto GS y F. Plátano alto GS.

El análisis de FTIR se realizó con la finalidad de verificar cualitativamente el cambio en la estructura química del almidón debido a la acetilación y observar las diferencias en los espectros de almidones acetilados a diferentes tiempos de reacción. Los espectros de los almidones nativo y modificados de maíz y plátano se muestran en la figura 2 y 3, respectivamente; en el almidón nativo de ambas fuentes se observan las señales típicas de almidón (Mano et al., 2003).
Las señales que se detectan entre 900 y 1250 cm^{-1} corresponden a los estiramientos C – O, estas señales se ven incrementadas en los almidones con mayor tiempo de acetilación dentro de esta región podemos observar una señal 1226 cm^{-1} la cual corresponde al enlace de C – O reportada en grupos acetilos (Colthup et al. 1990), y se va disminuyendo la señal del enlace O – H (3000 – 3900 cm^{-1}) y en menor proporción la señal

correspondiente al enlace O – H (1650 cm^{-1}), para ambos casos se evidencia la sustitución de los grupos OH por los grupos CH_3–C=O; este efecto también se puede observar en la región de 1420 cm^{-1} correspondiente al enlace C – H de los grupos metilos; además esto se corrobora con la disminución de la señal correspondiente al enlace C – H (2950 cm^{-1}) señales que corresponden a los metilos de los grupos acetilos. Adicionalmente, se observa la señal a 1740 cm^{-1}, característica de los módulos vibracionales de los grupos carbonilos presentes en el almidón (Colthup et al. 1990).

Lo anterior nos permite corroborar que se llevo a cabo la acetilación de los almidones y que esta fue menor en el almidón de plátano lo cual coincide con los GS obtenidos.

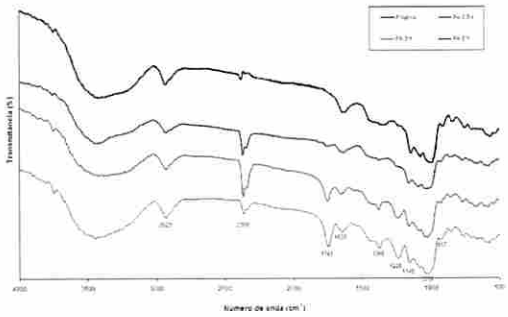


Figura 2. Espectro de FTIR de almidón de plátano: nativo, acetilado por 0.5 h, acetilado por 3 h, acetilado por 5 h.

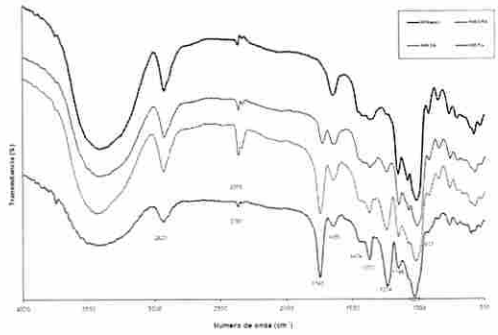


Figura 3. Espectro de FTIR de almidón de maíz: nativo, acetilado por 0.5 h, acetilado por 3 h, acetilado por 5 h.

CONCLUSIONES

Los valores del GS y de la k indican que el almidón de maíz se acetila en mayor proporción y a una velocidad mayor que el almidón de plátano. Los gránulos de almidón de plátano y maíz no pierden su estructura al ser acetilados a un bajo GS mientras que los gránulos de plátano presentan un daño menor que los gránulos de almidón de maíz. La temperatura de gelatinización (Tp) disminuye en los almidones de bajo grado de sustitución y se eleva en los almidones con alto grado de sustitución, mientras que la entalpía (ΔH) disminuye al aumentar el grado de susutitución. Con los resultados del FTIR se corrobora que se llevo a cabo la acetilación de los almidones y que esta fue menor en el almidón de plátano.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico a SIP-IPN, COFAA-IPN y EDI-IPN.

BIBLIOGRAFÍA

- Colthup N., Daly L. H. y Wiberley S. E. 1990. Introduction to Infrered and Raman Spectroscopy. Academic Press, USA. pp. 254–309.
- De Graaf R. A., Broekroelofs G. A., Janssen L. P. B. M. y Beenackers A. A. C. M. 1995. The kinetics of the acetylation of gelatinised potato starch. Carbohydrate Polymers. 28:137-144.
- Flores-Gorosquera E., García-Suárez F., Flores-Huicochea E., Núñez-Santiago M. C., González-Soto R. A. y Bello-Pérez L. A. 2004. Rendimiento del proceso de extracción de almidón de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. Acta Científica Venezolana 55:86-90.
- Khalil M. I., Hashem A., and Hebeish A. 1995. Preparation and characterization of starch acetate. Starch 47:394-398.
- Huber K.C. y BeMiller J.N. 2000. Channels of maize and sorghum starch granules.Carbohydrate Polymers. 41:269–276
- Mano J. F., Koniarova D., Reis R. L. 2003. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 14(2)127-135.
- Mark A. M. y Mehltretter C. L. 1972. Facile preparation of starch triacetates. Starch/Staerke, 24:73-76.
- Paredes-López, O., Schevenin, M.L., Hernández-López, D., and Cárabez, A. 1989. Amaranth starch isolation and partial characterization. Starch/Starke, 41:205.
- Paredes-López, O., Bello-Pérez, L. A., y López, M. G. 1994. Amylopectin: Structural, gelatinization and retrogradation studies. Food chemistry. 50: 411-418.
- Pushpamalar V., Langford S. J., Ahmad M. and Lim Y. Y. 2006. Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. Carbohydrate Polymers 64:312-318.
- Saartrat S., Puttanlek C., Rungsardthong V. y Uttapap D. 2005. Paste and gel properties of low-substituted acetylated canna starches. Carbohydrate Polymers 61:211-221.
- Walpole E. R., Myes H. R. and Myes L. S. 1991. Probabilidad y Estadística para Ingenieros. Ed. Prentice - Hall Hispanoamericana. S. A. Mexico. pp. 688-699.
- Wurzburg O. B. 1964. Acetylation. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. Whistler, Smith and Wolfrom (Eds.) Academic Press. USA. Vol. IV pp 240.
- Xu Y., Miladinov V. y Hanna M. A. 2004. Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution. Cereal Chemistry. 81:735-740.
- Zhang P., Whistler R. L., BeMiller J. N., Hamaker B. R. 2005. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility, review. Carbohydrate Polymers. 59:443-458.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AMILOSAS OBTENIDAS DE DIFERENTES FUENTES BOTANICAS

Rodríguez-Ambriz Sandra L, Sánchez-Rivera Mirna M., Méndez-Montealvo Guadalupe y Bello-Pérez Luis A.
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS. AP 24. C.P. 62731, Yautepec, Morelos, México. Tel. (735) 39 42020, Fax: (735) 39 41896. e-mail: labellop@ipn.mx.

Palabras clave: Amilosas, masa molar, cromatografía de permeación en gel.

RESUMEN

Se realizó una caracterización molecular mediante cromatografía de permeación en gel (CPG) a las amilosas obtenidas de diferentes fuentes botánicas (plátano, mango, papa y maíz), las cuales fueron comparadas con una amilosa comercial de papa. Las amilosas purificadas en el laboratorio presentaron una pureza entre 85.6 - 92.6 %, lo cual estuvo relacionado a los valores obtenidos de longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) al acomplejar con yodo (601-610 nm). Los cromatogramas obtenidos por CPG revelaron la presencia de moléculas de alto peso molecular, que se atribuyen a la presencia de amilopectina. Se realizó una curva estándar con pululanos, en el intervalo de masa molar (Mw) de las amilosas estudiadas, obteniéndose un coeficiente de regresión de 0.998. Los perfiles cromatográficos de las amilosas mostraron un pico principal, con una Mw entre 1.2 y 8.5 x 10^5 g/mol, los índices de polidispersidad estuvieron cercanos a 1.0. Es por ello que la cromatografía por exclusión o de permeación en gel empleada en este estudio, puede ser considera una técnica rápida y confiable para los realizar estudios moleculares de polímeros como la amilosa con una inversión mínima debido a que solo se empleo el detector de índice de refracción (IR).

INTRODUCCIÓN

La funcionalidad de los almidones así su organización física en la estructura granular depende básicamente de la amilosa (polímero esencialmente lineal con enlaces alfa:1-4) y de la amilopectina (polímero que además presenta ramificaciones con enlaces alfa:1-6) que la constituyen *(1)*. Las características moleculares y estructurales de los componentes del almidón son de gran importancia para poder sugerir sus posibles aplicaciones en los diversos sistemas alimenticios. Se ha demostrado que el peso molecular promedio de la amilosa y de la amilopectina esta directamente relacionado con las propiedades funcionales del almidón como es el caso de geles *(2)*, en productos extrudidos *(3)* y en pastas de almidón *(4)*; de las propiedades relevantes es la formación de geles la cual se a atribuido a la presencia de la amilosa *(5)*. Este polímero debe tener al menos una Mw de 40,500 para que se lleve a cabo la gelificación *(6)*. Se han reportado diversas técnicas para caracterizar a la amilosa como es el empleo de la dispersión de luz y la viscosidad intrínseca *(7, 8, 9)*; sin embargo, para un polímero poli-disperso como la amilosa, el valor promedio de la masa molar (Mw) no es suficiente para predecir sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, es por ello que una técnica valiosa que permite obtener información de la distribución macromolecular es la cromatografía de líquidos de alta resolución por exclusión de tamaño acoplado al detector de dispersión de luz (CLARET-DL) *(10)*.

Un prerrequisito para determinar la distribución de Mw para la amilosa y la amilopectina es realizar la completa disolución del almidón (ó de cada uno de los polímeros por separado, después de haber sido aislados) en un disolvente apropiado sin causar degradación de la molécula. La solubilidad del almidón o sus constituyentes se incrementa al trabajar con temperaturas altas y a pH alcalino, empleando disolventes acuosos; sin embargo puede causarse degradación, despolimerización u oxidación y por consiguiente reducirse el tamaño molecular (11) *(23)*.

En este trabajo se propone una metodología para realizar estudios de distribución de Mw de polímeros como la amilosa realizando la disolución en un horno de microondas y posteriormente emplear un sistema de cromatografía de Permeación en Gel con un detector de índice de refracción CPG-IR.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento del Almidón

Se utilizaron frutos inmaduros de plátano (*Musa paradisiaca*) adquiridos en el mercado local de Cuautla Morelos (México). El almidón se obtuvo aplicando la metodología reportada por Bello-Pérez et al. *(12)*. El almidón también se aisló de mangos en estado verde (*Mangifera indica L.*) de la variedad "Tommy Adkins", mediante el procedimiento previamente reportado por el grupo *(13)*, para el almidón de papa se utilizó el procedimiento con ligeras modificación de Kim et al. *(14)* y el almidón de maíz se obtuvo empleando el método de Adkins y Greenwood *(15)*. Los diferentes almidones se secaron en un horno de convección (Lab-Line Instruments, Inc., Imperial V, Melrose Park, IL) a 40 °C por 48 h, se molieron en un mortero y se pasaron por malla 100 y fueron almacenados a temperatura ambiente (25 °C) en contenedores de vidrio *(16, 17)*.

Aislamiento y pureza de polímeros de amilosa

Para aislar las amilosas se aplicó el método de acomplejamiento con timol y n-butanol *(18)*. Para este estudio se utilizó amilosa comercial de papa Tipo III de sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO USA) como referencia. Para determinar la pureza de las amilosas aisladas se utilizó la metodología propuesta por Hoover y Ratnayake (19) y así como la determinación de la longitud de onda de máxima absorción (λmax) *(20)*.

Cromatografía de Permeación en Gel-Indice de Refracción

Se realizó una curva de calibración con estándares de pululano (Fluka Chemie GmbH, Steinhein, Switzerland) de diferente Mw (1.6 x 10^6, 3.8 x 10^5, 1.8 x 10^5, 1.0 x 10^5, 4.8 x 10^4 y 1.2 x 10^4). Los pululanos se disolvieron en agua grado HPLC a 25°C durante toda una noche, se hicieron pasar a traves de filtros de jeringa de 0.2 y 5 µm (Daigger & Company, Inc. vernon Hills, IL), para posteriormente inyectarlos en el equipo de cromatografía de permeación acoplado al detector de índice de refracción (CPG-IR). Se realizó la disolución de la amilosa empleando un calentamiento en horno de microondas por 50 s (20). Los sobrenadantes se hicieron pasar por filtros de jeringa de nylon de 5 µm (Daigger & Company, Inc. vernon Hills, IL) y se inyectaron 50 µl en una columna Aquagel-OH mixed, 8 µm column (Agilent Technologies Deutchland GmbH Waldbronn, Germany) acoplada a un HPLC AT 1100 (Angilent Technology, Deutchland GmbH Waldbronn, Germany). La concentración del carbohidrato después de filtrar, se determino empleando el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de las amilosas aisladas

Las amilosas aisladas de las diferentes fuentes presentaron una pureza entre 85.6- 92.6 % (**Cuadro 1**); los valores corresponden con los de λ_{max} obtenidos para las mismas (601-610 nm). Se han reportado valores de λ_{max} de 650-660 nm se han reportado para amilosas puras (10, 22, 23); sin embargo Radosta et al.(23) reportó valores de pureza y λ_{max} de 99.0 % y 660 nm y de 96.3% y 667 nm para dos muestras estudiadas. Otros autores han reportado una λ_{max} de 652 y 662 nm para amilosas aisladas de diversas fuentes botánicas (10). En estudios posteriores, el mismo grupo (24), determinaron que esas muestras estaban contaminadas con componentes de alta masa molar, las cuales fueron separadas mediante ultra-centrifugación. Obteniendo así una Mw de la amilosa después de este paso, menor que la original.

Cuadro 1. Pureza y longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de amilosas obtenidas de diversas fuentes botánicas.

Muestra	Amilosa(%)	λ_{max} (nm)
Papa (Sigma)	85.6 ± 0.019	610
Papa	92.6 ± 0.003	601
Mango	88.5 ± 0.003	605
Maíz	90.7 ± 0.008	610
Plátano	86.0 ± 0.007	607

Curva estándar de pululanos

En la **Figura 1** se muestra la curva semi-logarítmica de la Mw contra el volumen de elusión (VE) de los estándares de pullulanos. El coeficiente de regresión entre la Mw y el VE fue de 0.998, mostrando que el sistema de CPG usado para la elusión es reproducible. El sistema de CPG se considera adecuado para el estudio de la estructura molecular de polímeros con un Mw promedio.

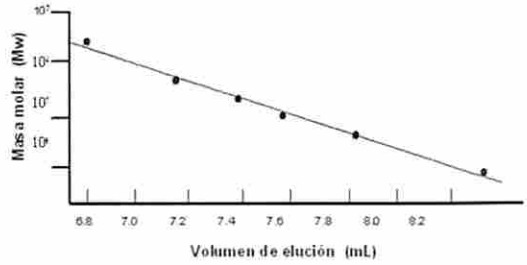


Figura 1 Gráfica Semi-logarítmica de la masa molar contra volumen de elusión de estándares de pululanos.

Características moleculares de las amilosas

La disolución de las amilosas estudiadas se encontró entre 85.0 y 99.7 % (**Cuadro 2**). Bello-Pérez et al. *(21)* reportaron valores de solubilidad de la amilosa del 100 %, empleando el sistema de horno de microondas. En la **Figura 2** se observa que la amilosa de papa presentó dos picos a los VE de 4.8 y 6.0 mL, la muestra comercial también presentó dos picos y la amilosa de plátano presentó solo un pico a 6.2 mL. 10^5 g/mol, ligeramente más bajos que los reportados por otros autores (10) (4.0 x 10^5 y 1.2 x 10^6 g/mol). Los valores obtenidos en este trabajo coinciden con los datos reportados para amilosas determinado su Mw usando detectores de dispersión de luz estática (1.08-9.42 x 10^5) y con CLARET (1.3-10.0 x 10^5 g/mol) *(23)*.

Cuadro 2. Solubilidad, masa molar promedio en peso (Mw) e índice de polidispersidad de amilosas de diferentes fuentes botánicas.

Muestra	Solubilidad (%)	Mw (10^5 g/mol)	Mw/Mn
Papa (Sigma)	99.73 ± 0.15	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.01
Papa	98.96 ± 1.70	3.0 ± 0.2	1.3 ± 0.05
Mango	87.50 ± 2.80	1.9 ± 0.05	1.3 ± 0.04
Maíz	85.00 ± 1.41	1.2 ± 0.001	1.4 ± 0.02
Plátano	99.70 ± 0.42	8.5 ± 0.4	1.4 ± 0.09

El índice de polidispersidad (Mw/Mn) es una medida de la distribución del tamaño de los polímeros presentes en la muestra. Los valores de polidispersidad obtenidos en este estudio fueron de 1.3 y 1.4 (**Cuadro 2**), sugiriendo que la metodología empleada para determinar la Mw de las diferentes amilosas fue adecuado, debido a que se han reportado valores de polidispersidad entre 1.7 y 4.4 para muestras similares *(10)*.

Durante la separación de las amilosas, algunas moléculas de amilopectina no pudieron ser separadas (**Figura 2**), éstas contribuyeron a sobrevalorar el valor de la Mw de la amilosa (24). Las muestras estudiadas presentaron un pico principal (amilosa) a un VE entre 7.2 y 7.6 mL. De manera general las Mw de las amilosas estudiadas se encontraron entre 1.2 y 8.5

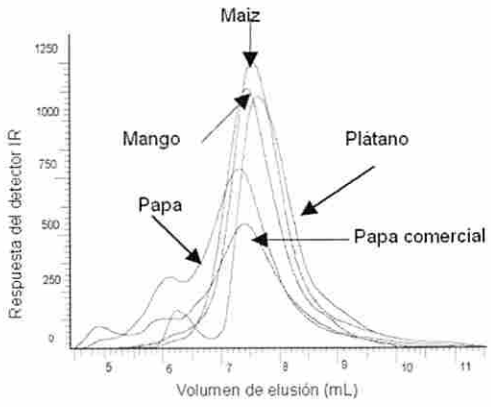


Figura 2. Perfiles cromatográficos de polímeros de amilosa de diferentes fuentes botánicas.

CONCLUSIONES

El porcentaje de disolución de las amilosas aisladas de plátano, mango, maíz y papa fue alto, indicando que la caracterización molecular empleando CPGI-IR brinda información acerca de la totalidad del polímero de amilosa presente en estos almidones. Los cromatogramas y la λ_{max} proporcionaron información de la presencia de pequeñas cantidades de moléculas de alta Mw como podría ser amilopectina. Las Mw de las amilosas determinadas en este trabajo se encuentran en el intervalo de las reportadas por trabajos previos, con bajos valores de índice de polidispersidad, presentando un intervalo corto de la distribución de Mw de las cadenas de amilosa estudiadas.

RECONOCIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo de la SIP-IPN, COFAA-IPN y EDI-IPN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

French, A. D. Organization of starch granules, starch. *Chemistry and technology;* Whistle, R. L., BeMiller, R. L., Paschall, E. F., Eds.; Academic Press: New York, **1984**; pp 183-247.

Clark, A. H.; Gidley, M. J.; Richardson, R. K.; Ross-Murphy, S. B. Rheological studies of aqueous amylose gels: the effect of chain length and concentration on gel modulus. *Macromolecules*. **1989**, *22*, 346-351.

Della-Valle, G.; Colonna, P.; Patria, A.; Vergnes, B. Influence of amylose content on the viscous behavior of low hydrated molten starches. *J. Rheol.* **1996**, *40*, 347-362.

Doublier, J. L.; Colonna, P.; Mercier, C. Extrusion cooking and drum drying of wheat starch. II: rheological characterization of starch pastes. *Cereal Chem.* **1986**, *63*, 240-246.

Biliaderis, C. G. The estructure and interactions of starch with food constituents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1991**. *69*, 60-78.

Gidley, M.J.; Bulpin, P.V. Aggregation of amylose in aqueous systems: the effects of chain length on phase behaviour and aggregation kinetics. *Macromolecules* **1989**, *22*, 341-346.

Banks, W.; Greenwood, C. T. Starch and its components. University Press. Edinburgh **1975**, pp 113-190.

(8) Kodama, M., Noda, H; Kamata T. Conformation of amylose in water. I. Light-scattering and sedimentation equilibrium measurements. *Biopolymers* **1978**, *17*, 985-1002.

(9) Ring, S.G.; I'Anson, K.J.; Morris, V.J.; Static and dynamic light scattering studies of amylose solutions. *Macromolecules*. **1985**, 18, 182-188.

(10) Roger, P.; Colonna, P. Evidence of the Presence of large aggregates contaminating amylose solutions. *Carbohydr. Polym.* **1993**, *21*, 83-89.

Zhong, F.; Yokoyama, W.; Wang, Q.; Shoemarker, C. F. Rice starch, amylopectin, and solubility in dimethyl sulfoxide-based solvents. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2320-2326.

Bello-Pérez, L.A.; Agama-Acevedo E.; Sayagó-Ayerdi S.G.; Moreno-Damián E.; Figueroa, J.D.C. Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, México. *Starch/Stärke* **2000**, *52* Nr. 2-3, S.68-73.

Agustiniano-Osornio J.C.; González-Soto R.A.; Flores-Huicochea E.; Manrique-Quevedo, N.; Sanchez-Hernández, L.; Bello-Pérez L.A. Resistant starch production from mango starch using a single-screw extruder. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 2105-2110.

Kim, S.; Wiesenborn, D.P.; Orr, P.H.; Grant, L.A. Screening potato starch for novel properties using differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1060-1065.

Adkins, G. K.; Greenwood, C. T. The isolation of cereal starches in the laboratory. *Starch/Stärke*. **1966**, *7*, 213-218.

Bello-Pérez, L. A.; Agama-Acevedo, E.; Sanchéz-Hernandéz, L.; Paredes-Lopéz, O. Isolation and partial characterization of banana. *Starch/Stärke*. **1999**, *47*, 854-857.

Aparicio-Saguilán, A. Aislamiento y caracterización parcial de almidón de mango (*Manguifera indica*). **2001**. BSc Thesis. Instituto Tecnológico de Acapulco, México.

Banks, W.; Greenwood, C.T. The fractionation of laboratory-isolated cereal starches using dimethyl sulphoxide. *Starch/Stärke*. **1967**, *19*, 394-398.

Hoover, R.; Ratnayake, W. S. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chem.* **2002**, *78*, 489-498.

Millan-Testa, C.E.; Mendez-Montealvo, M.G.; Ottenhof, M.A.; Farhat, I.A.; Bello-Pérez, L.A. Determination of the molecular and structural characteristics of okenia, mango and banana starches. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 495-501.

Bello-Pérez, L. A.; Roger, P.; Baud, B.; Colonna, P. Macromolecular features of starches determined by aqueous high-performance size exclusion chromatography. *J. Cereal Sci.* **1998**, *27*, 267-278.

Wang, L.Z.; White, P.J. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. *Cereal Chem.* **1994**, *71* (3):263-268.

Radosta, S.; Haberer, M.; Vorwerg, W. Molecular characteristics of amylose and starch in dimethyl sulfoxide. *Biomacromol.* **2001**, *2*, 970-978.

Roger, P.; Tran, V.; Lesec, J.; Colonna, P. Isolation and characterisation of single chain amylose. *J. Cereal Sci.* **1996**, *24*, 247-262.

ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUB-PRODUCTOS DEL PROCESAMIENTO DE SALMÓN.

Sergio Almonacid M., Caludia Castillo, Alik Abakarov, Erica Carevic y Ricardo Simpson.
Departamento de Procesos Químicos, Biotecnológicos y Ambientales
Universidad Técnica Federico Santa María

RESUMEN

El uso de hidrólisis enzimática es una manera atractiva de agregar valor a productos secundarios de la industria de procesos y en particular del procesamiento de pescados, debido al alto valor nutritivo de sus proteínas. Los hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado pueden tener propiedades funcionales nutraceuticas (i.e. antioxidante, antihipertensivo) y tecnológicas (capacidad de gel, solubilidad). Desde el punto de vista del proceso, es importante conocer los mecanismos y cinética de la reacción, a fin de facilitar el diseño y la optimización. El propósito de este trabajo fue proponer y validar experimentalmente un modelo de comportamiento cinético de una reacción enzimática de hidrólisis de proteína de pescado.

Se generaron datos experimentales para la hidrólisis de músculo de salmón con Alcalasa 2.4L at 60°C and a pH of 9.5. Se obtuvieron curvas de grado de hidrólisis v/s tiempo para diferentes concentraciones de sustrato y enzima. Los datos fueron tratados vía regresión no lineal para la estimación de los parámetros correspondientes al modelo propuesto; inhibición por sustrato e inactivación de enzima, basado en cinética de Michaelis-Menten. Se obtuvo un error medio cuadrado de 0.015 en promedio para todos los experimentos, lo cual indica que el modelo propuesto describe satisfactoriamente el proceso. La inhibición por sustrato e inactivación enzimática podrían ser testeadas en futuros experimentos, agregando enzima o sustrato durante el tiempo de reacción.

INTRODUCCIÓN.

La aplicación de hidrólisis enzimática es una manera atractiva de obtener productos de valor agregado. Las proteínas de pescado, especialmente las provenientes de productos secundarios de su procesamiento, pueden ser convertidas en hidrolizados proteicos de pescado (FPH). Los FPH pueden tener propiedades nutricionales (i.e. digestibilidad, alergenico), propiedades funcionales (i.e. solubilidad, formador de gel) y actividad biológica (i.e. antihipertensivo, antioxidante). Desde el punto de vista del proceso de hidrólisis enzimática, la comprensión de los mecanismos de cinética de reacción es esencial para un diseño de proceso adecuado.

OBJETIVOS.

El propósito general de este estudio fue obtener hidrolizado de proteína de pescado y estudiar los mecanismos de cinética de la reacción. Los objetivos específicos fueron:

1. Implementar el equipamiento y técnicas analíticas para realizar hidrólisis enzimática a escala de laboratorio.
2. Postular un mecanismo de cinética de reacción.
3. Contrastar el modelo cinético propuesto con resultados experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos e instrumentación:

1. Baño termostatado.
2. Agitador.
3. pH-meter.
4. Espectrofotómetro.
5. Material de vidrio

Determinación del grado de hidrólisis

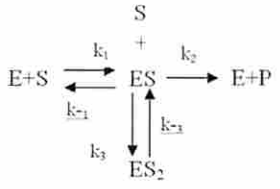
La técnica analítica relevante para el seguimiento o monitoreo del proceso de hidrólisis, es la determinación del grado de hidrólisis (DH, por sus siglas en Inglés). La técnica usada e implementada para este estudio fue la desarrollada por Nielsen et. al, 2001 y es la que requirió la mayor parte de los reactivos. Esta técnica fue elegida por su versatilidad, bajo tiempo de respuesta, y de aplicación simple y directa a escala piloto e industrial.

Reacción enzimática y Mecanismo.

Numerosos trabajos realizados en el tema indican que la velocidad de reacción es rápida a tiempo corto, para ir disminuyendo hasta estabilizarse a tiempo largo (Kristinsson and Rasco 2000).

Postulamos un mecanismo de inhibición por sustrato que opera en paralelo con una desactivación de la enzima. Esto se puede esquematizar como sigue:

a. Para inhibición por sustrato



donde

E: concentración de enzima
S: concentración de sustrato
ES: concentración complejo enzima/sustrato
P: concentración de producto
ES_2: concentración enzima/sustrato inhibición

b. Para desactivación de la enzima

$$E + ES_2 \xrightarrow{k_d} E_a + E_i + P$$

donde

E_a: concentración de enzima activa
E_i: concentración de enzima inactiva

Haciendo uso de la ley de acción másica y ordenando, se llega a:

$$r = \frac{k_2 S_0}{\frac{S_0^2}{K_I}} e_0 \exp\left[-\frac{k_d K_M}{k_2} x\right]$$

S_0: concentración inicial de sustrato
e_0: concentración inicial de enzima

Agrupando,

$$a = k_2 K_I \frac{e_0}{S_0^2}$$

$$b = \frac{k_d K_M}{k_2}$$

El modelo propuesto queda:

$$\boxed{r = \frac{dx}{dt} = a \exp[-bx]}$$

Donde deben estimarse los parámetros "a" y "b" a partir de datos experimentales.

RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Los datos experimentales fueron obtenidos por hidrólisis de proteínas de salmón con la enzima Alcalasa 2.4L. La reacción se llevó a cabo a 60°C y un pH de 9.5. Se generaron curvas (en duplicado) de grado de hidrólisis (DH) v/s tiempo para diferentes concentraciones de enzima y sustrato. Los datos fueron tratados por regresión no lineal para estimar los valores de las constantes "a" y "b" por minimización de la raíz cuadrada del Error Medio Cuadrado (RMSE):

$$\min\left(\sqrt{\frac{(X_{teorico} - X_{experimental})^2}{n}}\right)$$

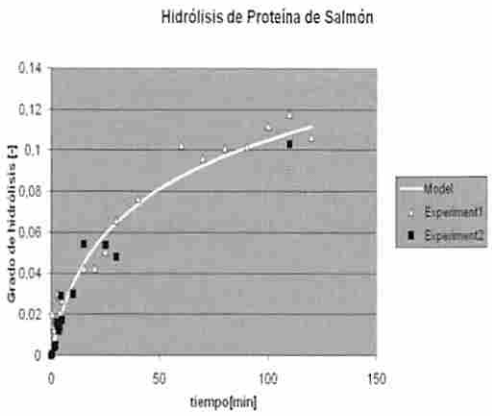


Figura 1: e_0: 0.4%; S_0: 10%

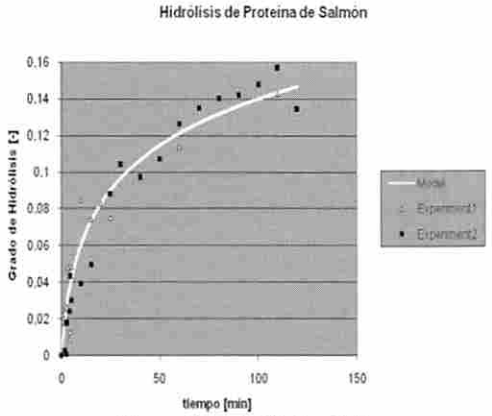


Figura 2: e_0: 0.8%; S_0: 10%

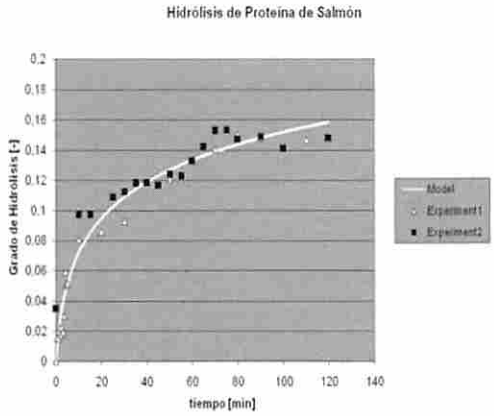


Figura 3: e_0: 1.6%; S_0: 10%

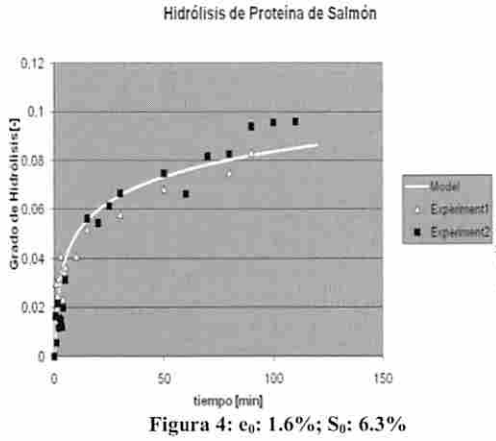


Figura 4: e_0: 1.6%; S_0: 6.3%

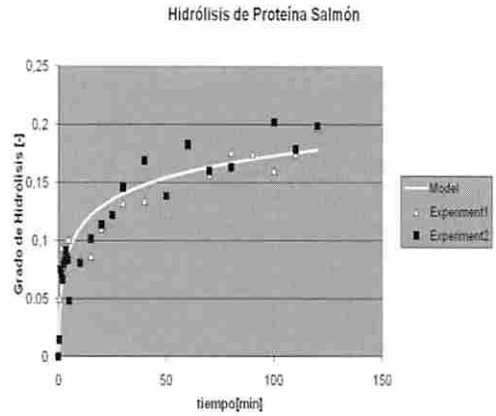


Figura 5: e_0: 1.6%; S_0: 14%

Tabla 1: Estimación de parámetros de modelo cinético.

e_0 $(\%)_{w/v}$	S_0 $(\%)_{w/v}$	a $[min]^{-1}$	b	RMSE [-]
0.4	10	0.0057	26.5	0.008
0.8	10	0.015	26.5	0.01
1.6	10	0.022	27.1	0.01
1.6	6.3	0.040	67.1	0.02
1.6	14	0.16	36.7	0.02

El modelo propuesto describe adecuadamente el fenómeno, por cuanto la fracción "degree of hydrolysis" arrojas valores de 0.02 o menor. Esto se puede interpretar como una ratificación de la hipótesis planteada.

CONCLUSIONES.

El planteo y validación de un modelo descriptivo posibilita la optimización del proceso, reduciendo costos experimentales. Sin embargo, también se puede utilizar otros medios como Redes Neuronales, que por un proceso de "aprendizaje" pueden tomar en cuenta la totalidad de los fenómenos ocurridos en el sistema en estudio, que evidentemente es de alta complejidad. En él interaccionan numerosos eventos que no son descritos por el modelo propuesto (i.e. interacciones entre los reactantes/productos de la reacción y otras moléculas presentes) y que pueden tener importancia. En este sentido es importante destacar que, como resultado de este proyecto, se cuenta con la implementación (equipamiento y técnicas) para la realización de experimentos a escala de laboratorio que permiten seguir evaluando técnicas de descripción del proceso de hidrólisis enzimática.

PERSPECTIVAS FUTURAS.

El eminente crecimiento del mercado de productos "amigables" con la salud humana y el medio ambiente, propician variadas aplicaciones de los hidrolizados proteicos, mas aun si las materias primas utilizadas son las hoy mal llamadas sub-productos o residuos sólidos. Se debe trabajar en la optimización del proceso fijando el material usado como materia prima (entrada), y las características deseadas en el producto (salida), i.e. ingrediente antioxidante, antihipertensivo, fertilizante orgánico u otros.

REFERENCIAS

Kristinsson H.G. and Rasco B.A. 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. Critical Reviews in Food Scisnce and Nutrition, 40(1):43-81.

Nielsen, P.M., Petersen, D. and Dambmann, C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. Journal of Food Science 66(5) 642-646.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL AGUAYMANTO (*Physalis peruviana*, Linnaeus, 1753) Y DE SU CONSERVA EN ALMÍBAR MAXIMIZANDO LA RETENCIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Encina Zelada, Christian Rene; Ureña Peralta, Milber y Repo de Carrasco, Ritva
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. La Molina s/n. Lima 12. Perú. Fax: 51-1- 3495764 E-mail: cencina@lamolina.edu.pe
LIMA - PERÚ

Palabras clave: Propiedades funcionales y sensoriales, Physalis peruviana, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenos totales.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación es el resultado del estudio de los compuestos bioactivos presentes en el aguaymanto (*Physalis peruviana*) proveniente del valle del Mantaro-Perú y en su conserva en almíbar. En la Etapa I se determinó los compuestos bioactivos en la materia prima, correspondientes a un estado de madurez 2 y 3 según ICONTEC (1999) el fue de 28,55 mg de ácido ascórbico/100 g; 1,77 mg de β-caroteno/100g; 79,23 mg ácido clorogénico/100 g y capacidad antioxidante de 288,95 µg eq trolox/g (parte hidrofílica) y 297,51µg eq trolox/g (parte lipofílica) medido por el método ABTS y de 249,23 µg eq trolox/g medido por el método del DPPH. En la Etapa II se determinaron los factores y sus niveles que influyeron significativamente ($p<0,05$) en la retención del ácido ascórbico en el proceso de elaboración de la conserva de aguaymanto en almíbar. Mediante el Método Taguchi. El pH del almíbar y la temperatura del tratamiento térmico resultaron ser los factores de mayor influencia en la retención del ácido ascórbico. Los niveles con los que se retuvo mayor cantidad de ácido ascórbico fueron: tiempo de descerado (90 s), temperatura del descerado (80°C), pH del Almíbar (2,5), grados Brix del Almíbar (30), concentración del NaOH en el descerado (0,05%), temperatura (95°C) y tiempo (11,52 min) del tratamiento térmico. En la Etapa III se caracterizó físico-químicamente y microbiológicamente correspondiente al proceso de elaboración de la conserva de aguaymanto en almíbar realizado con los parámetros que maximizaron la retención del ácido ascórbico (50,54 %), determinando además el efecto del tratamiento tecnológico sobre el contenido de carotenos totales (1,59 mg de β-caroteno/100g), Compuestos Fenólicos (39,23 mg ác. clorogénico/100 g) y Capacidad Antioxidante (383,73 µg eq trolox/g y 132,12 µg eq trolox/g medidos por los métodos del ABTS y DPPH respectivamente).

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y el cáncer son las principales causas de muertes en la civilización occidental; ante el estrés oxidativo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que dicho estrés puede causar la muerte de la célula. En las frutas y las legumbres se encuentran muchas sustancias capaces de atrapar radicales libres (responsable de diferentes tipos de daño celular), mejorando nuestra defensa antioxidante; numerosas investigaciones epidemiológicas y estudios experimentales han demostrado que el aumento en su consumo ayuda en la prevención de muertes por estas enfermedades, este efecto beneficioso se atribuye principalmente a sustancias con actividad antioxidante, como los compuestos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides entre otros compuestos, sugiriendo que estas sustancias aumentan la defensa antioxidante del organismo (Murillo, 2005). El aguaymanto (*Physalis peruviana*) contiene entre otros nutrientes compuestos bioactivos como el ácido ascórbico, β-caroteno (provitamina A) compuestos fenólicos, entre otras vitaminas que podría proporcionar un efecto fisiológico beneficioso en la salud, en el funcionamiento del organismo o en el bienestar, mayor que el proporcionado por los nutrientes sencillos que contiene, dado que se conoce que existe un efecto sinérgico entre los compuestos que presenta un alimento con estas características.

Los objetivos específicos de esta investigación fueron determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del aguaymanto medido por los métodos del DPPH y ABTS, la cantidad de ácido ascórbico, carotenos y compuestos fenólicos presentes en él así como determinar la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y carotenos en la conserva de aguaymanto en almíbar después de los tratamientos que optimizan la mayor retención de ácido ascórbico según el método Taguchi.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Se trabajó con aguaymanto (*Physalis peroviana*) procedente del Valle del Mantaro, azúcar blanca refinada, envases de vidrio de 393 ml de capacidad (C-246) con tapas metálicas de 63 mm, acido cítrico grado alimentario con 99,5% de pureza. Los análisis se realizaron en los laboratorios de Físico-Químico, Instrumentación y Biotecnología, Microbiología y Planta Piloto de Alimentos; instalaciones pertenecientes a la Facultad dé Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional.

Métodos.

Etapa 1: Caracterización de la Materia Prima

A. Análisis proximal

Se determinó la composición proximal de los frutos y conocer sus características de composición fisicoquímica.

B. Análisis Químico de Compuestos Bioactivos

Se determinó el contenido de ácido ascórbico (AOAC, 1995), carotenos totales (Talcott y Howard, 1999), compuestos fenólicos (Swain y Hillis, 1959) y capacidad antioxidante por el método del DPPH (método de Brand-Williams *et al.*, 1995) y ABTS (adaptado de Arnao, 2001).

Etapa 2: Determinación de los factores que influyen en la retención del ácido ascórbico durante el proceso de elaboración de la conserva de aguaymanto en almíbar

Se determinaron los factores que influyen significativamente ($p<0,05$), mediante la metodología "Taguchi", en la retención del ácido ascórbico durante el proceso de elaboración de aguaymanto en almíbar. Para cumplir con tal objetivo, se realizaron pruebas preliminares para poder determinar cuales son los niveles mínimo y máximo para cada una de las variables en la elaboración de la conserva de aguaymanto en almíbar, niveles que independientemente cumplían con propósito de acuerdo al proceso unitario para el cual era utilizado, además se realizó el análisis de la interacción tiempo de tratamiento térmico y pH del almíbar, factores que según investigaciones son las variables que tienen mayor efecto en la retención de la vitamina mencionada, los que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de factores para la optimización de la retención de ácido ascórbico en la conserva de aguaymanto en almíbar.

Factores / Niveles	A (pH)	B (s)	C (°C)	D (°Brix)	E (%)	F (°C)	G
Inferior	2,5	30	80	15	0,05	85	-1
Superior	3,5	90	100	30	0,2	95	+1

Etapa 3: Caracterización del producto final

En el producto final, elaborado en base a los factores que hacen óptima la retención de ácido ascórbico, se llevaron las siguientes evaluaciones: análisis proximal, análisis de compuestos bioactivos, y pruebas de esterilidad para conservas según recomendaciones de la ICMSF (2000).

Diseño experimental y análisis estadístico

Mediante el Método Taguchi, el que permitió reducir de 128 de un arreglo factorial 2^7 a 8 tratamientos de un arreglo ortogonal $L_8(2)^7$, se determinaron los factores (Tabla 1) que significativamente ($p<0,05$) influyeron en la retención de ácido ascórbico durante el proceso de elaboración de la conserva de aguaymanto. Los tratamientos se realizaron por duplicado y se

empleó el paquete estadístico Statistica® para los cálculos correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Compuestos Bioactivos de la materia prima

El contenido de ácido ascórbico (28,55 mg/100 g de fruto) se encuentra dentro del rango reportado por varios autores, así tenemos que es un valor menor al reportado para Tapia (2000) de 43 mg/100 g, pero mayor a lo reportado Bernal (1986) de 20 mg/100 g. De acuerdo con Davies y Albrigo (1994), los niveles de ácido ascórbico en los frutos son variables tendiendo a disminuir estacionalmente. Estos valores pueden diferir por varios factores, entre ellos: suelo, clima, labores culturales, variedad, estado de madurez, etc.

Los resultados promedios de carotenoides totales (1,77 mg de β-caroteno/100g, lo que equivale a 2950 UI de vitamina A) obtenidos para el aguaymanto se presentan en la Tabla 2, siendo un valor mayor que el mencionado por Tapia (2000), y Bernal (1986), pero algo menor al valor de 3 000 UI de vitamina A mencionado por el MINAG (2005).

Tabla 2. Análisis de los compuestos bioactivos del aguaymanto (*Physalis peruviana*).

Componente			Contenido
Ácido Ascórbico (mg / 100 g)			28,55 ± 0,10
Carotenos totales (mg de β-caroteno/100g)			1,77 ± 0,02
Compuestos Fenólicos (mg ácido clorogénico/100 g)			79,23 ± 0,41
Capacidad Antioxidante (µg eq trolox/g)	DPPH		249,23 ± 8,01
	ABTS	Hidrofílica	288,95 ± 3,62
		Lipofílica	297,51 ± 4,23

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos del aguaymanto resultando en un 79,23 mg ácido clorogénico/100 g, el cual es un valor relativamente bajo respecto a los valores mencionado por Murillo (2005), quien encontró en frutos tales como el marañon (186 mg ácido clorogénico/100 g), guayaba (210 mg ácido clorogénico/100 g), tomate de árbol (105 mg ácido clorogénico/100 g), mango (102 mg ácido clorogénico/100 g), papaya (60 mg ácido clorogénico/100 g).

Se determinó la capacidad antioxidante del aguaymanto, el resultado promedio para un estado de madurez dos y tres fue de 249,23 µg eq trolox/g según el método del DPPH y 288,95 (parte hidrofílica) y 297,51 (parte lipofílica) µg eq trolox/g según el método del ABTS, la capacidad antioxidante de un alimento depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales presentes en él. Se debe mencionar que al evaluar la capacidad antioxidante mediante el método del DPPH se evaluó utilizando como solvente al metanol, es decir se cuantificó la capacidad antioxidante de compuestos hidrófilos (ácido ascórbico y compuestos fenólicos), mientras que para la evaluación capacidad antioxidante mediante el método del ABTS se evaluó utilizando como solvente al metanol inicialmente y luego una mezcla de isopropanol/hexano, es decir se cuantificó la capacidad antioxidante de compuestos hidrófilos (ácido ascórbico y compuestos fenólicos) y compuestos lipófilos (carotenoides), razón por la cual en el segundo caso se obtuvo una mayor capacidad antioxidante.

Gordon (1990), indica que los compuestos lipofílicos (carotenoides) son mejores queladores que reductores, es decir, los métodos de cuantificación de capacidad antioxidante lipofílica tanto por ABTS como por DPPH no cuantificaría verdaderamente dicho valor, además del efecto sinérgico que existirían entre los compuestos lipofílicos e hidrofílicos presentes en el aguaymanto.

Determinación de los factores y niveles que hacen máxima la retención de ácido ascórbico

Los factores que se evaluaron durante la elaboración de la conserva en almíbar que influyeron significativamente se muestran en la Tabla 3. El análisis de los resultados obtenidos al aplicar el método de Taguchi puede ser interpretado a partir de la Figura 1 de la siguiente manera:

- El factor pH del almíbar tuvo una de los dos más altos valores de ETA significativos, correspondiendo el menor valor de ETA al nivel menor (2,5), por lo que fue seleccionado.
- El factor temperatura del Tratamiento Térmico tuvo el mayor valor de ETA significativo, correspondiéndole al nivel mayor (95°C), siendo por ello seleccionado.
- La interacción pH del almíbar-tratamiento térmico fue significativa. A un mayor nivel de interacción de tales factores se obtuvo un ETA mayor.

En la Tabla 3 se presentan los factores y sus niveles, los que se ensayaron en el proceso de elaboración de la conserva de aguaymanto en almíbar: temperatura (C) y tiempo del descerado (B) y concentración de NaOH (E); grados Brix (D) y pH (A) del almíbar y temperatura (F) de pasteurización, siendo G la interacción (AxF); mientras que N_1 y N_2 es la cuantificación del ácido ascórbico.

Tabla 3. Tratamientos aplicados para la optimización de la retención de ácido ascórbico.

	FACTORES DE CONTROL							ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/100g)	
Trat am.	A	B	C	D	E	F	G	N_1	N_2
1	2,5	60	80	15	0,05	85	--	13,43	13,51
2	2,5	60	80	30	0,2	95	--	19,58	19,73
3	2,5	90	100	15	0,05	95	--	19,35	19,67
4	2,5	90	100	30	0,2	85	--	13,31	13,48
5	3,5	60	100	15	0,2	85	--	11,21	11,33
6	3,5	60	100	30	0,05	95	--	15,23	15,54
7	3,5	90	80	15	0,2	95	--	15,11	15,96
8	3,5	90	80	30	0,05	85	--	12,32	12,41

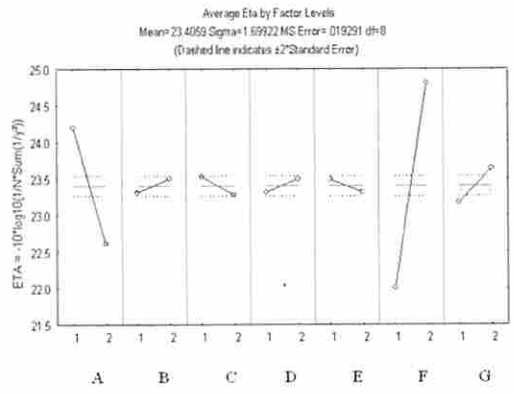


Figura 1. Valores Señal/Ruido (ETA) de cada factor evaluada para maximizar la retención de ácido ascórbico aplicando el método Taguchi $L_8(2^7)$.

Análisis de Compuestos Bioactivos de la conserva de aguaymanto en almíbar maximizando el contenido de ácido ascórbico

Se observa en la Tabla 4 una reducción del 49,45% de ácido ascórbico en el aguaymanto, después de realizado todo el proceso tecnológico para la obtención de la conserva. Texeira (1983), mencionado por Obregón (2001), encontró una reducción del 45,3% durante el almacenamiento de conservas de rodajas de naranja en almíbar.

Los resultados promedios de carotenoides totales (1,59 mg de β-caroteno/100g, lo que equivale a 2650 UI de vitamina A) obtenidos en la conserva de aguaymanto en almíbar se presentan en Tabla 4, obteniéndose una retención del 89,83%. Rodríguez-Amaya (1999) menciona que los tratamientos de cocción a pesar de su susceptibilidad a la descomposición, se pueden retener los carotenoides durante el procesamiento industrial si se siguen buenas prácticas tecnológicas. Se recomienda el procesamiento a la temperatura más baja por el tiempo más breve, pero el procesamiento a alta temperatura y tiempo corto es una buena alternativa.

El contenido de compuestos fenólicos de la conserva de aguaymanto en almíbar fue de 39,52 mg ác. clorogénico/100 g. es decir, una retención del 49,88 % respecto a la materia prima inicial, el cual es un valor relativamente bajo respecto al valor

inicial del fruto sin tratamiento, esto debido tal vez a que los compuestos fenólicos al ser hidrófilos pudieron migrar hacia el almíbar, resultando por ende una disminución de estos compuestos en el aguayamnto, así también pudieron existir reacciones de degradación durante la aplicación del tratamiento térmico al cual fue sometido la conserva. Dewanto *et al.* (2002), encontraron en el procesamiento de maíz a temperaturas de esterilización un aumento en el contenido de compuestos fenólicos y posteriormente en su capacidad antioxidante, concluyendo que a una mayor temperatura y menor tiempo se obtuvieron los mayores valores de estos compuestos, enfatizando que se realizaron en procesos de esterilización y no pasteurización como en el caso de lo conserva de aguaymanto en almíbar.

Al determinar la capacidad antioxidante de la conserva de aguaymanto se obtuvieron los valores de 132,12 µg eq trolox/g mediante el método del DPPH y 159,14 µg eq trolox/g (parte hidrófila) y 224,39 µg eq trolox/g (parte lipófila) medidas por el método del ABTS, lo que indicaría una reducción de la capacidad antioxidante del 53,01% y 55,08% y 75,42% respectivamente. Esta disminución se puede deber al efecto que tuvo el tratamiento térmico sobre los compuestos hidrofílicos (ácido ascórbico y compuestos fenólicos), así como sobre los compuestos lipofílicos (carotenoides) presentes en el aguaymanto, los cuales siguen actuando sinergicamente, pero con una disminución de su capacidad antioxidante respecto a la materia prima sin procesar. Existen estudios de determinación de la capacidad antioxidante en bebidas mediante la metodología del DPPH, obteniéndose valores en general que disminuyeron al realizarse el procesamiento de las frutas para obtener dichas bebidas, las que fueron sometidas también a tratamiento térmico durante su elaboración, referencias mencionadas en el estudio realizado por Murillo (2005).

Tabla 4. Análisis de los compuestos bioactivos en la conserva de aguaymanto en almíbar.

Componente			Contenido	Retención (%)
Ácido Ascórbico (mg / 100 g)			14,43 ± 0,02	50,54
Carotenos totales (mg de β-caroteno/100g)			1,59 ± 0,03	89,83
Compuestos Fenólicos (mg ácido clorogénico/100 g)			39,52 ± 0,41	49,88
Capacidad Antioxidante (µg eq trolox/g)	DPPH		132,12 ± 4,23	53,01
	ABTS	Hidrofílica	159,14 ± 3,78	55,08
		Lipofílica	224,39 ± 3,47	75,42

CONCLUSIONES

El contenido de compuestos bioactivos del aguaymanto fue de 28,55 mg de ácido ascórbico/100 g; 1,77 mg de β-caroteno/100g; 79,23 mg ácido clorogénico/100 g y capacidad antioxidante de 288,95 µg eq trolox/g (parte hidrofílica) y 297,51µg eq trolox/g (parte lipofílica) medido por el método ABTS y de 249,23 µg eq trolox/g medido por el método del DPPH.

Para la máxima retención de ácido ascórbico, empleando el Método Taguchi fue de 69,11%, el que se halló con los siguientes parámetros: pH del almíbar (2,5); concentración de NaOH, tiempo y temperatura del descerado (0,05%, 90 s y 80°C); grados Brix del almíbar (30); temperatura y tiempo del tratamiento térmico (95°C y 11,52 min).

El contenido de compuestos bioactivos de la conserva de aguaymanto en almíbar fue 14,43 mg de ácido ascórbico/100 g; 1,59 mg de β-caroteno/100g; 39,52 mg ácido clorogénico/100 g y una capacidad antioxidante de 159,14µg eq trolox/g (parte hidrofílica) y 224,39µg eq trolox/g (parte lipofílica) medido por el método ABTS y de 132,12 µg eq trolox/g medido por el método del DPPH.

REFERENCIAS

- AOAC., 1995. Official Methods of Analysis, 16TH edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC. p 1058-1059.
- Arnao, M. 2001. Some methodological problems in the detrmination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. Trends in Food Science and Technology. Vol II. Pag 419-421.
- Bernal, J. 1986 Ciencia y Agricultura: "Generalidades sobre el cultivo de la Uchuva". Facultad de Ciencias Agropecuarias UPTC - TUNJA. Editorial Rana y el Águila. Colombia. p 20-32.
- Brand-Willians, W., Cuevelier, M. y Berset, C., 1995. Use of a free Radical method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm. Wiss. Tol. Vol 28. pp 25-30.
- Davies, F. Y Albrigo, G. 1994. Cítricos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. p 15-17.
- Dewanto, V.; Wu, X. y Hai Liu, R. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, p 4959-4964.
- Gordon, M. 1990. Food antioxidants. Chapter 1. The Meclianism of Antioxidant Action *in vitro*. Elservier Applied Science London and New York. U.S.A. p 40-45.
- ICMSF. 2000. Microorganismos de los Alimentos, su significado y métodos de numeración. Segunda edición. Tomo II. Editorial Acribia. Zaragoza. España. p 130-135.
- ICONTEC 1999, Norma Técnica NTC 4580. Uchuva (*Physalis peruviana*). para el consumo fresco o destinado al procesamiento industrial. Colombia. p 1-10.
- MINAG. 2005. Informe anual del Ministerio de Agricultura. p 230.
- Murillo, E. 2005. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Instituto de Alimentación y Nutrición Universidad de Panamá. p25-30.
- Obregón, A. 2001. Efecto de la Temperatura sobre la Textura de Gajos de Mandarina Satsuma (*Citrus unshiu*) en Almíbar. Tesis para optar el titulo de Magíster en Tecnología de Alimentos, UNALM. Lima, Perú. p 140.
- Rodríguez-Amaya, D. 1999. Carotenoides y preparación de alimentos: La retención de los Carotenoides Provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. Facultad de Ingeniería de alimentos. Universidad Estatal de Campiñas. Campinas SP-Brasil.
- Swain, T. y Hillis, W. 1959. The Phenolic Constituets of Prunus domestica. I. The quantitative analysis of fenolic constituents. Journal of Food Science, Vol 10. pag 63-68.
- Talcott, S. y Howard, L. 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot pure. Journal of Food Chemistry. Vol 47. p 2l99-2215.
- Tapia, M. E. 2000. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago. p 11-12.

EFEITO DA KAPA-CARRAGENA NA ESTRUTURA E QUALIDADE DE SORVETES ADICIONADOS DE CÁLCIO

Costa, Fabiano Freire[1]; de Resende, Jaime Vilela[1]; de Abreu, Luiz Ronaldo[1]; Goff, H. Douglas[2]; Silva, Paulo Henrique da Fonseca[3]
1. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DOS ALIMENTOS
Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras/MG, Brazil. E-mail: jvresende@ufla.br
2. UNIVERSITY OF GUELPH, Guelph, ON, Canadá.
3. INSTITUTO DE LATICÍNIOS CANDIDO TOSTES – EPAMIG - Juiz de Fora/MG, Brazil

Palavras chave: kapa-carragena, cálcio, recristalização, gelo, sorvete.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the influence of addition of kappa-carrageenan and calcium on the process of ice recrystallization in the ice cream mix. A basic mixture was prepared and divided into three parts; the first parts, carrageenan (0,05%) and calcium (1 g/L) was added. The second parts received only carrageenan (0,05%) and the last one received no additives, considered as the control treatment. Each on of the six portions were simultaneously whipped and frozen in an ice cream maker, Inadal (Mod. DS-3). The portions were then packed in hermetically sealed, 1-liter containers and stored at -18°C. After 30, 60 and 90 days of storage, samples from each portion were drained, thawed and analyzed under an optic microscope (Meiji) with a cold stage system and video capture. The samples were refrozen on the microscope by the cold stage to an average temperature of -10°C, at which they were then microphotographed. In order to measure the ice crystals size Sigma Scan-Pro 5.0 image-analyzer software was utilized. The results demonstrated that the average size of the ice crystals varied according to the composition of each sample. The addition of carrageenan to the two samples did not significant impact the growth of ice crystals. However, the addition of calcium increased ($p < 0.05$) the average size of the ice crystals as well as the viscosity of the sample ice cream mass. These results can be explained by the interaction of the calcium with the other components present in each sample. It is reasonable to conclude that the addition of calcium directly interferes on the recrystallization process of ice in ice cream and that this phenomenon is unaffected by the addition of carrageenan.

INTRODUÇÃO

Os estabilizantes em solução aumentam a viscosidade e formam géis, devido a sua capacidade de retenção de grande quantidade de água (água de hidratação), resultante da atividade mútua destes compostos que formam pontes de hidrogênio entre si. Além de ligar-se com a água de hidratação, o produto pode se estruturar formando uma rede tridimensional que reduz ainda mais a mobilidade da água livre, sendo a estabilidade do produto dependente do grau de hidratação e das cargas das partículas que o compõem. A presença e o acúmulo de macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, podem modificar as propriedades de difusão/coligativas na interface água-cristal de gelo e, por meio desta, limitar o crescimento extensivo do cristal de gelo ou a recristalização. Em alguns sistemas alimentares, estes formam uma rede de gel a temperaturas baixas ou ambientais que, como tem sido demonstrado, reduzem severamente o crescimento e modificam os hábitos do cristal (Fennema, 1991).

A carragena é um ingrediente estabilizante comum para formulações de sorvetes de textura suave. O extrato pode ser separado em diversas frações, das quais as mais importantes são a kapa, a lambda e a iota. Sua capacidade de reação com proteínas facilita sua ação estabilizadora no leite. Entretanto, a carragena, pode interagir com metais bivalentes encontrados ou adicionados ao alimento afetando desta forma a eficiência dos hidrocolóides que está diretamente relacionada com a sua capacidade de formar gel e aumentar a viscosidade.

A suplementação de cálcio em alimentos, principalmente aos derivados de leite tem sido praticado pela industria no intuito de se aumentar o valor nutricional do produto e desta forma agregar valor. Estudos devem ser realizados no intuito de se investigar os efeitos das interações entre os suplementos e os ingredientes necessários para a produção dos alimentos visando a preservação da qualidade destes produtos (Costa, 2006).

No intuito de entender os mecanismos e interações entre os componentes do sistema que compõe o sorvete, este trabalho objetivou estudar os efeitos adição de cálcio na microestrurura e qualidade dos sorvetes adicionados de carragena.

MATERIAS E MÉTODOS

Fabricação do sorvete

Foi fabricada, em três repetições, uma mistura básica para sorvete lácteo. Esta mistura foi dividida em quatro lotes. Ao primeiro lote foi adicionado kapa-carragena (0,05%) e cloreto de cálcio (800 ppm), ao segundo lote foi adicionado apenas kapa-carragena (0,05%), o terceiro recebeu a adição de cloreto de cálcio (800 ppm) e o quarto ficou ausente dos aditivos (controle). O lote ao qual não foi adicionado kapa-carragena foi levado, primeiramente, ao homogeneizador. Os lotes foram homogeneizados no primeiro estágio submetidos à pressão de 15,5 MPa (aproximadamente 2.250 psi) e, no segundo estágio, a mistura foi submetida à pressão de 3,4 MPa (493 psi). Após a homogeneização, as misturas foram pasteurizadas (65°C/30 minutos) e resfriadas (10°C) em um resfriador do tipo cascata.

Os tratamentos da mistura foram encaminhados para a máquina produtora Inadal (Mod. DS-3) para a incorporação de ar (*overrun*) e o início do congelamento.

O sorvete foi embalado em potes de 1 litro hermeticamente fechado e armazenado em freezer (-18°C), pelo período de sete dias para completar o congelamento.

Microscopia ótica

As análises microscópicas foram realizadas após 30, 60 e 90 dias de armazenamento. As amostras de cada tratamento, armazenadas sob temperatura de refrigeração, foram coletadas, descongeladas e gotejadas em lâminas de microscopia. As lâminas foram fixadas no microscópio (Meiji) equipado com *cold stage* acoplado a um sistema de aquisição de imagens. As amostras foram recongeladas a uma taxa de congelamento, de aproximadamente, 0,4°C/minuto e as imagens foram adquiridas em intervalos de 1 minuto. Um *software* analisador de imagens (Sigma Scan-Pro 5.0) foi utilizado para mensurar o diâmetro e a área dos cristais de gelo de cada tratamento.

Viscosidade das amostras

As amostras de cada tratamento e tempo de armazenagem foram descongeladas e analisadas, à temperatura de 21°C, utilizando o Viscosímetro Brookfield RVT (Brookfield Engineering Laboratories, Inc. USA).

Dessoramento das amostras descongeladas

As amostras de sorvete descongelado que apresentaram dessoramento foram encaminhadas ao funil de separação, onde foram obtidas e pesadas as frações do soro das amostras nos tempos de 30, 60 e 90 dias de estocagem.

RESULTADOS E DISCUSSAO

Efeito do cálcio na viscosidade do sorvete

Os resultados da viscosidade média da mistura preparada para a fabricação do sorvete encontram-se na Tabela 1, segundo os quais constata-se que a adição de carragena aumentou

significativamente ($p < 0,05$) o valor médio da viscosidade. As amostras ausentes da adição de carragena apresentaram baixa viscosidade em comparação com os valores obtidos para as amostras adicionadas de carragena.

TABELA 1. Valores médios da viscosidade da calda preparada para a fabricação de sorvetes.

Carragena	Médias[1] (mPa.s)
Com	230,13 a
Sem	26,31 b

[1] Médias verticais seguidas por letras distintas diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott

Os valores da viscosidade média das amostras de sorvete descongelado armazenados no tempo de 30, 60 e 90 dias encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2. Valores médios da viscosidade das amostras de sorvete descongelado.

Aditivo	Médias[1](mPa.s)	
	Carragena (0,05%)	Carragena (0%)
Cálcio	55,47 a	19,36 c
Ausência	43,40 b	19,29 c

[1] Médias horizontais e verticais, seguidas de letras distintas, diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott. Médias verticais e horizontais seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo nível de significância.

Observa-se que a adição de carragena aumenta significativamente a viscosidade da massa e a adição de cálcio em amostras adicionadas de carragena resulta em valores médios de viscosidade mais altos ($p < 0,05$).
As variações encontradas na viscosidade entre os tratamentos podem ser explicadas pela capacidade que certos polissacarídeos de cadeia longa têm de interagir com átomos bivalentes, como o cálcio.

Dessoramento do sorvete após o descongelamento
Os resultados para porcentagem, em massa de soro, das amostras adicionadas de carragena e cálcio são mostrados na Tabela 3. Através dos resultados observa-se que ocorre um dessoramento do produto e este diminuiu em função do tempo de estocagem.

TABELA 3. Porcentagem, em massa de soro, das amostras adicionadas de carragena e cálcio, em função do tempo de estocagem.

Tempo (dias)	Médias[1] (%) soro
30	39,97 a
60	35,06 b
90	27,63 c

[1] Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

Segundo Fox e Mcsweeney (1998), com o passar do tempo, parte do cálcio presente se insolubiliza durante o congelamento e, com isso, as moléculas de água retomam as interações entre as moléculas dos polissacarídeos, reduzindo a quantidade de água livre e, conseqüentemente, diminuindo o dessoramento do sorvete.

Efeito do cálcio no processo de recongelamento da água no sorvete
Os valores médios dos diâmetros de cristais de gelo, em amostras de sorvete, em diferentes tempos de estocagem estão relacionados na Tabela 4. Nas amostras adicionadas de cálcio, associadas à adição de carragena, foram observadas uma diminuição do tamanho médio dos cristais de gelo durante o tempo de estocagem. Nas amostras ausentes de calcio, a carragena teve o efeito estabilizador do tamanho dos cristais de gelo, durante o processo de recongelamento. A adição de cálcio aumentou significativamente ($p < 0,05$) o tamanho médio dos cristais de gelo em comparação aos outros tratamentos. Entre as amostras adicionadas de cálcio e carragena, foi observada variação significativa no tamanho médio dos cristais de gelo, em função do tempo de 30, 60 e 90 dias de estocagem.

TABELA 4. Valores médios dos diâmetros dos cristais de gelo em amostras de sorvete, em diferentes tempos de estocagem.

Aditivo	Tempo (dias)	Médias[1] (µm)	
		Carragena (0,05%)	Carragena (0%)
Cálcio	30	45,49 a1	40,79 a1
Cálcio	60	41,12 a2	40,47 a1
Cálcio	90	28,14 a3	33,17 a1
Ausência	30	36,70 b1	35,78 b1
Ausência	60	32,26 b1	31,14 b2
Ausência	90	31,39 b1	20,76 b3

[1] Médias verticais seguidas de letras e números distintos diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott. Médias horizontais seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott. Médias verticais seguidas pelo mesmo número não diferem entre si.

CONCLUSÃO

A adição de carragena aumentou a viscosidade da calda e a adição de cálcio nestas amostras não interferiu na viscosidade da massa.
O tamanho médio dos cristais de gelo foi maior nas amostras adicionadas de cálcio armazenadas pelo tempo de 30 dias.
A presença de cálcio nos sorvetes adicionados de carragena e nos sorvetes sem adição de carragena diminuiu consideravelmente o tamanho médio dos cristais de gelo, em comparação com o tamanho médio dos cristais de gelo nas amostras sem adição de cálcio ou carragena, durante o tempo de 30, 60 e 90 dias de estocagem.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Costa, F.F. et al. Efeito da adição da carragena, cálcio e citrato na recristalização e distribuição do gelo na massa de sorvetes. **Revista do Instituto de Laticinios Candido Tostes**, Nov/Dez, nº 353, 61, 3-9, 2006.
Fennema, O.R. Instability of nonequilibrium states of water in frozen foods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.11, n.2, p.152-169, 1991.
Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London: Blackie Academic & Professional. 1998. 487p.

EFEITO DA ADICAO DO CALCIO NA ESTRUTURA E QUALIDADE DE SORVETES

Costa, Fabiano Freire[1]; de Resende, Jaime Vilela[1]; de Abreu, Luiz Ronaldo[1]; Goff, H. Douglas[2]; Silva, Paulo Henrique da Fonseca[3]

1. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DOS ALIMENTOS

Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras/MG, Brazil. E-mail: jvresende@ufla.br

2. University of Guelph, Guelph, ON, Canadá.

3. Instituto de Laticínios Candido Tostes – EPAMIG- Juiz de Fora/MG, Brazil

Palavras chave: cálcio, recristalização, gelo, sorvete.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the influence of calcium addition on the process of ice recrystallization in the ice cream mix. A basic mixture was prepared and divided into two parts; to one of them received 1.0 g/L of calcium chloride and another one received no additives, considered as the control treatment. Each one was simultaneously whipped and frozen in an ice cream maker, Inadal (Mod. DS-3). The portions were then packed in hermetically sealed, 1-liter containers and stored at -18°C. After 30, 60 and 90 days of storage, samples from each portion were dawned, thawed and analyzed under an optic microscope (Meiji) with a cold stage system and video capture. The samples were refrozen on the microscope by the cold stage to an average temperature of -10°C, at which they were then microphotographed. In order to measure the ice crystals size Sigma Scan-Pro 5.0 image-analyzer software was utilized. The results demonstrated that the average size of the ice crystals varied according to the composition of each sample. The addition of calcium increased ($p < 0.05$) the average size of the ice crystals. These results can be explained by the interaction of the calcium with the other components present in each sample. It is reasonable to conclude that the addition of calcium directly interferes on the recrystallization process of ice in ice cream.

INTRODUCAO

Um dos principais interesses das Industrias Alimentícias atualmente esta na fortificação e suplementação dos alimentos produzidos. Várias empresas adicionam minerais e vitaminas aos alimentos melhorando os valores nutritivos dos mesmos e em contra partida chamando a atenção do consumidor com relação a determinados produtos. Entretanto, é muito importante o entendimento das interações que podem ocorrer entre os produtos adicionados e os ingredientes dos alimentos que sofreram modificação ao ser suplementado ou fortificado, no intuito de manter a estrutura original e a estabilidade perante as condições de fabricação, transporte e armazenamento de cada alimento (Costa, 2006).

O cálcio é um mineral essencial ao ser humano podendo ser encontrado principalmente em leite e seus derivados. Este mineral e responsável pela formação óssea bem como regulador das contrações musculares, atividades enzimáticas, transporte da membrana e funções hormonais.

O sorvete, por ser um derivado do leite é uma rica fonte em cálcio e demais minerais como fósforo e potássio. A fortificação de cálcio em sorvetes é uma interessante estratégia no intuito de chamar atenção do consumidor desmistificando a idéia de que este produto deve ser consumido apenas em dias quentes.

A qualidade do sorvete, levando em consideração a textura suave ou a sensação de frescor percebida pelos consumidores enquanto o consomem, está diretamente relacionada com a formulação (ingredientes), a estrutura da espuma, o tamanho e a morfologia das bolhas de ar e dos cristais de gelo incorporados ao produto (Chang & Hartel, 2002).

O tamanho médio dos cristais de gelo, de açúcar e as bolhas de ar presentes no sorvete, recomendado por Goff et al. (1999), deve ser de 20 a 50 μm de diâmetro. De acordo com Donhowe & Hartel (1996), o tamanho médio dos cristais de gelo pode ser afetado pelo fenômeno de recristalização, o qual está diretamente relacionado com a quantidade e a qualidade dos estabilizantes adicionados e as oscilações de temperatura durante o transporte e a armazenagem.

O objetivo deste estudo foi investigar a influencia do cálcio na estrutura e qualidade de sorvetes verificando o efeito deste nas propriedades das proteínas do leite.

MATERIAS E METODOS

Preparo das amostras

Foi fabricada, em três repetições, uma mistura básica para sorvete lácteo. Os ingredientes foram balanceados e posteriormente misturados, a uma temperatura de 50°C, em um tacho aberto de aço inoxidável provido de parede dupla por onde circulam o vapor ou a água de resfriamento.

Esta mistura foi dividida em dois lotes, tendo apenas um recebido adição de 1g/L de cloreto de calcio. Os dois lotes foram homogeneizados no primeiro estágio submetidos à pressão de 15,5 MPa (aproximadamente 2.250 psi) e, no segundo estágio, a mistura foi submetida à pressão de 3,4 MPa (493 psi). Após a homogeneização, as misturas foram pasteurizadas (65°C/30 minutos) e resfriadas (10°C) em um resfriador do tipo cascata.

Os tratamentos da mistura foram encaminhados para a máquina produtora Inadal (Mod. DS-3) para a incorporação de ar (*overrun*) e o início do congelamento.

O sorvete foi embalado em potes de 1 litro hermeticamente fechado e armazenado em freezer (-18°C), pelo período de sete dias para completar o congelamento. As amostras foram transportadas em caminhão refrigerado e armazenadas por um período de 30, 60 e 90 dias para a execução das análises.

Microscopia ótica

As análises microscópicas foram realizadas após 30, 60 e 90 dias de armazenamento em embalagem hermeticamente fechada. As amostras de cada tratamento, armazenadas sob temperatura de refrigeração, foram coletadas, descongeladas e gotejadas em lâminas de microscopia. As lâminas foram fixadas no microscópio (Meiji) equipado com *cold stage* acoplado a um sistema de aquisição de imagens. As amostras foram recongeladas a uma taxa de congelamento, de aproximadamente, 0,4°C/minuto e as imagens foram adquiridas em intervalos de 1 minuto. Um *software* analisador de imagens (Sigma Scan-Pro 5.0) foi utilizado para mensurar o diâmetro e a área dos cristais de gelo de cada tratamento.

Ultracentrifugacão

Foi preparada uma solucao contendo 15,5% de leite em pó desnatado. Esta solução foi dividida em duas partes as quais uma recebeu a adição de cloreto de cálcio. Após 24 horas de armazenamento a 4 °C, em triplicata, esta soluções foram

encaminhadas a uma ultracentrífuga (Beckman L8-M ultracentrifugate com um T-47 rotor Beckaman, Fullerton, CA, USA). Foi utilizada uma rotação de 40,000*g* a 20°C por 60 min. O sobrenadante e o precipitado foram retirados e pesados.

RESULTADOS E DISCUSSAO

Os valores médios dos diâmetros dos cristais de gelo nas amostras de sorvete, em diferentes tempos de estocagem adicionados ou não de cloreto de cálcio estão relacionados na Tabela 1.

TABELA 1. Valores médios dos diâmetros dos cristais de gelo em amostras de sorvete, em diferentes tempos de estocagem.

Aditivo	Tempo (dias)	Médias[1] (μm)
Cloreto de Cálcio	30	40,79 [a]
Cloreto de Cálcio	60	40,47 [a]
Cloreto de Cálcio	90	33,17 [a]
Controle	30	35,78 [b]
Controle	60	31,14 [b]
Controle	90	20,76 [b]

[1] Médias verticais seguidas de letras distintas diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

Os resultados indicam que a presença de cálcio induz a formação de cristais de gelo maiores durante o recongelamento das amostras de sorvetes adicionadas de cálcio, quando comparados com os da amostra controle. A adição de cálcio aumentou significativamente ($p < 0,05$) o tamanho médio dos cristais de gelo em comparação com as amostras ausentes da adição de cálcio.

Este efeito pode ser observado na Figura 1. As fotomicrografias apresentadas na Figura 1 ilustram as diferenças entre os tamanhos dos cristais de gelo na ausência e na presença de cálcio. Não foi observada variação entre os diâmetros dos cristais de gelo durante o tempo de estocagem.

A Tabela 2 mostra os resultados das médias dos pesos (% m/m) do sobrenadante e do precipitado. De acordo com este experimento foi possível observar a influência do cloreto de cálcio quando este foi adicionado. Houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na porcentagem de soro da amostra. Do mesmo modo que foi observada uma diminuicao na porcentagem de precipitado. Nas amostras ausentes de cloreto de cálcio foi possível observar justamente o inverso, menor quantidade de sobrenadante (soro) e maior quantidade de precipitado.

TABELA 2. Valores médios dos pesos (% m/m) do sobrenadante e precipitado da amostras de leite adicionadas ou não de cloreto de cálcio.

Aditivo	Sobrenadante Peso (% m/m)	Precipitado Peso (% m/m)
Cloreto de Cálcio	82.75 a	16.20 a
Controle	79.20 b	19.77 b

[1] Médias verticais seguidas de letras distintas diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Turkey.

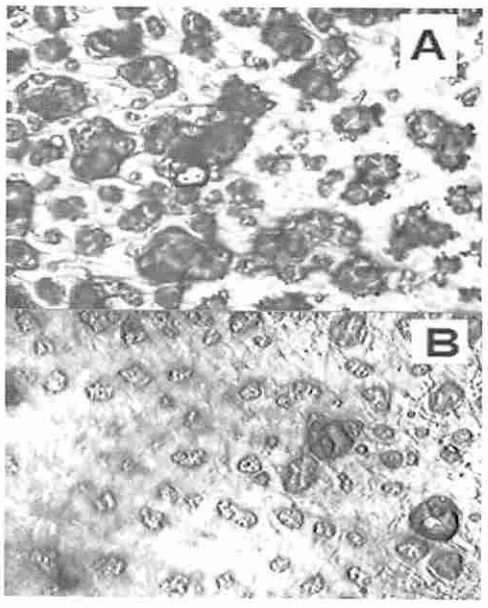


FIGURA 1. Fotomicrografias de uma amostra de sorvete adicionada de cloreto de cálcio (A) e controle (B)

Segundo Fox e Mcsweeney (1998), quando se adiciona cloreto de cálcio ao leite ou quando o leite possui uma grande variação na quantidade de cálcio solúvel, devido à sazonalidade e à individualidade de cada animal, ocorre uma diferença no potencial osmótico. No intuito de equilibrar esta diferença no potencial osmótico, os nanoclusters de fosfato de cálcio coloidal ligado a serina presente na caseína do leite se saturam devido à absorção de grande parte do cálcio solúvel presente no meio. Com isso parte da água anteriormente presente nas estruturas das proteínas do leite é liberada no intuito de se manter o equilíbrio. Quando esta água liberada se congela produz cristais de gelo maiores.

CONCLUSAO

Foi possível concluir com este trabalho que a suplementação ou fortificação de cálcio pode interferir diretamente na estrutura e qualidade dos sorvetes. Os sorvetes adicionados de cálcio apresentaram cristais de gelo maiores que os sorvetes ausentes da adição deste mineral. Este efeito reflete na importância de novos estudos relacionados nas interações entre o cálcio e as proteínas do leite.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Chang, Y.W.; Hartel, R.W. Development of air cells in a batch ice cream freezer. **Journal of Food Engineering**, London, v.53, n.1, 2002.

Costa, Fabiano Freire. **Efeitos de aditivos na cristalização de sorvetes.** 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Donhowe, D.P.; Hartel, R.W. Recristallization of ice during bulk storage of ice cream. **International Dairy Journal**, 1996.

Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London: Blackie Academic & Professional. 1998. 487p.

Goff, H.D.; Verespej, E.; Smith, A.K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v.9, p.817-829, 1999.

SÍNTESIS DEL ALMIDÓN OCTENILSUCCINADO DE *Phaseolus lunatus*: EFECTO DE LA MODIFICACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FUNCIONALES.

Segura-Campos, Maira; Chel-Guerrero, Luis; Betancur-Ancona, David.
Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Juárez No. 421, Cd. Industrial. C.P. 1288, Apdo. Postal 26, Suc. Las Fuentes. Mérida, Yucatán, México.
E. mail: bancona@uady.mx.

Palabras clave: Propiedades funcionales, composición química, *P. lunatus*, almidón, esterificación.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la modificación química del almidón nativo (AN) de *P. lunatus* por esterificación con anhídrido octenilsuccínico (OSA) y se evaluó el efecto sobre su composición química y propiedades funcionales. La succinación se realizó de acuerdo con un diseño factorial 2^3 con 4 réplicas del tratamiento central. Los factores y niveles evaluados fueron: concentración (1 y 3%), pH (7 y 9) y tiempo de reacción (30 y 60 min), siendo la variable de respuesta el porcentaje de succinílos. El mejor tratamiento se obtuvo haciendo reaccionar el almidón de *P. lunatus* con 3% de OSA a un pH de 7 durante 30 min, alcanzando 0.5083 % de grupos succinílos. Comparado con el AN, el derivado obtenido no presentó cambios significativos en su composición proximal; sin embargo, los niveles de amilosa aparente disminuyeron como resultado de la incorporación del agente modificador. La succinación aumentó la capacidad y estabilidad emulsificante; la firmeza, claridad y sinéresis de sus geles tanto en refrigeración como en congelación; disminuyó la temperatura y la entalpía de gelatinización, y no provocó cambios significativos en los parámetros de solubilidad y poder de hinchamiento.

INTRODUCCIÓN

El *P. lunatus* o frijol lima es una fuente no convencional para la extracción de almidón, es cultivado en el sureste de México y ha demostrado ser una fuente potencial de alimentación debido a su importante aporte de proteínas (25%) y carbohidratos (60%). Actualmente los almidones nativos, entre ellos el del frijol lima, presentan un conjunto de limitaciones que han hecho disminuir su uso en la industria alimentaria como espesante, estabilizante y gelificante. Sin embargo, la alta reactividad que le confieren los grupos hidroxilos libres presentes en su molécula, permite modificar y regular sus propiedades mediante tratamientos químicos (Betancur y col., 2002). Un ejemplo de ello es la succinación, la cual pertenece al grupo de reacciones por estabilización caracterizadas por disminuir la reasociación de las moléculas aumentando la estabilidad de los almidones por eterificación o esterificación (Van Hung y Morita, 2005). La succinación depende de factores como la concentración de reactivo, el pH y el tiempo de reacción, favoreciéndose la reacción de sustitución al controlar dichas condiciones para disminuir el efecto de la hidrólisis del anhídrido y del derivado que pueden producirse paralelamente a la reacción principal (Betancur y col. 2002). Esta modificación puede realizarse utilizando como agente de sustitución el OSA, con el que se logra introducir a la molécula de almidón un grupo sustituyente que posee una cadena hidrofóbica larga y de esta forma el derivado adquiere la habilidad para estabilizar emulsiones de aceite en agua al combinar la hidrofobicidad del grupo octenil con el grupo carboxil o carboxilato de sodio, ampliando con ello el uso de estos derivados en la industria alimenticia dada su naturaleza anfifílica (Shogren y col, 2000). Otra de las ventajas de realizar este tipo de modificación es que las propiedades de pastificación y gelificación de los derivados se estabilizan debido a que los grupos octenilsuccinatos interrumpen la linealidad de la amilosa y de la porción ramificada de la amilopectina, viéndose reflejado por un aumento en la viscosidad de las pastas y una disminución de la temperatura de gelatinización (Trubiano, 1986). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de OSA, pH y tiempo de reacción sobre la sustitución del almidón nativo de *P. lunatus* para establecer las condiciones más adecuadas para la obtención de almidones octenilsuccinados y evaluar el efecto de la modificación sobre la composición química y las propiedades funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Granos.

Los granos de *P. lunatus* se obtuvieron de la cosecha de febrero del 2005 de ejidos productores del estado de Yucatán, México. Se limpiaron y molieron 6 Kg de los mismos hasta obtener una harina capaz de pasar a través de un tamiz de malla 20 (0.85 mm de abertura de poro).

Métodos

Obtención del almidón nativo

Para obtener el almidón de *P. lunatus*, se empleó el método reportado por Betancur y col. (2004), el cual consistió en un fraccionamiento en húmedo de los componentes de la harina de la leguminosa.

Octenilsuccinación del almidón de *P. lunatus*

La modificación se efectuó de acuerdo con un diseño factorial 2^3 con cuatro réplicas del tratamiento central. Los factores y niveles evaluados fueron: concentración de anhídrido octenilsuccínico (1 y 3% p/p); pH, (7 y 9) y tiempo de reacción (30 y 60 min). La modificación del almidón y la determinación del porcentaje de grupos succinílos, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Báez (1996) y los cálculos se efectuaron utilizando la siguiente expresión según Wurzburg (1964):

% de succinílos = [(B-M) ml x N ácido x 0.045 / Peso de la muestra (g)] x 100

B = ml de HCl 0.2 M para blanco.

M = ml de HCl 0.2 M para la muestra.

Grado de Sustitución (G.S.) = (162 x % succinil) / (10 000 – (99 x % succinil))

162 = Peso molecular de la unidad de anhidro glucosa

10 000 = 100 x peso molecular del grupo succinil

99 = Peso molecular del grupo succinil – 1

Composición química del AN y A-OSA de *P. lunatus*

Al AN y A-OSA de *P. lunatus* seleccionado como el mejor tratamiento del experimento, es decir, aquél que presentó mayor porcentaje de succinílos, se les determinó el contenido de humedad, cenizas, proteína, fibra y grasa cruda, de acuerdo a los procedimientos oficiales descritos por la AOAC (1997) (métodos 925.09, 923.03, 954.01, 962.09 y 920.39, respectivamente). Los carbohidratos totales se estimaron por diferencia al 100 % como extracto libre de nitrógeno y se utilizó el método de Morrison y Laignelet (1983) para determinar el contenido de amilosa aparente, calculando el contenido de amilopectina por diferencia al 100% del contenido de amilosa.

Propiedades funcionales del AN y A-OSA de *P. lunatus*

La temperatura de gelatinización se determinó utilizando el método reportado por Ruales y Nair (1994), basado en calorimetría diferencial de barrido (CDB). La temperatura inicial (Ti), temperatura pico (Tp), temperatura final (Tf) y la entalpía de gelatinización (ΔH) se obtuvieron del termograma resultante.

Los patrones de solubilidad (S) y poder de hinchamiento (PH) se determinaron según el método de Schoch (1964).

La claridad de las pastas se determinó mediante el método de Bello-Pérez y col. (1999), empleando un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman Instruments, Inc. CA, USA) para determinar el porcentaje de transmitancia (%T) a 650 nm.

La capacidad emulsificante se determinó utilizando la técnica recomendada por Jiménez-Colmenero y García-Matamoros (1981), expresándose la respuesta en ml de aceite por ml de muestra.

Las propiedades de pastificación se determinaron por el método de Wiesenborn y col. (1994) utilizando un viscoamilógrafo Brabender PT-100 (Germany). La viscosidad máxima, la consistencia, la fragilidad y el asentamiento en Unidades Brabender (UB) se calcularon a partir de los amilogramas resultantes.

La estabilidad al almacenamiento en refrigeración y congelación se determinó mediante gelificación utilizando un viscoamilógrafo Brabender PT-100 (Germany) y almacenamiento a 4 y -10°C respectivamente; centrifugando y midiendo el agua separada del gel de almidón en ciclos de un día durante 5 días, de acuerdo al método de Eliasson y Ryang (1992).

La estabilidad de la emulsión del AN y A-OSA se determinó utilizando el método de Dagorn-Scaviner y col. (1986), cuantificando la cinética de la emulsión de los almidones de estudio por la medida del volumen (V_t en ml) de fase acuosa a los 30 s, 5, 30 y 120 min.

Los parámetros de elasticidad y carga máxima se determinaron de acuerdo al método de Hoover y Senanayake (1995), utilizando un viscoamilógrafo Brabender para preparar las pastas de almidón y una máquina universal de pruebas Instron modelo 4411 para medir la penetración del gel con una probeta de 5 mm, una celda de 5 kgf y a una velocidad de 1 mm/s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificación del almidón nativo

Los valores de grupos succinílos obtenidos oscilaron entre 0.0807 y 0.5083%, lo cual implicó un grado de sustitución de 0.0013 y 0.0083, respectivamente; razón por la cual los derivados obtenidos pueden clasificarse como de bajo GS. Los resultados del análisis de regresión para la variable de respuesta evaluada, indicaron que existió un ajuste ($P<0.05$) de los datos experimentales a un modelo polinomial de primer orden en el cual se observa el comportamiento del % de succinílos de los derivados obtenidos en función de la concentración del agente modificador (A), el pH (B) y tiempo de reacción (C):

$$\textbf{\% succinílos} = 0.268942 + 0.0399125\,(A) - 0.0687625\,(C) - 0.0355875\,(AB) + 0.0695375\,(BC) + 0.0227625\,(ABC)$$

El análisis del coeficiente de regresión de las variables permitió establecer que la modificación se favorece al emplear una concentración de reactivo alta, así como un pH y un tiempo de reacción bajo. El coeficiente de determinación ($r^2 = 0.9831$) indicó un excelente ajuste de los resultados al modelo matemático propuesto y al comparar las medias de los tratamientos mediante la prueba de Duncan se demostró que lo más conveniente es emplear niveles de OSA de 3%, un pH de 7 y un tiempo de reacción de 30 min (0.5083% de grupos succinílos).

Composición Química

La reacción de modificación no provocó variaciones importantes en cuanto a la composición química, sin embargo los niveles de amilosa aparente disminuyeron de 32.4 a 23.6% debido a la introducción de grupos octenilsuccinatos (hidrofóbicos) los cuales incrementaron posiblemente las ramificaciones y evitaron la absorción de mayor cantidad de yodo empleado en la técnica de determinación. Lo anterior se reflejó en el menor contenido de amilosa aparente del derivado obtenido el cual es dependiente de la cantidad de grupos succinílos incorporados y por lo tanto, el contenido de amilopectina fue mayor para el A-OSA (76.4 %) con respecto al AN (67.6 %).

Comparado con el AN, la temperatura de gelatinización del A-OSA disminuyó de 75.3 a 64.6°C, lo cual es una propiedad característica de los almidones estabilizados y permite su uso en procesos donde se requiera de un espesante que gelatinice a menores temperaturas o simplemente para reducir gastos energéticos durante la elaboración de los productos en que sean incorporados. También la Ti y Tf disminuyeron como resultado de la modificación, requiriéndose también menos energía para gelatinizar al almidón modificado (Tabla 1).

Tabla 1. Gelatinización del AN y A-OSA

	AN	A-OSA
Ti (°C)	67.9 ± 0.34[a]	56.7 ± 1.62b
Tp (°C)	75.3 ± 0.26a	64.6 ± 0.18b
Tf (°C)	89.3 ± 0.98[a]	72.4 ± 1.11b
ΔH (J/g)	10.7 ± 0.22a	9.7 ± 0.09b

Comparado con el AN el derivado obtenido presentó niveles de S y PH estadísticamente iguales, lo cual puede atribuirse al tipo de estructura granular que reduce la interacción con el agua, a los bajos niveles de sustitución obtenidos y a la presencia o introducción de los grupos OSA en la molécula de almidón, los cuales poseen una alta porción no polar, disminuyendo de esta forma la absorción de agua durante el calentamiento y su retención en el interior de las moléculas de almidón lo cual debe tomarse a consideración cuando el derivado se utilice como ingrediente funcional en sistemas alimenticios y otras aplicaciones industriales (Figura 1).

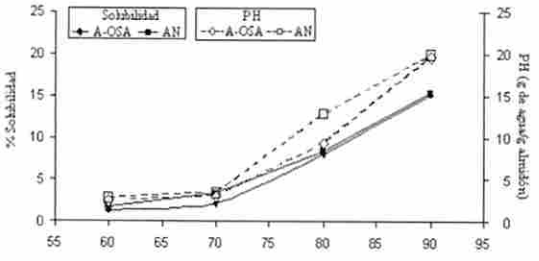


Figura 1. Solubilidad y poder de hinchamiento del AN y A-OSA

La introducción de grupos químicos sustituyentes dio lugar al incremento de la claridad de las pastas al observarse un aumento del %T de 23.84 y 37.32 %, resultando útil este almidón en sistemas alimenticios que requieran transparencia como rellenos para pay de frutas, en confitería, etc.

El A-OSA presentó una mayor CE (53 ml de aceite/ml de muestra) con respecto al AN (47.43 ml de aceite/ml de muestra). La succinación permitió introducir a la molécula de almidón un grupo sustituyente que posee una cadena hidrofóbica larga y, por lo tanto, se obtuvo un derivado con ligeras propiedades de actividad superficial que lo hace adecuado en la preparación de emulsiones.

Con respecto a las propiedades de pastificación, el AN fue el primero que empezó a formar pasta (Figura 2), con una temperatura inicial de 72 °C. Sin embargo, fue el A-OSA el que destacó por haber tenido el máximo pico de viscosidad (1000 UB) aunque presentó mayor fragilidad (290 UB comparado con 120 UB del AN) al observarse una disminución de la misma durante el proceso de calentamiento debido al hinchamiento de las moléculas de almidón. Los valores de consistencia (170 UB) y asentamiento (-120) obtenidos para el almidón modificado fueron iguales (170 UB) y menores (50 UB) respectivamente, a los obtenidos para el AN, indicando que el A-OSA fue menos estable a los procesos de calentamiento y enfriamiento; sin embargo, presentará una mayor

capacidad espesante al enfriar las pastas de los alimentos en que sea incorporado.

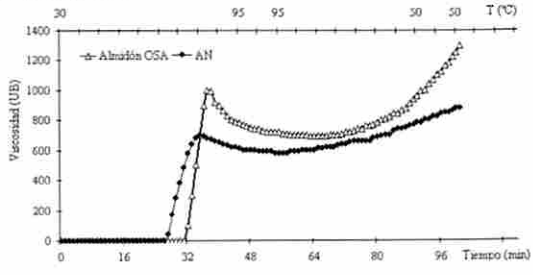


Figura 2.Viscoamilograma del AN y A-OSA

Los geles del A-OSA presentaron grados de sinéresis ligeramente mayores cuando se sometieron a ciclos de refrigeración (4°C) y congelación (-10°C), en comparación con el AN (Figura 3). Este fenómeno es indeseable para la industria alimentaria, ya que en refrigeración el derivado presentó un aspecto similar al de una esponja, capaz de absorber el agua e irla perdiendo a través del tiempo al ser centrifugada (8000 *x g* durante 15 min) esto como resultado de la reorganización de las moléculas de amilosa y amilopectina que provocaron la expulsión de agua del gel, así como de factores como la concentración que pudieron favorecer dicho proceso. También, cuando los almidones se someten a sucesivos ciclos de congelación-descongelación, la estructura se ve afectada, ya que se presenta una redistribución y dilución de las pastas de almidón por el crecimiento y disolución de los cristales de hielo. Probablemente, esto sucedió con el A-OSA, ya que el agua retenida pudiera haber sido expelida de las asociaciones inter e intra moleculares, resultando en una separación de fases: una rica en los polímeros (gel) y otra deficiente en ellos (parte líquida).

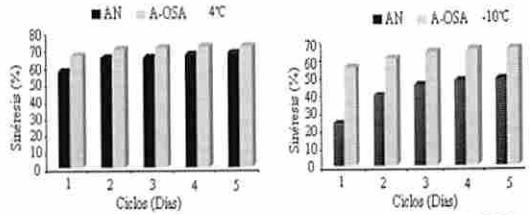


Figura 3. Estabilidad de la pasta del AN y A-OSA a 4 y -10 °C

El A-OSA presentó una mejor estabilidad de la emulsión a través del tiempo con respecto al AN debido a la combinación de la hidrofobicidad del grupo octenil con el grupo carboxil o carboxilato de sodio (Tabla 2).

Tabla 2. Volumen de las emulsiones del AN y A-OSA en función del tiempo

Tiempo	Volumen de la emulsión (ml)	
	A-OSA	AN
30 s	10	9
5 min	10	9
30 min	10	8.5
120 min	9.5	8.5

El gel formado con el A-OSA presentó una mayor deformación (14.90 mm) al requerir de 0.0314 kgf para romperse, comparado con 0.3401 kgf obtenida en el AN (7.27 mm). Dicha deformación podría deberse al menor contenido de amilosa aparente que presenta ya que ésta determina en mayor medida la firmeza de los geles debido a que sus moléculas se alinean uniéndose entre sí por puentes de hidrógeno, formando así una red tridimensional rígida.

CONCLUSIONES

La esterificación del almidón de *P. lunatus* con OSA se favoreció al utilizar 3% del agente modificador a pH 7 durante 30 min, alcanzando 0.5083 % de grupos succinilos y un GS de 0.0083. La modificación no provocó cambios significativos en la composición proximal del derivado obtenido. Sin embargo, los niveles de amilosa aparente disminuyeron como resultado de la incorporación del agente modificador. También, disminuyó la temperatura de gelatinización de 75.3 a 64.6°C, aumentó la viscosidad de 700 hasta 1000 UB, proporcionó a sus pastas y geles mayor transparencia, así como un aumento en su capacidad emulsificante y sobre todo en la estabilidad de sus emulsiones. La baja estabilidad al almacenamiento en refrigeración y congelación, así como, los mayores niveles de sinéresis obtenidos en el almidón OSA deben tomarse en cuenta al momento de utilizar este derivado como ingrediente funcional en sistemas alimenticios que necesiten ser almacenados a bajas temperaturas. Para la elección de este derivado como aditivo en un alimento especifico deben tomarse en cuenta las propiedades funcionales que presenta, los ingredientes que estarán presentes en el sistema y las condiciones del proceso.

REFERENCIAS

-Association of Oficial Analytical Chemists (A.O.A.C.) 1997. Oficial Methods of Analysis. 17th ed., William Horwitz editor, Washington D.C., U.S.A.

- Báez, R.E. 1996. Síntesis del succinato de almidón. Trabajo de diploma. Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana.

- Bello-Pérez, L. A.; Agama-Acevedo, E.; Sánchez-Hernández, L. and Paredes-López, O. 1999. Isolation and partial characterization of banana starches. J. Agric. Food Chem. 47(3):854-857.

- Betancur, D.A., García, E., Cañizares, L. and Chel, L. 2002. Chemical modification of jack bean (*Canavalia ensiformis*) starch by succynilation. Starch/Stärke. 54: 540-546.

- Betancur – Ancona, D.; Gallegos-Tintoré S. and Chel-Guerrero, L. (2004). Wet fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. J. SCI. Food Agr. 84: 1193-1201.

- Dagorn-Scaviner, C.; Guéguen, J., and Lefebre, J. 1986. Emulsifyng properties of pea globulins as related to their adsoption behaviours. JFS. 52: 335-341.

- Eliasson, A. C. and Ryang, H. K. 1992. Changes in rheological properties of hydroxipropyl potato starch paste during freeze-thaw treatmentes. J. Texture Studies. 23 (3):279-296.

- Jiménez-Colmenero, F., and García-Matamoros, E. 1981. Effects of washing on the properties of mechanically deponed meat. In Proceedings of the 27th European Meeting of Meat Research workers. O. Pranld (Ed.) Venna. pp: 351-354.

- Morrison y Laignelet. 1983. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. J. Cereal Sci. 1:19-35.

- Shogren, R.L., Viswanathan, A., Felker, F. and Gross, R.A. 2000. Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. Starch/Stärke.52: 196-204.

- Ruales, J. & Nair, B. 1994. Properties of starch and dietary fiber in raw and processed quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. Plant Foods Hum Nutr, 45, 223-246.

- Schoch, T. 1964. Swelling power and solubility of granular starches. In: Methods in Carbohydrates Chemistry. Academyc Press, New York. pp. 106-108.

- Tjahjadi, C. and Breene, W. 1984. Isolation and characterization of adzuki bean (*Vigna angularis cv. Takara*) starch. JFS. 49(3): 558-562.

- Trubiano, P. 1986. Succinate and substituted derivatives of starch. In: Modified Starches: Properties and Uses", Edit by Wurzburg O.B. CRC Press, Boca de Ratón, Florida, U.S.A.

- Van Hung, P. y Morita, N. 2005. Effects of granule sizes on physicochemical properties of cross-linked and acetylated wheat starches. Starch/Stärke. 57: 413-420.

- Wiesenborn, D.; Orr, P.; Casper, H. and Tacke, B. 1994. Potato starch paste behaviour as related to some physical/chemical properties. JFS. 63 (3):644.

- Wurzburg, O.B. 1964. "Acetylation". In: Methods in Carbohydrates Chemistry. Edit by Whisther R.L., Smith R.J. and Wolfrom M.L. Academic Press, U.S.A. Vol. 4. pp: 240-241.

EFECTO DEL PH EN EL TAMAÑO DE GOTA Y CARGA SUPERFICIAL EN NANOEMULSIONES DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSA PREPARADAS CON ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD.

Nerina A. Camino y Ana M. R. Pilosof *
Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
e- mail: apilosof@yahoo.com.ar

Palabras claves: propiedades funcionales y sensoriales, emulsiones submicrónicas, hidroxipropilmetilcelulosa, light scattering, potencial zeta.

RESUMEN

A diferencia de las microemulsiones, las nanoemulsiones poseen mayor estabilidad cinética, debido a que su tamaño de gota impide los fenómenos de desestabilización y son sistemas eficientes para encapsular y liberar controladamente componentes activos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del pH sobre el tamaño de gota y la carga superficial de nanoemulsiones estabilizadas con dos tipos de HPMC (E4M y E50LV).
Las emulsiones se prepararon por ultrasonido en dos relaciones aceite de girasol comercial y solución de HPMC (E4M 2% o E50LV al 3%). Se estudió el tamaño inicial de las gotas de aceite por dispersión de la luz y la carga superficial se determinó midiéndole potencial zeta El cremado de las emulsiones en función del tiempo y a temperatura ambiente, se analizó macroscópicamente.
Se obtuvo para todos los pH estudiados, que la menor relación de aceite: solución para las emulsiones estabilizadas por ambos polisacáridos, conducen a emulsiones con menor tamaño de partícula. Cuando se emplea E50LV el tamaño de gota resulta menor a todos los pH. Es importante resaltar que ninguna de las emulsiones presentó floculación ni coalescencia en el periodo de tiempo estudiado. La carga superficial fue más negativa a pH 5 para las emulsiones estabilizadas con ambos polisacáridos. Esto permitiría promover el complejamiento interfacial con la beta lactoglobulina, que tiene carga positiva debajo de su punto isoeléctrico, conduciendo a emulsiones estabilizadas por multicapas, lo cual aumentaría su estabilidad.

INTRODUCCIÓN

Las nanoemulsiones pueden emplearse como micro reactores de tamaño controlado para la obtención de partículas monodispersas (Porras y col., 2004). Tienen además propiedades de encapsulación y liberación controlada de componentes activos (Weiss y col., 2006). Su tamaño de gota está comprendido entre los 20 a 500 nm (Medina y col, 2001; Fernandez y col., 2004; Weiss y col., 2006). Debido a su pequeño tamaño de partícula, el movimiento browniano previene la sedimentación o el cremado, ofreciendo así una mayor estabilidad (Schulz y Daniels, 2000; Fernandez y col., 2004). Pueden persistir por meses o años (Mason y col., 2006).
La preparación de emulsiones con tamaño de gota en el rango submicrónico, requiere entregar gran cantidad de energía mecánica que generalmente se consigue con mezcladores de grandes deformaciones de cizalla, homogeneizadores de alta presión o generadores ultrasónicos (Schulz y Daniels, 2000; Fernandez y col, 2004; Mason y col., 2006).
Es posible la obtención de nanoemulsiones empleando biopolímeros alimentarios como proteínas y polisacáridos (Weiss y col., 2006). La mayoría de los polisacáridos de alto peso molecular, son altamente hidrofílicos y por lo tanto no tienden a adsorberse en la interfase aire- agua o aceite - agua. Sin embargo, algunos que poseen en su estructura grupos hidrofóbicos exhiben actividad interfacial y pueden estabilizar emulsiones (Baeza y col., 2004; Huang y col., 2001; Perez y col., 2006b).
Un grupo especial de polisacáridos con excelente actividad interfacial son las hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC). Son derivados de la celulosa que poseen grupos metilos e hidroxipropilos unidos a la cadena de anhidroglucosas. Incluyen una familia de éteres de celulosa que difieren entre si principalmente por su peso molecular, viscosidad, grado de substitución (DS) y substitución molar (MS). Es de interés utilizar este polisacárido debido a sus propiedades como agente de liberación controlada (Tadros, 2004), su alta actividad superficial (Perez y col, 2007) y su habilidad para formar geles por calentamiento (Perez y col., 2006a). Schulz y Daniels (2000) han obtenido emulsiones estabilizadas con hidroxipopilmetilcelulosa en el rango submicrónico utilizando homogeneizadores de alta presión.
La posibilidad de mejorar la estabilidad de una emulsión por la creación de multicapas alrededor de las gotas de aceite, ha sido demostrada en varios estudios (Dickinson y Pawlowsky, 1997, 1998; Singh, Tamhama, _Hemar y Munro, 2003; Gu, Decker y McClements, 2005).
Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha demostrado que a pH por debajo del punto isoeléctrico de la β-lactoglobulina (βlg), soluciones de HPMC y esta proteína existen en una única fase, lo que indicaría interacciones entre ambos polisacáridos.
Este trabajo es parte de un amplío estudio en la posible formación de nanoemulsiones estabilizadas por multicapas de HPMC y βlg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Methocell E4M y E50LV (calidad alimentaria) de Dow Chemical Company fueron donadas por Colorcon Argentina y se utilizaron sin purificación posterior. El contenido de humedad fue de 1,6%. La Tabla 1 muestra algunas de sus propiedades. Como fase aceite se empleó aceite de girasol comercial.

HPMC	E4M	E50LV
% metilos	28.0	29.1
% hidroxipropilos	10.2	9.2
Relación metilos/hidroxipropilos	2.3	3.2
Substitución en metilos (DS)	1.90	1.90
Substitución en hidroxipropilos (MS)	0.23	0.23
Substitución total (DS + MS)	2.13	2.13
Viscosidad (cp), solución al 2 %, 20°C	4965	41
Peso molecular	90000	18000

Métodos

Preparación de las soluciones de HPMC. Las soluciones de HPMC(E4M al 2% y E50LV al 3%) se prepararon en buffers 5 mM y de distinto pH (7, 6 y 5) previamente filtrados, a una temperatura de 80 – 90 °C. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se almacenaron a temperatura de refrigeración por 24 horas para alcanzar la máxima hidratación del polisacárido.

Preparación de las emulsiones. El aceite y la solución de HPMC se emulsificaron en ciclos de 5 minutos, en proporciones de 10:90 o 30:70 respectivamente mediante un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics modelo VCX 750 a una frecuencia de 20kHz y amplitud de 20%. Un baño de glicerina a 0°C se utilizó como medio refrigerante. Un equipo Ultraturrax T8 IKA Labortechnik, a 10000 RPM se empleó para mezclar la emulsión entre ciclos de sonicación. El tamaño de partícula se analizó inmediatamente después de su preparación.

Medición del tamaño de gota. Se determinó mediante dispersión de la luz (LS) con un Mastersizer 2000 equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000MU, ambos de Malvern Instruments Ltd, Malvern UK. Se evaluó el tamaño de gota en base al diámetro promedio de superficie - volumen o diámetro Sauter ($D_{32} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$) y en base al diámetro promedio equivalente de volumen o diámetro De Broucker ($D_{43} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$), donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i. D_{43} está relacionado con los cambios producidos en el tamaño de partícula por los fenómenos de coalescencia y floculación. D_{32} tiene en cuenta el área de la partícula creada por el proceso de homogeneización y se emplea como parámetro de formación de emulsiones. El tamaño de gota corresponde al promedio de diez mediciones realizadas en cada muestra ± SD.

Estabilidad de las emulsiones. Se prepararon por duplicado 5 ml de emulsión en tubos de 14 mm de diámetro interno y 100 mm de altura, perfectamente sellados y se almacenaron a temperatura ambiente. El cremado de las emulsiones y la aparición de aceite en función del tiempo se analizaron macroscópicamente. El tamaño de gota de la fase cremada se analizó por DLS en función del tiempo de almacenamiento.

Medición de Potencial zeta. Las emulsiones se diluyeron con el buffer en el cual fueron prepraradas en relación 1: 1000 para obtener una concentración de gota de 0.03% ó 0.01%. Se utilizó un equipo Malvern Zetasizer Nano-Zs (0,3 - 6000 nm) provisto de un laser He-Ne (633 nm) a un ángulo fijo de 173°. Este equipo mide el potencial zeta determinando la movilidad electroforética de las gotas cuando se aplica un campo eléctrico. El potencial zeta corresponde al promedio de diez mediciones realizadas en cada muestra ± SD.

RESULTADOS

Tamaño de gota .La figura 1 muestra los diámetros promedios iniciales. Se observa que se obtienen menores D_{32} para la relación 10:90 a todos los pH y para las emulsiones estabilizadas con E50LV. Esto se atribuye a que su menor peso molecular y menor viscosidad le permitiría una más rápida adsorción a la interfase y una mayor eficiencia en la propagación de las ondas ultrasónicas.

A pH 6, las emulsiones estabilizadas con E50LV y en relación 10:90 presentan el menor D_{32}, mientras que las emulsiones de E4M (para la misma relación aceite: solución) lo presentan a pH 7.

Con respecto al D_{43}, parámetro relacionado con la estabilidad de las emulsiones, se observa en general que si bien los diámetros de gota son submicrónicos en los pH analizados. Las emulsiones estabilizadas con E4M en relación aceite: solución 30:70, presentaron un D_{43} significativamente mayor, indicando mayor probabilidad a sufrir fenómenos de desestabilización.

Las curvas de distribución para todas las emulsiones preparadas resultaron monomodales, con mayor proporción de gotas de menor tamaño a menor relación aceite: solución.
La figura 2 muestra a modo de ejemplo la curva de distribución obtenida para emulsiones de E50LV en relación 10:90 y a pH 6.

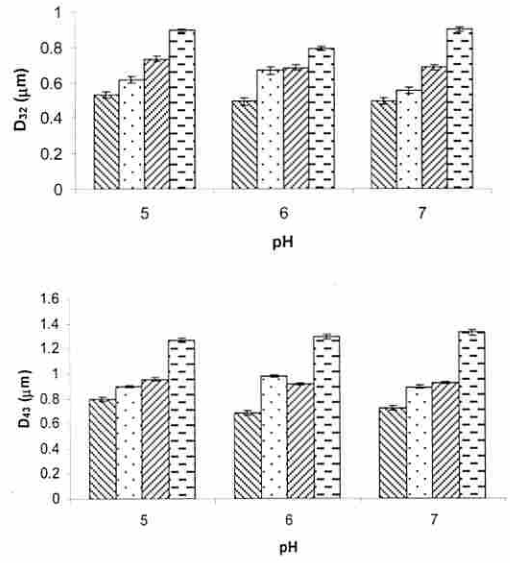


Figura 1. Efecto del pH y relación aceite: solución en el diámetro de gota. (\\\) E50LV 3% rel 10:90, (::) E4M 2% rel 10:90, (//)E50LV 3% rel 30:70, (--)E4M 2% rel 30:70

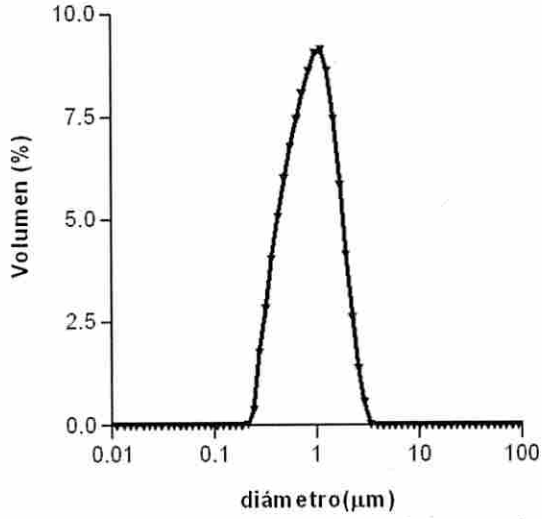


Figura 2. Curva de distribución de tamaño de gota para la emulsión estabilizada con E50LV 3 % a pH 6 y relación aceite: solución 10:90

Estabilidad de las emulsiones. Ninguna de las emulsiones preparadas presentó separación de fases ni separación de aceite en un período de 60 días. El D_{32} se analizó luego de 20 días de almacenamiento no presentando cambio alguno.

Potencial zeta. La figura 3 muestra los resultados obtenidos al medir la carga superficial de la emulsiones de E4M y E50LV para los distintos pH.

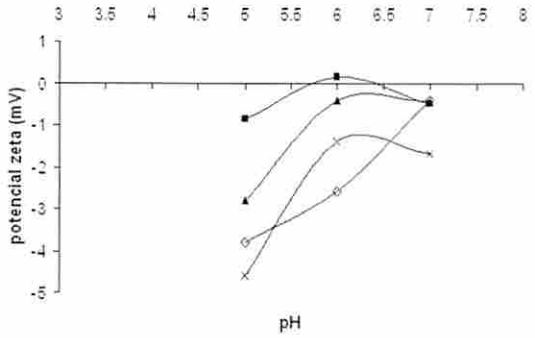


Figura 3. Potencial zeta para emulsiones de E4M y E50LV para distintos pH. (◊) E50LV rel 30:70, (■) E4M rel 30:70, (▲) E50LV rel 10:90, (x) E4M rel 10:90.

Los valores de carga superficial son próximos a cero, debido a que las HPMC son polisacáridos no iónicos.
A pH 6 y 7 no se observa un cambio importante en el valor de la carga superficial, excepto para emulsiones de E50LV en relación 30:70.
A pH 5 en todos los casos, se obtiene un decrecimiento en la carga superficial, haciéndose más negativa a pH ácidos.

Estos resultados permiten continuar los estudios a pH menores (3 y 2) donde se estima que este polisacárido tendrá una mayor carga negativa.
Como la β-lactoglobulina por debajo de su punto isoeléctrico (pH 5.2) tiene carga positiva, es posible que interactué con el polisacárido, como se ha determinado previamente en nuestro laboratorio.
Gu et al (2005) han demostrado que con variación en el pH de la emulsión, es posible obtener multicapas en la interfase.

CONCLUSIÓN

El análisis de la variación del tamaño de partícula y la carga superficial, permitió determinar que a pH ácidos las emulsiones analizadas adquieren mayor carga negativa y que los menores tamaños de gota se obtienen, para todos los pH, con una relación aceite: solución de 10:90 y empleando E50LV como estabilizante.

Esto será de interés en nuestros próximos estudios donde se estudiará la interacción con β lactoglobulina para la obtención de emulsiones estabilizadas por multicapas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte de la Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

BIBLOGRAFÍA

Baeza, R., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A.M.R. y Rodriguez Patino, J. M. (2004). Interactions of polysaccharides with β – lactoglobulin spread monolayers at the air – water interface. *Food Hydrocolloids, 18*, 959 – 966.

Dickinson, E., y Pawlowsky, K. (1997). Effect of i-carrageenan on flocculation, creaming, and rheology of a protein-stabilized emulsion. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45, 3799–3806.

Dickinson, E., y Pawlowsky, K. (1998). Influence of kapper-carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion. Food Hydrocolloids,12, 417–423

Fernandez, P., André, V., Rieger, J. y Kühnle, A. (2004) Nano – emulsions formation by emulsion phase inversion. *Colloids and surfaces a: Physicochemical engeneering Aspects, 251*, 53 – 58.

Gu,Y. S.,Decker, E. A. y McClements, D. J. (2005). Influence of pH and carrageenan type on properties of b-lactoglobulinstabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids, 19,83 – 91.*

Huang, X., Kakuda, Y. y Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids, 15*, 533-542.

Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B. y Graves, S. M. (2006) Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. *Journal of Physics: condensed Matter, 18*, 635 – 666.

Medina, J., Salvadó, A. y del Pozo, A. (2001) Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. *International Journal of Pharmaceutics, 216*, 1 – 8.

Perez, O. E., Wargon, V. y Pilosof, A.M.R. (2006a).Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloid, 20*, 966 – 974.

Perez, O.E., Carrera Sanchez, C., Rodriguez Patino y J.M., Pilosof, A.M.R.(2006b). Thermodynamics and dynamics characteristics of hydroxypropylmethylcellulose adsorbed films at the air water interface. *Biomacromolecules, 7*, 388-393.

Perez, O.E., Carrera Sanchez, C., Pilosof , A.M.R. y Rodriguez Patino, J.M. (2007). Dynamics of adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at the air - water interface. *Food Hydrocolloids, doi:1016 j.foodhyd.2006.12.005.*

Porras, M., Solans, C., Gonzalez, C., Martinez, A., Guinart, A. y Gutierrez, J.M. (2004) Studies of formation of w/o nano-emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engeering Aspects, 249*, 115 – 118.

Schulz, M. B. y Daniels, R. (2000) Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicrom emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 49*, 231 – 236.

Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y., & Munro, P. A. (2003).Interfacial compositions, microstructure and stability of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and k-carrageenan: 2. Whey protein isolate (WPI). Food Hydrocolloids, 17,549–561.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. y Solans, C. (2004) Formation and stability of nano – emulsions. *Advances in Colloid and Interfaces, 108*, 303 – 318.

Weiss, J., Takhistov, P. y McClements, J.D. (2006). Functional Materials in food Nanotechnology. *Journal of Food Science, 71 (9)*, 107 – 116.

INFLUENCIA DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSAS DE DIFERENTE VISCOSIDAD EN LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS Y DE TEXTURA DE SISTEMAS CÁRNICOS

Carp, Dina J[1,3], Perez, Oscar E.[2,3] y Pilosof, Ana M. R.[2,3]
(1) Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina.
(2) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina (54 11) 45763377 apilosof@di.fecn.uba.ar
(3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Palabras claves: Propiedades funcionales y sensoriales, textura, proteínas miofibrilares, hidroxipropil-metilcelulosas, gelificación

RESUMEN

La demanda de alimentos de reducido nivel de grasa, genera la búsqueda de ingredientes que puedan reemplazarla. Las hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) son polisacáridos con potencial uso en productos cárnicos por su viscosidad, adhesividad, actividad interfacial y gelificación durante el calentamiento. Para estudiar los efectos de las HPMC en las propiedades de textura y gelificación de sistemas cárnicos, se formularon sistemas con carne picada (C) (1:2), cloruro de sodio (NaCl) 0 – 3%, HPMC F4M y K15M 0 – 2%.

El análisis térmico diferencial (DSC) de los sistemas mixtos mostró las transiciones correspondientes a la carne y a HPMC individualmente, evidenciando la no miscibilidad entre ambos biopolímeros.

Se prepararon geles en un baño seco a 75°C. Se calculó la pérdida de líquido, observándose una gran disminución por agregado de NaCl, una disminución alta por agregado de HPMC K15M y baja con F4M.

Las propiedades de textura de los geles formados mostraron un efecto negativo en la dureza, elasticidad y cohesividad de los geles por presencia de las HPMC. El sistema C+K15M presentó la menor dureza y la menor cohesividad, observándose la menor elasticidad en el sistema C+F4M+NaCl.

Se estudiaron las propiedades de gelificación de los sistemas en un reómetro dinámico, observándose un aumento de G' con ambas HPMC usadas en ausencia de NaCl. Cuando se agregó NaCl, se observó una disminución de G' significativa con F4M. Las diferencias observadas en los sistemas C+HPMC pudieron vincularse con las propiedades viscosas, mientras que las propiedades de gelificación y el efecto del NaCl, fueron preponderantes en el comportamiento de los sistemas de C+NaCl+HPMC.

Los resultados obtenidos muestran que la potencial aplicación de HPMC en formulaciones con bajo contenido graso dependerá de la combinación de las mismas con varios ingredientes, modulando los factores que influyen en las interacciones.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado la demanda de alimentos "light" o de reducido nivel de grasa, debido a la asociación entre el alto consumo de la misma y el desarrollo de diversas enfermedades (cardiovasculares, hipertensión, obesidad, diabetes, etc). La grasa animal contribuye en las características organolépticas (olor, sabor, textura) de productos cárnicos procesados y su reducción disminuye la aceptabilidad de los mismos, debido a problemas asociados con la textura y las propiedades de retención de agua. Como reemplazantes de grasa se han utilizado diversos ingredientes como goma xántica, iota o kappa carragenano (Ramírez y col.., 2002; De Freitas y col.,1997), almidones y celulosas (Keeton, 1991), β- glucano (Morin y col., 2004), proteínas foráneas como por ejemplo proteínas de origen vegetal (soja, gluten) o de origen animal (plasma , caseinatos, derivados del lactosuero, albúmina de huevo) (Barbut, 2006; Lin y col., 2000; Cofrades y col. 2000; Jiménez Colmenero y col., 1996). Las hidroxipropil-metilcelulosas (HPMC) son polisacáridos derivados de la celulosa que presentan propiedades espesantes, surfactantes, forman películas interfaciales y forman geles termorreversibles. La particularidad de los geles de HPMC, que se forman por deshidratación, posterior asociación hidrofóbica con altas temperaturas, y fusionan al enfriar, los hace especialmente interesantes para su potencial aplicación en formulaciones cárnicas con bajo contenido graso.

Para poder entender el tipo de interacciones entre las proteínas cárnicas y los polisacáridos adicionados es necesario considerar los aspectos de compatibilidad/incompatibilidad que tienen lugar en mezclas de biopolímeros (Tostoguzov, 1998). Estos fenómenos que dependen del tipo de macromolécula, concentración y condiciones del medio y de procesamiento, pueden generar interacciones antagónicas o sinérgicas que se manifiestan en las propiedades organolépticas y estabilidad de los productos formulados. A pH por encima del pH isoeléctrico de la proteína (pH 4-5 en el caso de proteínas miofibrilares) la interacción entre proteínas y polisacáridos es termodinámicamente desfavorable, llevando, por un fenómeno de exclusión molecular, a una microseparación de fases (bajas concentraciones) o a una neta separación de fases (altas concentraciones de ambos biopolímeros) (Samant y col., 1993).

En el presente trabajo se estudiaron las posibles interacciones entre diferentes HPMC y proteínas cárnicas, con el fin de explicar mecanismos de acción de las HPMC y su posible utilización en productos cárnicos y así optimizar formulaciones para la elaboración de productos emulsionados con nuevos ingredientes (o combinación de ingredientes) que puedan actuar como imitadores de grasa.

MATERIALESY MÉTODOS

Los sistemas se prepararon con carne vacuna (corte usado: cuadrada de novillo Aberdinangus, picada pasando 2 veces por la picadora de la carnicería) homogeneizando en una procesadora multipime comercial.

Las soluciones de HPMC se prepararon al 5% de hidrocolide por solubilización en caliente en agua destilada. Las HPMC utilizadas fueron productos de Dow Chemical para Colorcon - Argentina, grado alimenticio, Methocel F4M y K15M (29,2% y 23,3% de grupos metoxilo, 6,0% y 8,3% de grupos hidroxipropilo, relación metil/hidroxipropil 4,9 y 2,8; PM: 86.000 y 120.000; viscosidad sn. acuosas 2% a 20°C: 4.000cp y 17.436cp).

Los sistemas se formularon (sobre una base de 100g): a) C (carne): 50g de carne + 48g H_2O + 2g Na_3N; b) C + NaCl: 50g de carne + 45g H_2O + 3g NaCl + 2g Na_3N; c) C + HPMC 2%: 50g de carne + 8g H_2O + 40g HPMC 5% + 2g Na_3N, d) C + HPMC 2% + NaCl: 50g de carne + 5g H_2O + 40g HPMC 5% + 3g NaCl + 2g Na_3N. El pH de los sistemas varió entre 5,50 – 5,75.

Formación de geles: los geles fueron preparados en un baño seco, Thermolyne Dri – Bath, por calentamiento de 6 ml de muestra 30 min. a 75°C. Luego se enfriaron durante 1h en la heladera y dejaron equilibrar a temperatura ambiente (aprox. 25°C).

Pérdida de líquido: expresado como (masa inicial - masa final)*100/ masa inicial, donde la masa inicial corresponde al peso de las muestras luego del calentamiento donde se

formaron los geles, y la masa final al peso luego de la extracción del líquido que no había sido incorporado a los mismos. Los sistemas se midieron por cuadriplicado.

Propiedades de textura: Se realizó un análisis del perfil de textura (TPA) en un analizador de textura (Stable Micro Systems TA.XTI2) usando un cilindro (36 mm de diámetro) para comprimir muestras cilíndricas (19 mm de diámetro x 10 mm de alto) hasta un 30%, velocidad de compresión de 0,5 mm/s. Los sistemas se midieron por cuadriplicado.

Dinámica de formación de geles: Se hicieron mediciones oscilatorias dinámicas utilizando un reómetro Paar Physica US 2000 V2.21. con esfuerzo de corte controlado, en un sistema de platos paralelos (separación: 1 mm). Se realizó un programa de calentamiento/enfriamiento: a) 25°C - 75°C calentamiento a 10°C/min, 20 min a 75°C y enfriamiento de 75°C - 25°C a 10°C/min. La frecuencia y la amplitud de deformación fueron de 1 Hz y 0,01%, respectivamente.

Análisis Térmico Diferencial: calorímetro Mettler Toledo Calorimeter (Schwerzenbach, Switzerland) DSC 822, con el software de análisis Mettler Stare program. El instrumento fue previamente calibrado con indio (156.6ºC), plomo (327.5ºC) y zinc (419.6ºC). Las muestras se sometieron a calentamiento controlado según las siguientes condiciones: velocidad de calentamiento: 10ºC/min; intervalo de temperatura: 4 a 95ºC; capacidad de las cápsulas: 160 µl; masa de muestra dentro de la cápsula: 60 mg; referencia: una cápsula vacía.

Análisis Estadístico: Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y para comparaciones pareadas simultáneas se eligió el test de Fisher, LSD ($p<0,05$) utilizando el software estadístico Statgraphics plus V3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La pérdida de líquido en los distintos sistemas se muestra en la Figura 1. En la carne picada y homogeneizada entre un 50 – 70% de las fibras musculares permanece intacta, pero pierden la estructura definida y anisotrópica del músculo entero. Durante el tratamiento térmico, ocurren cambios estructurales que disminuyen la capacidad de retención de agua: encogimiento del tejido conectivo y de las fibras musculares, desnaturalización de las proteínas y formación de una estructura más agregada y densa en las miofibrillas (Tornberg, 2005). Altas concentraciones de sal incrementan la capacidad de retención de agua y el hinchamiento de las miofibrillas (Xiong, 1997). Las HPMC son hidrocoloides con capacidad de retención de agua, produciendo una disminución de la pérdida de líquido. Aunque los sistemas se encuentran en incompatibilidad termodinámica (debido al pH superior al pH isoeléctrico), la separación macroscópica de fases no es completa, quedando una fase enriquecida en HPMC, ocluida en la matriz de gel proteico formada, reteniendo líquido. Altas viscosidades contribuyen a disminuir la velocidad de separación de fases, lo cual explicaría el mayor efecto observado para K15.

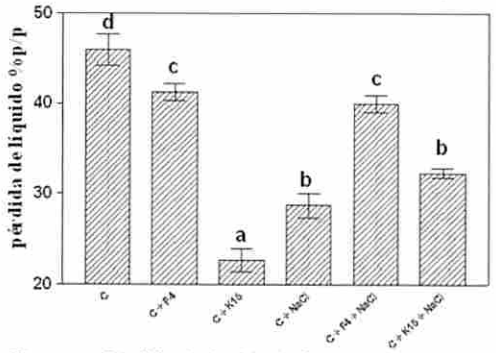


Figura 1: Pérdida de líquido al formarse a los geles. C: carne, letras diferentes indican diferencias significativas entre promedios ($p<0,05$).

En los termogramas de los sistemas mixtos se observaron las transiciones correspondientes a la carne y a HPMC individualmente, lo cual es una evidencia de la no miscibilidad entre biopolímeros (Feldstein y col., 2003, Perez y col., 2006).

El agregado de HPMC produjo disminuciones significativas en la dureza, elasticidad y cohesividad de los geles (Figura 2 a, b y c), a diferencia de lo observado por Barbut (2006) donde la formación de geles rellenos de proteínas lácteas dentro del gel cárnico no sólo disminuía las pérdidas por cocción sino que también tenían un impacto positivo en las propiedades de textura. Durante el enfriamiento, se produce la fusión de la fase gelificada de HPMC, quedando la matriz cárnica rellena con una fase líquida, de alta viscosidad, la cual tiene un efecto negativo sobre las propiedades de textura de los geles.

El agregado simultáneo de NaCl y HPMC produjo mayores pérdidas de líquido que el agregado de los componentes por separado y tuvo un impacto negativo en las propiedades de textura de los geles.

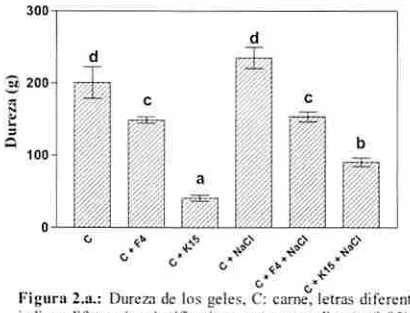


Figura 2.a.: Dureza de los geles. C: carne, letras diferentes indican diferencias significativas entre promedios ($p<0,05$).

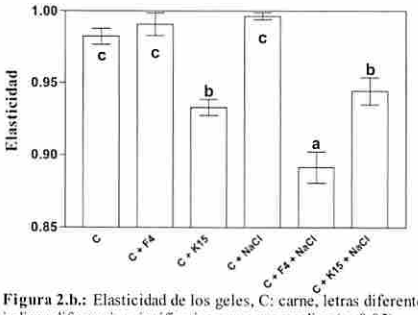


Figura 2.b.: Elasticidad de los geles. C: carne, letras diferentes indican diferencias significativas entre promedios ($p<0,05$).

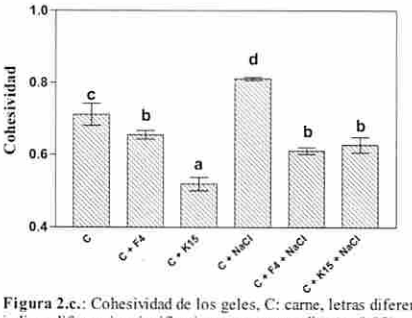


Figura 2.c.: Cohesividad de los geles. C: carne, letras diferentes indican diferencias significativas entre promedios ($p<0,05$).

En el comportamiento reológico característico de los sistemas cárnicos (Figura 3.a.) se observa un pico correspondiente a la formación inicial de una matriz de gel elástico, probablemente debido a la agregación de la miosina desplegada, seguido del descenso temporal en G', atribuido al desdoblamiento de los dominios de miosina y reordenamientos de las uniones intermoleculares, a la disociación del complejo actina – miosina, y / o a limitaciones cinéticas; luego el incremento de G' atribuido a la desnaturalización de la actina, un aumento de los entrecruzamientos entre los agregados proteicos y la posterior formación de una red permanente (Xiong, 1997). El agregado de NaCl disminuye la energía de activación aparente para la gelación de miofibrillas (Samejima y col., 1985) observándose un desplazamiento del pico generado a menores temperaturas (C: 65±1°C, C + NaCl: 50±1°C). Además aumenta el carácter sólido de los geles (G') (Figura 3.b). En presencia de HPMC dicho pico no se observó, probablemente debido a la disminución de la viscosidad de la solución con hidrocoloide antes que comience a gelificar y a la gelificación de la HPMC en ese mismo rango de temperatura (Pérez y col, 2006) (T_{gel} HPMC 2% F4M=52±1°C y K15M= 50±1°C). Al enfriar, la estructura del gel se refuerza (aumenta G'), lo cual

El NaCl disminuye la temperatura de gelificación y aumenta la fuerza de los geles de HPMC (Sarkar, 1979), observándose una $\Delta T_{gel} \approx$ 10°C para F4M, y $\Delta T_{gel} \approx$ 5°C para K15M y un incremento en el carácter elástico de los geles (Figura 3.c.). Las diferencias observadas entre F4M y K15M pueden relacionarse con el mayor % de grupos metoxilo presentes en F4, pues las HPMC presentan mayor velocidad de gelificación y mayores valores de G' al aumentar dicho % (Sarkar, 1995). En los sistemas con HPMC y NaCl, la gelificación del hidrocoloide se produce a una baja temperatura, probablemente inhibiendo la separación de fases. Una gelificación suficientemente rápida puede obstaculizar la separación de las mismas (Perez y col., 2006). Las proteínas cárnicas se encontrarían rodeadas de una fase gelificada y semirígida (Figura 3.c. mayor G' para F4M + NaCl) donde podrían presentarse impedimentos estéricos para la formación del gel protéico (Figura 3.b. menor G' para C + F4M + NaCl). La presencia de HPMC posiblemente interferiría en la formación de la red protéica, ocupando el hidrocoloide espacios en el interior de dicha red e impidiendo la asociación de las proteínas (Rosell y col., 2006).

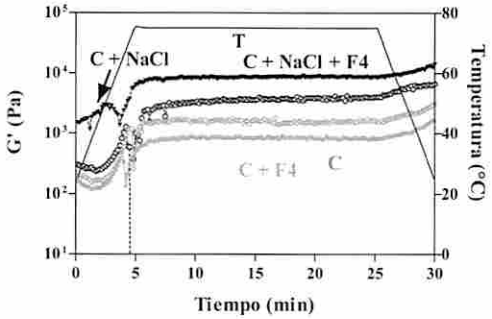


Figura 3.a.: Variaciones de G' vs tiempo, para los sistemas: carne (C), C con NaCl (C + NaCl), C con HPMC F4M (C + F4) y C con NaCl y HPMC F4M (C + NaCl + F4).

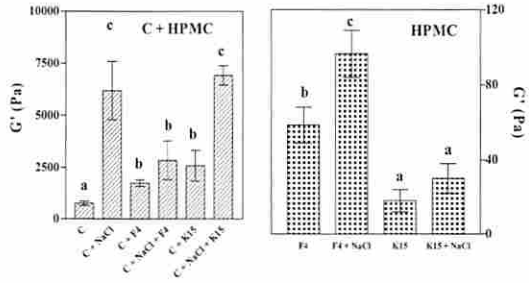


Figura 3.b.y 3.c.:Módulo elástico G' al finalizar la etapa de calentamiento, sistemas C (carne) + HPMC, sistemas HPMC solas, letras diferentes indican diferencias significativas entre promedios ($p<0,05$).

CONCLUSIONES

Las diferencias observadas en los sistemas C + HPMC pudieron vincularse con las propiedades viscosas, mientras que las propiedades de gelificación y el efecto del NaCl sobre las mismas, fueron preponderantes en el comportamiento de los sistemas de C + NaCl + HPMC.

Los resultados obtenidos muestran que la potencial aplicación de HPMC en formulaciones con bajo contenido graso dependerá de la combinación de la misma con varios ingredientes, modulando los factores que influyen en las interacciones.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Republica Argentina, Universidad de Buenos Aires y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por el financiamiento.

REFERENCIAS

Barbut, S. (2006) Effects of caseinate, whey and milk powders on the textura and microstructure of emulsified chicken meat batters, *LWT*, 39:660-664.

Cofrades, S.; Guerra, M.A.; Carballo, J.; Fernández – Martín, F. y Jiménez Colmenero, F. (2000) Plasma potein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level, *J. Food Science* 65 (2): 281 – 287.

DeFreitas, Z.; Sebranek, J.G.; Olson, D.G. and Carr, J.M. *a* (1997) Carrageenan effects on salt – soluble meat proteins in model systems, *J. Food Science* 62 (3): 539 - 543

DeFreitas, Z.; Sebranek, J.G.; Olson, D.G. and Carr, J.M. *b* (1997) Carrageenan effects on thermal stability of meat proteins, *J. Food Science* 62 (3): 544 - 547

Feldstein, M.M.; Roos, A.; Chevallier, C.; Creton, C. and Dormidontova, E.E., Polymer, 44: 1819 - 1834 (2003).

Jiménez Colmenero,F.; Barreto, G., Fernández, P. and Carballo, J. (1996) Frozen storage of bologna sausages as a function of fat content and of levels of added starch and egg white, *Meat Science*, 42 (3): 325 – 332

Keeton, J.T. (1991) Fat substitutes and fat modification in processing, *Recipr. Meat Conf. Proc.*, 44: 79 (1991)

Lin, K.W. y Mei, M.Y. (2000) Influences of gums, soy protein isolate and heating temperatures on reduced – fat meat batters in a model system, *J. Food science* 65 (1): 48 – 52

Morin, L.A.; Temelli, F. and McMullen, L. (2004) Interactions between meat proteins and barley (Hordeum spp.) β-glucan within a reduced – fat breakfast sausage system, *Meat Science*. 68: 419-430

Pérez, O.E.; Wargon, V. y Pilosof, A.M.R. (2006) Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins / hydroxypropylmethylcellulose mixtures, *Food Hydrocolloids*. 20: 966 – 974.

Ramírez, J.A., Barrera, M., Morales, O.G.y Vázquez, M. (2002) Effect of xanthan and locus bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein, Food Hydrocolloids, 16: 11 – 16

Rosell, C.M. y Foegeding, A. (2006) Interaction of hydroxypropylmethylcellulose with gluten proteins: Small deformation properties during thermal treatment, *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd.2006.08.003

Samant, S.K.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P. R. y Rege, D.V. (1993) Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations, *Int. J. Food Sci. Technol.*, pp. 28 - 547

Samejima, K.; Egelandsdal, B. y Fretheim, K. (1985) Heat gelation properties and protein extractability of beef myofibrils, *J. Food Science*, 50: 1540 – 1543.

Sarkar, N. (1979) Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropylmethylcellulose, *J.Appl. Polym. Sci.*, 24: 1073-1087.

Sarkar, N. (1995) Kinetics of thermal gelation of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose in aqueous solutions, *Carbohydrate Polymers*, 26: 195–203.

Tornberg, E. (2005) Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products, *Meat Science*, 70: 493 – 508.

Tolstoguzov, V.B. (1998) Functional properties of protein – polysaccharyde mixtures, in S.E. Hill, D.A. Ledward and J.R. Mitchell, Functional properties of food macromolecules, 252 - 277, Gaithersburg,MD: Aspen publishers inc.

Xiong, Y. L. (1997) Structure – Function Relationships of Muscle Proteins, in Food Proteins and their Applications, ed. By Damodaran, S. and Paraf, A.; Marcel Dekker, Inc., New York, p. 341 - 392.

RHEOLOGICAL PROPERTIES OF WHEAT FLOUR DOUGH WITH INULIN

Laborde, L.1, Couri, S.2, Nogueira, I. R. 2, Germani, R.2
1ENSBANA - 1 Esplanade Erasme 21000, Dijon, France, laborde.lila@caramail.com;
2Embrapa Food Technology - Av. das Américas, 29501, 23020-470, Rio de Janeiro-RJ, Brazil, scoury@ctaa.embrapa.br.

Key Words: inulin, wheat dough

ABSTRACT

The present research aimed to optimise the concentration of inulin that could be used in the formulation of dough for french type bread produced in Brazil by replacing the fat and/or the sugar from the formulation. Different inulin concentrations (0%, 1.0%, 1.5%, 2.5% and 5.0%), sugar (0% and 3%) and fat (0% and 3%) was used to evaluate the rheological behavior of the dough, using the farinograph and the alveograph. The addition of inulin, sugar and fat confer different mixing properties of the dough, and these results could be explained by the interaction between these ingredients and gluten. Inulin, sugar and fat addition reduced the water absorption, more intensively with inulin which weakens the dough. The addition of inulin, sugar and fat promoted differences on the dough alveograph characteristics specially by the inulin and fat.

INTRODUCTION

The development of functional foods is an unique opportunity to contribute to the improvement of the quality of food and of the consumers health and well-being (Hasler, 1998; Milner, 1999). Dietary fibres promote beneficial physiological effects, including laxation, and/or blood cholesterol attenuation, and/or blood glucose attenuation (AACC, 2001). Dietary fibres are included in the ''prebiotics''. Prebiotics are food ingredients that selectively stimulate the growth and activity of bifidobacteria and lactic acid bacteria in the human intestine (Gibson, 1999; Gordon, 2002). Research has shown that a balanced intestinal flora can provide improved regularity, stimulation of immune factors, production of digestive enzymes, and assistance in controlling the formation of free radicals (Gibson & Williams, 1999; Kummel & Brokx, 2001). The prebiotic effects of inulin has been confirmed in previous laboratory and human trials (Cherbut, 2000; Kolida, Tuohy, & Gibson, 2002).

Inulin is a soluble fibre well suited for use in diabetic or low-calorie foods. The ingredients also offer a variety of technological functional properties: water retention, enhanced viscosity for improving binding and texture, stability at different temperature levels, and a stable pH (Pszczola, 1999).

The aim of the present research to determine the potential substitution of fat and/or sugar by inulin of the dough used in the french type of bread by mean of its rheological properties measured by the farinograph and alveograph.

MATERIAL AND METHODS

A commercial wheat flours, sugar and shortening was used. The inulin (Raftiline GR) was supplied by ORAFTI (Belgium).

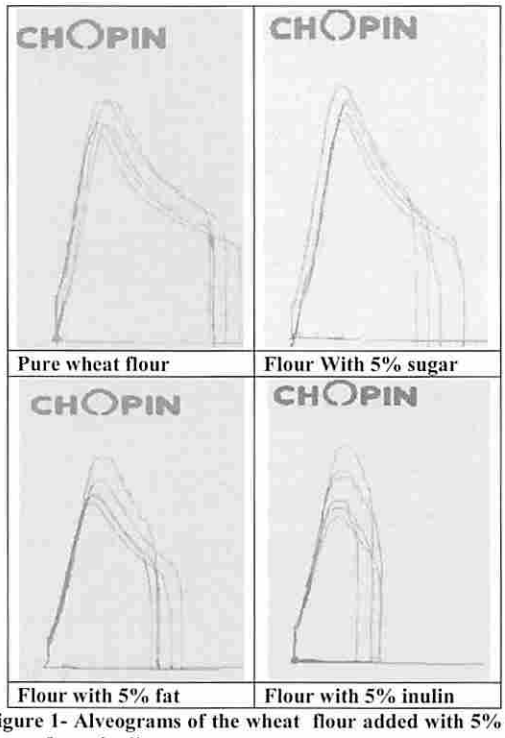
The rheological effect of inulin (0%, 1.0%, 1.5%, 2.5% and 5.0%), sugar (0% and 3%) and fat (0% and 3%) was measured on the farinograph (Brabender, Duisburg, Germany) and alveograph (model MA82, Tripette et Renaud, France), following the procedures 38-12 and 54-30A, respectively, from AACC (1995).

RESULTS AND DISCUSSIONS

The addition of inulin, sugar and fat promoted differences on the alveograph characteristics of +- dough (Figure 1). P values (maximal overpressure - tenacity) decreased with the addition of the inulin and fat, but less with sugar addition. Additionally, L (rupture abscissa - extensibility of dough) was reduced by adding inulin, sugar and fat. The resulting effect on P and L became evident in the P/L ratio, which value increased with the three ingredient addition and particular with the inulin addition. The influence on W (deformation work) was reduced by inulin, sugar and fat. But the differences were more important with the inulin and fat. The addition of inulin promoted differences on the dough mixing behaviour measured by the farinograph (Figure 2). Inulin addition reduced the water absorption, the dough development time and stability, these reductions were more important for inulin and fat than for sugar. These results could be explained by the interactions between inulin and gluten, as suggested Chen et al. (1988), due to its composition in polysaccharides of fructose (Wanga, 2002).

CONCLUSION

It is possible to see that even if the results of inulin were the most different from the results obtained with pure wheat flour, there were similarity between those ones obtained by the fat addition. This two ingredients, fat and inulin, had a similar effect on the wheat dough, been, thus, interesting to replace the fat by inulin to obtain french bread which are rich in fibres and lower in energy value.



Pure wheat flour	Flour With 5% sugar
Flour with 5% fat	Flour with 5% inulin

Figure 1- Alveograms of the wheat flour added with 5% of sugar, fat or inulin.

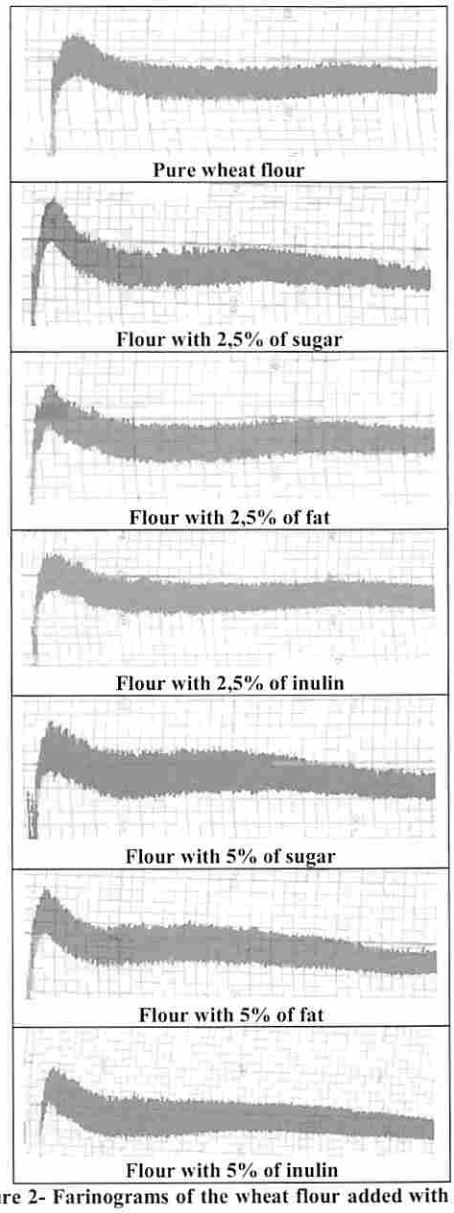


Figure 2- Farinograms of the wheat flour added with 2.5% and 5% of sugar, fat or inulin.

THANKS

To the company CLARIANT (Suzano, SP), for kindly supplying the sample of inulin and CNPq for the financial support.

REFERENCES

AACC. (1995). Approved methods of the AACC (9th ed.). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.

Chen, H.; Rubenthaler, G. L.; Schanus, E. G. (1988). Effect of apple fiber and cellulose on the physical properties of wheat flour. Journal of Food Sciences, 53, 304-305.

Cherbut, C. (2000). Tolerância e efeito prebiótico da goma acácia em humanos saudáveis. Food Ingredients, 2(9), 48–51.

Cummings, J. H.; MacFarlane, G. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. British Journal of Nutrition, 87(Suppl.2), S145–S151.

Gibson, G. R. (1999). Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofrutose and inulin. The Journal of Nutrition, 129(Suppl. 7), 1439s–1441s.

Gibson, G. R.; Williams, C. M. (1999). Gut fermentation and health advantages: myth or reality? British Journal of Nutrition, 81, 83–84.

Gordon, D. T. (2002). Intestinal health through dietary fibre, prebiotics and probiotics. Food Technology, 56(4), 23.

Hasler, C. M. (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. Food Technology, 52(11), 63–70.

Izzo, M.; Niness, K. (2001). Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. Cereal Foods World, 46(3), 102-10.

Wang, J (2002). Effect of the addition of differents fibres on wheat dough performances and bread quality. Food chemistry 79, 221-226.

Kolida, S.; Tuohy, K.; Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87(Suppl. 2), S193–S197.

Kummel, K. F.; Brokx, S. (2001). Lactitol as a functional prebiotic. Cereal Foods World, 46(9), 424-429.

ORAFTI Active Food Ingredients (2002). Raftiline GR. ProductSheet. Doc. A4-03*01/02.

Pszczola, D. E. (1999). fibre ingredient may find a good start in breakfast foods. Food Technology, 53(3), 62–63.

ELABORACIÓN DE UN ADEREZO TIPO SALSA CON GOMA DE ALGARROBO (*Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz)

ESCOBAR, BERTA, ESTÉVEZ, ANA MARÍA,VEGA, SUSANA Y SÁENZ, CARMEN.
Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004 Santiago, Chile. Fax 562 – 9785796. bescobar@uchile.cl

Palabras Claves: Propiedades funcionales y sensoriales, aderezos, propiedades reológicas. hidrocoloides, algarrobo chileno.

RESUMEN

El endosperma de la semilla de algarrobo tiene un hidrocoloide (galactomanano) que se puede utilizar en la elaboración de aderezos para ensaladas (emulsiones aceite/agua) para mejorar o controlar sus propiedades reológicas. Los objetivos de esta investigación fueron: evaluar el reemplazo, en tres niveles, de goma xantano por goma de algarrobo en la elaboración de un aderezo tipo salsa y caracterizar física, química y sensorialmente el producto elaborado. Se preparó un aderezo base con 0,45% de goma xantano (X), reemplazándola por goma de algarrobo en 50 (A50), 75 (A75) y 100 % (A100), utilizando un diseño completamente aleatorio con 4 tratamientos y 4 repeticiones. En cada tratamiento se determinó pH, acidez, color, características reológicas (esfuerzo de cizalla, gradiente de deformación, e índice de comportamiento de flujo) calidad y aceptabilidad sensorial. Con la incorporación de goma de algarrobo, el pH tendió a aumentar (de 4,28 a 4,51) y la acidez a disminuir (0,68% a 0,64% de ácido cítrico anhidro). En los parámetros de color, el tratamiento A100 tuvo la mayor luminosidad y un alto aporte de amarillo. No se observó separación de fases durante siete días de almacenamiento refrigerado. Todos los tratamientos presentaron comportamiento pseudoplástico y se ajustaron al modelo de Herschel-Bulkey ($r = 0,985$). El índice de comportamiento de flujo (η) y el umbral de fluencia (τ_0) disminuyeron al aumentar el reemplazo de goma xantano, lo que indica que el flujo se vuelve cada vez más pseudoplástico; el índice de consistencia (K mPa*s^n) aumenta de 0,2 en X a 5,1 en A75. Sensorialmente, todos los tratamientos fueron aceptados, A75 tuvo la mayor aceptabilidad (10,7 puntos en escala de 1 a 15). Se concluye que se puede reemplazar un 75% de la goma xantano por goma de algarrobo sin afectar las características físicas, químicas y sensoriales del aderezo.

INTRODUCCIÓN

El algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) es una especie de la familia Mimosaceae perteneciente al género Prosopis, nativo de Perú, Bolivia, zona central y norte de Chile y el noroeste de Argentina. Su fruto es una vaina indehiscente arqueada, lineal, plana, de color amarillo dorado de 4-10 cm de longitud; el rendimiento de los frutos es variable, en Chile se ha estimado entre 10 y 200 kg de frutos por árbol al año. Las semillas están envueltas en una pulpa carnosa y dulce, son de color café-amarillentas y de cuyo endosperma se extrae una goma o hidrocoloide (FAO, 2000; FAO, 1997; Habit et al., 1981). En las dispersiones de goma de algarrobo existe una relación inversa entre viscosidad y temperatura, independiente de la concentración y del pH. Este factor es importante para escoger el tipo de alimento al cual se incorpora la goma y si el consumo será en caliente o frío (Espinoza, 2002). La goma de algarrobo forma dispersiones estables y con propiedades viscosantes intermedias entre la goma guar y garrofín (Frez et al., 1999), aún en concentraciones inferiores al 1% (Espinoza, 2002). Esta goma es un polisacárido formado por manosa y galactosa, en la relación 1,4:1 (Presle et al., 2003). La goma de algarrobo puede interactuar sinérgicamente con la goma xantano formando mezclas de alta viscosidad a bajas concentraciones de polisacárido, lo que se utiliza en la industria alimentaria porque aumenta la viscosidad y presenta propiedades gelificantes (Casas et al., 2000; Casas y García-Ochoa, 1999; Garti y Leser, 2001). Los aderezos comerciales para ensaladas son emulsiones de aceite en agua (o/w), que deben tener cierta textura y deslizamiento sobre la base que se pretende aderezar, cuya estabilidad es de primera importancia para la industria de alimentos (Carrillo y Kokini, 1988; Coia y Stauffer, 1987).

La estabilidad de las emulsiones se puede mejorar al utilizar hidrocoloides, que sin ser verdaderos emulsificantes (no intervienen activamente sobre las interfases del líquido), dan estabilidad a la emulsión principalmente incrementando la viscosidad y disminuyendo la movilidad del líquido (Fennema, 1993; Garti y Leser, 2001). La presente investigación tuvo como objetivos, evaluar el reemplazo de goma xantano, en tres niveles, por goma de algarrobo en la elaboración de un aderezo tipo salsa, caracterizando física, química, sensorial y reológicamente, el producto elaborado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La goma de algarrobo se obtuvo por extracción ácida (H_2SO_4, 72% p/v a 80°C por 20 minutos) de semillas de algarrobo colectadas en la Región Metropolitana de Chile; la goma se hidrató durante 12 horas para facilitar su separación de los cotiledones, se secó en estufa a 37°C por 12 horas y se molió con tamiz número 60. Los ingredientes para la formulación de los aderezos fueron adquiridos en el comercio.

Los aderezos se formularon utilizando una fórmula base: aceite de girasol (45,9%), agua (35,9%), vinagre comercial (7,5%), ingredientes menores (sal, azúcar, lecitina de soya, propilenglicol, jugo de limón, benzoato se sodio, EDTA, cebolla y ajo deshidratado- 10,1%) y goma xantano (0,45%) (X). La goma xantano se reemplazó en tres niveles 50 (A50), 75 (A75) y 100 % (A100), utilizando un diseño completamente aleatorio con 4 tratamientos y 4 repeticiones. Previo a su utilización la goma de algarrobo, se hidrató durante doce horas a 50ºC y se dejó enfriar por 30 minutos hasta 20ºC. Para la preparación de la emulsión se utilizó una Mini-pimer® BRAUN® a 220 rpm; primero se mezclaron la lecitina de soya con el aceite y el vinagre, hasta emulsionarlos; luego se incorporó el resto de materias primas secas y líquidas, a excepción de la goma; finalmente se añadió la goma hidratada y se mezeló durante un minuto. Para formar la emulsión todos los ingredientes deben estar a temperatura ambiente.

A la gomas de algarrobo y xantano se les realizó un análisis químico proximal (AOAC, 1995). En cada tratamiento se determinó: pH; acidez (expresada como ácido cítrico anhidro); color (en colorímetro de reflectancia MINOLTA CR-200b, registrando los parámetros L*, a* y b* y calculando C* y H*); características reológicas (reómetro Brookfield™, RHEO 2000 R/S de cilindros concéntricos utilizando el "spindle" CC-14 DIN. El tiempo de medición fue de 1200 segundos y se obtuvieron 300 puntos; se determinó esfuerzo de cizalla, gradiente de deformación, e índice de comportamiento de flujo); separación de fases (cada 24 horas durante 7 días). Además, un panel entrenado de 12 jueces evaluó su calidad sensorial por el método descriptivo (apariencia, consistencia, color, aceitosidad, salado, acidez, amargor y sabor extraño) y uno de 24 jueces (12 entrenados y 12 no entrenados) evaluó su aceptabilidad sensorial utlizando escala hedónica (con pauta no estructurada de 0-15). Los resultados fueron sometidos a ANDEVA y prueba de Duncan cuando fue necesario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La goma de algarrobo tuvo un 7,4% de humedad. Además presentó 2,2 g/100g de cenizas, 0,2 g/100g de lípidos, 1,7 g/100g de proteínas, 0,9 g/100g de fibra cruda y 95,0 g/100g de hidratos de carbono, en base materia seca. Por su parte, es necesario destacar que la goma xantano, tuvo 8,8 g/100g de cenizas.

El tratamiento testigo (X) presentó un pH de 4,28, mientras que los aderezos elaborados con goma de algarrobo fluctuaron en el rango 4,44-4,51, incrementándose al aumentar la cantidad de goma reemplazada. El tratamiento testigo (X) presentó una acidez de 0,68% y los tratamientos elaborados con goma de algarrobo fluctuaron en el rango 0,64-0,65%, lo cual se debe a los ácidos utilizados en su elaboración (ácido acético y ácido cítrico).

Todos los aderezos presentaron color amarillo suave con un leve matiz verde. En el tabla 1 se presentan los parámetros de color de los aderezos, observándose que los tratamientos presentan una alta luminosidad L*, cercana al blanco y una tendencia hacia el color verde (valores negativos de a*). El parámetro b*, al tener valores positivos, indica una tendencia hacia los colores amarillos. El parámetro H* (matiz) y el parámetro C* (croma) indican color amarillo para todos los tratamientos.

Tabla 1 Parámetros de color

Tratam.	L*	a*	b*
X	71,40±0,47^{b}	- 2,98±0,21^{b}	18,23±0,17^{d}
A	74,43±0,06^{d}	- 3,12±0,02^{b}	17,69±0,02^{c}
A75	71,36±0,20^{b}	- 2,84±0,03^{a}	16,11±0,09^{b}
A50	72,07±0,79^{c}	- 2,70±0,09^{a}	15,34±0,03^{a}

Desde un punto de vista reológico, los aderezos para ensalada elaborados se ajustaron al modelo matemático de Herschel-Bulkley con coeficientes de correlación del orden de 0,985, lo que confirma el buen ajuste de los datos experimentales al modelo citado. Estos corresponden a un fluido no Newtoniano independiente del tiempo de tipo pseudoplástico con umbral de fluencia.

En la Figura 1 se puede observar que al aumentar el gradiente de deformación, la fuerza de cizalla aumenta en todos los tratamientos. A medida que la fuerza de cizalla aumenta, la estructura interna del fluido se rompe, generándose un aumento del flujo del aderezo.

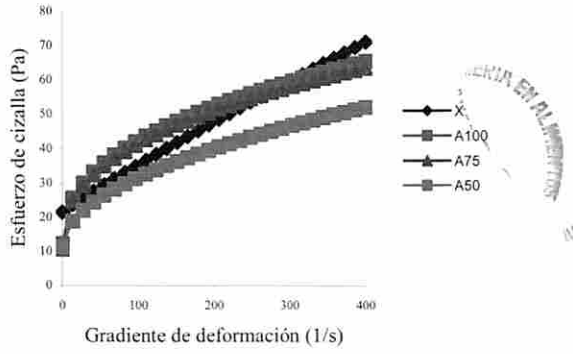


Figura 1 Curva de flujo de los aderezos

En la Figura 2, se aprecia que todos los tratamientos presentan una disminución en la viscosidad aparente a medida que aumenta el gradiente de deformación, lo cual es característico de los fluidos pseudoplásticos. Este comportamiento indica una ruptura o reorganización continua de su estructura, dando como resultado una menor resistencia al flujo.

La viscosidad aparente o dinámica (η), es una propiedad de los fluidos. En el caso de los fluidos no Newtonianos, la viscosidad no permanece constante cuando la temperatura y su composición permanecen sin variación, sino que depende del gradiente de deformación. Debido a lo anterior, se puede decir que la viscosidad aparente no permanece constante en el tiempo.

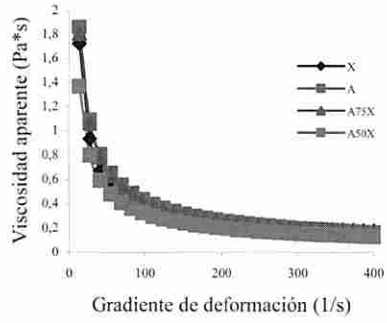


Figura 2 Resistencia al flujo de los aderezos

No hubo separación de fases en ninguno de los tratamientos hasta los siete días de almacenamiento; sin embargo, el tratamiento A presentó alta espumosidad lo que provocó una disminución del volumen en 10 mL.

En cuanto a las características sensoriales (tablas 2 y 3), no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en apariencia, color, acidez, salado, amargor ni en sabor extraño.

Tabla 2 Parámetros sensoriales de apariencia, color y acidez de los aderezos

Tratam	Apariencia	Color	Acidez
X	9,38±2,75^{a}	8,26±2,67^{a}	8,60±2,40^{a}
A	8,41±3,77^{a}	7,24±2,75^{a}	8,04±1,48^{a}
A75	10,91±3,27^{a}	8,45±1,91^{a}	8,92±1,56^{a}
A50	10,66±2,43^{a}	7,80±1,90^{a}	8,83±1,43^{a}

En color, los valores fluctuaron entre "normal" (A) y "levemente alto" (X, A75 y A50). La apariencia fluctuó entre "más que regular" (X y A) y "buena" (A75 y A50). El gusto salado y la acidez fueron "levemente altos" para todos los tratamientos. Los aderezos fueron evaluados como "sin amargor" y "sin sabor extraño".

Tabla 3 Parámetros sensoriales de salado, amargor y sabor extraño de los aderezos

Tratam	Salado	Amargor	Sabor extraño
X	8,98±1,55^{a}	0,73±0,93^{a}	1,52±1,09^{a}
A	9,17±2,56^{a}	1,18±1,27^{a}	1,78±1,15^{a}
A75	9,28±1,50^{a}	1,20±1,77^{a}	2,03±1,41^{a}
A50	8,98±2,17^{a}	1,04±1,12^{a}	1,73±1,54^{a}

En la tabla 4 se presentan los valores de consistencia, aceitosidad y aceptabilidad de los aderezos., La consistencia no presentó diferencias entre los tratamientos, fluctuando entre "normal" (A) y levemente alta" (X, A75 y A50), lo que se pudo deber al efecto sinérgico entre la goma xantano y la goma de algarrobo.

Tabla 4 Parámetros sensoriales de consistencia, aceitosidad y aceptabilidad de los aderezos

Tratam	Consistencia	Aceitosidad	Aceptabilidad
X	9,49±2,86^{a}	9,28±1,97^{b}	8,74±2,57^{ab}
A	7,22±1,55^{a}	8,91±1,94^{ab}	10,06±3,13^{bc}
A75	8,61±1,59^{a}	9,07±1,31^{b}	10,66±2,59^{c}
A50	8,25±2,21^{a}	9,07±2,07^{b}	7,82±3,89^{a}

En el parámetro aceitosidad, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el de valor más alto el aderezo elaborado sólo con goma xantano. Sin embargo, al interpretar sensorialmente los valores, estos corresponden a "levemente alto" en todos los tratamientos. Los tratamientos más aceptados fueron A, y A75 (superior al testigo) dado principalmente por su fluidez.. El único tratamiento cuyo valor fue "indiferente" fue A50.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible reemplazar goma xantano por goma de algarrobo, en distintos niveles, en la elaboración de un aderezo tipo salsa, observándose sinergia entre goma algarrobo/goma xantano.

La temperatura de incorporación de las gomas es un factor importante a considerar con el propósito de evitar la separación de fases del aderezo la cual debe ser cercana a 20°C.

Todos los aderezos elaborados se ajustaron al modelo matemático de Herschel-Bulkley, presentando un comportamiento de flujo de tipo pseudoplástico.

El reemplazo de goma xantano por goma algarrobo no afectó la calidad sensorial de los aderezos. Lo anterior concuerda mayoritariamente con los valores observados para la aceptabilidad del producto.

REFERENCIAS

[AOAC]. Association of Official Analytical Chemist .1995. Official methods of analysis. 19° ed. Washington D.C. USA. 1141 p.

Carrillo A, Kokini J. 1988. Effect of egg yolk + salt on rheological properties and particle size distribution of model oil-in-water salad dressing emultions. Journal of Food Science. 53 (5): 1352-1355.

Casas JA, García-Ochoa F. 1999. Viscosity of solutions of xanthan / locust bean gum mixtures. Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 25-31.

Casas JA, Mohedano AF, García-Ochoa F. 2000. Viscosity of guar gum and xanthan / guar gum mixture solutions. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1722-1727.

Coia K, Stauffer K. 1987. Shelf life study of oil/water emulsions using various comercial hydrocolloids. Journal of Food Science 52(1): 166-172.

Espinoza S. 2002. Estudio de algunas propiedades físicas de hidrocoloides provenientes de las semillas de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) y de cladodios de nopal (*Opuntia ficus-indica*). Tesis grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 71 p.

FAO. 1997. Especies arbóreas y arbustivas para zonas áridas y semiáridas de América Latina. (Serie: Zonas áridas y semiáridas N°12) Organización de Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 347 p.

FAO. 2000. Productos Forestales no Maderables. Disponible en: http://www.fao.org/ docrep/t2354s/t2354s0t.htm Leído el 02 de Noviembre de 2003.

Fennema O. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1095 p.

Frez C, Carreño P, Escobar M. 1999. Caracterización química de la goma de semilla de algarrobo. Disponible en: http:// www. unal. mx/publicaciones/respyn/ especiales/tec alimentos/pdf/SECCION3.pdf. Leído el 02 de Noviembre de 2005.

Garti N, Leser ME. 2001. Emulsification properties of hidrocolloids. Polymers for advanced technologies 12: 123-135.

Habit M, Contreras D, Gonzalez R. 1981. Prosopis tamarugo, arbusto forrajero para zonas áridas. FAO, Roma. 116 p.

Presle L, Escobar B, Estévez AM, Guerrero J, Matsuhiro B, Saenz C. 2004. Polisacáridos de *Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz (Algarrobo): Caracterización química y análisis por espectrometría de RMN de ^{1}H y de ^{13}C. XXV Jornadas Chilenas de Química. Antofagasta. Chile.

DESARROLLO DE UNA BEBIDA DE SOYA ADICIONADA DE PROBIÓTICOS

CHAMORRO, DANIEL[2], FIGUEROLA, FERNANDO[1], ESTÉVEZ, ANA MARIA[2], VALLADARES, LUIS[3] Y PRIETO, CARMEN[2]

[1]Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Casilla 47 Valdivia, Chile. ffiguero@uach.cl

[2]Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

[3]Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile.

Palabras Claves: Propiedades funcionales, bebida probiótica, bebida de soya, isoflavonas, bacterias lácticas

RESUMEN

Las bebidas fermentadas de soya entregan beneficios nutricionales por sus altos niveles de proteína, bajos niveles de grasa saturadas y lactosa, ausencia de colesterol y presencia de isoflavonas. La fermentación de la leche de soya con bacterias lácticas, permite aumentar su vida útil, modificar el sabor y la textura, mejorar la composición de la flora microbiana intestinal y aumentar el nivel de isoflavonas libres. Los objetivos de esta investigación fueron, diseñar una formulación para la elaboración de una bebida de soya rica en probióticos y evaluar el efecto de la actividad de las bacterias ácido-lácticas sobre la aparición de formas libres de isoflavonas. Mediante Diseño de Mezclas se formularon 10 tratamientos utilizando leche de soya líquida, leche de soya deshidratada (LSD) (entre 4 y 5 %), azúcar comercial (S) (entre 2 y 3%), glucosa anhidra (G) (entre 3 y 4%). Las mezclas se pasteurizaron 5 min a 90°C. En cada mezcla a 32°C se añadió 2% de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. Los tratamientos de incubaron por 12 horas a 32°C y se almacenaron por 28 días a 4°C. Cada tres días se realizaron análisis de pH, acidez titulable, color, recuento de bacterias lácticas, sólidos solubles, viscosidad y calidad y aceptabilidad sensorial. En los tres tratamientos de mayor aceptabilidad se determinó daidzeina y genisteina. Todos los tratamientos mantuvieron recuentos superiores a 10^8 lo que garantiza su condición de bebida probiótica. El pH de todos los tratamientos disminuyó desde 7,0 a alrededor de 3,5; la acidez aumentó en todos ellos, siendo el efecto más marcado en el tratamiento T7 (4,0% LSD/3,0% S/3,0% G). Los tratamientos de mayor aceptabilidad fueron TI, T3 y T9, obteniéndose en los primeros, la mayor desconjugación de isoflavonas. Se concluye que T1 (5% LSD/2,0% S/3,0% G) es un buen alimento funcional por su alta concentración de prebióticos e isoflavonas libres, así como por su alta aceptabilidad.

INTRODUCCIÓN

Las bebidas de soya fermentadas tienen altos niveles de proteína, niveles bajos de grasa saturada y ausencia de colesterol. y lactosa. La fermentación de estas bebidas no sólo se utiliza como un medio de preservación de la leche de soya, también se puede modificar o mejorar el sabor y la texturas de estos productos, como también incrementar los beneficios a la salud humana (Donkor *et al.*, 2005).

Estudios epidemiológicos han demostrado que el incremento en el consumo de alimentos vegetales como la soya, puede prevenir, en general, la carcinogénesis. La soya contiene muchos compuestos fitoquímicos saludables, entre los cuales las isoflavonas se consideran las más importantes. Numerosas investigaciones indican que las isoflavonas pueden poseer una actividad biológica que inhibe la proliferación de cáncer y el estrés oxidativo, estimulando, adicionalmente, el sistema inmune (Kao *et al.*, 2004).

Hasta el momento se han identificado doce formas de isoflavonas de la soya y sus derivados, las que incluyen tres formas libres (genisteina, daidzeina y gliciteina) que son las más biodisponibles, y sus nueve respectivos glucósidos conjugados que no son biodisponibles e incluyen: tres formas de β-glucósidos, tres de malonil-glucósidos y tres de acetil-glucósidos (Kawakami *et al.*, 2004). Según Kao *et al.* (2004), la biodisponibilidad de las isoflavonas puede estar influenciada por sus formas químicas en los alimentos y la susceptibilidad a la degradación durante el calentamiento. Se demostró que la genisteina se puede formar a partir de la genistina durante la fermentación, mientras que el 6''-O-malonilgenistina se puede convertir a 6'' -O- acetilgenistina o genistina durante el calentamiento. De esta manera, la conversión entre varias isoflavonas durante el procesamiento de productos de soya, tiene que ser investigada con más profundidad.

Otros estudios han demostrado que los microorganismos del género *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium sp.*, tienen actividad β-glucosidasa, y juegan un importante papel en la hidrólisis de numerosos β-glucósidos vegetales como los presentes en la soya. A la población occidental, la que está acostumbrada al gusto de la leche de vaca, generalmente le disgusta el perfil de sabor de la leche de soya debido al sabor que queda después de probarla *"aftertaste"*, que a menudo se describe un sabor afrejolado *"beany flavor"* o amargo *"bitter"*. Se ha demostrado que el uso de azúcares y bacterias ácido lácticas puede ayudar a disminuir el sabor antes mencionado (Tsangalis y Nagendra, 2003).

La International Dairy Federation (IDF) recomienda que un producto lácteo, como la leche acidificada, debe contener al menos 10^7 UFC/mL de cultivos prebióticos vivos (Champagne y Gardner, 2005). Los avances en las investigaciones sobre la flora intestinal son el escenario para el aparecimiento de los "alimentos funcionales". Los alimentos funcionales pueden ser definidos como "cualquier alimento que pueda proveer de beneficios a la salud además de los nutrientes tradicionales que ellos contengan". Pueden incluirse en los alimentos funcionales los probióticos, prebióticos y la mezcla de los anteriores que se los llama simbióticos. Algunas bacterias ácido lácticas como *L. acidophilus y L. casei* proliferan bien en la leche de soya, pero producen menos ácido que en la leche de vaca, debido a que la leche de soya carece de monosacáridos libres y algunos disacáridos como la lactosa. Se ha podido demostrar en diferentes estudios un incremento en la producción de acidez en la leche de soya, después de adicionar azúcares simples como lactosa, sacarosa, glucosa, y galactosa, y/o sólidos lácteos (Donkor *et al.*, 2005). De acuerdo a lo anterior los objetivos de esta investigación fueron, diseñar una formulación para elaborar una bebida de soya adicionada de probióticos; y evaluar el efecto de la actividad de las bacterias ácido-lácticas sobre la aparición de formas libres de isoflavonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante Diseño de Mezclas Simplex Lattice Cúbico Especial, se formularon 10 tratamientos utilizando leche de soya líquida y cultivos lácteos como ingredientes fijos; y leche de soya deshidratada (LSD) (entre 4 y 5 %), azúcar comercial (S) (entre 2 y 3%), glucosa anhidra (G) (entre 3 y 4%), como ingredientes variables. Para la activación y repique de los cultivos bacterianos se utilizó caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) Merck KGaA y leche de soya líquida. Para el cultivo madre se colocó, en un frasco de vidrio estéril, 0,012 g de *L. casei* CHR–HANSEN. CASEI-01 en 50 mL de caldo MRS y en otro se colocó 0,012 g de *L. acidophilus* NCFM® 100B SKP™ de RHODIA INC en 50 mL de caldo MRS, los que se incubaron 12 horas a 32°C. Posteriormente, a partir del cultivo madre de cada cepa, se realizó un repique al 2% (10 mL) en leche de soya, se dejó incubar por 12 horas a 32°C.

Las mezclas se pasteurizaron 5 min a 90°C. En cada mezcla enfriada a 32°C se añadió 2% de los inóculos en leche de soya. Los tratamientos se incubaron por 12 horas a 32°C en envases estériles de 350 mL. Después del período de incubación, se almacenaron los envases a 4°C durante 28 días. Se adicionó sacarosa (4%), como edulcorante, antes de realizar los análisis sensoriales.

En la leche de soya se determinó el contenido de isoflavonas por el método de inmunofluorescencia con resolución de tiempo (Labmaster, 2006), y azúcares totales por el método de Munson y Walker (AOAC, 1995). En los tratamientos, los días 0, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 y 28 después de elaborado el producto, se efectuaron los siguientes análisis: acidez titulable (AOAC, 1995), pH, color (colorímetro triestímulo Minolta modelo CR-200b), recuento de bacterias lácticas (en agar extracto de malta), viscosidad (viscosímetro de Haake, a 20°C, utilizando aguja #3), calidad y aceptabilidad sensorial (con un panel entrenado que usó el método de Scoring y con panel entrenado y no entrenado por el método de Escala Hedónica, respectivamente), con una pauta no estructurada de 0 – 15 cm. En los tratamientos de mayor aceptabilidad al día 16 de almacenamiento, se determinó isoflavonas libres.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se presenta en las Figuras 1 y 2, todos los tratamientos tuvieron recuentos superiores a 10^8 al cabo de 28 días de conservación a 4°C. El tratamiento T7 (4,0% LSD/3,0% S/3,0% G) fue el que presentó los mayores recuentos microbianos, probablemente debido a que era uno de los que tenía el mayor nivel de prebióticos. Por otra parte, los tratamientos T3 (4,6% LSD/2,0% S/3,3% G) y T9 (4,0% LSD/2,3% S/3,6% G), que tenían los menores niveles de prebióticos, obtuvieron los menores recuentos.

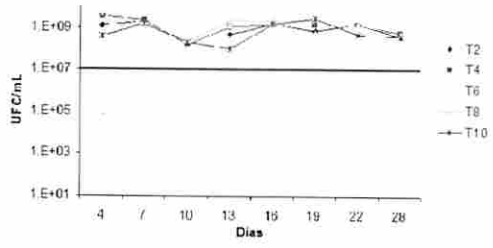


Figura 1. Curva de sobrevivencia microbiana en los tratamientos T2, T4, T6, T8 y T10 durante 28 días de almacenamiento a 4°C

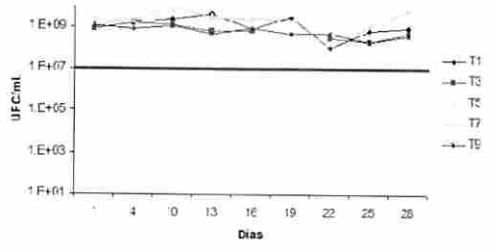


Figura 2. Curva de sobrevivencia microbiana en los tratamientos T1, T3, T5, T7 y T9 durante 28 días de almacenamiento a 4°C.

En todos los tratamientos, el comportamiento del pH fue similar durante los 28 días de evaluación, obteniéndose en el primer día valores máximos de 7 y 6,9; después de cuatro días de elaborado el producto, se presentó una disminución considerable que fluctuó entre 4 y 5. Del día cuatro en adelante, se registró una disminución entre cada período de evaluación, de 0,4 y 0,3 hasta llegar a un valor mínimo de 3,8 en el día 28. La baja gradual de pH se debe a la producción de ácido láctico y CO_2, causado por microorganismos ácido-lácticos, al utilizar el azúcar como fuente de energía. En la primera etapa de fermentación, las bacterias ácido-lácticas tienen un crecimiento paralelo a la producción de ácido láctico, lo que se traduce en un aumento de la acidez desde 0,2% de ácido cítrico a 1,25 % en el tratamiento T7 (4,0% LSD/3,0% S/3,0% G). A medida que aumentó la acidez, alrededor del día 16, aumentó la viscosidad de las bebidas, probablemente debido a la coagulación de algunas proteínas; este efecto fue más marcado en los tratamientos T5 (4,3% LSD/2,3% S/3,3% G) y T7. Las bebidas elaboradas fueron de color amarillo pálido; todos los tratamientos presentaron una alta luminosidad, (L*) entre 75,9 (T4) y 77,8 (T5), que no cambió en forma considerable durante el almacenamiento; su valor de b* fluctuó entre 12,8 (T8) y 14, 1 (T9).

En las tablas 1 y 2 se presentan los parámetros sensoriales de calidad de las bebidas después de 16 días de almacenamiento. Se presentan los resultados sensoriales para el día 16, debido a que ese es un período normal de comercialización para los productos probióticos y a que en ese momento el producto contaba con el mayor recuento. Todos los tratamientos presentaron una "buena" apariencia, un color "normal", aroma "normal" y cuerpo "normal" y no existió diferencias significativas entre los tratamientos para apariencia, color, aroma y cuerpo.

Tabla 1. Calidad sensorial para apariencia, color, aroma y cuerpo de la bebida de soya en el día 16 de almacenamiento a 4 °C.

Tratamiento	Apariencia	Color	Aroma	Cuerpo
T1	10,85 ± 2,49 a[1]	7,57 ± 1,78 a	8,41 ± 1,11 a	8,43 ± 2,23 a
T2	10,03 ± 2,26 a	8,23 ± 1,24 a	8,31 ± 1,50 a	8,45 ± 1,53 a
T3	11,39 ± 1,85 a	7,60 ± 1,29 a	7,29 ± 0,63 a	7,28 ± 2,04 a
T4	10,01 ± 1,88 a	7,90 ± 1,24 a	6,92 ± 1,57 a	7,83 ± 2,30 a
T5	11,23 ± 2,22 a	7,28 ± 1,34 a	7,58 ± 0,95 a	7,88 ± 2,04 a
T6	10,05 ± 2,14 a	7,95 ± 1,23 a	6,92 ± 1,57 a	7,75 ± 2,39 a
T7	11,39 ± 1,93 a	7,48 ± 1,22 a	7,43 ± 0,79 a	8,22 ± 2,15 a
T8	10,10 ± 2,55 a	7,28 ± 2,71 a	7,56 ± 2,02 a	8,03 ± 1,88 a
T9	11,26 ± 2,20 a	7,48 ± 1,22 a	7,48 ± 0,70 a	9,05 ± 2,28 a
T10	10,06 ± 2,19 a	8,54 ± 1,43 a	7,00 ± 1,95 a	6,54 ± 0,83 a

[1] Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 2. Calidad sensorial para dulzor, sabor, gusto ácido y amargor de la bebida de soya en el día 16 de almacenamiento a 4 °C.

Tratamiento	Dulzor	Sabor	Gusto ácido	Amargor
T1	8,75 ± 2,31 b[1]	8,26 ± 1,12 a	4,47 ± 2,84 a	1,55 ± 2,33 a
T2	7,54 ± 1,63 ab	8,75 ± 1,50 a	8,93 ± 2,14 bc	2,44 ± 2,92 a
T3	8,05 ± 1,85 ab	7,97 ± 0,68 a	6,40 ± 2,43 ab	2,26 ± 2,46 a
T4	7,59 ± 1,16 ab	8,55 ± 1,69 a	5,43 ± 2,85 a	2,46 ± 2,79 a
T5	6,37 ± 1,21 a	8,44 ± 1,77 a	10,85 ± 1,85 c	2,98 ± 3,16 a
T6	7,59 ± 1,16 ab	8,43 ± 1,56 a	5,38 ± 2,79 a	2,38 ± 2,65 a
T7	6,70 ± 1,68 ab	8,24 ± 1,06 a	10,71 ± 1,89 c	2,26 ± 2,48 a
T8	7,70 ± 0,99 ab	8,64 ± 1,45 a	6,65 ± 2,63 ab	4,63 ± 3,97 a
T9	8,79 ± 1,95 b	8,12 ± 0,90 a	6,73 ± 2,14 ab	2,12 ± 2,39 a
T10	8,62 ± 1,47 b	8,01 ± 1,19 a	3,60 ± 3,04 a	3,76 ± 4,02 a

[1] Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

Los tratamientos con mayor dulzor fueron T9, T1 y T10 y el de menor dulzor, T5 que tenía un contenido moderado de prebióticos (5,6%) y una alta acidez, lo que también fue apreciado sensorialmente. El sabor no presentó diferencias significativas y fue considerado como "normal"; el amargor fue considerado como "muy suave".

La figura 3 muestra la aceptabilidad del panel no entrenado, para todos los tratamientos en el día 16 después de haber sido elaborado el producto y almacenado a 4 °C. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas, para un nivel de confianza del 95%,. Los tratamientos que presentaron los promedios más altos fueron el T1, T3 y T9. Estos tres fueron escogidos para hacer el análisis del contenido de isoflavonas.

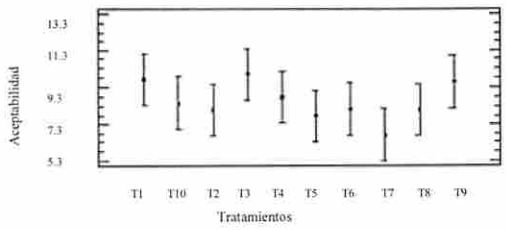


Figura 3. Aceptabilidad del panel no entrenado para los tratamientos, en el día 16 de almacenamiento a 4 °C.

En la Figura 4 se muestra la superficie de respuesta para el parámetro de aceptabilidad. El R^2 indicó que un 67,80% de la variabilidad en la aceptabilidad, estuvo explicada por la presencia de los ingredientes. Este valor puede considerarse bajo, pero vale la pena tener en cuenta que el panel utilizado para este análisis no era entrenado, sino de consumidores y además, no acostumbrado a la leche de soya. .El análisis de la superficie de respuesta indicó que, para maximizar la aceptabilidad, la proporción recomendada de ingredientes debería tener un nivel de inclusión de 5% de LSP (Leche soya en Polvo), 2% de sacarosa y un 3% de glucosa, que corresponde a la mezcla del tratamiento T1

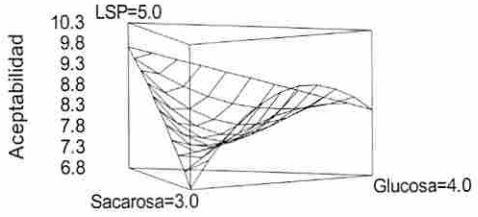


Figura 4. Superficie de respuesta para aceptabilidad de panel de consumidores.

Como se muestra en las Figuras 5 y 6, los resultados observados demostraron que, existió un desconjugamiento continuo de las isoflavonas de la bebida de soya probiótica, debido a la acción β-glucosidasa de las bacterias ácido lácticas inoculadas en el producto. La mayor concentración de genisteina se presentó en el tratamiento T1, después le siguió el T3, y por último el T9; en cambio, con respecto a la daidzeina, la mayor concentración se encontró en el tratamiento T3, después le siguió el T1 y por último el T9. Cuando se suman las dos agluconas (genisteina y daidzeina) en los tratamientos antes mencionados, se puede notar que el tratamiento T1 es el que tiene mayor cantidad de agluconas, luego le sigue el T3 y después el T9. Como se esperaba, la mayor cantidad de agluconas se dieron en el tratamiento T1, debido a que poseía el mayor porcentaje de materia prima de soya, seguido por el T3 y después el T9.

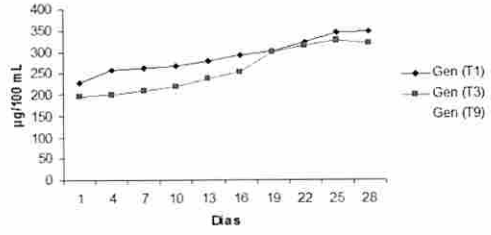


Figura 5. Curva de desconjugamiento de isoflavonas a genisteína durante el período de almacenamiento en los tratamientos T1, T3 y T9.

En cambio, el mayor desconjugamiento de glucósidos se produjo en el tratamiento T9, luego le siguió el T3 y por último el T1. Según Otieno *et al.* (2006), la enzima β-glucosidasa es responsable por el rompimiento de los enlaces glucosídicos β-1-6, el cual une al azúcar y la aglucona. Cuando se hidroliza el enlace glucosídico, las isoflavonas glucósidas se rompen y se convierten en aglicones bioactivos.

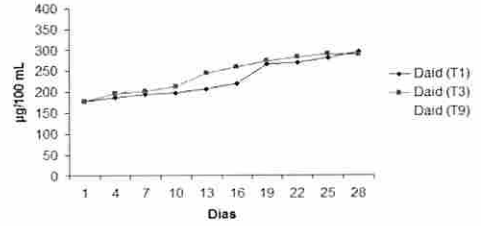


Figura 6. Curva de desconjugamiento de isoflavonas a daidzeína, durante el período de almacenamiento en los tratamientos T1, T3 y T9.

Finalmente se pudo constatar que las bacterias probióticas utilizadas fueron capaces de crecer eficientemente usando los azúcares sacarosa y glucosa aportadas en la formulación de los productos. En los diferentes tratamientos los microorganismos utilizaron al día 16, entre un 75,5 y un 77,5% de los azúcares aportados.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados se concluyó que era posible elaborar una bebida de soya con características físicas, químicas, probióticas y sensoriales adecuadas.

Dentro de las formulaciones evaluadas, el tratamiento T1 (5% LSD, 2% Sacarosa y 3% Glucosa) refiriéndose en términos generales a los parámetros analíticos y sensoriales, fue el que obtuvo las calificaciones más altas, y además, fue el que tuvo el mayor porcentaje de materia prima de soya. Este tratamiento puede ser considerado como un alimento funcional, debido principalmente a su concentración de probióticos (mayores de 1 x 10^7 UFC/mL) y a la presencia de fitohormonas como la genisteina y la daidzeina.

Las bacterias ácido lácticas usadas (*Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*), fueron muy efectivas en la liberación de las isoflavonas bioactivas (genisteina y daidzeina) de los glucósidos presentes en la leche de soya

REFERENCIAS

[AOAC]. Association of Official Analytical Chemist .1995. Official methods of analysis. 19° ed. Washington D.C. USA. 1141 p.

Champagne C, Gardner N. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45: 61 – 84.

Donkor O, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah N. 2005. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. Journal of Food Science 70: 375 – 381.

Kao T, Lu Y, Hsieh H, Chen B. 2004. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. Food Research International 37: 891-900.

Kawakami Y, Tsurugasaki, W, Yoshida Y, Igarashi, Y, Nakamura S, Osada K. 2004. Regulative Actions of Dietary Soy Isoflavone on Biological Antioxidative System and Lipid Metabolism in Rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 1764 – 1768.

Labmaster. 2006. Labmaster TR-FIA test. [on line] disponible en: http://www.labmaster.fi/products/tr-fia-kits/index.htm (fecha de consulta Mayo 2006).

Otieno D, Ashton J, Shah N. 2006. Evaluation of enzymic for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei.* Food Research International 39: 394 – 407.

Tsangalis D, Nagendra P. 2003. Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. International Journal of Food Science and Technology 39: 541-554.

EFECTO DEL CALCIO SOBRE LA REOLOGÍA DE EMULSIONES W/O/W PREPARADAS A BASE DE LECHE DE SOJA

Márquez, Andrés L.[1, 2]; Wagner, Jorge R.[2]*

[1] Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Universidad Nacional de La Plata, calle 47 (s/n) y 116 (B1900AJJ), La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

[2] Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352 (B1876BXD), Bernal, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

*** E-mail: jwagner@unq.edu.ar**

Palabras clave: propiedades funcionales y sensoriales, emulsiones w/o/w, leche de soja, calcio, reología

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento reológico de emulsiones dobles o agua en aceite en agua (w/o/w) preparadas con leche de soja y aceite de girasol, empleando poliglicerol polirricinoleato (PGPR) como emulsionante para obtener la emulsión w/o primaria y diversas soluciones de calcio como fase acuosa interna. Se analizaron los efectos de la cantidad de calcio añadido, tipo de sal de calcio, concentración de PGPR, contenido de aceite y porcentaje de fase acuosa interna. Los sistemas obtenidos mostraron un comportamiento viscoelástico con mayor carácter elástico que viscoso, efecto atribuido a la formación de una red de agregados de gotas de aceite (conteniendo gotitas de agua) por interacción del calcio (eventualmente liberado de la fase acuosa interna) con las proteínas de la soja que forman parte de la interfase leche-aceite. Consecuentemente, el aumento del contenido de cloruro de calcio produjo emulsiones claramente más viscoelásticas, debido a la mayor cantidad de catión liberada. La adición de iguales concentraciones de calcio a través de sales menos disociables que el cloruro de calcio (lactato y carbonato de calcio) produjo la disminución de la viscoelasticidad de estos sistemas. Lo mismo fue observado al aumentar el contenido de PGPR, al verse favorecida la retención de la fase acuosa interna que contiene al catión. Por otra parte, el aumento del contenido de aceite (a expensas de menores porcentajes de fase acuosa interna o por aumento de la cantidad de fase dispersa en la leche de soja) produjo sistemas más viscoelásticos por haber un mayor número de gotas disponibles para formar estructuras de agregados. Estas emulsiones dobles elaboradas con leche de soja, debido a su textura, su reducido contenido en lípidos y su aporte de calcio, serían una potencial alternativa a las cremas de leche batidas.

INTRODUCCIÓN

La leche de soja es un alimento muy nutritivo que, además de estar libre de colesterol y lactosa, tiene un mayor aporte de proteínas y hierro que la leche de vaca. Sin embargo, una de las desventajas de la leche de soja frente a la leche vacuna es que su contenido en calcio es considerablemente menor. Además, la fortificación con calcio, aun en concentraciones por debajo de la leche de vaca (100 mg Ca^{2+}/100 g), tiene limitaciones debido a que este catión tiende a formar complejos con las proteínas de la soja, dando lugar a la formación de agregados proteicos y desestabilizando al sistema (Appu Rao y Narasinga Rao, 1975). Trabajos previos mostraron que la fortificación de la leche de soja a altas concentraciones de calcio es posible mediante el agregado de citrato y/o fosfato como agentes secuestrantes (Yazici y col., 1997; Molina y Wagner, 1999).

Las emulsiones denominadas como dobles o agua en aceite en agua (w/o/w) son sistemas complejos con dos fases acuosas y una lipídica. La primer fase acuosa se halla dispersa en la fase oleosa, que a su vez está dispersa en una segunda fase acuosa continua. El método más común de preparación de este tipo de emulsiones tiene dos etapas de homogeneización, consistentes en la preparación de una emulsión agua en aceite (w/o) primaria (con un surfactante lipofílico) que luego es dispersada en una segunda fase acuosa conteniendo un emulsificante hidrofílico (Matsumoto y Kang, 1989). Otro método relativamente nuevo incluye el uso de micropipetas para inyectar pequeñas gotas de agua en gotas de aceite más grandes (Hou y Papadopoulos, 1996). También es posible obtener emulsiones w/o/w en un solo paso por inversión de las fases durante la homogeneización (Márquez y col., 2007).

El objetivo de este trabajo fue obtener emulsiones w/o/w a base de leche de soja y aceite de girasol, a fin de analizar el efecto de la inclusión de calcio en la fase acuosa interna sobre la reología de estos sistemas. De esta manera se pretendió estudiar la eficacia con que el calcio es aislado de las proteínas que se hallan en la leche de soja y evaluar a estas emulsiones como un potencial sustituto 100% vegetal y reducido en lípidos de las cremas de leche batidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Leche de soja fluida (SOYANA SH; San Martín, Argentina); Aceite de girasol refinado (Molinos Río de la Plata S.A.; Avellaneda, Argentina); agua destilada; poliglicerol polirricinoleato (PGPR; Calsa; Lanús, Argentina); goma xántica (Parafarm; Buenos Aires, Argentina); cloruro de calcio anhidro (Anedra; San Fernando, Argentina; pureza: 94.0%); lactato de calcio (Parafarm; Buenos Aires, Argentina; pureza: 98.7%); carbonato de calcio precipitado (Parafarm; Buenos Aires, Argentina; pureza: 100.0%).

Preparación de las emulsiones

Las emulsiones w/o/w fueron obtenidas en dos etapas. La primera consistió en la preparación de una emulsión w/o por homogeneización de diversas soluciones de calcio y aceite (conteniendo PGPR como emulsificante) mediante el uso de un equipo Ultraturrax T-25 (IKA-Works; Wilmington, EE.UU; diámetro del rotor: 12.7 mm) a 24000 rpm durante 2 min (70 g de muestra; vaso de 100 ml). En la segunda etapa se mezcló la emulsión w/o primaria con leche de soja (conteniendo 0.2% p/p de goma xántica como estabilizante) y se homogeneizó con Ultraturrax (diámetro del rotor: 7.5 mm) a 24000 rpm por 1 min (50 g de muestra; vaso de 100 ml). En forma abreviada, se llama FLD a la fase lipídica dispersa, añadida en forma de emulsión w/o primaria; y FAD a la fase acuosa dispersa/interna en relación porcentual con FLD. Todos los porcentajes que se indican se refieren a proporciones en peso.

Microscopía óptica

Las micrografías se obtuvieron con un microscopio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems, GmbH; Wetzlar, Alemania), con una cámara digital adaptada (Leica DC100) operando con un aumento de 200x.

Estudios de reología

El análisis de la reología de las diferentes emulsiones (almacenadas a 4°C durante 1 día) fue efectuado con un reómetro dinámico de platos paralelos (Haake RS600; Karlsruhe, Germany) con una separación de 1 mm y rotor rugoso. Se determinó el módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y tan δ (G''/G') en función de la frecuencia de oscilación (0.01-10 Hz), dentro del rango de viscoelasticidad lineal (esfuerzo = 1 Pa). Las mediciones se llevaron a cabo al menos por duplicado y la temperatura fue controlada a 15°C durante todo el experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las emulsiones obtenidas mostraron una consistencia cremosa, similar a la de una crema de leche batida. Este efecto se debe a

la adición de calcio, dado que en ausencia del catión se obtuvieron sistemas líquidos, ya sea en forma de emulsión aceite en agua (o/w) o doble (w/o/w). Las nuevas propiedades adquiridas se atribuyen a la formación de una red tridimensional de agregados de gotas de aceite (con pequeñas gotas de agua dentro de ellas), las cuales estarían unidas gracias a la interacción del calcio con las proteínas que componen la interfase leche de soja-aceite (Figura 1). Parte de la fase acuosa dispersa que contiene al catión en la emulsión w/o primaria sería liberada hacia la fase acuosa continua durante la segunda homogeneización efectuada para la obtención de la emulsión w/o/w final; de esta manera una fracción del calcio añadido quedaría liberada para unirse con las proteínas de la soja.

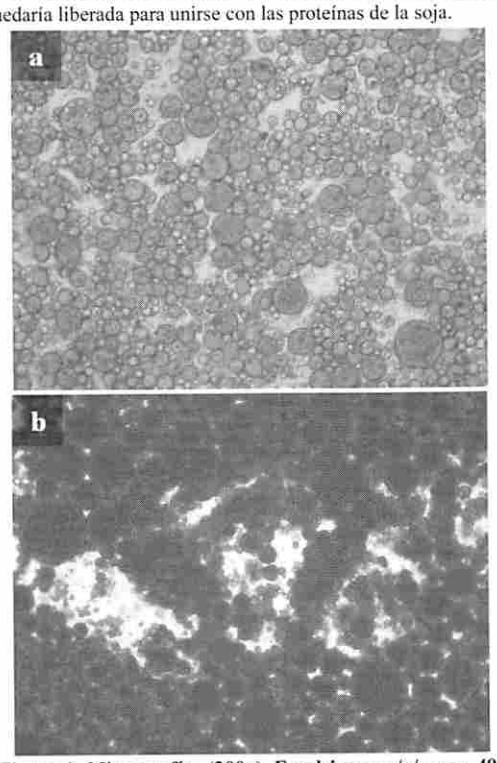


Figura 1. Micrografías (200x). Emulsiones w/o/w con 40% FLD (1% PGPR; 20% FAD): a) con carbonato de calcio (120 mg Ca^{2+}/100 g); b) con cloruro de calcio (60 mg Ca^{2+}/100 g).

La Figura 2 muestra el efecto de la variación del contenido de cloruro de calcio sobre la reología de las emulsiones estudiadas. Se observa un aumento contundente de los valores de G' y G'' con el aumento de la concentración de calcio, lo cual evidencia la formación de sistemas más viscoelásticos como consecuencia de la mayor cantidad de catión interactuando con las proteínas. Como regla general se observó que tan $\delta < 1$ (G' > G''), por ser sistemas más elásticos que viscosos. Además, en todos los casos se observó que mayores valores de G' y G'' significaron menores tan δ, indicando que a mayor viscoelasticidad el carácter elástico se ve favorecido por sobre el viscoso (datos no mostrados).

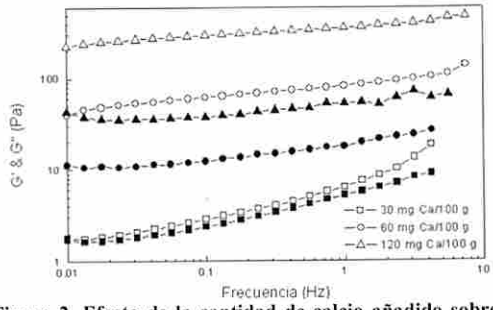


Figura 2. Efecto de la cantidad de calcio añadido sobre el módulo elástico (G'; símbolos abiertos) y el módulo viscoso (G''; símbolos cerrados) de emulsiones w/o/w con 40% FLD (1% PGPR; 20% FAD) y cloruro de calcio.

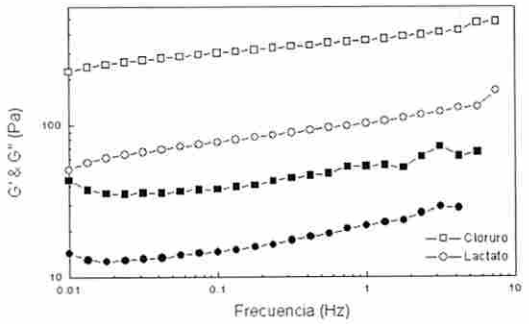


Figura 3. Efecto del tipo de sal de calcio añadido sobre el módulo elástico (G'; símbolos abiertos) y el módulo viscoso (G''; símbolos cerrados) de emulsiones w/o/w con 40% FLD (1% PGPR; 20% FAD) y 120 mg Ca^{2+}/100 g.

La adición de calcio en forma de distintos tipos de sales también influyó directamente sobre la reología de estas emulsiones. Manteniendo fija la concentración del catión bivalente, sales menos disociables dieron sistemas menos viscoelásticos, indicando la necesidad de que el calcio se encuentre disociado para poder interactuar con las proteínas. Con lactato de calcio se obtuvieron emulsiones con menor viscoelasticidad que con cloruro, que es la sal más disociable (Figura 3); y con carbonato de calcio (la sal menos disociable) los sistemas mostraron un comportamiento líquido (no se analizó su reología debido a que el esfuerzo aplicado estaba fuera de su rango de viscoelasticidad lineal). Los agregados formados en presencia de carbonato de calcio (Figura 1a) son de menores dimensiones y se hallan más dispersos que los observados con cloruro de calcio (Figura 1b). El lactato de calcio produjo valores de G' y G'' similares a los conferidos por la mitad de calcio añadida en forma de cloruro (Figura 2). lo cual puede dar una estimación comparativa del grado de disociación del catión.

La reología de estas emulsiones también se vio afectada por la cantidad de emulsionante utilizado para estabilizar la fase acuosa interna que contiene al calcio y se halla dispersa dentro de las gotas de aceite. Mayores contenidos de PGPR produjeron menores valores de G' y G'' (Figura 4), debido a que la cantidad de calcio liberada hacia la fase acuosa continua sería menor, por una mejor contención de la fase acuosa interna. Aparentemente, a relativamente altas concentraciones de PGPR la disminución de G'' es menos apreciable, probablemente debido a que una mayor concentración de emulsionante contribuye a aumentar el carácter viscoso de la emulsión, actuando en contra del efecto atribuido a la menor cantidad de calcio liberada.

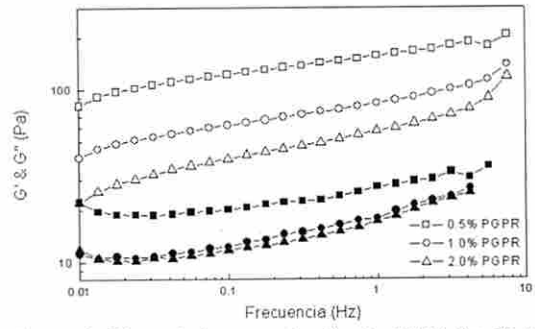


Figura 4. Efecto de la concentración de PGPR (en FLD) sobre el módulo elástico (G'; símbolos abiertos) y el módulo viscoso (G''; símbolos cerrados) de emulsiones w/o/w con 40% FLD (20% FAD) y cloruro de calcio (60 mg Ca^{2+}/100 g).

El efecto producido por el contenido de fase lipídica dispersa (FLD) se muestra en la Figura 5. Se observa que una mayor proporción de FLD, y por ende de aceite, conduce a emulsiones más viscoelásticas. Un mayor número de gotas de aceite (conteniendo las gotitas de agua) posibilitaría la formación de una mayor cantidad de agregados, explicando el aumento de los parámetros viscoelásticos. En este caso, la

cantidad de calcio liberada hacia la fase acuosa continua no sería un factor determinante, dado que se mantuvieron fijas las condiciones que tendrían mayor influencia en el grado de contención del catión.

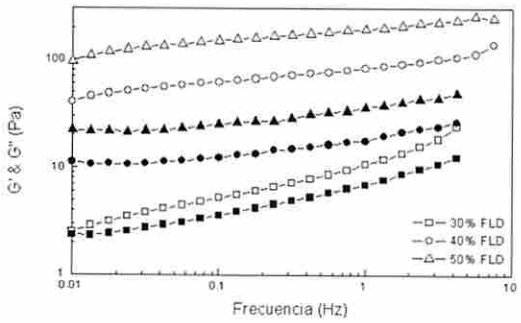


Figura 5. Efecto del contenido de fase lipídica dispersa (FLD) sobre el módulo elástico (G'; símbolos abiertos) y el módulo viscoso (G''; símbolos cerrados) de emulsiones w/o/w con 20% FAD, 1% PGPR (en FLD) y cloruro de calcio (60 mg Ca^{2+}/100 g).

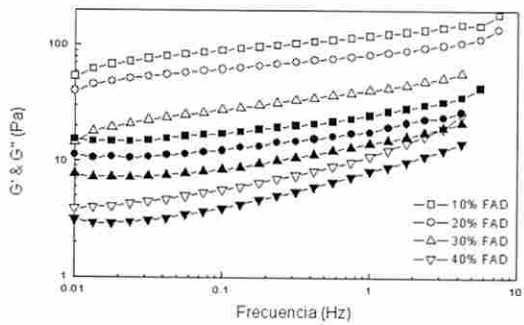


Figura 6. Efecto del porcentaje de fase acuosa dispersa (FAD) sobre el módulo elástico (G'; símbolos abiertos) y el módulo viscoso (G''; símbolos cerrados) de emulsiones w/o/w con 40% FLD (1% PGPR) y cloruro de calcio (60 mg Ca^{2+}/100 g).

Finalmente, se analizó la variación de fase acuosa dispersa (FAD) que contiene al calcio, manteniendo fijo el contenido de FLD (Figura 6). Mayores porcentajes de FAD otorgaron un comportamiento menos viscoelástico. Este resultado podría ser explicado por la disminución del número de gotas de aceite cuando mayor es la proporción de FAD, debido al menor contenido oleoso en favor del mayor contenido acuoso. Éste sería un factor más importante que la cantidad de calcio liberada hacia la fase acuosa continua, dado que incluso una más baja relación FAD/aceite favorecería la retención de una mayor proporción de FAD; sin embargo, la viscoelasticidad disminuye con el aumento de FAD/aceite. Un análisis comparativo señala que la emulsión con 40% FLD y 40% FAD (Figura 6) arroja valores de G' y G'' muy similares a los de la muestra con 30% FLD y 20% FAD (Figura 5); estas dos emulsiones, además de tener la misma concentración de cloruro de calcio (60 mg Ca^{2+}/100 g), tienen igual contenido de aceite agregado (24% sobre la emulsión w/o/w final) pero diferentes porcentajes de FAD, lo cual confirmaría que la proporción de aceite es un factor más importante que la cantidad de calcio retenida/liberada.

CONCLUSIONES

La adición de calcio en la fase acuosa interna de emulsiones w/o/w preparadas a base de leche de soja y aceite de girasol produjo claros cambios reológicos, efecto evidenciado por el aumento de los parámetros viscoelásticos de estos sistemas. Es posible obtener emulsiones w/o/w con diferente viscoelasticidad al variar la cantidad de calcio añadido, el tipo de sal de calcio, la concentración de PGPR en la fase lipídica, el contenido de aceite y el porcentaje de fase acuosa dispersa. De esta manera el calcio, además de contribuir con su propiedad nutritiva, actúa funcionalmente al permitir la obtención de sistemas con textura cremosa sin la necesidad de añadir grasas saturadas. Estos resultados llevan a la conclusión de que las emulsiones estudiadas en este trabajo pueden funcionar como un sustituto reducido en lípidos de la crema de leche batida, aportando igual o mayor cantidad de calcio, además de estar libre de colesterol y ser rico en proteínas y ácidos grasos insaturados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT, PICT 2002 09-10768), Universidad Nacional de La Plata. El Ing. Andrés L. Márquez y el Dr. Jorge R. Wagner son becario doctoral e investigador independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), respectivamente.

REFERENCIAS

Appu Rao, A.G. y Narasinga Rao, M.S. 1975. Binding of Ca (II) by the 11S fraction of soybean proteins. Cereal Chem., 52:21-33.

Hou W. y Papadopoulos K.D. 1996. Stability of water-in-oil-in-water type globules. Chem. Eng. Sci., 51(22):5043-5051.

Márquez, A.L., Palazolo, G.G. y Wagner, J.R. 2007. Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology. Colloid Polym. Sci., 285(10):1119-1128.

Matsumoto, S. y Kang, W.W. 1989. Formation and application of multiple emulsions. J. Dispers. Sci. Technol., 10:455-482.

Molina, M.I. y Wagner, J.R. 1999. The effects of divalent cations in the presence of phosphate, citrate and chloride on the aggregation of soy protein isolate. Food Research Int., 32:135-143.

Yazici, F., Alvarez, V.B., Mangino, M.E. y Hansen, P.M.T. 1997. Formulation and processing of a heat stable calcium-fortified soy milk. J. Food Sci., 62:535-538.

RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD INTERFACIAL Y LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS DEL CASEINOGLICOMACROPÉPTIDO (GMP).

Martinez, M. Julia; Pilosof, Ana M. R.
Laboratorio de Biopolímeros, Nano partículas y Coloides Alimentarios, Dpto. de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Pabellón de Industrias, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.
e-mail: apilosof@di.fcen.uba.ar

Palabras Claves: propiedades funcionales y sensoriales, caseinoglicomacropéptido; agregación; actividad superficial.

RESUMEN

El caseinmacropéptido o glicomacropéptido (GMP) es un péptido presente en el suero lácteo, derivado de la hidrólisis enzimática de la κ-caseína. Aunque algunos reportes indican que posee muy buenas propiedades espumantes y emulsionantes, no existe información acerca de sus propiedades interfaciales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el comportamiento del GMP en la interfase aire-agua y estudiar si existe relación entre estas propiedades con el grado de asociación del GMP a pH 5 y 7. Para cada mezcla se determinó: (1) la distribución del tamaño de partícula en soluciones de GMP en un equipo de dispersión de luz láser; (2) la presión superficial en un tensiómetro de Wilhelmy; (3) la cinética de adsorción y (4) las propiedades viscoelásticas dinámicas de las películas interfaciales mediante un tensiómetro de gota, Tracker. El GMP a pH 5 se encontró asociado principalmente en forma de tetrámero, mientras que a pH 7 se encontró como monómero. Con respecto a las propiedades interfaciales, a pH 7 se obtiene menores valores de presión de equilibrio que a pH 5 en todo el rango de concentraciones estudiadas. Con respecto a los parámetros reológicos, las películas obtenidas con GMP a pH 5 presentaron además el mayor carácter elástico.

INTRODUCCIÓN

El GMP se forma a través de la ruptura específica de la κ-caseína por acción de la quimosina o renina durante la formación del queso. El GMP tiene una heterogénea composición que consiste en diferentes formas fosforiladas y glicosiladas con un idéntico esqueleto peptídico, excepto por los dos aminoácidos diferentes en las variables genéticas principales A y B.
Después de la β-lactoglobulina y la α-lactoalbúmina, el GMP es el péptido/proteína más abundante en las proteínas del suero, encontrándose en concentraciones del 15-25% (Abs El-Salam et al., 1996; Tomä-Worringer et al., 2006). Kawakami et al. (1992) reportaron una asociación pH-dependiente del GMP. A pH 7 el peso molecular se encuentra en un rango de 20 a 50 kDa pero a pH 3.5 es 10 a 30 kDa. Ellos sugirieron que el GMP forma asociaciones a pH neutro a través de interacciones no covalentes, en forma similar a la proteína del trigo gliadina. Mikkelsen et al. (2005) encontraron que el GMP se puede encontrar en forma monomérica (7 kDa), dimérica (18 kDa) y tetramérica (35 kDa).
El GMP es una molécula altamente hidrofílica soluble en agua aún a bajos pH (Haertlé y Chobert, 1999). La solubilidad del GMP mostró un mínimo (80%) entre los valores 1 a 5 de pH y no se ve afectada por tratamiento térmico (Chobert et al., 1989; Moreno et al., 2002). Otro atributo del GMP es su buena capacidad emulsificante con un máximo de actividad observado a pH alcalino y un mínimo a pH 4.5-5.5.
La técnica de dispersión dinámica de luz es una técnica muy usada para determinar tamaño molecular, radio hidrodinámico y cinéticas de agregación de biopolímeros (Sharma, M., et al, 1996).
Debido a que no existe información acerca de las propiedades interfaciales de este biopolímero, el objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades superficiales del GMP y relacionarlo con los estados de asociación en solución a pH 5 y 7.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Se empleó BioPURE GMP provisto por DAVISCO Foods International, Inc. Su composición fue: proteína (N x 6.47) 79.0%; GMP (N x 7.07) 86.3%, grasa 0.6%, cenizas 6.3% y humedad 6.4%.
Para la medición de tamaño de partícula las muestras fueron preparadas en agua ultrapura y luego fue ajustado el pH a 5 y 7 con ácido clorhídrico 0.1N.
Las soluciones para la caracterización interfacial de las películas de GMP se prepararon disolviendo los polvos en buffer preparados con agua ultrapura Milli-Q. Se utilizó ácido acético y acetato de sodio de grado analítico y Trizma [(CH2OH)3CNH2/(CH2OH)3CNH3Cl], provistos por Sigma (>95%) sin posterior purificación, para preparar las soluciones buffer a pH 5.0 y 7.0 respectivamente.

Determinación del tamaño de partícula. Las mediciones se realizaron en un equipo de dispersión de luz láser Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments provisto con un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, Modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión fijo de 173°. La técnica mide la difusión de la partícula debido al movimiento Browniano y la relaciona al tamaño de la partícula. El parámetro calculado se define como el coeficiente de difusión translacional (D). El tamaño de la partícula es calculado entonces a partir del coeficiente de difusión translacional usando la ecuación de Stokes-Eisntein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde, *d(H)*: diámetro hidrodinámico; *D*: coeficiente de difusión tralsnacional; *k*: constante de Boltzmann; *T*: temperatura absoluta; *η*: viscosidad.
La concentración de las muestras para esta determinación fue de 5% p/p.

Isotermas π vs concentración. La presión superficial se determinó mediante un tensiómetro de Wilhelmy, tensiómetro digital Sigma 701 (KSV, Finlandie), que permite medir la dependencia de la tensión superficial con la concentración de surfactante en la subfase. Este método consiste en medir la fuerza adicional sobre una placa vertical inmersa parcialmente en un líquido.

Determinación de tensión superficial. Se midió la presión superficial y simultáneamente, los parámetros viscoelásticos en función del tiempo de películas de GMP adsorbidas en la interfase en un tensiómetro automático de gota (según Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 2002). La tensión superficial (σ) se calculó a través del análisis del perfil de la gota (Labourdenne et al., 1994). La presión superficial es $\pi = \sigma^0 - \sigma$, donde σ^0 es la tensión superficial del agua pura en ausencia de la macromolécula. La precisión promedio de la tensión fue de 0.1 mN/m. Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados (para por lo menos dos mediciones) fue mayor al 1%.

Propiedades superficiales dilatacionales. En el mismo tensiómetro de gota se midieron los parámetros viscoelásticos superficiales: módulo superficial dilatacional, *E*, y sus

componentes elástica, *Ed*, y viscosa, *Ev*, en función del tiempo, θ, a una amplitud de deformación ($\Delta A/A$) y a una frecuencia angular (ω) de 100 mHs. El método involucra una compresión y expansión interfacial sinusoidal periódica automatizada controlada, con disminución y aumento del volumen de gota a una amplitud dada. En un material puramente elástico el esfuerzo y la deformación se encuentran en fase, con $\delta = 0$, de forma que la parte imaginaria es cero. En caso de un material perfectamente viscoso, el desfase será de 90°, siendo por tanto la parte real nula. Así, el ángulo de desfase (δ) aporta una información sobre las propiedades viscoelásticas del material. Las películas más elásticas (a una determinada frecuencia), darán lugar a menores ángulos de desfase y por tanto a una menor cantidad de energía disipada por ciclo. Dicho ángulo de desfase se expresa:

$$tg\delta = \frac{Ev}{Ed}$$

Las mediciones fueron realizadas a 20°C y la temperatura del sistema se mantuvo constante en ±0.1°C por circulación de agua desde un baño. La concentración de GMP en la subfase fue de 4% para los dos pHs estudiados, 5 y 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución del tamaño de partícula. En la *Figura 1* se muestra la distribución en intensidad de tamaño de partícula para el GMP 4% a pH 7 y se observa la presencia de un pico correspondiente a diámetro hidrodinámico (D_h) de entre 2 y 3 nm y además otros picos correspondientes a formas agregadas de este polipéptido. Mediante la estimación del peso molecular se infiere que el pico de menor diámetro corresponde a la forma monomérica del GMP.

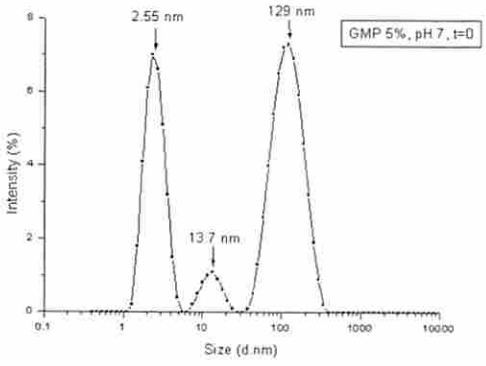


Figura 1. **Distribución de tamaño de partícula del GMP 5%, pH 7.**

En la *Figura 2* se observa un pico mayoritario correspondiente a un D_h de alrededor de 5 nm que corresponde a la forma tetramérica de la proteína y otro de agregados de tamaños mayores (114 nm).

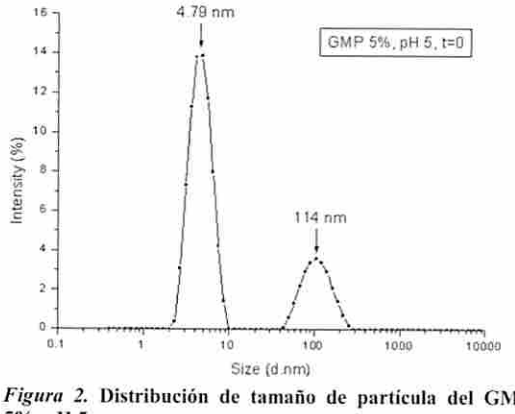


Figura 2. **Distribución de tamaño de partícula del GMP 5%, pH 5.**

Isotermas de adsorción (π vs concentración) de GMP. Se estudió el comportamiento del GMP en las interfases aire-agua en el equilibrio mediante el tensiómetro tipo Wilhelmy. Los resultados se muestran en la *Figura 3* donde se puede observar la dependencia de la presión superficial con la concentración. La curva obtenida muestra un comportamiento sigmoideo, típico de las sustancias tensioactivas. La presión superficial se incrementó con la concentración de GMP y se observan mayores valores para pH 5 que para pH 7 en todo el rango de concentraciones estudiadas.

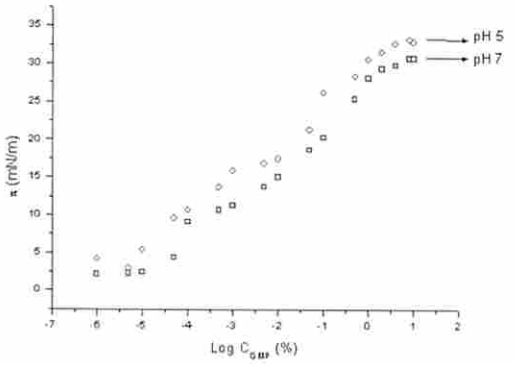


Figura 3. **Dependencia de la presión superficial con la concentración de GMP en la subfase.**

Reología de las películas. En la *Figura 4* se observa que a pH 5 se obtienen películas más elásticas que a pH 7, mientras que con respecto a la viscoelasticidad relativa las que obtuvieron el mayor valor (menor valor de tg δ) fueron las de pH 7 (*Figura 5*). El carácter viscoso de las películas se mantiene relativamente sin cambios dado que la tangente de δ aumenta en igual medida que el carácter sólido (*Tabla 1*).

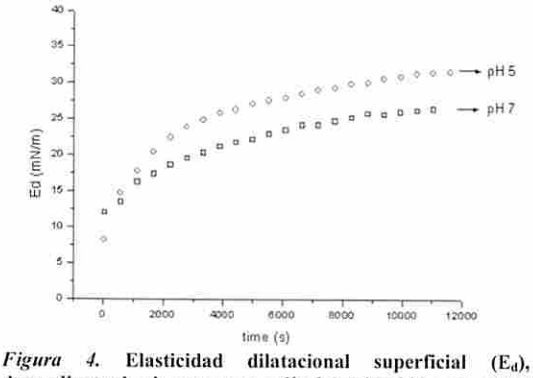


Figura 4. **Elasticidad dilatacional superficial (E_d), dependiente de tiempo para películas adsorbidas de GMP 4% p/p en la interfase aire-agua. Frecuencia: 100mHz. Amplitud de deformación 15%. Temperatura 20°C, pH 5 y 7 y I = 0.05.**

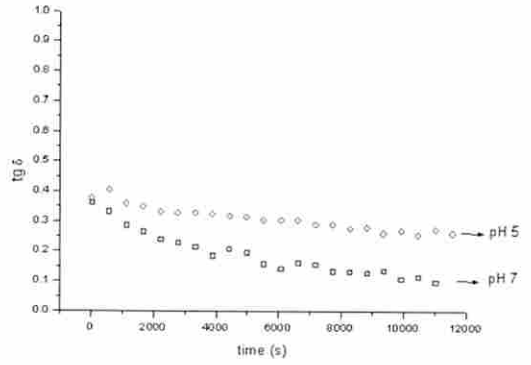


Figura 5. **Tangente del ángulo desfase (tg δ), dependiente de tiempo para películas adsorbidas de GMP 4% p/p en la interfase aire-agua. Frecuencia: 100mHz. Amplitud de deformación 15%. Temperatura 20°C, pH 5 y 7 y I = 0.05.**

Tabla 1. **Valores finales (12000 s) de elasticidad dilatacional superficial (E_d) y de viscoelasticidad relativa (tg δ) de las películas de GMP 4% p/p en las dos condiciones de pH estudiadas.**

	E_d	tg δ
pH 7	26.53	0.10
pH 5	33.22	0.25

CONCLUSIONES

La mayor actividad superficial del GMP a pH 5 observada en las isotermas π-C estaría vinculado a la existencia del GMP en la subfase principalmente en la forma tetramérica que ha sido reportado que presenta mayor hidrofobicidad que la forma monomérica (Mikkelsen et al. (2005). Además a pH 5 las películas de GMP presenta el mayor carácter elástico (E_d), lo cual le permitirá formar estructuras interfaciales más cohesivas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de la Universidad de Buenos Aires, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

REFERENCIAS

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S. and Buchheim, W. 1996. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide *International Dairy Journal, 6: 327-341.*
- Chobert, J. M., Touati A., Bertrand-Harb, C., Dalgalarrondo, M. y Nicolas, M. G. 1989. Solubility and emulsifying properties of kappa casein and its caseinmacropeptide. *Journal of Food Biochemistry, 13: 457-473.*
- Haertlé, T., & Chobert, J. M. (1999). Recent progress in processing of dairy proteins: A review. *Journal of Food Biochemistry, 23, 367–407.*
- Kawakami, H., Kawasaki, Y., Dosako, S., Tanimoto, M., & Nakajima, I. (1992). Determination of k-casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchmissenschaft, 47, 688–693.*
- Labourdenne, S., Gaudry-Rolland, N., Letellier, S., Lin, M. Cagna, A., Esposito, G., Verger R. and Rivière C. 1994. The oil-drop tensiometer: potential applications for studying the kinetics of (phospho)lipase action. *Chemistry and Physics of Lipids, Volume 71, Issue 2, 23 May 1994, Pages 163-173.*
- Mikkelsen T. L., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., Ferranti, P. y Barkholt, V. 2005. Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ-casein. *Journal of Dairy Science, 88: 4228-4238.*
- Moreno, J. F., López-Fandiño, R. y Olano A. 2002. Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 5179-5184.*
- Rodríguez Niño, M. R. y Rodríguez Patino, J. M. 2002. Effect of the aqueous phase composition on the adsorption of bovine serum albumin to the air-water interface. *Industrial & Engineering Chemistry Research, 41: 1489-1495.*
- Sharma, M., Haque, Z. U. and Wilson, W. W. (1996). Association tendency of beta lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids, 10 (3) 323-328.*
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J, and López-Fandiño, R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal, 16:1324-1333.*
- Worringer, T., Sørensen, J. y López-Fandiño, R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal, 16: 1324-1333.*

RELATIONSHIP BETWEEN INTERFACIAL AND FOAMING PROPERTIES OF SOY PROTEIN ISOLATE AND THEIR HYDROLYSATES WITH POLYSACCHARIDES

Martínez, Karina D.[a] ,Carrera Sánchez Cecilio [b] Rodríguez Patino, Juan M [b] and Pilosof, Ana M.R. [a *] E-mail: karinadafnem@yahoo.com.ar

[a] Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428) Buenos Aires, Argentina, TE = 541145763377.

[b] Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, C/Prof. García González, 1,41012 Seville , Spain.

Keywords: Functional properties; Foam; Soy protein hydrolysates; Polysaccharides; Air-water interface

SUMMARY

The objective of the work was to study the relation between foaming and interfacial properties of soy protein and their hydrolysates with polysaccharides at 2%/0.25% wt% respectively. As starting material a sample of commercial soy protein isolate was used (SP) and hydrolysates were produced by an enzymatic reaction. In this contribution we are concerned with the analysis of foaming by whipping method (foam overrun (FO), stability against liquid drainage (K_{dr}) and collapse (collapse time 10ml)) and interfacial properties (surface dilatacional rheology).

The effect of polysaccharides on foaming properties depended in a complicated way on the degree of hydrolysis of soy protein and the kind of polysaccharide, being foam stability the consequence of the contribution of polysaccharide to bulk viscosity and to film elasticiy/viscoelasticity.

Relative viscoelasticity of films from the less hydrolyzed soy protein increased in the presence of polysaccharides, but decreased or did not change for the more hydrolyzed protein. This points out that a limited hydrolysis is sufficient to improve the properties of surface films when the protein is used in combination with polysaccharides.

INTRODUCTION

There is a limited amount of theoretical work suggesting that interfacial properties of a surfactant significantly influence bulk foam or emulsion rheology (Buzza, Lu & Cates, 1995; Edwards & Wasan, 1996).

There seems to be a lack of studies that directly measure both interfacial and foaming properties of the same material, especially foaming studies that utilize a protein concentration relevant to the food industry and utilizes whipping as a bubble production, again the most industrially relevant method of foam formation. Accordingly, we choose to whip foams of 2%wt/wt protein and hydrolysates solutions, utilizing commercially soy isolate as starting material.

At high degrees of hydrolysis, the decrease in molecular size can be expected to decrease the ability of the polypeptides at the interface to interact, so that less viscoelastic films will cause a decrease in foam stability.

Therefore, because of the decreased foam stability of hydrolysed proteins, their use would require the addition of polysaccharides as stabilizers.

In this work we studied the foaming and interfacial behavior of mixed soy protein (SP) /hydrolysates + polysaccharide (PS) systems at 2/0.25wt% respectively to gain information on the interactions between these biopolymers at the air –water interface under dynamic conditions which can be related to foam behaviour.

MATERIALS AND METHODS

Materials

A commercial soy protein isolate (SP) (90% protein) from Sambra, Brazil was used as substrate for the hydrolysis with fungal protease from *Aspergillus oryzae*, provided by Quest International. The protein isolate was denatured as detected by differential scanning calorimetry. Surface hydrophobicity determined with the fluorescence probe 1-anilino-8naphatalene-sulphonate (ANS) was So=685 (Kato & Nakai, 1980).

The following polysaccharides (PS), from Sanofi Bioindustries, Argentina were used without further purification: xanthan (X), λ and κ-carrageenan (λC and κC), guar (G), locust bean gum (LB) and hydroxypropylmethylcelluloses (HPMC) called E4M, F4M and E50lv as surface-active polysaccharides from Dow Chemical Co.

Enzymatic hydrolysis

SP isolate was hydrolyzed according to Zylberman & Pilosof (2002) batch-wise by at pH 7, 50°C for 1h , with different enzyme/substrate (E/S) ratios. Hydrolysis was stopped by heating at 80°C for 10 min.

The degree of hydrolysis (DH), was calculated from the determination of free amino groups by reaction with *o*-phthaldialdehyde (OPA) according to Church, Swaisgood, Porter & Catignani (1983). Protein hydrolysates with 0.4, 5, 2% (H1) and 5.35% (H2) and 5,75% degree of hydrolysis were obtained.

Surface hydrophobicity determined with the fluorescence probe 1-anilino-8naphatalene-sulphonate (ANS) (Kato & Nakai, 1980) was So= 503 and So= 657 for hydrolysates H1 and H2 respectively.

Foaming properties

Foam formation

30 mL of solutions were foamed at 25 °C in a graduated tube. Hydrolesates used were 0.4; 5 and 5.75%DH for 3 min with Griffin & George stirrer at 2500 rpm. Overrun was calculated as:

$$FO(\%)=[(\text{foam volume}-30)/30]100 \qquad (1)$$

Foam drainage and collapse

The volume of liquid drained to the bottom of the graduated tubes and foam height (collapse) were recorded over time. The rate constant for drainage (k_{dr}) was calculated as:

$$k_{dr}=n/Vc^{1/n} \qquad (2)$$

where: V *is* the maximum drained volume; n is a constant related to the sigmoid shape of the curves; and c a constant related to drainage half time by $c^{-1/n}$. The decrease of foam volume (V) over time (foam collapse) was described by the time required to decrease in 10 ml the height of the foam (collapse time 10 ml).

The data reported are means of at least two replicates. The relative error were less than 15 %.

Interfacial properties

Surface dilatational properties

For surface dilatational properties measurements of SP, H1 and H2 adsorbed samples films at the air-water interface an

automatic drop tensiometer (TRACKER ,IT Concept, Longessaine, France) was used as described elsewhere (Rodriguez Patino, Rodriguez Niño & Carrera Sanchez ,1999), at 15% of amplitude ($\Delta A/A$) and the angular frequency (ω) was of 100 mHz.

The experiments were carried out at 20°C . Protein/polysaccharide solutions were prepared freshly and stirred for 30 min. The solution protein/hydrolysates and polysaccharide concentration of 2% wt and 0.25% wt respectively were placed in the syringe and then in a compartment and was allowed to stand for 30 min to reach the desired constant temperature. Then a drop of solution was delivered and allowed to stand for 180 min at 20°C to achieve protein/polysaccharide adsorption at the air-water interface. The average standard accuracy of the surface properties is roughly 0.1 mN/m. However, the reproducibility of the results (for at least two measurements) was better than 0.5%.

RESULTS

Foaming properties

Foam formation

SP+Polysaccharides

Figure 1 shows the effect of PS and the FO of foams made from SP.

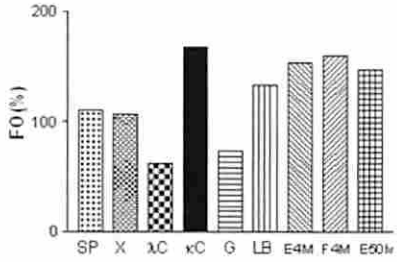


Figure 1: Effect of polysaccharides at 0.25%wt on the foam overrun (FO) of foams made from soy protein isolate (SP) at 2%wt. X : xanthan gum; λC: lambda carrageenan; κC: kappa carrageenan; G:guar gum; LB: locust bean gum; E4M, F4M and E50lv: hydroxypropylmethycelluloses.

The non surface active- PS alone did not show foaming capacity, whereas the surface-active PS exhibited =130% FO. κC, LB and HPMCs increased the FO of SP, the tensioactive character of HPMCs would contribute to the foam formation.

Hydrolysates+polysaccharides

Figure 2 shows the effect of PS on FO of hydrolysate of 0.4 %DH.

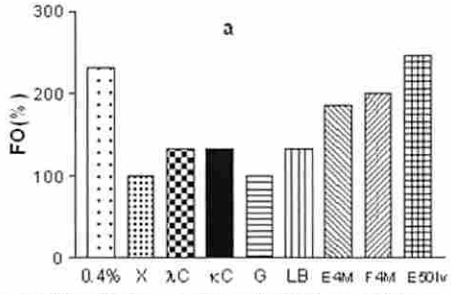


Figure 2: Effect of polysaccharides at 0.25wt% on the foam overrun (FO) of foams made from hydrolysate of 0.4%DH at 2%wt.

It was observed a general behavior independent of the hydrolysate studied: when HPMCs were added, the foam ability was equal or better comparing with the hydrolysates alone. When the other polysaccharides were added to hydrolysates, the FO was always lower. X produced the highest decrease of FO. The positive effect of HPMCs would be related to their tensioactive character and could contribute to foam formation. However, the effect of polysaccharide addition depended on the hydrolysate used. When κC was added to 0.4%DH, the FO decreased, whereas when κC was added to 5 or 5.75%DH (data not shown) the FO was the same or higher than hydrolysates alone. G and LB provoked a decrease of FO when these polysaccharides were added to 5.75%DH, the FO did not change or increased in the mixed systems.

Liquid Drainage

SP+Polysaccharides

Figure 3 shows the liquid drainage rate of foams made from SP in the presence of PS.

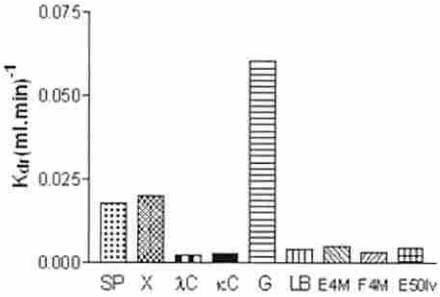


Figure 3: Effect of polysaccharides at 0.25%wt on the drainage rate (K_{dr}) of foams made from soy protein isolate (SP) at 2% wt.

When X was added, the K_{dr} did not change by comparing with protein alone, but when G was added, K_{dr} increased. The other PS improved the stability against liquid drainage of SP.

Hydrolysates + polysaccharides

Figure 4 shows the liquid drainage rate (K_{dr}) of hydrolysate 0.4%DH in the presence of PS.

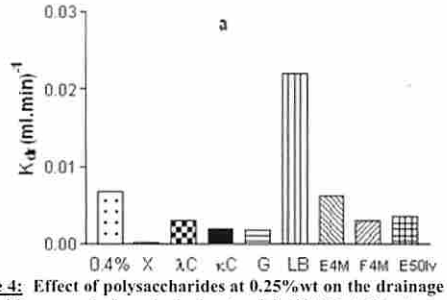


Figure 4: Effect of polysaccharides at 0.25%wt on the drainage rate (K_{dr}) of foams made from hydrolysate of 0.4%DH at 2%wt.

In general the PS decreased the liquid drainage rate. X was the better stabilizer, whereas the HPMCs were the worst. The only one that produced an increase of K_{dr} was LB when was added to hydrolysate of 0.4%DH.

The degree of hydrolysis of protein presented a great impact on the drainage rates of foams in the presence of PS (data not shown).

The stabilizing effect of X was higher as the degree of hydrolysis increased, and when mixed with SP had no effect (Figure 3). λC, κC, LB and HPMCs presented better performance as stabilizers when were added to SP, than in the presence of hydrolysates.

Foam collapse

SP + Polysaccharides

Figure 5 a-b shows the time required to start the foam collapse (lag time) and the time to decrease in 10 ml the height of the foams (collapse time) for SP and the mixed systems.

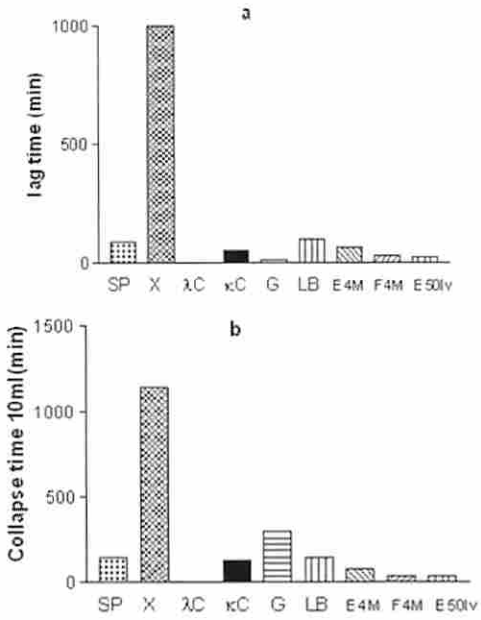


Figure 5: Effect of polysaccharides at 0.25%wt on the collapse properties of foams made from soy protein isolate (SP) at 2%wt. (a) lag time; (b) collapse time for 10 ml.

In the presence of λC it was not observed collapse in a frame of the experiment made (> 5 hours).
X showed also a great stability of foams. κC decreased the lag time but the collapse time was similar to SP alone. Curiously, G promoted a short lag time to collapse but at same time, with a large stability to collapse 10 ml of foam. HPMCs produced a decrease of lag time to collapse and collapse time to 10 ml of foam, which implies a decrease of stability against collapse. LB did not modify the collapse of foams.

Hydrolysates + polysaccharides

Figures 6 and 7 show the time required to start the collapse of the foam (lag time) and the time necessary to decrease the height in 10 ml (collapse time) for soy protein hydrolysate of 0.4%DH and PS added.

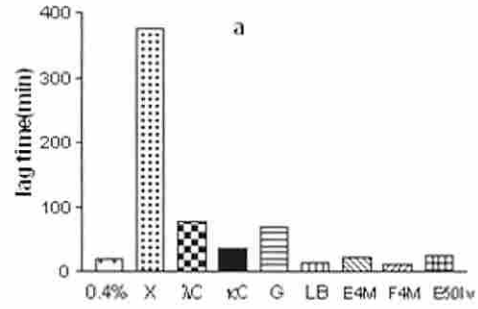


Figure 6: Effect of polysaccharides at 0.25%wt on the lag time to collapse of foams made from hydrolysate 0.4%DH at 2%wt.

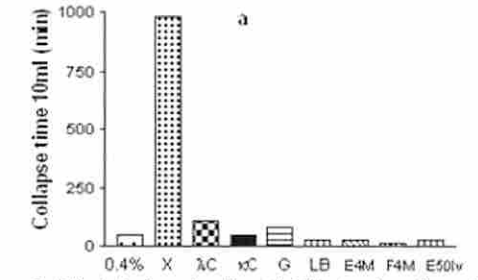


Figure 7: Effect of polysaccharides at 0.25%wt on the collapse time for 10 ml of foams made from hydrolysate of 0.4%DH at 2%wt.

With the exception of HPMCs and LB (on hydrolysate of 0.4%DH) all PS increased significantly the collapse stability of foams (data not shown). When X was added, changes were not observed during the experiment, then, X was the better stabilizer of hydrolysates of 5 and 5.75%DH. When HPMCs were added, decreased the degree of hydrolysis influenced the collapse time to 10 ml in the presence of PS. The hydrolysates stability against collapse, depended on the type of hydrolysate and HPMC used. 5%DH was which resulted more stable against collapse. When X was added to hydrolysate, the foams were totally stabilized, whereas, λC totally stabilized the foams made from SP. However, LB and HPMCs decreased the stability of foams made from SP and hydrolysates.

Interfacial properties

Effect of polysaccharides on the rheological properties of the interface for SP

Over the adsorption period studied it was observed that values for the surface dilatational elasticity were very close to surface dilatational modulus indicating that the single protein film behaved as viscoelastic with a phase angle higher than zero (Martinez, Carrera Sanchez,Ruiz-Henestrosa, Rodriguez Patino & Pilosof, 2006 a). The addition of polysaccharides increased the elastic (*Ed*) component and decreased the viscous (*Ev*) component (data not shown) of surface dilatational modulus. In the presence of λC and HPMC the films were more viscoelastic than single soy protein film as shown by the much lower value of the phase angle (Martinez et al, 2006 a). The addition of LB little affected the phase angle that is the relative viscoelasticity of surface film.
The type of interactions between SP and polysaccharides on film viscoelasticity could be deduced from comparison of the rheological parameters-time curves for the single biopolymers and for the mixtures (dates not shown).
The surface dilatational elasticity of single HPMC film was higher than that of single soy protein film. In the mixed systems at short adsorption times, soy protein dominates the surface dilatational elasticity of mixed films. Nevertheless due to competitive adsorption of HPMC, surface dilatational elasticity tended to increase over time.
The relative viscoelasticity of the mixed film described by the phase angle value, was dominated by HPMC. The single λC + contaminants film had a higher surface dilatational elasticity than single soy protein film and also than surface-active HPMC. The evolution of surface dilatational elasticity of the mixed system, in between the curves for single components, indicates a cooperative interaction between the surface-active component, the protein, and the polysaccharide (Martinez et al.,2006 a). The relative viscoelasticity of soy protein film in the presence of λC was dominated by the polysaccharide.
Contrarily, in the presence of LB gum + contaminants, the elastic (*Ed*) component of surface dilatational modulus was dominated by soy protein over the whole adsorption time. Therefore soy protein also dominated the relative viscoelasticity of the interface in the mixed system as indicated by the phase angle values that were closer to the single protein curve (Martinez at al.,2006 a).

Effect of polysaccharides on the viscoelastic properties of the interface for hydrolysates

Over the adsorption period studied it was observed that values for the surface dilatational elasticity were very close to surface dilatational modulus indicating that the films behaved as viscoelastic with a phase angle higher than zero (Martinez, Carrera Sanchez, Ruiz-Henestrosa, Rodriguez Patino & Pilosof, 2006 b). The decrease of the phase angle with time for adsorbed films of H1 and H2 should be ascribed to adsorption of polypeptides resulting from the hydrolysis at the air-water interface (Rodríguez Patino, Molina, Carrera Sánchez, Rodriguez Niño & Añón, 2003). The more hydrolyzed soy protein preparation (H2) film was more viscoelastic than the film formed by the less hydrolyzed preparation (H1) (data not shown). Increased surface hydrophobicity of hydrolysate H2 may account for by the increased film viscoelasticity, as peptides aggregation at the interface would be favored.

The addition of polysaccharides gave rise to an increase of the relative viscoelasticity of films, as shown by the lower values of the phase angles (Martinez et al.,2006 b). Nevertheless, the effect on H2 was smaller.

The type of interactions between hydrolysed soy proteins and the polysaccharides on film viscoelasticity could be deduced from comparison of the phase angle-time curves for the single biopolymers and for the mixtures (dates not shown).

In the presence of HPMC, the film viscoelasticity was determined by both components that showed a competitive behaviour. The relative viscoelasticity of H1 films in the presence of λC or LB was dominated by the polysaccharides that exhibited lower phase angles than the protein. The comparison of the phase angle-time curves for single H2, polysaccharides and for the mixtures explains why the effect of polysaccharides was lower when added to the more hydrolysed protein (H2) (data not shown). In the presence of HPMC at short adsorption times the film viscoelasticity was dominated by HPMC; nevertheless with time H2 predominated, determining the phase angle at long adsorption times. In the presence of λC, H2 dominated the viscoelasticity over all the adsorption time. In the presence of LB a competitive behavior led to a mixed film of intermediate viscoelasticity (Martinez et al.,2006 b). Therefore, it may be concluded that H2 was able to dominate more than H1 the viscoelasticity of mixed films. The peptides forming the hydrolysate of higher DH (H2) due to their enhanced hydrophobicity and lower molecular size would be able to penetrate the interface in a higher amount and interact to form a viscoelastic film determining the elastic character of the interface in the presence of polysaccharides.

CONCLUSIONS

It can be concluded that stability of foams would be influenced by bulk viscosity as a consequence of the PS added and the viscoelasticity and /or dilatational elasticity of interfacial films.

Above a critical concentration of PS which depends on the structure/viscosity, the foam stability will be controlled by the continuous phase viscosity. Below a critical concentration, the interfacial rheologic properties started to have importance and then, the stability of foams would be determined by both, bulk viscosity and interfacial viscoelasticity (Baeza, Carrera Sanchez, Pilosof, & Rodriguez Patino.,2004) it possible to.

Studies made on the effect of PS on interfacial properties (Martinez et al.,2006 a; 2006 b) showed that in the spite of the thickening bulk effect of PS, tensioactives and non-tensioactives ones, promoted a direct improvement of films properties when PS were used in combination with SP. However, the nature of interactions protein-polysaccharides are strongly affected by the degree of hydrolysis of protein, even in a short range studied (2-5.35%DH). The viscoelasticity of H1 films increased in the presence of PS, however, when H2 was studied, the viscoelasticity decreased or did not change (Martinez et al.,2006 b). This means that a limited hydrolysis is enough to improve the interfacial properties when SP is used in combination with polysaccharides.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CYTED through project A.1.2. The authors also acknowledge the support from CYCYT, Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

REFERENCES

Baeza, R.I., Carrera Sanchez, C., Pilosof, A. M.R. and Patino. J.M.R. (2004). Interactions of polysaccharides with β-lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids, 18*, 959-966.

Buzza, D.M.A., Lu, C.Y.D., & Cates, M.E. (1995). *Journal Phys. II 5*, 37.

Church, F.C., Swaisgood, H.E, Porter, D.H., & Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal Dairy Science*, *66*, 1219-1227.

Edwards, D.A.,& Wasan, D.T. (1996). In: R.K. Prud 'homme, S.A. Khan (Eds) *Foams*, Marcell-Dekker, Inc., New York, pp. 189-215.

Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe methods and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta, 624*, 13-20.

Martínez, K.D., Carrera Sánchez, C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A.M.R. (2006a). Soy protein interactions-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids,21*,804-812.

Martínez, K.D., Carrera Sánchez, C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A.M.R. (2006b). Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air-water interface. *Food Hydrocolloids,21*,813-822.

Rodriguez Patino, J.M., Rodriguez Niño, M.R., & Carrera Sánchez, C. (1999). Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as a function of processing conditions: a rheokinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*, 3640-3648.

Rodríguez Patino, J.M., Molina, S.E., Carrera Sánchez, C., Rodriguez Niño, Ma R.,& Añón, C. (2003). Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. *Journal Colloid Interface Science, 268*, 50-57.

Zylberman,V., & Pilosof, A.M.R.(2002). Relationship between the Glass Transition, Molecular Structure and Functional Stability of Hydrolyzed Soy Proteins. In H. Levine (Ed.), *Amorphous Food and Pharmaceutical Systems* (pp. 158-168). Royal Society of Chemistry.

VISCOELASTICIDAD DE EMULSIONES ACEITE-AGUA ELABORADAS CON MEZCLAS DE CASEINATO DE SODIO-GELANA Y SU RELACIÓN CON LA FRACCIÓN VOLUMEN DE ACEITE

Sosa- Herrera, María Guadalupe; Barrientos-García, María Mercedes; Rocandio-Pineda, Maritza y Martínez-Padilla, Laura Patricia
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
LABORATORIO DE PROPIEDADES REOLOGICAS Y FUNCIONALES EN ALIMENTOS
Avenida Primero de Mayo s/n, Campo 1, C.P. 54740. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. MÉXICO
E.-mail: lpmp@servidor.unam.mx

Palabras clave: propiedades funcionales, reología, emulsiones, fracción volumen, viscoelasticidad.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la fracción volumen de aceite en la fase dispersa sobre el comportamiento vscoelástico de emulsiones con caseinato de sodio a 2%, gelana 0.05% y sus mezclas. Se manejaron tres concentraciones de aceite puro de girasol (20%, 40% y 60%), en agua desionizada pH 6.5-7.0), con y sin la adición de 5 mM $CaCl_2$. Se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud previamente la determinación de la zona viscoelástica lineal. Las emulsiones elaboradas sólo con caseinato de sodio con 40 y 60% de aceite mostraron comportamiento viscoelástico típico de emulsiones semidiluídas y concentradas, la adición de iones en éstas sólo produjo disminución en los valores de los módulos G' y G", lo que se atribuyó a la agregación de caseinato promovida por la presencia de éstos. Tras la adición de gelana, las características de las emulsiones deja de estar dominada por la fase dispersa, encontrándose predominio del módulo de pérdida, G" sobre el de almacenamiento, G', en todas las emulsiones, inclusive en aquéllas con mayor concentración de aceite. La presencia de cloruro de calcio en las mezclas acentúa el dominio de gelana presente en la fase continua, sobre las propiedades viscoelásticas de las emulsiones, dada su habilidad para interaccionar con el calcio y formar gel.

INTRODUCCIÓN

El comportamiento de emulsiones aceite en agua en alimentos está definido por las tres partes que constituyen el sistema (Dalgleish, 2006); la grasa o aceite que se encuentra en el interior de las gotas de la emulsión; el material interfacial en el exterior de las gotas, que en sistemas alimenticios generalmente son proteínas, y la fase acuosa que puede contener iones o macromoléculas. Las grasas o aceites tienen muchas funciones importantes en emulsiones alimenticias ya que determinan características y propiedades específicas como apariencia, textura, sabor, estabilidad, reología e inclusive costo (Mc Clements, 1999). En emulsiones aceite en agua, la grasa o aceite, el cual es empleado para formar la emulsión tiene un efecto funcional que depende principalmente del grado de cristalinidad. Los aceites que son líquidos a la temperatura en la que las emulsiones son producidas, como es el caso del sistema en estudio, éstos se encuentran dispersos en la fase continua en forma de gotas actuando esencialmente como rellenos que pueden coalescer si los glóbulos de grasa son desestabilizados y si la capa interfacial es suficientemente débil. El volumen ocupado por esta fase dispersa es conocido como la fracción volumen, ϕ, tiene un importante efecto debido a que están relacionadas las fuerzas de interacción o "estructurales" entre las partículas, que a su vez pueden ser reflejo de las características viscoelásticas del sistema. Se ha reportado que la relación proteína/aceite en emulsiones de caseinato de sodio repercute sobre el fenómeno de floculación en las mismas, reflejándose en cambios sobre las propiedades de flujo y viscoelásticas de dichos sistemas (Dickinson y Golding, 1997).
Por otro lado, las interacciones interfaciales del emulsificante en la superficie de las gotas dispersas pueden influir sobre las propiedades de la emulsión al producir una capa con cierto espesor y elasticidad. El primero, el espesor de la capa, afectará la fracción volumen efectiva de la emulsión debido a que el radio hidrodinámico se ve incrementado, mientras que la elasticidad de dicha capa puede afectar la deformabilidad de la gota (Barnes, 2004), modificando así el fenómeno de floculación. La forma de la interacción entre gotas de aceite adyacentes en una emulsión se ve por lo tanto, afectada también por las características de la fase continua que puede contener polisacáridos y sales capaces de interaccionar con el emulsificante que se localiza en la superficie de las gotas dispersas.
Las emulsiones alimenticias son sistemas extraordinariamente complejos, donde el contenido de sal y el pH pueden variar, así como suelen estar presentes también algunos polisacáridos.
A pesar de que se han realizado estudios de mezclas de proteínas lácteas con polisacáridos para la estabilización de emulsiones (Ye y col., 2006; Singh y col., 2003; Sánchez y Renard, 2002) muy poco se ha estudiado en relación con estos sistemas modificando la fracción volumen de la fase dispersa, siendo que en la actualidad, algunos alimentos procesados existen ya sea como emulsiones de bajo o de muy alto contenido de aceite.
Por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fracción volumen y la adición de iones calcio sobre las propiedades viscoelásticas de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio, en mezcla con un polisacárido aniónico que además modifica las propiedades de la fase continua.
La goma gelana es un heteropolisacárido aniónico relativamente nuevo del que se sabe que es un hidrocoloide altamente susceptible a la presencia de iones, lo que le permite formar una red tridimensional en fase acuosa, dicho polisacárido ha sido ampliamente estudiado en sistemas acuosos y no así en emulsiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los hidrocoloides empleados fueron caseinato de sodio (Lactonat EN, lote No. 31023, Lactoprot, Alemania), con 5.63% $\pm$ 0.09% de humedad; gelana de bajo acilo y de tamaño de partícula fino (Kelcogel F, lote No. 2A0021A, Kelco, San Diego, USA), con 10.2% $\pm$ 0.25% humedad; aceite comestible puro de girasol (Capri); cloruro de calcio grado analítico (Merck); agua desionizada. Se utilizó 0.03% de azida de sodio como conservador. Se estudiaron 3 niveles de fracción volumen de aceite (20%, 40% y 60% p/p), con 2% p/p de proteína, gelana (0.05% p/p) y agua desionizada como medio de disolución, con y sin la adición de 5 mM de $CaCl_2$.

Métodos

Preparación de muestras

Disoluciones de caseinato de sodio se prepararon adicionando la muestra en polvo en agua desionizada, con agitación magnética a 25 °C, por 30 min. En los sistemas con iones, éstos se disolvieron previamente a la adición de proteína. Las disoluciones de gelana a 0.05% se obtuvieron por calentamiento de la dispersión de gelana a 90 °C durante 10 min bajo agitación magnética, adicionando iones calcio (5 mM de $CaCl_2$), en los casos requeridos, al final de la preparación de las mismas. Las mezclas de caseinato de sodio y gelana se prepararon mezclando partes iguales de las disoluciones de

proteína y de gelana conteniendo el doble de la concentración requerida. Para éstas los iones se adicionaron en la disolución de proteína. Las mezclas se realizaron a 25 °C, empleando agitador magnético, durante 30 min. Se adicionó 0.03 %, de azida de sodio como conservador.

Emulsiones con 20, 40 y 60 %, de aceite de girasol se elaboraron adicionando éste a la disolución acuosa, ya sea de los componentes solos o de mezclas, a una velocidad aproximada de 2 mL/min, manteniendo una agitación constante aproximada de 495 rpm (agitador de propela marca Heidolph), a 25 °C. Posteriormente se homogenizaron la muestras a una velocidad aproximada de 5927 rpm durante 15 min a 25 °C (Agitador de alta velocidad, Silverson L4R, Inglaterra). Para mantener constante la temperatura (25 °C) y evitar el calentamiento de la muestra durante la homogenización se adaptó un baño María con agua a 16 °C, tomando lecturas de temperatura cada 2 minutos con un sensor de temperatura láser (Paytek Minitemp, Oaklon, Instruments, USA). Las emulsiones se caracterizaron de inmediato.

Pruebas de cizalla oscilatoria

Se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud a 25 °C en un reómetro de control de esfuerzos (Physica, LS100) empleando geometría de doble espacio anular, DG 1 (relación de radios 1.041), para las muestras fluidas y un reómetro (Physica, MC100) empleando geometría MP31/P (placa rugosa/placa separación = 0.5 mm, radio = 26 mm) o MK24/25 (cono y placa separación = 0.05 mm, radio del cono 37.5 mm, ángulo 1°, truncación del cono de 50 µm), para muestras semisólidas, para este último caso se adaptó una "capa de arenilla" en la placa inferior para evitar deslizamiento.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los módulos dinámicos G' y G" de las emulsiones de caseinato de sodio solo, con 40 y 60% de aceite. Las emulsiones de caseinato solo con 20% de aceite fueron altamente inestables, presentando cremado, por lo que no fue posible su caracterización. Esta inestabilidad se atribuyó, principalmente al bajo contenido de aceite y a la baja viscosidad de la fase acuosa. La emulsión con 40% de aceite mostró comportamiento viscoelástico de emulsiones concentradas, en el que la tendencia de los módulos dinámicos presenta poca dependencia con la frecuencia, mientras que a 60% el espectro corresponde a un sistema semidiluído (Barnes, 2004), con el módulo almacenamiento menor que el módulo de pérdida, a bajas frecuencias, el cual aumenta y se vuelve mayor que el de pérdida a mayores frecuencias. A pesar de la alta concentración de aceite en el caso de la emulsión a 60 %, se observó un carácter elástico menor que el de la emulsión a 40%, lo que se puede atribuir a que la concentración de proteína presente es insuficiente para cubrir completamente la superficie de las gotas de aceite, de acuerdo con la relación proteína/aceite presente en la emulsión (Dickinson y Golding, 1997). Al adicionar iones calcio en estos sistemas, se observa una mayor disminución de los módulos (gráfico no mostrado), principalmente del módulo elástico, G'. De acuerdo con algunos autores (Carr y col., 2002; Dickinson y col., 2001), la adición de iones calcio en las disoluciones de caseinato de sodio, promueve la asociación de submicelas, es decir, un incremento en el valor del peso molecular promedio, lo que se atribuye al enlace de calcio con los residuos de fosfoserina de las caseínas mayoritarias, alfa s-1 y beta. Destacan en su estudio que entre 2-6 mM de Ca^{2+} existe un mínimo grado de asociación de caseína (como si la asociación de calcio ocurriera principalmente en el interior de la misma molécula de proteína más que entre las diferentes moléculas de proteína), lo que podría explicar la atenuación del módulo elástico, al verse disminuida la cantidad de caseinato que rodea la gota de aceite.

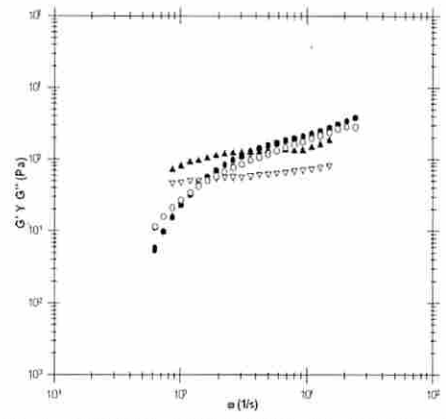


Figura 1. Módulos viscoelásticos en función de la frecuencia, de emulsiones elaboradas con 2% de caseinato de sodio, en agua desionizada con 40% (G'▲, G''▽) y 60% (G'●, G"○) de aceite de girasol.

En la Figura 2. Se muestran los espectros dinámicos para emulsiones elaboradas con mezcla de caseinato de sodio y gelana a 20, 40 y 60 % de aceite en la fase dispersa. El espectro de la emulsión a 20% es característico de una emulsión diluida típica. Las emulsiones con 40 y 60% de aceite mostraron una marcada disminución de los módulos, cambiando inclusive la tendencia de los mismos, siendo ahora el módulo de pérdida el que predomina sobre el sistema, a pesar de las concentraciones de aceite presentes.

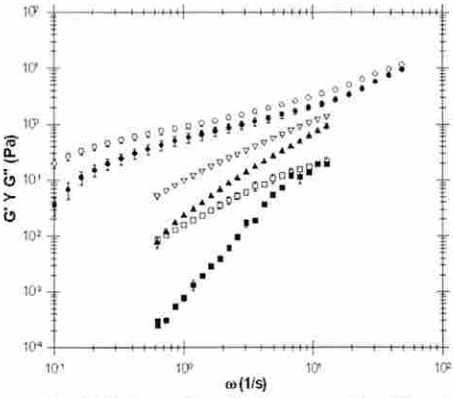


Figura 2. Módulos viscoelásticos en función de la frecuencia, de emulsiones elaboradas con 2% de caseinato de sodio, y 0.05% de gelana, en agua desionizada con 20%(G'■, G"□), 40% (G'▲, G"▽) y 60% (G'●, G"○) de aceite de girasol.

De acuerdo con estudios realizados por Huang y col. (2001), la gelana, al ser un polímero hidrofílico, no presenta superficie activa, por lo que la gelana por sí sola no forma emulsiones aceite en agua y se encuentra integrando la fase continua de la emulsión. Existen estudios en donde se ha hecho evidente la interacción entre la proteína y el polisacárido presente en la fase continua (Ye y col., 2006) y recientemente para el caso específico de gelana con caseinato de sodio (Sosa Herrera y col., 2007), por lo que es posible atribuir estos comportamientos a que al estar interaccionando el caseinato de sodio con la gelana, la capa de proteína que cubre las gotas de aceite se ve disminuida, lo cual justifica la atenuación del carácter elástico del sistema.

En el caso de las emulsiones con mezclas de caseinato de sodio y gelana más la adición de cloruro de calcio (Figura 3), se observa un predominio de la fase continua sobre las propiedades viscoelásticas del sistema. Se ha reportado (Martínez-Padilla y col., 2004) que la goma gelana forma geles fluidos con carácter elástico, en presencia de iones calcio aún a concentraciones bajas, como la empleada en este estudio. Este carácter elástico se manifiesta claramente en las emulsiones con 20% de aceite, la cuál no sólo muestra un aumento en los valores de los módulos sino que además, en ésta, el módulo de

almacenamiento predomina en todo el intervalo de frecuencia estudiado. Este efecto es cada vez menos evidente, conforme aumenta la concentración de aceite, sin embargo, existe un aumento en los valores de los módulos aún para la concentración de 60%.

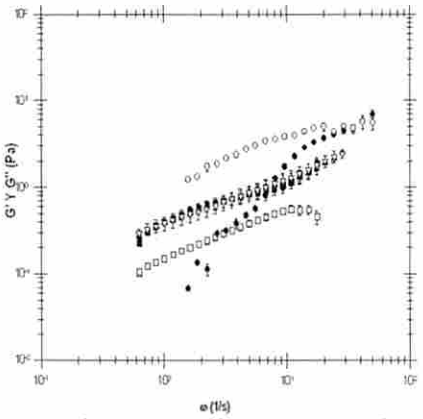


Figura 3. Módulos viscoelásticos en función de la frecuencia, de emulsiones elaboradas con 2% de caseinato de sodio, 0.05% de gelana en agua desionizada con 20% (G'■, G"□), 40% (G'▲, G"▽) y 60% (G'●, G"○) de aceite de girasol, con la adición de 5 mM de $CaCl_2$

CONCLUSIONES

A baja concentración de aceite (20%) las emulsiones sin $CaCl_2$ pueden ser consideradas como diluidas, en donde las interacciones interpartícula pueden ser despreciables y las propiedades reológicas de las mismas están dominadas por las características de la fase continua.

Cuando existen altas concentraciones de aceite (40 y 60%) las interacciones interpartícula pueden promover la formación de flóculos, por lo que el comportamiento al flujo, así como las propiedades viscoelásticas de las emulsiones de caseinato de sodio solo se ven dominadas por la fase dispersa. En donde, la relación caseinato de sodio/aceite es determinante sobre las características viscoelásticas.

La gelana juega un papel importante en las emulsiones a pesar de no tener propiedades emulsificantes, debido a su alta sensibilidad a la presencia de iones Ca^{++} para modificar su conformación y formar gel. Observándose un claro dominio de ésta, inclusive sobre las características de las emulsiones concentradas (60%). Cuando se encuentran en mezcla el caseinato de sodio y la goma gelana, éstos pueden interaccionar por la presencia de iones (Na^{+} y Ca^{++}), modificando así las propiedades de la capa que rodea las gotas de aceite.

El estudio de la incorporación de la goma gelana en emulsiones aceite en agua al 40%, con 2% de caseinato y 5 mM de $CaCl_2$ proporciona una alternativa de formulación base para aderezos.

AGRADECIMIENTO

Proyecto financiado por DGAPA-UNAM (IX 110604). María Guadalupe Sosa-Herrera agradece la beca para estudios de doctorado otorgada por CoNaCyT, México.

REFERENCIAS

-Barnes, H.A. 2004. The rheology of emulsions. in "Emulsions: Structure Stability and Interactions". (Petsev, D. N. ed.) London, UK. Ed. Elsevier Ltd. Pp: 721-759.

-Carr, A.J., Munro, P.A. and Campanella, O.H. 2002. Effect of added monovalent or divalent cations on the rheology of sodium caseinate solutions. Int. Dairy J., 12: 487-492.

-Dalgleish, D.G. 2006. Food emulsions-their structure-forming properties, Food Hydrocoll., 20: 415-422.

-Dickinson, E. and Golding, M. 1997. Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions, J. Coll. Interf. Sci., 191: 166 – 176.

-Dickinson, E., Semenova, M.G., Belyakova, L.E., Antipova, A.S., Il'in, M.M., Tsapkina, E.N. and Ritzoulis, C. 2001. Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: relationship to emulsion flocculation. J. Coll. Interf. Sci., 239: 87-97.

-Huang, X., Kakuda, Y. and Cui, W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. Food Hydrocoll., 15: 533-542.

-Martínez-Padilla, L.P., López-Araiza, F. and Tecante, A. 2004. Steady and oscillatory shear behavior of fluid ges formed by binary mixtures of xanthan and gellan. Food Hydrocoll., 18: 471-481.

-McClements, D. J. 1999. "Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques". Washington. Ed. CRC Press.

-Sánchez, Ch. and Renard, D. 2002 Stability and structure of protein-polysaccharide coacervates in the presence of protein aggregates. Int. J. Pharm., 242: 319 – 324.

-Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y. and Munro, P. 2003. Interfacial compositions, microstructures and properties of oil in water emulsions formed with mixtures of milk proteins and k-carrageenan: 1. Sodium caseinate. Food Hydrocoll., 17: 539-548.

-Sosa-Herrera, M. G., Berli, C. L. A. and Martínez-Padilla, L. P. 2007. Physicochemical and rheological propierties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures, Food Hydrocoll. (en prensa).

-Ye, A., Flanagan, J. and Singh, H. 2006. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseintae and gum Arabic. Biopolymers, 82: 121-133.

BIOACTIVE SUBSTANCES IN TROPICAL FRUITS – AN EVALUATION WITH TOSC AND "ACTIVITY GUIDED" RP-HPLC-FRACTIONATION

Friedhelm Marx[1], Roberta Burger-Rodrigues, André Gordon, Menelaos Papagiannopoulos
Institute of Nutrition and Food Sciences – University of Bonn – Germany
[1]To whom correspondence should be addressed, E-mail: f.marx@uni-bonn.de

Key words: Functional properties of fruits, bioactive substances, TOSC, antioxidant capacity

SUMMARY

In order to develop products with added value out of underutilized tropical fruits açai, blackberry, camu-camu, cashew apple and tree tomato have been investigated. Firstly, the overall antioxidant capacity of each fruit was determined with the TOSC assay. Furthermore some particular responsible secondary plant compounds could be identified by "activity guided" HPLC separation and HPLC-MS^n analyses. By far, camu-camu turned out to be the fruit with the highest antioxidant potential. This could be explained to a certain extend by the extremely high ascorbic acid content of up to 3000 mg / 100 g fresh weight and small amounts of anthocyanins. But also blackberries and açaí with low ascorbic acid content showed very respectable results mainly due to anthocyanins and probably other yet unidentified substances.

INTRODUCTION

A project aided by the European Union centres the development of products with added values for the human health out of so far underutilized fruits from Latin America. In a cooperation of several European and Latin American research institutions, in total nine promising topical fruits have been investigated on their nutritional and functional potential. On the other hand economic aspects were taken into account for this project as well by developing good agricultural practices and a sustainable and innovative processing infrastructure close to the production site of these fruits which up to now all have been cultivated in rural regions with low incomes. Chosen fruits were blackberries (*Rubus ssp.*), tree tomato (*Cyphomandra betacea*), red pitahaya (*Hylocereus purpusii*), berrycactus (*Myrtillocactus schenkii*), açaí (*Euterpe oleracea*), cashew apple (*Anacardium occidentale*), narranjilla (*Solanum quitoense*), palm peach fruits (*Bactris gasipaes*) and camu-camu (*Myrciaria dubia*) of which five have been investigated by us in detail.

In recent years, fruits have received particular attention because they contain high amounts of antioxidants such as polyphenols, vitamin C, vitamin E, β-carotene and lycopene [1]. These kinds of natural antioxidants are potential scavengers of reactive oxygen species (ROS) that are continuously formed in several metabolic pathways of human metabolism [2]. ROS can cause oxidative damage to macromolecules as DNA, proteins, and lipids. Beside body's own ROS scavenging antioxidants, protective actions may be assisted by antioxidants from food especially when the body's equilibrium between oxidants and antioxidants is disturbed. Since the possible role of food antioxidants in those metabolic reactions is far from being understood completely, in vitro studies on the individual contributions of food ingredients to the overall antioxidant capacity are performed. Following in vivo studies may be helpful to reveal the rate of absorption and the influence of food antioxidants on prevention of oxidative damages.

The total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay is an in vitro method to measure the antioxidant capacity. Originally it was introduced for environmental related studies on marine organisms [3] but meanwhile the TOSC assay can also be applied to assess the antioxidant power of water soluble food compounds. It is based on the inhibition of radical-depending formation of ethylene from α-keto-γ-methiol butyric acid (KMBA) by antioxidants and permits to study the antioxidant capacity of samples against three different ROS with physiological relevance – peroxyl radicals, hydroxyl radicals and peroxynitrite.

For fruits containing high amounts of antioxidant micronutrients, an appropriate in vitro antioxidant activity could have been shown [4]. Following the measuring of the in vitro antioxidant capacity of a fruit, an oral application of a corresponding fruit juice on healthy subjects might be useful in order to show whether or not this potential can be exerted in vivo. The so called comet assay based on the method of Singh et al [5] enables to ascertain the bioavailability of plant compounds by assessing endogenous oxidative damage in lymphocyte DNA.

MATERIALS AND METHODS

TOSC Assay

TOSC assay conditions are described in detail in [6]. Briefly, samples and buffered solutions of KMBA are mixed and one of the ROS is formed. Peroxyl radicals are generated by the thermal homolysis of 2, 2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dichloride. Hydroxyl radicals are formed during the iron plus ascorbate driven Fenton reaction. Peroxynitrite is produced by the decomposition of 3-morpholinosyndnonimine-N-ethyl-carbamide. Due to the presence of the ROS, the KMBA molecules are decomposed by liberation of ethylene gas. Presence of antioxidants in the samples decreases the ethylene formation. The time course of ethylene formation is monitored during one hour by repeated gas chromatographic analyses of 100 µL aliquots from the headspace in the sample vials and compared to the ethylene formation in control vials filled with the same amount of water instead of the sample.

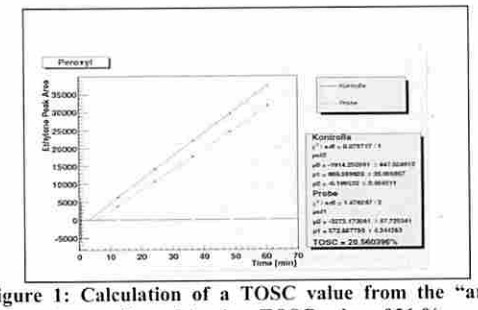


Figure 1: Calculation of a TOSC value from the "areas under the curve" resulting in a TOSC value of 21 %.

For the estimation of the TOSC values the kinetic curves that best fit the experimental GC data over a period of 60 min have to be calculated. Then the corresponding areas under the time curves (AUC) for samples and controls are determined. TOSC values result from the relation between the area of the uninhibited control and the area of the sample.

A TOSC value of 0 % characterizes a sample without any antioxidant property. A solution that suppresses the ethylene formation completely achieves a TOSC value of 100 %. An example for TOSC value calculation is shown in Fig. 1.

"Activity guided" RP-HPLC-Fractionation

In order to clarify the question which substances of a sample do have an antioxidant potential, the water soluble sample compounds are separated with reversed phase HPLC by collecting the eluent in several fractions. A gradient separation permits the detection of substances with different polarities.

The liquid chromatographic system consisted of a pump model 2250 and a central processor model 1152 (Bischoff, Leonberg, Germany), a Degasys 1310 degasser (Uniflows, Tokyo, Japan), a detector LC-55 B (Perkin-Elmer, Waltham, USA) and a column Synergi 4u MAX-RP 80-A (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The system was controlled by EZChrom Elite v2.8 (Scientific Software, Pleasonton, USA). Solvents for the gradient elution program were 2 % formic acid

in high-purity water (mobile phase A) and 2 % formic acid in acetonitrile (ACN) (mobile phase B). The gradient separation was conducted with a linear program starting either with 0 % B to 40% B after 25 min (Fractionation 1) or starting with 0 % B to 25 % B after 40 min (Fractionation 2) depending on the amount of detected substances. Before starting the program the column was equilibrated with A for 15 min to initial conditions. After separation the column was flushed for 20 min with B. The flow rate was 0.8 mL / min. The chromatogram was recorded at a wave length of 260 nm. The injection slope had a volume of 20 µL.

Following the fractionation the antioxidant capacity of the respective fraction was verified. An example is given in Fig. 2.

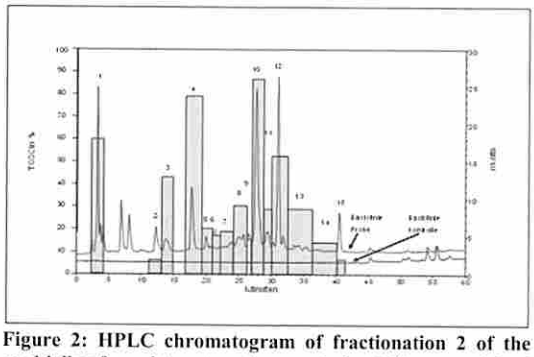


Figure 2: HPLC chromatogram of fractionation 2 of the seed jelly of a red tree tomato recorded at 260 nm combined with particular experimental TOSC values against peroxyl radicals.

Identification of the antioxidant compounds

Identification of polyphenolic antioxidant compounds is performed by HPLC/DAD-MS^n. The liquid chromatograph was a summit system consisting of a Degasys DG-1310 degasser (Uniflow), a P-580A HPG pump, an ASI-100 T automated sample injector, a STH-585 column oven, and an UVD-340S UV-vis detector equipped with a capillary cell (Dionex, Germering, Germany). The system was controlled using the Chromeleon software package v6.7 SP2 (Dionex). The analytical column (Aqua 3 µm C 18, 150 mm, 2 mm i.d., Phenomenex) was kept at 25°C. 5 % acetonitrile and 0.2 % trifluoracetic acid (TFA) in high purity water (mobile Phase C) and 45 % ACN with 0.2 % TFA in high purity water (mobile Phase D) were used as solvents with a flow rate of 0.2 mL / min. A gradient elution program was used starting at 5 % C with a linear gradient of 0.5 % D/ min. up to 30 % D after 60 min. The column was washed with 100 % D for 10 min and reequilibrated for 15 min with the initial conditions. 10 µL of each sample was injected for analysis and the chromatogram was monitored at 200 – 595 nm with a wavelength of 520 nm for quantification.

An LCQ classic ion-trap mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray interface (ESI) and metal needle kit was coupled to the HPLC and controlled with Xcalibur software v1.2 (Thermo Finnigan, Egelsbach, Germany). A flow of 100 µL / min methanol delivered by a System Gold programmable solvent module 116 (Beckmann, Unterschleissheim, Germany) was added through a T-union before the HPLC eluent entered the ion source to enhance ionization of very polar compounds. The settings for the MS were as follows: source voltage, 4.5 kV (negative mode); sheath gas flow, 60; auxiliary gas flow, 0; capillary voltage, -45 V; capillary temperature, 200 °C; first octapole offset, +3.0 V; interoctapole lens voltage, +22.0 V; second octapole offset, +7.0 V; ion trap DC offset, +10.2 V. [7].

RESULTS

Açaí

Açaí is one of most common naturally occurring palm species in the eastern Amazonian estuary floodplains. Their spherical grape-sized fruits usually ripen to a dark purple colour due to a high content of anthocyanins [8]. TOSC assays with the açai fruit pulp approve the assumption of a high antioxidant capacity at least against peroxyl radicals and peroxynitrite. As the TOSC assay covers only water soluble antioxidants, mainly vitamin C and polyphenols are to be considered responsible for the antioxidant capacity of the sample. Because of the negligible vitamin C content in açaí the main attention has to be drawn on the polyphenols. The HPLC-MS analysis proves the presence of two different anthocyanins in appreciable amounts and some others in minor concentrations. The two main anthocyanins were identified as cyanidine-3-glycoside and cyanidine-3-rutinoside. The sample with the highest anthocyanin content also had the highest TOSC values. However, an estimation of the contributions of the two main anthocyanins to the overall antioxidant capacity showed a far higher antioxidant capacity against peroxyl radicals and peroxynitrite for the naturally açaí samples in comparison with the pure anthocyanin standard solution.

Camu-camu

Camu-camu grows naturally in the Amazonian basin and has the highest content of natural vitamin C known in a fruit (up to 3000 mg/100g). TOSC assays against peroxyl and hydroxyl radicals as well as peroxynitrite indicate outstanding antioxidant features of the camu-camu fruit as can be seen in Fig. 3-5. To evaluate the contribution of ascorbic acid to the overall antioxidant capacity of camu-camu the juice was diluted to achieve the same ascorbic acid concentration that was used for a standard ascorbic acid solution (1.66 mg/100mL) [4]. The resulting TOSC of the camu-camu juice was 68 % compared to 49 % of the ascorbic acid standard. Consequently, ascorbic acid contributes to a major part to the antioxidant capacity. Due to a relatively low overall anthocyanin content of about 54 mg/100 g [9], the difference in the TOSC values indicates that other compounds or synergistic effects must be involved.

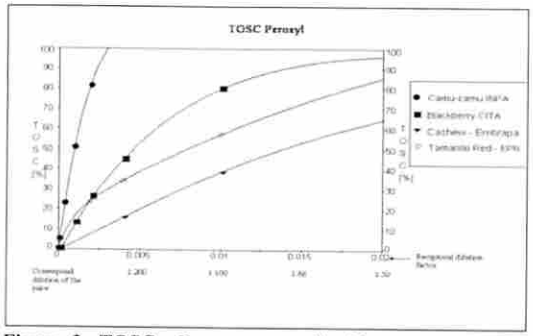


Figure 3: TOSC of camu-camu, blackberry, cashew and tree tomato against peroxyl radicals.

Blackberry

In Latin America blackberries are commercially cultivated from the southern highlands of Mexico to the northern Andes and contain reasonable amounts of antioxidants like ascorbic acid and polyphenols among others anthocyanins [10]. Mentionable TOSC values were found against all determined ROS. Noteworthy is the antioxidant potential against hydroxyl radicals (Fig. 5). Fruits from different origins in Latin America and Germany were studied and showed a similar behaviour whereas TOSC values for samples from Latin America were somewhat higher than that from Germany.

Cashew apple

The cashew tree originates from the north east of Brazil, a tropic region with pronounced droughts. It is cultivated on a big scale for the production of cashew nuts that are located within the bean-shaped fruit. The peduncle is thickened to a juicy and due to high amounts of glucose and fructose relatively sweet yellow to reddish pseudo fruit, representing about 90% of the complete "apple". Up to now only 2 % of these pseudo fruits are further processed although they are rich in vitamin C (ca. 200 mg/ 100 mL juice) and have an exotic aroma [11]. A juice of the cashew apple shows its highest antioxidant capacity against peroxyl radicals, followed by peroxynitrite and hydroxyl radicals. However, compared to juices rich in anthocyanins TOSC values are lower (Fig. 3-5). The half of its antioxidant capacity against peroxyl radicals can be attributed to ascorbic acid. Moreover, the glucose and fructose content contributes to the antioxidant potential particularly against hydroxyl radicals. Phenolic anacardic acid could also be

identified in cashew apple juice but showed no antioxidant activity.

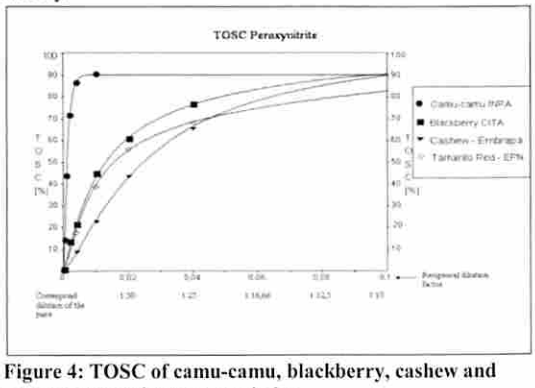


Figure 4: TOSC of camu-camu, blackberry, cashew and tree tomato against peroxynitrite.

Tree tomato

Tree tomatoes were originally domesticated by Indians from the tropical Andes in South America. In the meantime they are cultivated in tropical and subtropical areas all over the world. Especially in New Zealand tree tomatoes are grown with commercial success [12]. These fruits have an ascorbic acid content of 21.9 – 30 mg /100 g fresh weight [13]. Additionally relatively high amounts of carotinoids with provitamin A activity as means β-carotene and cryptoxanthine were found [14].

In opposite to yellow varities in red tree tomatoes anthocyanins are present which were mainly identified as rutinosides of pelargonidine, cyanidine and delphinidine.

Overall, red tree tomatoes have shown intermediate TOSC values against peroxyl radicals and peroxynitrite (Fig 3-4). Probably due to the anthocyanins concentrated in the seed jelly this part performs better against these ROS than the pulp. Against hydroxyl radicals only a moderate activity was observed (Fig. 5).

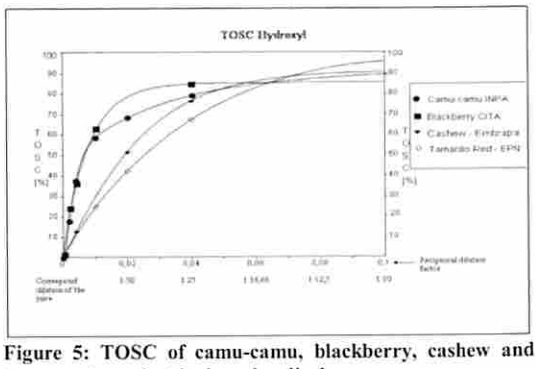


Figure 5: TOSC of camu-camu, blackberry, cashew and tree tomato against hydroxyl radicals.

CONCLUSION

TOSC assays on five tropical fruits resulted in a ranking as follows regarding to their effectiveness to scavenge different ROS:

Peroxyl radicals:

Camu-camu > Açaí > Blackberry > Cashew apple > Tree tomato red

Peroxynitrite:

Camu-camu > Blackberry > Açaí > Cashew apple > Tree tomato red

Hydroxyl radicals:

Blackberry > Camu-camu > Cashew apple > Tree tomato red > Açaí

It turned out that camu-camu is a fruit with outstanding properties against peroxyl radicals and peroxynitrite. Also the potential to scavenge hydroxyl radicals is worth to mention.

These characteristics would make camu-camu a favourable candidate for bioavailability studies with the comet assay. But given the recommendation of the German Nutrition's Association for vitamin C of 100 mg / d a juice of camu-camu could only be administered highly diluted or in small quantities. This suggests mixing up camu-camu with some other investigated fruits of high antioxidant activity that is not only attributed to ascorbic acid. Beside camu-camu two other fruits can be favoured. Açaí and blackberries are relatively poor sources for ascorbic acid but both have respectable antioxidant potential. Indeed, TOSC analyses of a mixture of these fruits in proportion of 12, 44 and 44 % for camu-camu, açaí and blackberry respectively showed that high TOSC values could be maintained. Despite the low addition of camu-camu the antioxidant power against peroxyl radicals and peroxynitrite remained outstandingly high and was kept above levels of blackberry or açaí. Only against hydroxyl radicals TOSC values were halved possibly in consequence of the weak scavenging activity of açaí.

If our juice mixture can give rise to a positive result in vivo after oral application by healthy subjects remains to be seen. In a study accomplished by Weisel et al [15] reduced oxidative DNA damages after drinking of an anthocyanin / polyphenolic-rich fruit juice could have been shown already.

REFERENCES

[1] Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) „Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging". Proc Natl Acad Sci USA 90, 7915-7922

[2] Diplock, A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi, G. Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. (1998) "Functional food science and defense against reactive oxidative species." Brit J Nutr 80 (Suppl 1), 77-112

[3] Regoli, F., Winston, W. (1999) "Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxyl radicals, and hydroxyl radicals". Toxicol Appl Pharmacol 156, 96-105

[4] Rodrigues, R.B., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., Marx, F. "Camu camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh]: A potential functional food from Amazonia". Ernaehrung (Vienna, Austria) in evaluation process

[5] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) "A simple technique for quantification of levels of DNA damage in individual cells". Exp Cell Res 175, 184-191

[6] Lichtenthäler, R., Marx, F., Kind, O.M. (2003) "Determination of antioxidative capacities using an enhanced oxidant scavenging capacity (TOSC) assay". Eur Food Res Technol 216, 166-173

[7] Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R. (2004) "Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS^{n}". J Agr Food Chem 52, 3784-3791

[8] Rogez, H. (2000) "Açaí, prepare, composição e melhoramentc da conservação" Belém, Brazil: EDUFPA, p. 313

[9] Zanatta, C.F., Cuevas, E., Bobbio, F.O., Winterhalter, P., Mercadante, A.Z. (2005) "Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR". J Agr Food Chem 53, 9531-9535

[10] Jakobek, L., Seruga, M., Medvidovic-Kosanovic, M., Novak, I. (2007) "Anthocyanin content and ascorbic acid of various red fruit juices". Deutsche Lebensmittel-Rundschau 103, 58-64

[11] Akinwale, T.O. (2000) "Cashew apple juice: Its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits". Eur Food Res Technol 211, 205-207

[12] Bohs, L. (1988) "Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae)". Economic Botany 43, 143-163

[13] Romero-Rodriguez, M.A., Vazquez-Oderiz, M.L., Lopez-Hernandez, J., Simal-Lonzano, J. (1992) "Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC". Journal of Chromatographic Science 30, 433-437

[14] Rodriguez-Amaya, D.B., Bobbio, P.A., Bobbio, F.O., (1983) "Carotinoid composition and vitamin A value of the Brasilian fruit". Food Chemistry 12, 61-65

[15] Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.P., Kulling, S., Rüfer, C., Johannes, C., Janzowski, C. (2006) „An anthocyanin / polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands". Biotechnology Journal 1, 388-397

WHEY PROTEINS-HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE SYSTEMS: GELATION AND MICROSTRUCTURE.

Jara, Federico L.; Peréz, Oscar E. ; Pilosof, Ana M. R.

Laboratorio de Biopolímeros, Nano partículas y Coloides Alimentarios, Dpto. de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires. Pabellón de Industrias, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina. e-mail operez@di.fcen.uba.ar

Keywords: Functional and sensorial properties; Whey proteins; Hydroxypropylmethylcellulose; Phase separation; Gelation

ABSTRACT

The influence of a commercial type of a low viscosity hydroxypropylmethycellulose (i.e. E50LV) on whey proteins (WPC) gelling properties was studied under thermodynamic compatibility (12 % WPC + 0.25% E50LV, wt) and incompatibility (12 % WPC + 4% E50LV, wt) conditions at neutral pH and room temperature. The binodal curve characterizing phase separation was determined.

The micrographs of the non-segregated mixed systems showed a regular pattern of microdomains of proteins imbibed into E50LV matrix. Segregated mixture displayed great zones of protein with irregular edges immersed in a continuous phase of E50LV.

Gelation dynamics of segregated mixture showed highly synergistic phenomenon in the solid character (G′) during heating. In the case of non-segregated mixtures, the gelation temperature, the relative viscoelasticity, and G′ of constituted gels, determined by dynamic rheometry, were similar to the protein.

In general terms, the rheological behaviour of these mixed systems were dictated by the biopolymer constituting the continuous phase in segregate mixture or the protein in non-segregated mixture.

INTRODUCTION

Mixtures of food bipolymers in aqueous solution are in general unstable (Grinberg and Toltoguzov, 1997), resulting in phase separation of these mixtures. Moreover, the mixing of protein and polysaccharide, above the protein isoelectric point often results in phase separation driven by thermodynamic incompatibility (Turgeon et al., 2003). Each phase is enriched in one of the polymers, with a partition of solvent between these two phases.

Segregative phase separation will increase local polymer concentration. In this way, specific microstructures are formed, which in turn constitute an important base for macroscopic properties, e.g. rheology, fracture properties and sensorial attributes (van de Velde et al., 2003). This work is part of an integral study undertaken to characterize the impact of different kinds of HPMC on phase separation of mixed systems formed by HPMC/WPC. Gelling and textural properties and microstructure of gels obtained were also studied.

Whey proteins have many technological applications. The main proteins present are β-lactoglobulin (β-lg), α-lactalbumin (α-lac) and bovine serum albumin (BSA) (Cayot and Lorient, 1997) and they account for by 70% of total whey proteins. These proteins are responsible for the hydration capacity, gelling, foaming and emulsifying properties of whey protein concentrates (WPC).

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) is used in the food industry, printing technology, and has pharmaceutical applications because is nontoxic and possesses good mechanical properties. In the pharmaceutical industry, HPMC has acquired special interest for controlled drug release matrices (Ford, 1999; Mc Cristal et al., 1997). The usefulness of HPMC is essentially based upon four key attributes: efficient thickening, surface activity, film forming ability, and the capacity to form thermal gels that melt upon cooling. These interesting properties are given by methyl substitutes along the cellulose backbone that constitute strong hydrophobic zones and hydroxypropyl groups that are more hydrophilic. Although several works have been focused on certain properties of HPMC such as water affinity (Ford and Mitchell, 1995; Fyfe and Blazek, 1997; Tritt-Goc and Pislewski, 2002) and gelation (Sarkar and Walker, 1995; Yuguchi et al., 1995), there is scarce literature concerning their behaviour in ternary systems, i.e. systems formed by water, proteins and HPMC.

Thus, the objective of this work was to characterize WPC and E50LV mixtures in compatible and incompatible conditions from a microscopic and a rheological point of view.

MATERIALS AND METHODS

Materials. HPMC (commercial denomination E50LV), food grade was from The Dow Chemical Company, kindly supplied by Colorcon, Argentina. It was used without further purification. This cellulose derivative has 29.1% methyl groups, 9.2% hydroxypropyl groups, the methyl/hydroxypropyl ratio being 3.2%. Viscosity, measured on 2% (wt) aqueous solutions, at 20 1°C determined by Ubbelohde viscometer, was 41.0 cp and molecular weight 18,000 Da. Moisture content was 1.0%.

WPC powder was kindly given by Milka Frank, Santa Fe, Argentina. Its composition was: proteins 78.9% (Nx6.25) (AOAC, 1980); lactose 5%; fat 6%; ash 4.3% and moisture 5.6%. WPC PAGE-electrophoresis in native conditions was made in a Mini-Protean II dual slab cell system (Bio-Rad Laboratories). Quantification of the protein bands was accomplished by means of Bio-Rad GS-670 imaging densitometer. Bio-Rad Molecular Analyst/PC Molecular Imager program allowed the analysis of molecular weight and band intensities under volumetric test option. WPC proteins composition was: β-lg 44%, α-lac 20.1%, BSA 8%. The remainder proteins were inmunoglobulins and the proteose–peptone fraction (Mulvihill and Donovan, 1987).

Phase diagram determination. To obtain the phase diagram of WPC/E50LV systems, solutions of pure components were prepared and equal volumes were mixed to obtain systems with WPC in the range 4–20% wt and E50LV 0.25–4% wt. pH of pure components solution was within 6.6–6.8. The assay was performed in duplicate.

In order to ensure phase separation the mixtures were centrifuged in 15 ml capacity tubes during 7 h at 9000g, in a Griffin & George (London, UK) centrifuge. The volumes of separated lower phases (V_L) and upper phase (V_U) were determined. The protein concentration in lower phase, rich in protein, was determined by the Kjeldhal method. The protein content of upper phase (X_U) was determined by the difference

between the total protein content in the sample (also determined by Kjeldhal method) and that determined in the lower phase (X_L). The polysaccharide concentration in the lower, rich protein phase (Y_L), and in the upper, rich polysaccharide phase (Y_S), were calculated according to Eq. (1), that represents the straight line passing through initial concentration coordinates of each mixture (X_O, Y_O), and through coordinates defining the upper composition (X_U, Y_U) and the lower composition (XL, YL). The slope is defined by volume ratio of phases a (V_U/V_L):

$$Y_{LU} = [(-\alpha Y_O + Y_O)/(X_O + \alpha X_O)] \cdot \alpha X_{LU} + \alpha Y_O + Y_O \quad (1)$$

The binodal curve was obtained by gathering together each tie-line points corresponding to the initial concentration of each mixed system, using Microcal Origin 6.0 software.

Dynamics of gelation and viscoelasticity. Dynamic oscillation measurements were performed in a Paar Physica controlled stress Rheometer (MCR 300). WPC solutions, E50LV solutions or their mixtures were poured onto the bottom plate of a parallel plate measuring system, gap 1 mm. The temperature of the bottom plate was controlled with a Peltier system (Viscotherm VT2, Paar Physica), and liquid paraffin was applied to the exposed surfaces of the sample to prevent evaporation. During gelation experiments, the frequency was 1Hz and the strain was kept at 0.01%, a value found to be in the linear viscoelastic region in preliminary experimentation. The samples were heated from 20 to 90 °C at a rate of 10 °C/min, then kept at 90 °C during 15 min, which was sufficient time to allow G´ equilibration and then cooled to 20 °C at 25 °C/min.

Confocal scanning laser microscope. Images were recorded by an Olympus FV300 CLSM, equipped with a vertical microscope (model Olympus BX61), used in the single photon mode with an Ar/HeNe visible light laser. The following Olympus objective lenses were used: UplanFl 10X/0.3NA/dry and UplanFl 10X/0.5NA/dry. Non-covalent labeling of protein was performed with a few drops of rhodamine B 10% p/V solution (excitation wave length 560 nm; emission maximum 625 nm). Digital image files were acquired in multiple.tif format in 1024 x 1024 pixel resolution.

RESULTS AND DISCUSSION

Behaviour of mixed systems at 25 °C

Protein and polysaccharide mixtures at pH 7 are generally unstable and upon a critical concentration they separate in a protein-rich phase and a polysaccharide-rich one (Tolstoguzov, 2003).

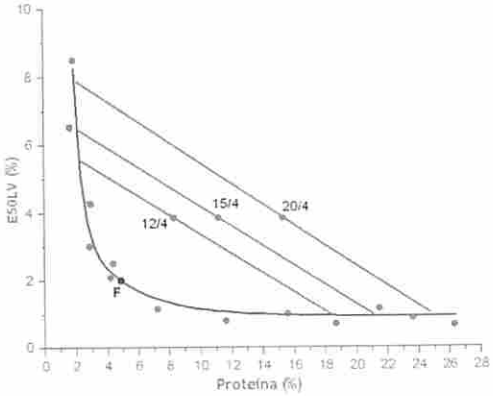


Figure 1. Phase diagram for WPC/E50LV mixtures at room temperature, pH 7. The solid line is the binodal curve. 12/4, 15/4 and 20/4 represent original (wt) concentrations of WPC/E50LV in these systems; F: phase separation threshold.

Figure 1 shows the phase diagram for the WPC+E50LV systems at 25 °C that separates in an upper E50LV-rich phase and a lower WPC-rich phase. The tie-lines connect binodal points representing coexisting phase compositions and the measured volumes of each phase are proportional to the segment length that determine it.

The phase diagram shows that: (a) The binodal curve is very close to axis, that means the compatibility zone is relatively small and phase separation takes place in a broad range of polymer concentrations; (b) The phase diagram is asymmetrical, i.e. the point called 15/4 represents a mixed system formed by WPC 15% and E50LV 4%. This system separates into two phases, the upper containing 6.5% polysaccharide and 2.25% protein and the lower phase containing 21.0% protein and 0.98% polysaccharide. This example shows that the differences between each polymer concentration in the protein-rich phase and in the polysaccharide-rich phase could be several times higher. The asymmetry in the phase diagram reflects the water competition between both biopolymers, which is caused by differences in molecular weight and hydrophilicity (Zhuravskaya et al., 1986). The position of phase separation threshold (F) represents the point of contact between the binodal curve and the straight-line cutting segments of the same length on the concentration axis (Tolstoguzov, 1995). In this case F values corresponded to 2% of E50LV and 5% of WPC.

Visualization of biopolymer mixtures

Confocal scanning laser microscope (CSLM) is a powerful optical tool for the visualization of the structure of biopolymer mixtures and food products on the micrometer scale (van de Velde et al., 2003). The protein selective dye rhodamine B was accumulated in the protein rich domains of the WPC/E50LV mixtures. Figure 2a shows the microstructural aspect of a non-segregated mixture (12% WPC and 0.25 % E50LV), i.e. it does not show macroscopic phase separation. Although, confocal images present protein domains with uniform size distribution.

When biopolymer bulk concentration increases macroscopic phase separation is evident, i.e. mixed systems located above binodal curve. Figure 2b shows the microscopic pattern of system 12 % WPC/4% E50LV. Phase separation involved the formation of bicontinuous protein structures immersed in a continuous phase of E50LV (dark area).

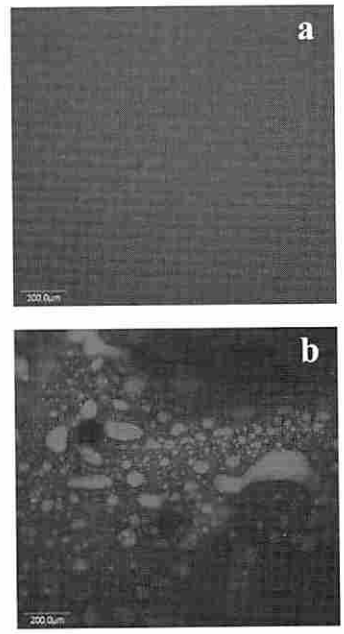


Figure 2. Confocal micrographs of mixtures containing 12% of WPC and 0.25% of E50LV (a) and 12% of WPC and 4% of E50LV (b)

Gelation dynamics of mixed systems

This part of the work focused on thermal gelation of WPC/E50LV mixtures, above the binodal curve and beneath of it. Table 1 displayed the main rheological parameters obtained by dynamic rheological studies. First of all, the gelation temperature (T_{gel}) was highly influenced by the continuous phase since the T_{gel} was close to that of E50LV in 12% WPC/4 % E50LV mixture. T_{gel} of 12% WPC/0.25% E50LV mixed system, naturally is reflecting the high protein concentration in the non-segregated mixture.

Fig. 3 shows the evolution of elastic modulus (G´) upon time of 12% WPC/4% E50LV and 12% WPC/0.25% E50LV mixed systems upon heating time. In the case of segregated mixture, a synergistic effect caused by the presence of E50LV was seen. This is an example of protein concentration by the polysaccharide due to excluded volumes.

On the other hand, rheological behaviour of non-segregative mixture is dominated by the protein which is the main component.

Table 1. Rheological parameters of WPC/E50LV mixed systems. A: WPC 12%, **B**: E50LV 4%, **C**: E50LV 0.25%, **D**: 12% WPC/0.25% E50LV,**E**: 12% WPC/4% E50LV

System	T_{gel}	G´	tan δ	G´ (c)
A	82.2±1.1	151.1±1.2	0.10±0.04	527.0±7.2
B	56.6±	30.8±	0.20±0.02	26.3±0.3
C	48.5±	31.0±0.8	0.17±0.01	25.0± 0.2
D	79.3±0.2	175.5±2.7	0.10±0.01	554,1±3.5
E	60.5±0.4	333.2±3.3	0.53±0.02	27.6±0.3

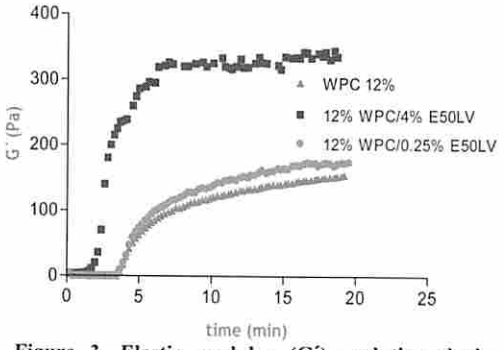


Figure 3. Elastic modulus (G´) evolution during thermal gelation of WPC and mixtures WPC/E50LV

CONCLUSIONS

Mixtures of WPC and E50LV at neutral pH and 25 °C are thermodynamically incompatible and exhibit phase separation above a minimal total concentration of 7%. Upon heating several complex events can take place, same of them simultaneously: (a) E50LV chains dehydration, hydrophobic groups exposition and their interaction; (b) aggregation/gelation of dehydrated E50LV; (c) denaturation of WPC; (d) aggregation/gelation of WPC; (e) phase separation. The dynamics of gelation and gel macrostructure upon heating and cooling, pointed out that there are two competitive phenomena: phase separation and gelation of both biopolymers. It has to be taken into account that an increase in temperature could affect the biopolymer incompatibility as described in the phase diagram at 25 °C.

In general terms, it can be concluded that the rheological behaviour of these mixed systems were dictated by the biopolymer constituting the continuous phase in segregated mixture or the protein in non-separated.

The results showed that segregation of biopolymers may be exploited because of the synergism in rheological behaviour to develop new structures and food.

These complex systems manifest very realistic component relationships occurring in real food, therefore the control of process parameters should allow a better use in food formulation (Turgeon et al, 2003).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the support from Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

REFERENCES

-Cayot, P., and Lorient, D. 1997. "Food proteins and their applications" Ed. Marcel Dekker, New York. p. 225–256

-Ford, J. L. 1999. Thermal analysis of hydroxypropylmethycellulose and methylcellulose: powders, gels and matrix tables. Inter. J. Pharm. 179: 209–228.

-Ford, J. L., and Mitchell, K. 1995. Thermal analysis of gels and matrix tablets containing cellulose ethers. Thermochim. Acta, 248: 329–345.

-Fyfe, C. A., and Blazek, A. I. 1997. Investigation of hydrogel formation from hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) by NMR spectroscopy and NMR imaging techniques. Macromol., 30: 6230–6237.

-Grinberg V. Y. and Toltoguzov, V.B. 1997. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. Food Hydrocol., 11 (2):145-158.

-Mc Cristal, C. B., Ford, J. L., and Rajabi-Siahboomi, A. R. 1997. A study on the interaction of water and cellulose ethers using differential scanning calorimetry. Thermochim. Acta, 294: 91–98.

-Sarkar, N., and Walker, L. C. 1995. Hydration–dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. Carbo. Pol., 27: 177–185.

-Tolstoguzov, V. B. 1995. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. Food Hydrocol., 9(4):317–332.

-Tolstoguzov, V. 2003. Some thermodynamic considerations in food formulation. Food Hydrocol., 17: 1–23.

-Tritt-Goc, J., and Pislewski, N. 2002. Magnetic resonance imaging study of the swelling kinetics of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in water. J. Control. Rel., 80: 79–86.

-Turgeon, S. L., Beaulieu, M., Schmitt, C., and Sánchez, C. 2003. Protein–polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. Cur. Op. in Col. Inter. Sci., 8: 401–414.

- van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman M. W., van der Linden E., Tromp R. H. 2003. Visualization of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labeling techniques. Col. Surf. B, 31: 159-168.

-Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kitamura, S., Ohno, S., and Kajiwara, K. 1995. Gelation mechanism of methylhydroxypropylcellulose in aqueous solution. Food Hydrocoll., 9(3): 173–179.

-Zhuravskaya, N. A., Kiknadze, E. V., Antonov, Y. A.,Tolstoguzov, V. B. 1986. Concentration of proteins as a result of the phase separation of water-protein-polysaccharide systems. I. Phase equilibria in water-milk proteins-polysaccharide systems, Nahrung 30(6): 591-599

EFECTO DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOBRE EL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y GRADO DE FLOCULACIÓN EN EMULSIONES ACEITE EN AGUA

PALAZOLO, Gonzalo G. [a, b]; WAGNER, Jorge R. [b, *]
([a]) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 116 (B1900AJJ), La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
([b]) Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Sáenz Peña 352 (B1876BXD), Bernal, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
([*]) *E-mail*: jwagner@unq.edu.ar

Palabras clave: Propiedades funcionales y sensoriales. Emulsiones, tamaño de partícula, homogeneización, floculación

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia del tipo y concentración de muestra y el método de homogeneización sobre la distribución de tamaño de partícula y el grado de floculación de emulsiones aceite en agua preparadas con dispersiones acuosas de aislado de soja (ASN) o caseinato de sodio (CS) (0,5 y 1,0 % p/v) y aceite de girasol refinado (ϕ=0,25). Se emplearon dos métodos de emulsificación: i) emulsiones H: homogeneización con un dispositivo rotor/estator de alta velocidad y ii) emulsiones V: recirculación de las emulsiones H en un homogeneizador a válvula. A partir de los diámetros promedio de Sauter (d_{32}), obtenidos de las distribuciones en superficie medidas en ausencia y presencia de SDS, se determinó el grado de floculación (GF). Las emulsiones H de ASN y CS mostraron un carácter bimodal sin y con SDS, independientemente de la concentración de muestra. En cambio, las emulsiones V exhibieron un comportamiento marcadamente diferente en función del tipo de muestra: para CS, las distribuciones fueron monomodales y similares con y sin SDS; para ASN fueron bimodales en ausencia de SDS, en tanto que en presencia del detergente resultó una distribución monomodal por la desaparición de la población de mayor tamaño de partícula. Este resultado indica la presencia de flóculos estables en las emulsiones V-ASN en las condiciones de medida. Cuando las emulsiones H y V de ASN se mezclaron en diferentes proporciones volumétricas se observó un incremento del GF con el aumento de la proporción de emulsión V en la mezcla, aunque ni las distribuciones ni el GF fueron aditivas. Esto indicaría que la presencia de partículas de distintos tamaños provenientes de emulsiones diferentes provocaría un reordenamiento formando flóculos de distinto tamaño al de las emulsiones originales.

INTRODUCCIÓN

La estabilidad y la textura de las emulsiones alimentarias dependen fuertemente de su microestructura, entendiendo por esta a la distribución de tamaño de partículas y la existencia o no de flóculos. Si bien estas propiedades están primariamente determinadas por el tipo de homogeneizador empleado, son modificadas por la composición de las fases acuosa y lipídica, la fracción volumétrica de esta última y sobre todo por el tipo y concentración de emulsionante empleado (McClements, 2004). Las proteínas son unos de los biopolímeros más empleados en alimentos emulsionados, por su doble función, su aporte nutricional y sus propiedades emulsificantes (Damodaran, 2005). El caseinato de sodio es una de las proteínas que mejor cubre ambos aspectos, su composición aminoacídica y la alta flexibilidad estructural de sus proteínas constituyentes le brindan propiedades superficiales únicas que se reflejan en la formación de emulsiones muy estables (Dickinson, 2006). En los últimos años se incrementó el empleo de proteínas de origen vegetal en la elaboración de alimentos, entre ellas las proteínas aisladas de soja. Si bien los aislados proteicos de soja, constituidos mayoritariamente por las globulinas 7S y 11S, poseen la capacidad de formar emulsiones, estas presentan características microestructurales diferentes a las preparadas con caseinato de sodio, debido en gran medida a la tendencia a la floculación de las gotas (Tornberg et al., 1997)

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado nativo de soja (ASN) se preparó a partir de harina de soja desgrasada (Santista, Brasil) según el procedimiento de Sorgentini y Wagner (1999). El caseinato de sodio (CS), de calidad analítica (Sigma Co., St. Louis, USA) se utilizó sin ningún tratamiento previo. Las dispersiones acuosas (0,5 y 1,0 % p/v) de ASN y CS se prepararon en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 por agitación magnética durante 2 horas.

Las emulsiones aceite en agua (o/w) se prepararon con 150 ml de dispersión de ASN o CS y 50 ml de aceite de girasol refinado (Molinos Río de la Plata, Argentina) (ϕ = 0,25). Según el equipo de homogeneización empleado resultaron dos tipos de emulsiones:

Emulsiones H: homogeneización con dispositivo rotor/estator Ultraturrax T-25 (rotor S20-S25NK-19, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) a 20000 rpm durante 30 s.

Emulsiones V: homogeneización secundaria de las emulsiones H con un homogeneizador a válvula de alta presión (40 MPa y 4 MPa en la primera y segunda válvula, respectivamente) (FPG 7400, Stansted Fluid Power, Essex, Reino Unido). Se recirculó la emulsión 4 veces a un caudal de 70 ml/min.

La distribución de tamaño de partícula se determinó en un analizador por light scattering (Malvern Mastersizer Microparticle Analyzer, Worcestershire, UK). La distribución desde 0,03 a 360 µm se expresó como superficie diferencial y se seleccionó la presentación estándar, acorde a los índices de refracción de las fases continuas y dispersa, respectivamente. Para realizar la medición, las emulsiones se diluyeron 1:1 en el mismo buffer utilizado para preparar la dispersión acuosa o en buffer Tris/HCl a pH 8,0 conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1,0 % (Anton et al., 2002). A partir de las distribuciones obtenidas se calculó el diámetro promedio de Sauter (mm) de gotas y flóculos estables en las condiciones de medida (d_{32}, sin SDS) y de gotas individuales ($d_{32\ SDS}$, en presencia de SDS). Esta última condición permitió estimar el grado de floculación según la expresión (Palazolo et al., 2005):

$$GF\ (\%) = [(d_{32} - d_{32\ SDS})/D_{32\ SDS}] \times 100$$

A partir de las emulsiones originales H y V se prepararon mezclas en distintas proporciones volumétricas. Las mezclas se agitaron suavemente por inversión y se almacenaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de llevar a cabo las determinaciones de tamaño de partícula. Las mezclas están formadas por emulsiones H y V preparadas con la misma muestra (ASN o CS), a la misma concentración en la dispersión acuosa (0,5 o 1,0 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las distribuciones de tamaño de partículas de emulsiones elaboradas con dispersiones de ASN y CS a una concentración de 0,5% se muestran en la Figura 1. Las emulsiones H (preparadas con homogeneizador de alta velocidad) tanto con CS como con ASN exhiben un carácter bimodal en ausencia de SDS, mientras que las emulsiones V son sólo bimodales en las preparadas con ASN. Las emulsiones de CS pero medidas en presencia de SDS dan distribuciones similares, tanto las H como las V. Esto indica la ausencia de flóculos estables, aún en las emulsiones V, en las cuales sería esperable una mayor floculación por estar formadas por una población de gotas menores a 5 µm (moda 0,6 µm). La tendencia a la floculación se ve incrementada con la reducción del tamaño de gotas y por ende una mayor área interfacial (McClements, 2004).

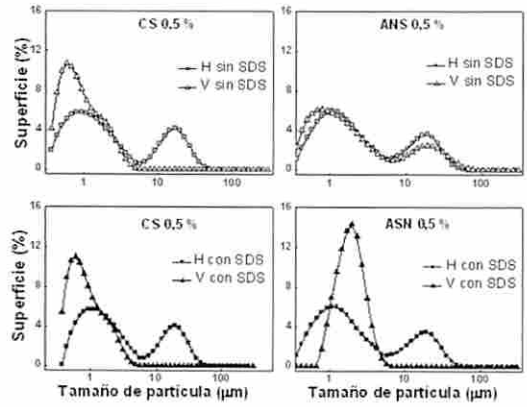


Figura 1: Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones o/w preparadas con ASN y CS 0,5%, medidas sin y con SDS.

Evidentemente, la naturaleza de las proteínas constituyentes del CS (alta flexibilidad estructural y presencia de restos glicosídicos y residuos de fosfoserina), favorece la formación de emulsiones con una baja tendencia a la floculación, debido a la repulsión electrostática y estérica entre las gotas (Tornberg et al, 1997, Dickinson, 2006).

Siguiendo con el análisis de la Figura 1 puede verse que la emulsión H de ASN con o sin SDS da distribuciones similares; un resultado muy diferente se observa cuando esta emulsión se prepara con el homogenizador a válvula de alta presión. En ausencia de SDS la emulsión V de ASN es marcadamente bimodal, pasando a una distribución monomodal al incluir SDS en la medida. Esta emulsión estaría constituida por lo tanto por gotas de un tamaño inferior a 6 µm (moda ≈ 2 µm) en forma libre y una parte de ellas formando flóculos de un tamaño mayor a 8 µm. La formación de emulsiones de ASN con alta tendencia a la floculación ha sido reportada previamente (Tornberg et al., 1997). Las globulinas 7S y 11S tienen una estructura cuaternaria compleja, por lo que el anclaje y reordenamiento de las moléculas de proteína en la interfase no es lo suficientemente rápido en comparación con la velocidad de creación de área por parte del homogeneizador. Sumado esto a la concentración relativamente baja de proteína y al aumento de la hidrofobicidad de las globulinas adsorbidas en la interfase, favorece la formación de flóculos por un mecanismo de puenteo. Este efecto es mucho mayor cuando se utilizan dispositivos de homogeneización de alta energía (Tornberg et al., 1997), por lo que los flóculos se observan en las emulsiones V preparadas con ASN.

Cuando las emulsiones son preparadas con dispersiones acuosas al 1% de ASN y CS resultan las distribuciones de tamaño de partícula mostradas en la Figura 2.

Nuevamente se observa que las emulsiones H son de carácter bimodal para ambas muestras. Las modas de los picos no se ven apreciablemente influenciadas por el incremento de la concentración de proteína, resultado que sugiere que el método de homogeneización tiene mayor peso sobre los demás factores: tipo de muestra y concentración.

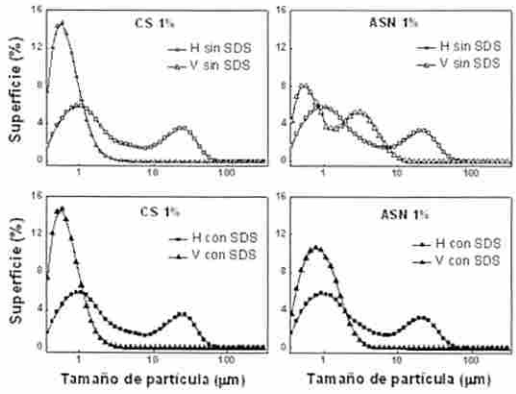


Figura 2: Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones o/w preparadas con ASN y CS 1 %, medidas sin y con SDS.

En cambio, las emulsiones V si bien muestran el mismo comportamiento que a 0,5%, o sea, bimodal para ASN y monomodal para CS, presentan un desplazamiento de las modas hacia menores tamaños de partícula. La mayor cantidad de proteína disponible permite la creación de una mayor área interfacial y su estabilización, las cuales serán mayores para la proteína con mejor actividad interfacial, CS (Palazolo el al., 2003). Sin embargo, la magnitud del cambio debido al incremento al doble de la concentración, es mayor en las emulsiones ASN, las cuales si bien son bimodales, ambas poblaciones de partículas tienen un tamaño inferior a 10 µm.

En la Figura 2 también se pueden observar las distribuciones de las emulsiones preparadas con 1% de muestra pero medidas en presencia de SDS. Las emulsiones H para ASN y CS dan distribuciones bimodales similares a las emulsiones sin el detergente. Las emulsiones V por su parte no muestran cambios apreciables para el caso de CS en tanto que para ASN la presencia de SDS provoca la desaparición total de la población de mayor moda dando una distribución monomodal de tamaño de partícula inferior a 3 µm. Este resultado, coincidentemente con lo observado para la dispersión más diluida, indica que la emulsión V de ASN está formada por gotas libres y flóculos pero con sus diámetros medios reducidos por efecto del incremento de la concentración proteica. La tabla 1 muestra los valores d_{32} en todas las condiciones ensayadas permitiendo observar los efectos combinados del método de homogeneización, de la muestra y su concentración en la dispersión acuosa.

Tabla 1: Diámetros promedio de Sauter medidos en ausencia y presencia de SDS para emulsiones preparadas con ASN y CS.

Muestra	Concentración (%)	Emulsión H		Emulsión V	
		d_{32}	$d_{32\ SDS}$	d_{32}	$d_{32\ SDS}$
ASN	0,5	6,5	6,5	5,9	1,8
	1,0	6,6	6,6	1,8	1,0
CS	0,5	5.8	5.8	1,0	0,9
	1,0	6,4	5,9	0,7	0,7

Los resultados hasta ahora mostrados indican claramente una mayor tendencia a la floculación en las emulsiones preparadas por homogeneización con válvula y con proteínas de soja. Un ensayo adicional para corroborar esta tendencia consistió en mezclar en distintas proporciones las emulsiones preparadas con ambos métodos de homogeneización. De esta manera, para cada condición (muestra y concentración) es esperable que las emulsiones mixtas contengan las partículas (gotas y flóculos) aportadas por cada tipo de emulsión (H y V).

En la Figura 3 se muestra como ejemplo las distribuciones de tamaño de partícula de algunas de las mezclas V + H de las emulsiones de ASN 1,0 %. Se puede observar que dichas

distribuciones no son aditivas; la presencia de partículas de distintos tamaño provenientes de emulsiones de características diferentes provocaría un reordenamiento formando flóculos de distinto tamaño al de las emulsiones originales. A partir de los valores de d_{32} y $d_{32\ SDS}$ de las emulsiones iniciales y de sus mezclas se determinó el grado de floculación (GF %) (Figura 4). Puede observarse que en las emulsiones ASN el GF % aumenta de modo no lineal a medida que se incrementa la proporción de emulsión V en la mezcla, siendo el GF % mayor para las emulsiones ASN con menor concentración de proteína (0,5 %). Las emulsiones de CS presentan un bajo contenido de flóculos estables tanto en las emulsiones iniciales como en sus mezclas corroborando la baja tendencia a la floculación mencionada con anterioridad.

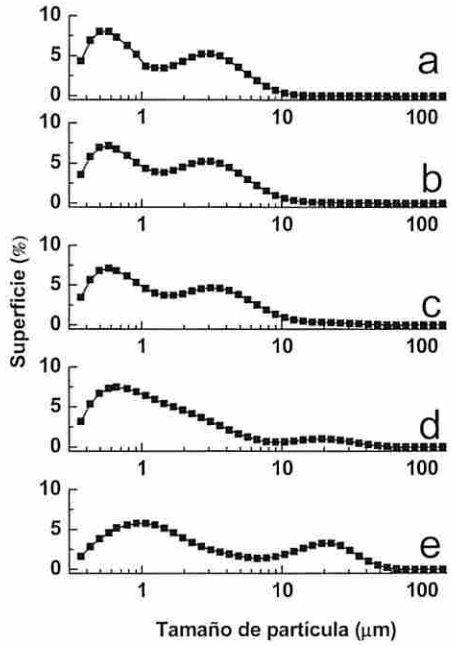


Figura 3: Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones mezcla H y V preparadas con ASN 1,0 %. Porcentajes de emulsión V en la mezcla: a) 100 %, b) 80 %, c) 50 %, d) 20 %, e) 0 %

CONCLUSIONES

El empleo de muestras cuyas proteínas constituyentes exhiben propiedades estructurales e interfaciales diferentes, como el aislado de soja y el caseinato de sodio, influye marcadamente sobre la microestructura de la emulsión (tamaño de gota y flóculos), especialmente cuando se utilizan dispositivos de homogeneización con una alta capacidad de creación de área, como el homogeneizador a válvula (emulsiones V). A diferencia del caseinato de sodio, el aislado de soja está constituido por proteínas de estructura oligomérica y globular, por lo que tiende a dar emulsiones con una alta tendencia a la formación de flóculos estables en las condiciones de medida de tamaño de partícula, comportamiento que se observa principalmente a bajas concentraciones de muestra. En cambio, la utilización de dispositivos de baja energía, limita el área interfacial que se puede crear por lo que el efecto del tipo y concentración de muestra es mucho menos pronunciado (emulsiones H). No obstante, cuando se mezclan emulsiones de aislado de soja preparadas con ambos métodos en distintas proporciones volumétricas, el comportamiento no aditivo de las distribuciones de tamaño de partícula y el aumento no lineal del grado de floculación con el incremento del contenido de emulsión V en la mezcla sugiere un reordenamiento de las partículas formando flóculos de distinto tamaño al de las emulsiones originales. Este efecto podría ser aprovechado para modular la estabilidad y la textura de emulsiones, las cuales dependen en gran medida de la presencia de flóculos.

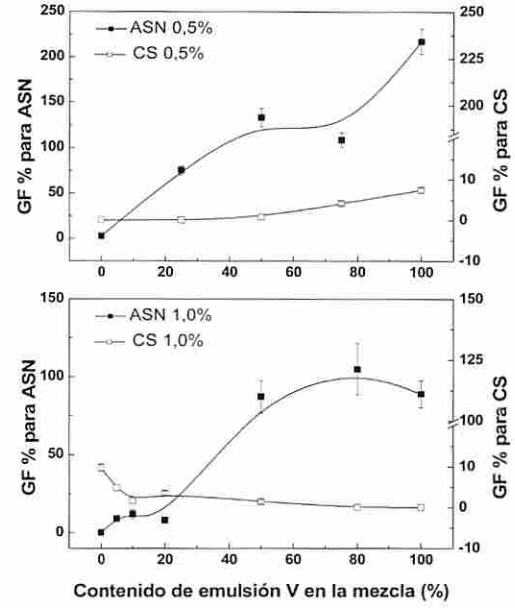


Figura 4: Efecto del tipo y concentración de muestra sobre el grado de floculación (GF %) de emulsiones H, V y mezclas de ambas en distintas proporciones volumétricas. Las emulsiones se prepararon con dispersiones acuosas de ASN o CS (0,5 % y 1,0 %)

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la Universidad Nacional de La Plata y la Universidad Nacional de Quilmes por financiar este trabajo a través de proyectos internos; a la empresa Refinerías de Maíz S.A.I.C.F (Unilever Bestfoods Argentina, Parque Industrial Pilar) por la disponibilidad del analizador de tamaño de partículas.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

-Anton, M., Beaumal, V., Brossard, C., Llamas, G. y LeDenmat, M. 2002. Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: "Food Emulsions and Dispersions" Ed. Anton, M. Research Signpost, Kerala, India, pp: 15-28.

-Damodaran, S. 2005. Protein stabilization of emulsions and foams. J. Food Sci. 70:54-66.

-Dickinson, E. 2006. Structure formation in casein-based gels, foams and emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical Eng. Aspects. 288: 3-11.

-McClements, D.J. 2004. "Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques", Ed. CRC Press, Boca Raton, USA

-Palazolo, G.G., Mitidieri, F.E. y Wagner, J.R. 2003. Relationship between interfacial behaviour of native and denatured soybean isolates and microstructure and coalescence of oil-in-water emulsions. Effect of salt and protein concentration. Food Sci. Tech. Int. 9: 409-419.

-Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A y Wagner, J.R. 2005. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured soy proteins in comparison with soy protein isolates. Food Hydrocolloids. 19: 595-604.

-Sorgentini, D.A. y Wagner, J.R. 1999. Comparative study of structural characteristics and thermal behaviour of whey and isolate soybean proteins. J. Food Biochem. 23: 489-507

- Tornberg, E., Olsson, A., y Persson, K. 1997. The structural and interfacial properties of food proteins in relation to their function in emulsions. En: "Food Emulsions. 3rd edition, revised and expanded" Ed. Friberg, S.E y Larsson, K. Marcel Dekker, Inc., pp: 267-391.

FORMULAÇÃO DE NÉCTAR MISTO DE ACEROLA, GOIABA E MANGA

COUTO, Camila Nair Batista[1]; RAMOS, Afonso Mota[1]; FURUYA, Lilian Boson[1] FARAONI, Aurélia Santos[1]; SOUSA, Paulo Henrique Machado[1];

[1] UFV, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campus Universitário, CEP: 36570-000. Viçosa-MG, Brasil. e-mail: amramos@ufv.br

Palavras chaves: Propriedades funcionais y sensoriais, frutas tropicais, formulação de misturas,

RESUMO

Existe um mercado crescente para bebidas compostas de misturas de frutas, principalmente frutas tropicais. As bebidas mistas de frutas apresentam uma série de vantagens, como a possibilidade de combinação de diferentes aromas, sabores e componentes nutricionais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver néctares mistos de acerola, goiaba e manga, formulados com 35% de polpa, com adição de água e açúcar (padronizados a 12 °Brix) e determinar a mistura de maior aceitação. Os teores das polpas variaram da seguinte maneira: goiaba e manga (12,25 – 21,00 %) e acerola (1,75 – 10,5 %), segundo um delineamento de misturas. As avaliações das respostas basearam-se em determinações físico-químicas e sensoriais. Os modelos foram avaliados em termos dos valores de F ($p \leq 0,05$) e dos coeficientes de determinação (R^2). Somente os modelos para acidez, relação (SST/ATT), valor L* e valor b* foram significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, sendo o restante utilizado como indicadores de tendência. A formulação com 12,25% de goiaba, 16,8% de manga e 6,3% de acerola foi a de melhor aceitação pelos provadores.

INTRODUÇÃO

Para a expansão do mercado internacional, é necessário incluir a produção agroindustrial que, aliada à melhoria dos níveis de vida nos países em desenvolvimento e às facilidades decorrentes da globalização econômica, tem demonstrado que as exigências do consumidor e sua avidez por novos produtos intensificam-se em período de tempo cada vez mais curto (ARAÚJO et al., 1999).

Um setor que vem crescendo nos últimos anos é o de bebidas. Os levantamentos estatísticos revelam números crescentes de consumo per capita e global. Esses valores são mais expressivos quando se refere às bebidas obtidas de frutas, pelo fato das mesmas se constituírem fontes de vitaminas e minerais, além de seus sabores atrativos.

Em conjunto, esses fatores e mais a alternativa de se poder optar por maior praticidade sugerem a produção de sucos de frutas, no cenário do agronegócio nacional e internacional, como uma das atividades mais promissoras no ramo alimentar (ARAÚJO et al., 1999; ASTN, 2001).

Os planejamentos experimentais para o estudo de misturas têm uma importante diferença em relação aos planejamentos tradicionais de superfícies de respostas. As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus ingredientes, e não pela sua quantidade total. Além disso, as proporções dos diversos componentes de uma mistura não são independentes. A soma de todas elas tem que dar sempre 100% (BARROS NETO et al., 1995).

Conforme BARROS NETO et al. (1995), começa-se postulando um ou mais modelos para descrever as propriedades de interesse em função da composição da mistura. Planeja-se o experimento, especificando as composições das misturas a serem estudadas tendo como objetivo determinar os parâmetros do modelo testado com o mínimo de erro. Finalmente, o ajuste do modelo aos resultados experimentais é avaliado e comparado com os resultados de modelagens alternativas. A forma escolhida para o modelo determina quais são as composições mais adequadas, para obtenção de estimativas dos seus parâmetros.

OBJETIVOS

Objetivou-se determinar, por meio de um delineamento de misturas, em que proporções às polpas de acerola, goiaba e manga deveriam ser combinadas para desenvolver um néctar misto de frutas tropicais de máxima aceitação sensorial.

MATERIAIS E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas foram: polpas de acerola, goiaba e manga.

O teor de sólidos solúveis totais foi fixado em 12º Brix e o teor da mistura de polpas, em 35%. Levando-se em conta o ponto de equilíbrio entre os seus componentes, a doçura, o aroma, a acidez e o sabor. As proporções das polpas de acerola, goiaba e manga foram definidas segundo um delineamento de mistura simplex aumentado de 10 tratamentos (BARROS NETO et al., 1995). Para a utilização do programa a soma dessas três proporções deveria ser igual a 35% e as restrições foram as seguintes: a proporção de goiaba e manga deve ser no mínimo 12,25% e a de acerola, no mínimo 1,75% sendo baixo este valor pelo limitado apelo sensorial da acerola (MATSURA et al., 2004), o que poderia comprometer a aceitação sensorial em valores mais elevados na mistura. Os teores das polpas variaram da seguinte maneira: goiaba e manga (12,25 – 21,00 %) e acerola (1,75 – 10,5 %), segundo um delineamento de misturas

As polpas de frutas foram pesadas e homogeneizadas juntamente com água e açúcar.

As misturas foram submetidas a avaliações físico-químicas de pH, atividade de água, acidez total titulável e cor e escolhidas através de testes sensoriais de escala hedônica estruturada de nove pontos, através da impressão global.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As respostas experimentais de cada tratamento foram apresentadas.

As equações de (1) a (7) representam os modelos estatísticos para cada uma das respostas, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2). O tipo de modelo foi escolhido com base nos valores de F das regressões. Em alguns casos, o modelo linear foi o único que gerou um valor de F significativo ($p \leq 0,05$); em outros, o cúbico especial mostrou-se mais adequado para representar as variações do atributo. As variáveis são: x: proporção de manga na mistura; y: proporção de goiaba; z: proporção de acerola.

Impressão global = 6,85.x + 6,98.y + 6,09.z + 0,39.x.y + 2,97.x.z + 1,78.y.z - 8,59.x..y.z $R^2 = 0,923$ (1)

pH = 3,52.x + 3,54.y + 3,33.z + 0,09.x.y – 0,34.x.z - 0,70.y.z $R^2 = 0,7691$ (2)

Aw= 0,96.x.+.0,97.y.+.0,97.z + 0,04.x.y -0,018.x.z – 0,029.y.z + 0,17.x.y.z $R^2 = 0,881$ (3)

Acidez = 1,95.x + 1,95.y + 2.48.z $R^2 = 0,908$ (4)

$L^* = 50{,}01.x + 47{,}65.y + 46{,}26.z + 0{,}97.x.y - 7{,}049.x.z - 8{,}28.y.z \quad R^2 = 0{,}906 \quad (5)$

$a^* = 12{,}31.x + 12{,}61.y + 13{,}68.z + 1{,}26.x.y - 1{,}92.x.z - 2{,}24.y.z - 12{,}45.x.y.z \quad R^2 = 0{,}759 \quad (6)$

$b^* = 29{,}09.x + 23{,}62.y + 21{,}76.z \quad R^2 = 0{,}902 \quad (7)$

Somente os modelos para acidez, valor L* e valor b* foram significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, sendo o restante utilizado como indicadores de tendência.

A superfície de resposta gerada pelas equações acima, foram representadas por gráficos de contorno (diagrama de coordenadas triangular). A representação bidimensional da superfície modelada é feita por meio de suas curvas de nível.

Analisando a Figura 1, observou-se que a aceitação foi melhor em misturas com maiores proporções de polpa de goiaba, seguida pela de manga, enquanto a polpa de acerola contribuiu para menores notas na aceitação. Porém, a formulação menos aceita ainda apresentou uma boa aceitação pelos provadores ("gostei ligeiramente"). As outras formulações apresentaram médias variando de 6,85 a 7,17.

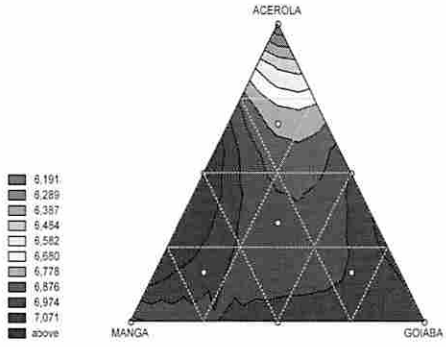


Figura 1. Curvas de contorno do modelo cúbico especial referente à aceitação global (1: "desgostei extremamente" a 9: "gostei extremamente")

O pH e a acidez (Figura 2 e 3) tiveram pouca variação entre as formulações o que se atribui aos valores próximos de pH e acidez das polpas utilizadas. Porém, observou-se um pequeno aumento da acidez atribuído à polpa de acerola na formulação que continha 10,5% dessa polpa. Entretanto, esta tendência foi amenizada pela pequena proporção de polpa de acerola utilizada nas formulações.

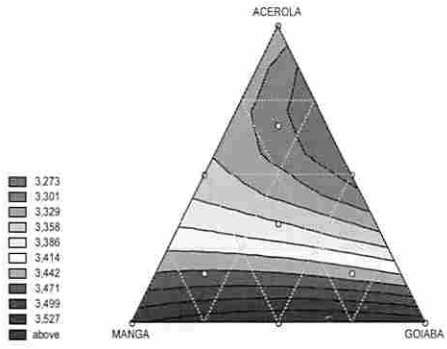


Figura 2. Curvas de contorno do modelo cúbico especial referente ao pH.

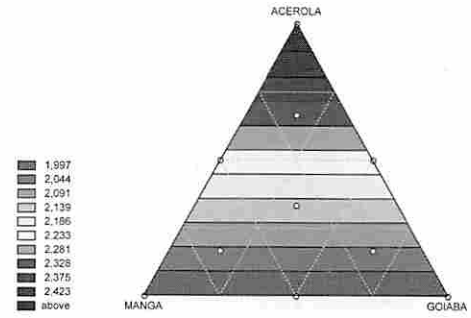


Figura 3. Curvas de contorno do modelo linear referente à acidez.

A atividade de água (Figura 4) teve pouca variação (0,978 -0,965). As formulações com maiores proporções de manga e goiaba apresentavam maiores valores de a_w, enquanto as formulações com mais manga e acerola e com mais goiaba e acerola obtiveram valores menores.

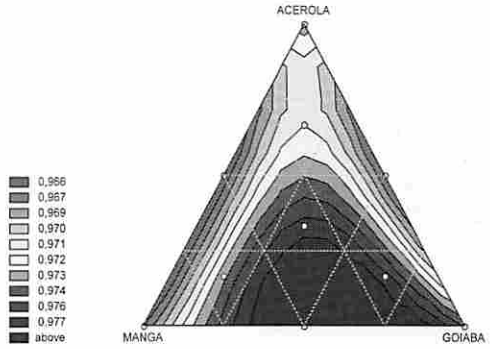


Figura 4. Curvas de contorno do modelo cúbico especial referente à atividade de água.

Em relação à cor, observa-se que de uma maneira geral houve aumento da luminosidade (Figura 5) em formulações que continham maior quantidade de polpa de manga. Os maiores valores de vermelho (Figura 6) foram observados nas formulações com maior quantidade de polpa de acerola seguidos pelas formulações com mais polpa de goiaba. As formulações com maior porcentagem de manga e goiaba tiveram valores de a* menor. Quanto aos valores de amarelo (Figura 7), foram observados maiores valores em formulações com maior quantidade de polpa de manga. Formulações com mais acerola obtiveram valores mais baixos para b*.

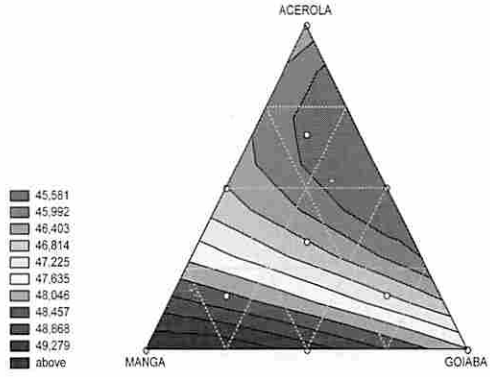


Figura 5. Curvas de contorno do modelo quadrático referente ao valor L*.

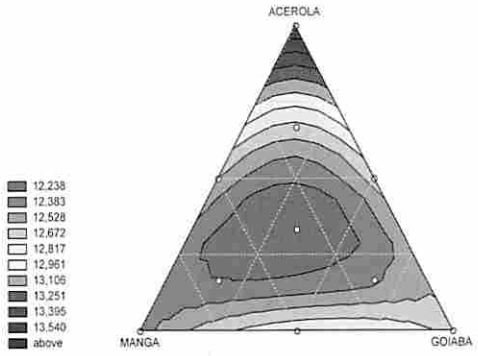


Figura 6. Curvas de contorno do modelo cúbico especial referente ao valor a*.

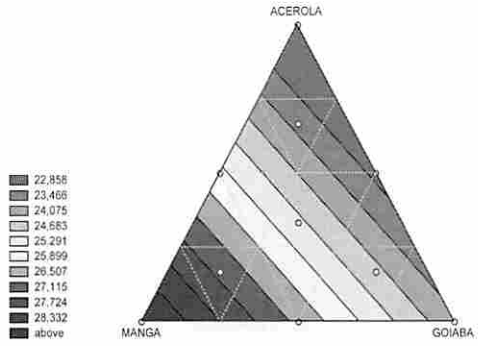


Figura 7. Curvas de contorno do modelo linear referente ao valor b*.

CONCLUSÃO

Foram obtidos néctares mistos de boa aceitação a partir de goiaba, manga e acerola.

Os sucos de goiaba e manga devem participar numa maior proporção da mistura, já que favorecem a aceitação.

A formulação com 12,25% de goiaba, 16,8% de manga e 6,3% de acerola foi a de melhor aceitação pelos provadores, porém as outras formulações tiveram média do valor sensorial variando pouco, ficando seus termos hedônicos entre 6,85 e 7,17 ("gostei ligeiramente" - 6 e "gostei moderadamente" - 7) o que ainda é uma boa aceitação.

BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, A.C.; KHAN, A.S. SILVA, L.M.R.; VALENÇA, L.H.R.; CARVALHO, R.M.O. O agrobiness de polpa de polpa de frutas no Estado da Bahia. In: COBGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL. **Anais...** Brasília, 1999.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUMS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995. 299p.

ASTN (Associação das Indústrias Processadoras de Frutas Tropicais). **Relatório sobre exportações de sucos de frutas**. Aracaju, 2001. 3p. Disponível em: http://tropicaljuice.com.br.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. **Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000**, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial da União, Brasília, Nº 6, 10 de jan. 2000. Seção I, p.54-58.

MATSUURA, F.C.A.U.; FOLEGATTI, M.I.S.; CARDOSO, R.L.; FERREIRA, D.C. Sensory acceptance of mixed nectar of papaya, passion fruit and acerola. **Scientia Agrícola,** v. 61, n. 6, p. 604-608, 2004.

EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE AS PROTEÍNAS DE CONCENTRADOS PROTÉICOS DE AMARANTO

Bejarano-Luján D.L., Motta E.M.P., Netto, F.M.
Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
Rua Monteiro Lobato s/n. Cidade Universitária "Zeferino Vaz". CEP: 13083-862 – Campinas, SP - Brasil.
dagnithl@fea.unicamp.br, flavia@fea.unicamp.br
Palavra chave: processamento, concentrados protéicos, proteínas de amaranto.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos tratamentos nas características dos concentrados protéicos de *A. hypochondriacus* (CPAs). O concentrado protéico obtido pela extração protéica alcalina convencional (CPAp) foi comparado aos concentrados protéicos obtidos por extração protéica com prévia lavagem ácida (CPAla) e extração protéica com aquecimento (CPAtt). O efeito dos tratamentos foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE, cromatografia líquida de alta eficiência fase reversa (CLAE-FR), solubilidade em água e NaCl 0,05M para pH 3,0; 4,5 e 7,0, grupos sulfidrilas livres (SH) e compostos fenólicos. O teor de proteína do CPAp foi 67% e dos concentrados CPAtt e CPAla superiores a 70% ($p<0,05$). O tratamento térmico induziu a formação de agregados de alta massa molecular com diminuição da solubilidade do CPAtt em água e NaCl 0,05M nos pH 3,0; 4,5 e 7,0, entanto aumento na solubilidade foi observado para o CPAla. Os tratamentos diminuíram os grupos sulfidrilas livres totais dos CPAtt e CPAla, porém a exposição dos grupos sulfidrilas livres aumentou em 10%. O teor dos compostos fenólicos, expresso em equivalente de ácido gálico (EAG)/g de amostra, diminui com o desengorduramento da farinha de 0,4 na farinha integral de amaranto (FIA) para 0,3 mg EAG/g na FDA e os concentrados CPAtt e CPAla tiveram redução de 50% ($p<0,05$) em relação ao CPAp. Os resultados sugerem que as condições de processamento podem modificar as propriedades funcionais dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs) e limitar seu uso na industria de alimentos.

INTRODUÇÃO

Estudos têm mostrado que as proteínas de amaranto apresentam composição balanceada de aminoácidos essenciais, principalmente lisina, triptofano e metionina, os quais se encontram em baixas concentrações em cereais e leguminosas convencionais, e qualidade protéica semelhante a do leite, carne e ovos (Teutónico e Knor 1985; Mendoza e Bressani, 1987; Martinez e Añon, 1996; Castellani et al, 1999). A inclusão de produtos protéicos de amaranto na formulação de alimentos depende amplamente de suas propriedades funcionais, as quais estão diretamente relacionadas com suas características estruturais (Markone e Kakuda, 1999) e condições de processamento tais como temperatura, pH e força iônica (Avanza e Añon, 2007). Embora propriedades físico-químicas de isolados protéicos de amaranto venham sendo amplamente estudadas (Martinez et al, 1997; Marconi et al, 1999; Goristein et al, 2001), o conhecimento sobre o efeito das condições de processamento é ainda bastante escasso (Martínez e Añon, 1996; Avanza e Añon, 2007). Dessa forma, foram realizados estudos para avaliar os efeitos da extração protéica com prévia lavagem ácida e extração protéica com aquecimento em relação ao tratamento convencional nas proteínas dos concentrados protéicos de amaranto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os CPAs foram obtidos a partir da farinha desengordurada de amaranto (FDA). O concentrado protéico padrão (CPAp) foi obtido segundo processo convencional (Salcedo-Chávéz et al, 2002): FDA foi dispersa em água destilada (10% p/v) e o pH foi ajustado para 9,0 com NaOH 0,1 N. A dispersão foi agitada por 2 h a temperatura ambiente e centrifugada (10000 x g, 60 min, 4 °C). O pH do sobrenadante foi ajustado para 4,5 com HCl 0,1 N e mantido durante a noite a 4 °C. O precipitado foi separado por centrifugação (10000 x g, 60 min, 4 °C), e lavado 3 vezes, e resuspendido em água deionizada, neutralizado e liofilizado. O CPA com prévia lavagem ácida (CPAla) resultou do processo convencional, porém a FDA foi dispersa (1:10) em água pH 4,5, agitada por 30 min a temperatura ambiente, centrifugada, e o precipitado foi, então, levado para extração protéica alcalina, conforme descrito para o CPAp. O CPA com aquecimento (CPAtt) foi obtido com a extração alcalina realizada a 50 °C. Os processos de obtenção dos CPAs e farinhas (FIA e FDA) foram realizados três vezes. Teores de cinzas e umidade foram determinados de acordo a AOAC (1997), a proteína determinada pelo método semi micro-Kjeldahl (N x 5,85) (Martinez e Añon, 1996) e lipídeos totais pelo método de Bligh e Dyer (1959). Os rendimentos dos CPAs (g CPA/100 g FDA) e rendimentos protéicos (g proteína CPA/g proteína FDA) também foram determinados. Os efeitos dos tratamentos sobre as proteínas dos CPAs foram avaliados por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Padrões de massa molar de 14,4 a 97,4 kDa (Bio-Rad, Alemanha) foram utilizados para determinação da massa molecular das frações protéicas. Os perfis cromatográficos dos CPAs foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência fase reversa (CLAE-FR) utilizando-se uma coluna C18 serie 072269-9, Varian (25 cm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta pelo solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% - TFA em água, v/v) e solvente B (acetonitrila, água e TFA - 60:40:1 v/v). Os cromatogramas foram divididos em duas regiões: I, de baixa hidrofobicidade, peptídios que eluíram até 15 min com um gradiente de solução B até 20%, e II, de alta hidrofobicidade ou peptídeos que eluíram até 60 min com um gradiente de eluição B até 100%. Volume de 20 µL das amostras (5 mg/mL de proteína em água mili Q) foi injetado na coluna. As corridas foram conduzidas a 35 °C, fluxo de 1 mL/min e absorbância monitorada a 214 nm (Smyth et al, 1998, com modificações). A solubilidade protéica dos CPAs foi determinada a partir de dispersões 1% de proteína (p/v) em 0,05 M de cloreto de sódio ou água destilada em pH 3,0; 4,5 e 7,0 (ajustados com HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N), de acordo com Morr et al (1985). A proteína solúvel determinada pelo método semi micro-Kjeldahl. O teor de compostos fenólicos da FIA, FDA e CPAs e dos soros obtidos nas etapas de lavagem ácida e precipitação isoelétrica foi determinado utilizando reagente de Folin-Ciocalteau (Gamel et al, 2006) a partir de seus respectivos extratos metanólicos (Tsaliki et al, 1999 com modificações). Para a elaboração da curva padrão foi utilizado o ácido gálico nas concentrações (20 a 120 µg/mL) e os fenólicos totais foram expressos como equivalente de ácido gálico (EAG). Para determinação de grupos sulfidrilas livres (SH), foi utilizado o procedimento descrito por Beveridge et al (1974) e Castellani et al (1999) utilizando reagente de Ellman. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela média, análise de variância, e teste de Tukey a um nível de significância de 5%, através do programa estatístico STATISTICA V6.0.

RESULTADOS

A composição centesimal da FIA, FDA e CPAp estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal da FIA, FDA e CPAp

Composição (%)	FIA	FDA	CPAp
Proteínas	13,4	14,4	67,9
Lipídios	6,9	1,7	3,1
Cinzas	2,7	2,7	3,2
Umidade	9,5	10,1	7,7

* Análises realizadas em triplicata, valores médios de três processamentos. Farinha integral de amaranto (FIA), farinha desengordurada de amaranto (FDA) e concentrado protéico padrão (CPAp).

A FDA apresentou teor de proteína, semelhante aos valores relatados por outros autores (Salcedo-Chávez et al, 2002; Cordero-de-los-Santos et al, 2005). A Tabela 2 mostra o teor de proteínas e rendimentos dos CPAs obtidos pelos 3 processos bem como os rendimentos médios.

Tabela2. Efeito das condições de processo sobre o teor de proteína e rendimentos dos CPAs

Tratament.	%*				
	CPAs		Distribuição de proteína		
	Rendim.	Protein.	CPAs	Soro	Resíduo
Controle	4,72 ^{a}	67,92 ^{c}	23,13 ^{e}	14,55 ^{g}	50,80 ^{i}
Lav. ácida	3,51 ^{b}	72,53 ^{d}	17,60 ^{f}	27,21 ^{h}	43,93 ^{j}
Aquecimen.	4,98 ^{a}	70,06 ^{cd}	25,40 ^{e}	21,32 ^{gh}	49,95 ^{i}

* valores representam média de três processamentos. Letras diferentes na mesma coluna denotam significância estatística ($p<0,05$).

O teor de proteína do CPAtt e CPAla aumentou significativamente ($p<0,05$), cerca de 3 e 7% respectivamente, em relação ao CPAp. Os rendimentos (rendimento do concentrado e rendimento protéico) do CPAtt foram 1,1 vez em relação ao CPAp enquanto o CPAla, quando comparado ao CPAp apresentou menores rendimentos (0,7 vezes). Os valores de rendimento dos CPAs foram semelhantes aos obtidos por Martinez e Añon (1996), porém os valores de rendimento protéico foram inferiores aos relatado por Salcedo-Chávez et al (2002) para isolados de *A. cruentus* (53,4 a 61%) e Cordero-de-los-Santos et al (2005) para isolados de *A. hypochondriacus* (56,4%). O CPAla apresentou cor mais clara (observação visual) em relação aos outros CPAs, possivelmente pela remoção de pigmentos no soro da lavagem ácida. A maior perda de proteína nas etapas de obtenção dos CPAs foi no resíduo alcalino sendo que o tratamento com prévia lavagem ácida produziu a menor perda ($p<0,05$) em relação aos demais tratamentos (Tabela 2). Houve diferenças significativas no teor de proteína do soro total, e o tratamento ácido apresentou perda de proteína de duas vezes maior que o tratamento controle. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Bejosano e Corke (1998), que relataram baixa recuperação de proteína (37,64) no concentrado protéico e quantidades significativas de proteína no resíduo fibroso.

O perfil SDS-PAGE dos CPAs e soros é apresentado na Figura 1. No perfil do CPA padrão foram observadas 8 bandas eletroforéticas na faixa de 15 a 64 kDa (15,3; 18,4; 21,4; 24,9; 39,7; 46,1; 58,8 e 64,5 kDa). De acordo com vários estudos, a fração com 64,5 kDa é uma globulina (Mora-Escobedo 1990, Barba de la Rosa et al, 1992; Marcone e Yada, 1992; Segura-Nieto et al, 1994; Gorinstein et al, 1996). Bandas com massa molecular abaixo de 30 kDa correspondem a albumina-1 Martinez e Añon (1996). As bandas de massa molecular superior a 30 kDa correspondem aos componentes das frações albumina-2, globulinas e glutelinas (Konishi et al, 1991; Segura-Nieto et al, 1994; Martinez e Añon, 1996). O CPAla apresentou perfil eletroforético semelhante ao CPAp, porém com maior intensidade das bandas correspondentes a 39,7 e 64,5 kDa. Essa maior intensidade das bandas foi observada no CPAtt, além da presença de um agregado de alta massa molecular (maior a 97 kDa) e uma diminuição de intensidade da banda de 15,3 kDa.

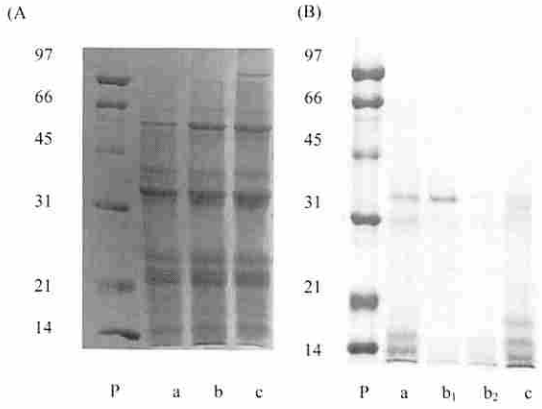


Figura 1. Perfil eletroforético SDS-PAGE dos CPAs (A) e soros (B). (a) Tratamento controle, (b) tratamento ácido (b_1 - soro após lavagem ácida e b_2 – soro após precipitação isoelétrica) e (c) tratamento térmico. A coluna P apresenta o padrão de massa molecular: fosforilase b, 97,4 kDa; albumina de soro bovina, 66,2 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrase carbonica, 31 kDa; inibidor de tripsina da soja, 21,5 kDa; e lisosima, 14,4 kDa.

O perfil eletroforético dos soros protéicos após precipitação isoelétrica (a, b_2 e c) mostrou bandas de 39,7 kDa e frações de baixa massa molecular (< 20 kDa), correspondentes às frações protéicas globulinas e albuminas. A lavagem ácida (soro b_1) produziu perdas principalmente de globulinas e perda de albuminas no soro da precipitação isoelétrica (soro b_2). O tratamento térmico levou a maior perda de frações de baixa massa molecular em relação aos tratamentos controle e ácido. Resultados semelhantes foram relatados por Bejosano e Corke (1999) que mostraram a presença de globulinas (massa molecular intermédia) e albuminas (baixa massa molecular) em soros protéicos, obtidos como subprodutos da extração de amido de *A. cruentus*.

As condições de processo afetaram o perfil de hidrofobicidade das proteínas (Figura 2).

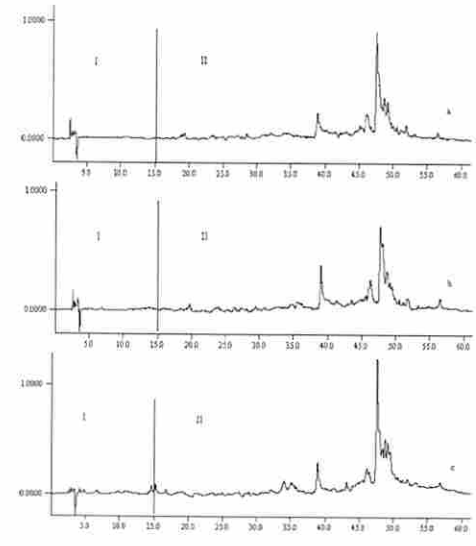


Figura 2. Separações CLAE-FR dos CPAs obtidos por tratamento controle (a), prévia lavagem ácida (b) e aquecimento (c).

Foram observados poucos picos na região I e um pico de maior intensidade, eluído na região II entre 45 e 50 minutos. O tratamento com prévia lavagem ácida reduziu o tamanho do pico eluído na região II na mesma proporção que o aquecimento aumentou o tamanho do pico em relação ao tratamento controle. Essas diferenças podem ser resultantes da agregação da proteína durante o aquecimento, produzindo um CPA mais hidrofóbico.

Os CPAs foram significativamente mais solúveis ($p<0,05$) em água (pH 3,0 e 7,0) do que 0,05M NaCl. A previa lavagem ácida apresentou um aumento significativo da solubilidade em pH 3,0, de 17% em relação ao CPAp e de 23% em relação ao CPAtt. Em tanto, quando o aquecimento (CPAtt) foi comparada com o tratamento controle (CPAp) houve uma diminuição da solubilidade de 7, 17 e 58% em pH 3,0; 7,0 e 4,5 respectivamente. O tratamento térmico diminuiu a solubilidade do concentrado protéico em água e NaCl 0,05M em todos os pH. Houve diferenças significativas de solubilidade em NaCl 0,05M entre os CPAs para todos os pH avaliados. As diferenças dos efeitos dos dois tratamentos podem estar relacionadas às diferenças na estrutura molecular das proteínas dos CPAs. Quando isolados protéicos de soja foram obtidos por lavagem ácida seguida do aquecimento a 55ºC por 45 min previa a extração protéica e aquecimento nas mesmas condições após extração protéica, não houve diferenças para a primeira condição, porém o aquecimento do soro isoelétrico diminuiu a solubilidade para 29% ($p<0,01\%$) em relação ao tratamento controle. Os pesquisadores atribuíram tal fato às diferenças na estrutura molecular das proteínas previa e após solubilização a pH 9,0, contribuindo para maior e menor desdobramento da proteína (H'ocine et al, 2006). Diminuição de solubilidade também foi observada para isolados protéicos de amaranto aquecidos a 70 e 90 ºC por 10 a 30 min, essas diferenças foram fundamentadas pela formação de agregados protéicos formados principalmente por polipeptídeos de 52 e 56 KDa (Scilingo et al, 2002; Avanza e Añon 2007).

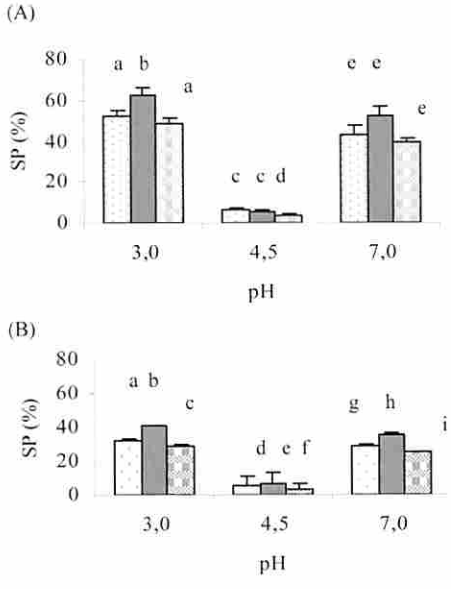


Figura 3. Solubilidade dos CPAs em água (A) e NaCl 0,05M (B) obtidos pelos diferentes tratamentos. Valores de cada nível de pH com diferente letra diferem significativamente ($p<0,05$).

Os valores dos grupos sulfidrílas livres dos CPAs são mostrados na Figura 4. A previa lavagem ácida e o aquecimento diminuíram os grupos SH livres totais e reativos dos CPAla e CPAtt em relação ao tratamento controle, porém a exposição dos grupos sulfidrilas livres aumentou em 10%. O aquecimento diminuiu significativamente a exposição dos grupos SH livres, sugerindo seu envolvimento na formação de agregados via ligação dissulfídica.

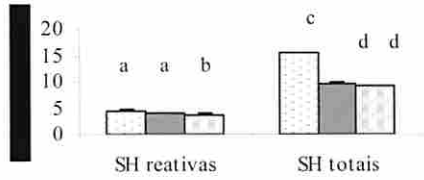


Figura 4. Efeito dos tratamentos sobre o conteúdo de grupos sulfidrilas livres nos concentrados protéicos. Valores das colunas dentro da serie com diferente letra diferem significativamente ($p<0,05$).

O teor de compostos fenólicos na FIA e FDA foram 0,4 e 0,3 mg de EAG/g de amostra, respectivamente. A Figura 5 mostra os compostos fenólicos presentes no soro total (após lavagem ácida, precipitação isoelétrica e lavagem do precipitado) e CPAs. O tratamento com prévia lavagem ácida aumentou significativamente (33%) a extração de compostos fenólicos da FDA quando comparado com o tratamento controle. Em contraste o aquecimento diminui (30%, $p<0,05$) o conteúdo de compostos fenólicos nos soros. Contudo esse efeito não foi observado no CPAtt. Ambos os tratamentos reduziram o conteúdo de compostos fenólicos nos CPAla e CPAtt em relação ao CPAp para 63,6 e 58,4%, respectivamente, mantendo valores próximos em relação a FDA. Pelos resultados obtidos verifica-se que o aquecimento não contribuiu para a redução de compostos fenólicos, além de ter levado a formação de agregados e em conseqüência diminuição da solubilidade protéica. A maior extração dos compostos fenólicos com a previa lavagem ácida foi refletida em maior solubilidade do CPAla. Vários trabalhos têm relatado a interação proteína-fenol, assim como a influência do pH, tempo e temperatura nessa interação (Xu e Diosady, 2002; Gamel et al, 2006, 2006).

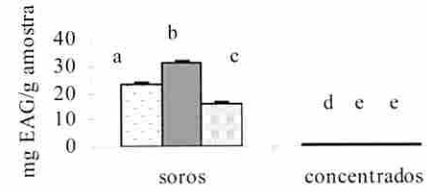


Figura 5. Teores de fenólicos totais (como equivalente de ácido gálico) de CPAs tratados. Valores das colunas dentro da serie com diferente letra diferem significativamente ($p<0,05$).

CONCLUSÃO

A modificação das condições de processo afetou as propriedades fisicoquímicas e funcionais das proteínas presentes nos concentrados protéicos. Essas mudanças podem ter sido influenciadas também por o tipo e características das frações protéicas presentes em cada concentrado. Os tratamentos podem levar para diferentes graus de desnaturação, agregação e dissociação das proteínas. As características dos CPAs foram melhoradas por prévia lavagem ácida e prejudicadas pelo aquecimento.

REFERÊNCIAS

Avanza e Añon. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. J Sci Food Agric. 87:616-623, 2007

L'Hocine e Boye. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. J Food Sci. 71(3):C137-C145, 2006

Gamel et al. Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. J Sci Food Agric. 86:1095-1102, 2006.

PROTEÍNA AISLADA DE SOYA COMO SUSTITUTO DE GRASA DE YOGUR BAJO EN GRASA Y SU EFECTO EN SUS PROPIEDADES REOLÓGICAS

Pérez-Lucio A., Aguirre-Mandujano, E. y Mejenes-Quijano A.,
Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México, C.P. 56230. eleagman@yahoo.com

Palabras clave: propiedades funcionales, proteína aislada de soya, sustituto de grasa, reología, yogur.

RESUMEN

La disminución de grasa en la leche para la elaboración de yogur, disminuye el aporte calórico, la cantidad de ácidos grasos saturados y de colesterol en la dieta, pero también se modifican sus propiedades mecánicas y el sabor en el producto. El uso de sustitutos de grasa de diversa estructura química mejora el comportamiento mecánico del yogur reducido en grasa; no obstante, se debe considerar que este último es resultado de las interacciones moleculares y el arreglo estructural de sus componentes. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la proteína aislada de soya, sobre las propiedades reológicas y sensoriales de yogur reducido en grasa, explicando los resultados en términos de interacciones moleculares entre sus componentes. Se elaboró un yogur control completo en grasa (30g/L leche), uno reducido en grasa (15g/L leche) adicionados con 2, 3 y 4% de proteína de soya respectivamente. A los yogures se le determinaron pruebas oscilatorias de baja intensidad y su comportamiento de flujo en función del tiempo de almacenamiento. La adición de proteína de soya en el yogur ocasionó incrementos significativos en los valores de los Módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G"), el porcentaje de sinéresis también se vio disminuido significativamente en todos los tratamientos adicionados con proteína de soya. La adición de 2% de proteína de soya permitió obtener yogures con propiedades reológicas similares al completo en grasa, esto asociado a una matriz proteica de elevada densidad con un número menor de glóbulos grasoso que los presentes en el yogur control. El yogur con 2% de soya fue sensorialmente similar y aceptado igualmente por los consumidores que el yogur control completo en grasa.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado en los países industrializados una modificación importante en los patrones dietéticos de la población, dando prioridad a una alimentación orientada a la salud. Lo anterior debido a que se tienen datos de la relación que existe entre el consumo de grasas y las enfermedades del corazón, por lo que los nutriólogos recomiendan disminuir el consumo de grasas, especialmente las de origen animal. (Guven et al.2005). En la actualidad el consumo de productos lácteos bajos en grasa, ha tenido un incremento debido a los beneficios que tienen este tipo de productos a la salud.

El problema que se crea al reducir el contenido de lípidos en la materia prima para la elaboración de productos lácteos, es que la estructura interna del producto es alterada y provoca la modificación en las propiedades mecánicas y el sabor y como resultado de lo anterior la aceptación de los consumidores también se modifica. Por lo que la industria alimentaria ha comenzado a desarrollar nuevas tecnologías e ingredientes que puedan ser usados como substitutos totales o parciales de la grasa que es eliminada, los cuales deben emular las propiedades mecánicas que la grasa imparte a los alimentos. Uno de los ingredientes con alto potencial para ser usado como sustituto de grasa es la proteína de soya, debido a que provee diferente funcionalidad como son la absorción y retención de agua, y propiedades emulsificantes (Lee and Brennand, 2005). Se ha utilizado a la proteína de soya como substituto de grasa en helados bajos en grasa (Friedeck et al. 2003), y en evaluaciones sensoriales se demostró que no existieron diferencias significativas en la apariencia y textura entre los helados que contenían 4% de proteína aislada de soya. Y el control completo en grasa.

En le presente trabajo se evaluaron los efectos de la incorporación de proteína aislada de soya en yogur bajo en grasa, sobre sus propiedades sensoriales y reológicas y su comparación con el completo en grasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración del yogur

El yogur se elaboraró de acuerdo al método descrito por Drake *et al.* (2000), con un 17 % (P/P) de sólidos base con 1.0 % de grasa (P/P), leche (9% sólidos), sacarosa (6% w/w), leche descremada en polvo (3 % w/w). Se elaboró un yogur control bajo en grasa con 1.5% de grasa y otro control completo en grasa con 3.0% de grasa; los tratamientos de yogur bajos en grasa se elaboraran con 1.5% de grasa de leche y los niveles de la adición de la proteína de soya como sustituto parcial de grasa fueron de 2%, 3% y 4%.

Tratamientos de yogur bajo en grasa adicionado con proteína aislada de soya

Tratamiento	Grasa (%)	proteína de soya (%)
C50G (control)	1.5	0
C100G (control)	3.0	0
T_1	1.5	2
T_2	1.5	3
T_3	1.5	4

La leche estandarizada se calentó a 65°C y fue depositada en una licuadora industrial para añadir y disolver los ingredientes en polvo (proteína de soya, sacarosa y leche descremada en polvo) los cuales fueron pesado y mezclados previamente. El tiempo de mezclado fue de 5 min. La mezcla de todos los ingredientes fue homogeneizada a 2500 lb/plg^2 y posteriormente sometida a un tratamiento térmico de 85°C por 30 min. y después enfriada a 43°C para ser inoculada con el cultivo láctico hasta que se alcanzo una acidez de 90°D y posteriormente el yogur se almaceno a 5°C.

Análisis químico proximal

Se determinó el contenido de proteína por el método Kjeldahl, el contenido de grasa por el método Gerber descrito por Egan *et al.* (1987). El contenido de humedad se determinó por el método gravimétrico 930.15 (AOAC, 2000). La acidez fue medida por titulación con hidróxido de sodio (0.1 N) y el pH fue medido potenciometricamente .

Sinéresis

Todos los tratamientos fueron centrifugados, colocando 10 g de yogur en una Centrífuga Adams (Clay Adams Inc., Chatsworth, CA), a 5°C y 5000 rpm. El suero se decanto y por diferencia de pesos se calculó el porcentaje de sinéresis.

Propiedades reológicas

Pruebas oscilatorias de baja intensidad fueron aplicadas a los tratamientos de yogur en un Reómetro Paar Physica MCR 301 (Physica Messtechnik, Stuggart, Alemania), con una geometría de cono-plato de 75 mm de diámetro, manteniendo la temperatura de las muestras a 5°C. Los barridos de frecuencia fueron realizados en un intervalo de 0.01 a 10 Hz y una deformación constante de 1%.

Con objeto de determinar el comportamiento de flujo del yogur bajo en grasa se realizaron pruebas rotacionales variando la tasa de corte de 0.1 a 100 s^{-1} y registrando los cambios en la viscosidad.La temperatura se fijó en 5°C.

Evaluación sensorial

A los 5 días después de la elaboración de los yogures, se realizo la evaluación sensorial aplicando un Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) siguiendo los procedimientos descritos por

Meilgaard *et al.* (1991) con 6 panelistas, con edades entre 20 y 30 años.

Por otra parte se llevo acabo una prueba de aceptación a 60 panelistas, usando una escala hedónica con un rango de 1 a 9, donde 1 indica me gusta extremadamente, y 9 me disgusta extremadamente.

Los datos obtenidos se sometieron a un Análisis de Varianza ($\alpha \leq 0.05$), con objeto de determinar las diferencias de las variables respuesta. El análisis de los datos se efectuó con el paquete estadístico SAS (Versión 8.0, SAS Inc., NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico proximal

La composición de las muestras de yogur bajo en grasa se presenta en la tabla 2, en ella se muestra que los contenidos de grasa en los yogures bajos en grasa no presentaron diferencias significativas entre ellos. En cuanto al contenido de proteína se observa diferencia significativa entre los tratamientos de yogur con respecto al control, dicho incremento estuvo en proporción a la cantidad de proteína aislada de soya adicionada.

Los yogures control C50G y C100G tiene altos contenidos de humedad pero no existe diferencia significativa entre ellos, la disminución de la grasa no hace variar la capacidad de la red de atrapar agua. Los tratamientos T_3, T_1 y T_2 tuvieron los contenidos de humedad significativamente más pequeños que el yogur control, T_3 fue el que presento los valores más pequeños, lo anterior posiblemente se debe a que se incrementan las interacciones agua-proteína, permitiendo que la estructura fije una mayor contenido de humedad y también al incremento de sólidos totales.

Tabla2. Análisis químico proximal de los tratamientos de yogur

Tratamiento	Grasa (%)	Proteína (%)	Humedad (%)
C50G	1.53b	3.76d	83.52a
C100G	2.96a	3.70d	83.15a
T_1	1.50b	5.70c	81.28b
T_2	1.53b	6.62b	80.35b
T_3	1.50b	7.59a	79.06c

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa ($p<0.05$)

Acidez titulable y pH

El uso de proteína aislada de soya como substituto parcial de grasa no afecta significativamente los valores de pH y acidez titulable durante el periodo de almacenamiento, debido a que no existe diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$) lo anterior coincide con lo encontrado por Drake *et al.* (2000), donde señalan que los valore de pH no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y así mismos la fermentación no se ve afectada por la proteína de soya.

Sinéresis

Los porcentajes de sinéresis para todos los yogures se incrementaron con el tiempo de almacenamiento esto debido al que el pH bajó durante el tiempo de almacenamiento lo cual hace que las proteínas sean insolubles y la retención de agua disminuya. Se puede observar que al aumentar la cantidad de proteína, disminuye significativamente el porcentaje de sinéresis siendo T_3 menor que T_2 y T_1, respectivamente. La adición de proteína de soya permitió una fijación mayor del agua, las interacciones proteína-proteína-agua se incrementaron con el contenido de aislado de soya.

Tabla 3. Porcentaje de sinéresis a los diferentes periodos de almacenamiento

Tratamiento	5 días	12 días
C50G	29.66b	38.00a
C100G	33.00a	34.66b
T_1	29.66b	32.66b
T_2	27.33c	27.33c
T_3	15.66d	20.66d

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa ($p<0.05$)

Propiedades Reológicas

Las pruebas de barridos de frecuencia realizadas a 5 y 12 días después de la elaboración de los yogures (Fig. 1 y 2) muestran que los valores de los módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G").

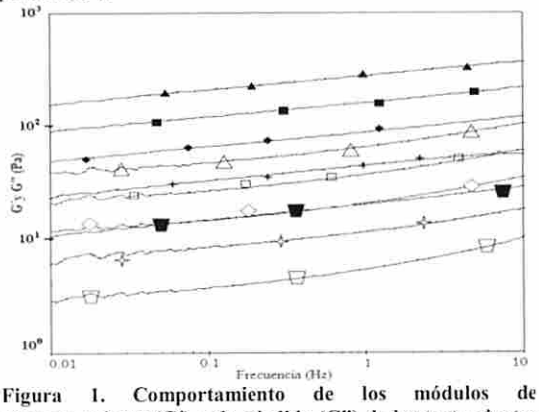


Figura 1. Comportamiento de los módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G") de los tratamientos a los 5 días de elaboración. T_3 (▲, △), T_2 (■,□), T_1 (♦,◊), C100G (+, ✧), C50G (▼▽).

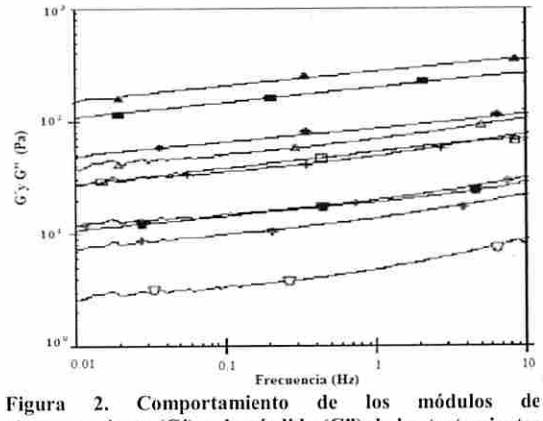


Figura 2. Comportamiento de los módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G") de los tratamientos a los 12 días de elaboración. T_3 (▲, △), T_2 (■,□), T_1 (♦,◊), C100G (+, ✧), C50G (▼▽).

Los tratamiento con adición de soya presentan valores más altos del módulo de almacenamiento (G´) y módulo de perdida (G") que los yogures controles completo y bajo en grasa, exhibiendo estructuras más elásticas, debido a que la adición de aislado de soya incrementa el contenido de proteína y aumenta el número de interacciones proteína-proteína, conformando una red más consistente, según lo muestran los altos valores de G´ y la red atrapa los glóbulos de grasa y agua, permitiendo una mejor hidratación. Las estructuras formadas presentan un comportamiento viscoelástico sólido en todo el rango de frecuencias. El incremento en los valores de los módulos G´ y G" fue proporcional a las cantidades de proteína de soya adicionadas. El tiempo de almacenamiento no afectó significativamente el comportamiento viscoelástico de los yogures. La adición de proteína de soya permitió obtener geles más consistentes, incluso que el yogur completo en grasa.

Las curvas de flujo mostraron que las estructuras de los yogures con adición de proteína de soya presentaron valores de viscosidad mas altos a bajas tasas de corte, el mayor número de enlaces proteína-proteína permite a estos tratamientos almacenar mas energía en sus estructuras antes de comenzar a fluir (Fig. 3). A tasas de corte más elevadas se observa una caída pronunciada en los valores de viscosidad. En general los tratamientos adicionados con aislado de soya presentaron valores de viscosidad superiores al yogur completo en grasa.

Las curvas de flujo mostraron que las estructuras de los yogures con adición de proteína de soya presentaron valores de viscosidad mas altos a bajas tasas de corte, el mayor número de enlaces proteína-proteína permite a estos tratamientos almacenar mas energía en sus estructuras antes de comenzar a fluir (Fig. 3). A tasas de corte más elevadas se observa una caída pronunciada en los valores de viscosidad. En general los tratamientos adicionados con aislado de soya presentaron valores de viscosidad superiores al yogur completo en grasa.

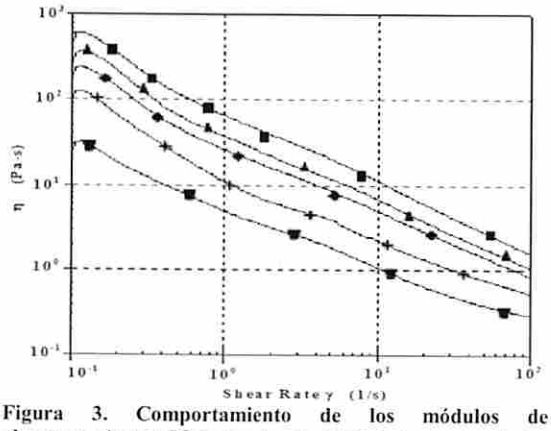


Figura 3. Comportamiento de los módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G") de los tratamientos a los 5 días de elaboración. T_3 (▲), T_2 (■), T_1 (♦), C100G (+), C50G (▼)

Evaluación sensorial

Los atributos sensoriales determinados y evaluados por el panel se muestran en la tabla 4 y 5. Los atributos sensoriales como astringencia, aroma y sabor a soya aumentaron con la adición de la proteína aislada de soya. El yogur control completo en grasa y el yogur con 2% de soya presentaron un perfil sensorial similar, este resultado se refuerza con la prueba de aceptación realizada, en donde estos mismos tratamientos fueron aceptados de igual manera por los panelistas sin encontrar diferencia significativa.

Tabla 4 Atributos sensoriales de textura, apariencia y aroma

Tratamiento	consistencia	color blanco	Aroma a yogur	Aroma a avena	Aroma a soya
C50G	5.05d	7.61a	7.55a	0c	0c
C100G	7.83c	7.55a	7.66a	0c	0c
T_1	7.88c	7.22a	6.72b	0.05c	0.16c
T_2	12.55b	4.05b	3.66c	1.44b	2b
T_3	14.77a	2.83c	1.88c	3.55a	4.16a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p<0.05$)

Tabla 5 Atributos sensoriales de sabor de yogur bajo engrasa

Tratamiento	dulzura	Sabor a soya	sensación arenosa	astringencia
C50G	7.33a,b	0d	0d	0c
C100G	7.55a	0d	0d	0c
T_1	7.16b	0.66c	0.72c	0.11c
T_2	4.72c	5.11b	3.88b	1.88b
T_3	2.88d	7.77a	7.38a	4.33a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p<0.05$)

Los atributos sensoriales como astringencia, aroma y sabor a soya aumentaron con la adición de la proteína aislada de soya. El yogur control completo en grasa y el yogur con 2% de soya presentaron un perfil sensorial similar, este resultado se refuerza con la prueba de aceptación realizada, en donde estos mismos tratamientos fueron aceptados de igual manera por los panelistas sin encontrar diferencia significativa.

CONCLUSIONES

La adición de proteína de soya a diferentes niveles permitió obtener yogures bajos en grasa con porcentajes de sinéresis pequeños y con características reológicas y sensoriales similares a un yogur completo en grasa.

Conforme el porcentaje de proteína de soya aumento, los valores de G', G" y de viscosidad aumentaron debido a que se tiene una estructura proteínica de elevada densidad con enlaces más resistentes a la deformación. El yogur adicionado con 2% de proteína de soya presentó propiedades sensoriales similares al yogur completo en grasa, y los panelistas no detectaron la presencia de soya en el yogur bajo en grasa.

REFERENCIAS

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Análisis (17th ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, EUA.

Drake, M.A., Chen, X.Q., Tamarapu, S. and Leenanon, B. 2000. Soy protein fortification affects sensory, chemical, and crobiological properties of dairy yogurts. J Food Sci. 65(7):1244-1247.

Egan, H., Kirk, R. y Sawyer, R. (1987). Análisis Químico de Alimentos de Pearson. C.E.C.S.A., D.F., México.

Friedeck, K.G., Karagul-Yuceer, Y. and Drake, M.A. 2003. Soy protein fortification of a low-fat dairy-based ice cream. J Food Sci. 68(9): 2651-2657.

Guven, M., Yasars, K., Karaca, O. B. and Hayaloglu, A.A. 2005. The effect of inulin a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufature. Int J Dairy Tech. 58(3):180-184.

Lee, K-A. and Brennand, C.P. 2005. Physico-chemical, textural and sensory properties of a fried cookie system containing soy protein isolate. Int J Food Sci and Tech. 40: 501-508.

Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1991.Descriptive análisis techniques. In : Sensory Evaluation Techniques. Boston, Mass. CRC Press, Inc.

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN DE PLÁTANO MODIFICADO QUÍMICAMENTE

Guerra-DellaValle D.[1], Sánchez-Rivera M. M.[1], Méndez-Montealvo G.[1] y Bello-Pérez L. A.[1]*
[1] Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, Apartado postal 24. C.P. 62731, Yautepec, Morelos, México. Phone: +52 735 3942020, Fax: +52 735 3941896,
*** e-mail: labellop@ipn.mx**

Palabras clave: Propiedades funcionales; acetilación; oxidación; temperatura de gelatinización; viscoelasticidad.

RESUMEN

La obtención de almidón de fuentes no convencionales en conjunto con la modificación química permite proponer alternativas con la finalidad de mejorar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de éstos. Se modificó el almidón de plátano por métodos químicos como la acetilación y oxidación, evaluando sus propiedades térmicas y reológicas. El almidón oxidado presentó un contenido bajo de grupos carbonilo y carboxilo, esto debido al pH acido en el cual se realizaron los experimentos. Se obtuvo almidón acetilado considerado como de bajo grado de sustitución con 1.15% de grupos acetilos; este almidón presentó menor temperatura y entalpía de gelatinización que los almidones nativo y oxidado. Los tres almidones mostraron un comportamiento reológico no-newtoniano de tipo reofluidizante. En el análisis dinámico de las pruebas de viscoelasticidad se encontró que el almidón oxidado formo un gel más firme que el obtenido con el almidón acetilado. Las aplicaciones del almidón de plátano dependen del tipo de modificación y de sus características fisicoquímica y reológicas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se ha desarrollado un gran número de productos que contienen almidón, este biopolímero imparte viscosidad, mejora la solubilidad, disminuye la retrogradación y la sinéresis; por ello se han buscado fuentes alternativas para obtener almidones con diferentes y con mejores características fisicoquímicas y funcionales [1]. El almidón es el principal componente del plátano inmaduro debido a esto se han realizado algunos estudios acerca del aislamiento y caracterización parcial de este almidón [2]; también se ha resaltado la importancia de la modificación en el almidón [3] debido a la versatilidad que puede conferir en la aplicación de este polímero.

Se ha ido limitando el uso de los almidones nativos debido a que su manejo requiere variantes en la temperatura, pH, presión, esfuerzo de corte, etc. Estos inconvenientes pueden solucionarse si se realiza una modificación ya sea química, física o enzimática, siendo la modificación química una de las más utilizadas [4]. En esta modificación se adicionan reactivos específicos para cambiar la estructura química de algunas de las unidades α-D-glucopiranosil (unidad de anhidro glucosa, UAG) en la molécula del almidón nativo [5].

La acetilación del almidón se produce mediante la esterificación de este polímero con anhídrido acético; la eficiencia de la reacción depende de la concentración del reactivo, tiempo de reacción, catalizador, pH, fuente de almidón, contenido de amilosa/amilopectina y de la estructura de la amilopectina. Las propiedades funcionales del almidón acetilado dependen de los grupos acetilos introducidos a las UAG del almidón [6].

La modificación por oxidación consiste en hacer reaccionar el almidón con cantidades específicas de agente oxidantes (el hipoclorito de sodio es el agente oxidante mas utilizado en la industria) a temperatura y pH controlados [7]. Los grupos hidroxilos de la UAG del almidón se oxidan, formando grupos carbonilos y posteriormente grupos carboxilos. El número de estos grupos en el almidón indican el nivel de oxidación [8]. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la modificación química en las propiedades fisicoquímicas del almidón de plátano.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de almidón de plátano

Se emplearon plátanos en estado inmaduros (*Musa paradisiaca*) adquiridos en Cuautla, Morelos, México. El almidón se aisló siguiendo el procedimiento propuesto por Flores-Gorosquera et al., [9].

2.2 Oxidación del almidón

La oxidación se realizó según el método planteado por Sánchez-Rivera et al. [8].

2.3 Acetilación del almidón

La acetilación se llevo a cabo por el método propuesto por Bello-Pérez et al. [3].

2.4 Grado de modificación de los almidones

El contenido de grupos carbonilos y carboxilos de los almidones oxidados se determinó siguiendo la metodología propuesta por Sanchez-Rivera et al. [8]. El porcentaje de grupos acetilos y el grado de sustitución del almidón acetilado se obtuvo mediante la metodología establecida por Wurzburg [10].

2.5 Análisis térmico

La propiedades térmicas del almidón nativo y los modificados fueron evaluadas en un Calorímetro de Barrido Diferencial (CBD, TA Instruments, modelo 2010, New Castle, USA). Se siguió el procedimiento establecido por Paredes-López et al. [11]. Las muestras se sometieron a un programa de calentamiento de 10 a 120 °C, con una velocidad de 10 °C/min. La temperatura pico (T_p) y la entalpía de transición (ΔH) se obtuvieron de los termogramas en el programa TA Instruments OS/2 version 2.1

2.6 Prueba rotacional: Curvas de flujo

Se prepararon dispersiones de almidón al 10% (p/v) b.s. de sólidos totales y se analizaron en un Reómetro TA Instruments, modelo AR 2000 (New Castle, E.U.A.), utilizando un sistema de cono y placa con trampa de solvente, ángulo de 1°, diámetro de 4 cm. El reómetro se programó para realizar dos ciclos ascendente–descendente (0.06–600 s^{-1}), y un tercer ciclo descendente (600–0.06 s^{-1}) a 10 °C, empleando una velocidad de calentamiento-enfriamiento de 2.5°C/min; en una cinética de 25 a 90° C–cocción a 90 °C por 10 min–enfriamiento hasta 10° C. Se empleo la ecuación de la Ley de la Potencia para evaluar los datos obtenidos.

2.7 Método dinámico: Viscoelasticidad

Se prepararon dispersiones de almidón al 10% (p/v) b.s. de sólidos totales. Las propiedades viscoelásticas fueron evaluadas con pruebas oscilatoria en un Reómetro TA Instruments, modelo AR 2000 (New Castle, E.U.A.), utilizando el sistema de

cono y placa con trampa de solvente, con un ángulo de 1°, diámetro de 4 cm. Para determinar la región viscoelástica lineal (RVL) se realizaron barridos de amplitud de 0.01-5% de deformación, con una frecuencia de 1 Hz, en una cinética de calentamiento (25 a 90 °C)–cocción (90 ° C, etapa1)–enfriamiento (hasta 25 °C, etapa 2) con una velocidad de calentamiento-enfriamiento de 2.5 °C/min. Al encontrar el valor de % de deformación se realizaron los barridos de frecuencia en un intervalo de 0.1 a 10 Hz con una deformación de 0.3%, empleando la misma cinética antes mencionada. Se evaluaron los parámetros del módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') por medio del programa Data Analysis de TA Instruments.

2.9 Análisis estádistico

Se realizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$) utilizando el programa estadístico Sigma-stat, version 2.1 [12]; cuando se encontraron diferencias significativas, se aplico un análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la modificación de los almidones

El almidón de plátano oxidado presentó un contenido de grupos carbonilos de 0.019 %; este valor puede relacionarse con los pigmentos y los compuestos fenólicos presentes en el almidón, debido a que antes de realizarse la oxidación del almidón, el reactivo actúa sobre pigmentos y proteínas presentes en el almidón nativo [13]; por esta razón el almidón oxidado presentó un color más blanco que el nativo. Además cuando la reacción se realiza en condiciones alcalinas se producen grupos carbonilos, explicando así los valores bajos de grupos carboxilos obtenidos en este estudio (0.050%) comparados con otro estudio de almidón de plátano oxidado (0.076 %) a la misma concentración de cloro activo pero diferente pH [8].

El porcentaje de grupos acetilos en el almidón de plátano fue de 1.15, lo cual representa un grado de sustitución de 0.04; estos valores clasifican al almidón de plátano acetilado como de baja sustitución y se considera que pueden utilizarse en la elaboración de alimentos, según la reglamentación de la FDA (Federal Drug Administration). El valor obtenido fue similar al reportado por Bello-Pérez et al. [3].

3.2 Propiedades térmicas

La temperatura de gelatinización (T_p) del almidón de plátano nativo fue ligeramente mayor que el almidón oxidado (Cuadro 1), indicando que los gránulos de ambos almidones presentaron una organización similar. Sin embargo, si hubo diferencias en los valores de entalpía, siendo mayor para el almidón nativo, esto se atribuye a la despolimerización que sucede durante la modificación.

El almidón de plátano acetilado presentó la temperatura y entalpía de gelatinización más bajas (Cuadro 1); puede ser atribuido a la introducción de grupos hidrofílicos; estas diferencias obtenidas son un indicativo de los cambios estructurales producidos por la modificación [14].

Cuadro 1. Calorimetría de barrido diferencial de almidones de plátano nativo y modificados.

Almidón	Temperatura de pico (°C)	Entalpía de gelatinization (J/g)
Nativo	70.25 ± 0.28^{a}	13.15 ± 0.49^{a}
Acetilado	64.56 ± 0.14^{c}	6.29 ± 1.38^{c}
Oxidado	69.05 ± 0.30^{b}	9.00 ± 1.69^{b}

Promedio de tres mediciones ± E.E. Valores con la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativa.

3.3 Prueba rotacional: Curvas de flujo

Tanto el almidón nativo como los modificados presentaron un comportamiento no–newtoniano del tipo refluidizante, su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de deformación.

Se aplicó el modelo de Ostwald de Waele´s (Ley de la Potencia) para ajustar los datos experimentales (R>0.99) (Cuadro 2); las muestras tuvieron un índice de comportamiento del flujo (n) menor a 1, sin embargo, el almidón nativo presentó mayor dependencia a la velocidad de deformación, y el almidón oxidado la menor. En cuanto a los valores del índice de consistencia (k), el almidón acetilado presentó el valor mayor y el almidón oxidado, el menor.

Al realizar una oxidación se incorporan grupos funcionales provocando un sistema más suave, permitiendo la introducción de más moléculas de agua, además que se llevó acabo una despolimerización lo cual provoco una disminución en la viscosidad; durante la reacción de acetilación se forma un material denso, incrementado la consistencia de la suspensión de almidón, esta modificación retarda o elimina la retrogradación del almidón, afectando la estabilidad de las pastas del almidón. Rutenberg & Solarek [13] reportaron que la introducción de grupos acetilos reduce la fuerza de los enlaces entre la amilosa y la amilopectina incrementando la solubilidad y la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón. Esto facilita el acceso de agua a las zonas amorfas, incrementando la capacidad de retención de agua de la matriz de almidón, desarrollando una estructura con mayor organización.

Cuadro 2. Parámetros del modelo de Ostwald-de Waele de almidones de plátano modificado y sin modificar.

Almidón	10 °C		
	R	n	k (Pa.s)
Nativo	0.999	0.465	15.87
Acetilado	0.999	0.479	35.44
Oxidado	0.986	0.566	0.9213

3.5 Método viscoelástico dinámico

Cuando se produce la gelatinización en el almidón, se presenta un incremento tanto en el modulo de almacenamiento G' como en el modulo de perdida G'', ésto se atribuye al hinchamiento de los gránulos y a la liberación de la amilosa. Al enfriar la suspensión de almidón gelatinizado se forma un gel [15] llevandose a cabo las mediciones dinámicas en el gel formado.

En los barridos de amplitud de la deformación G' fue mayor que G''. En la Figura 1, se presentan los resultados a 25 °C; determinando la región viscoelástica lineal de las muestras estudiadas. Las muestras tuvieron una respuesta similar en el intervalo estudiado, por ello se obtuvo el valor de 0.3 % de deformación para realizar los barrido de frecuencia en los almidones de interés.

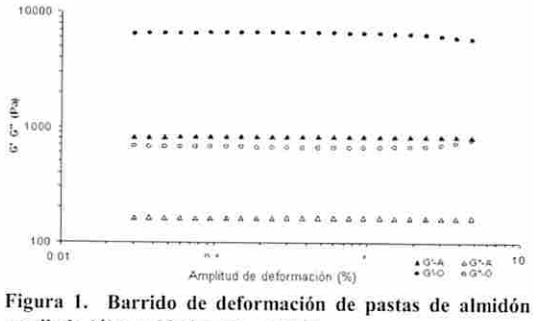


Figura 1. Barrido de deformación de pastas de almidón acetilado (▲) y oxidados (●) a 25 °C.

En los barridos de frecuencia, G' fue mayor que G'', y a 90 °C (Figura no mostrada), la diferencia entre los módulos fue de un ciclo logarítmico; tanto G' como G'' mostraron una dependencia con la frecuencia, lo cual se puede atribuir al mecanismo de relajación que sufre el gel a bajas frecuencias lo cual indica que se trata de un biopolímero rígido en solución.
A 25 °C (Figura 2), G' no mostró una dependencia con la frecuencia, como si lo presento G'', describiendo así el comportamiento característicos de un gel, presentando mayor contribución el carácter elástico.

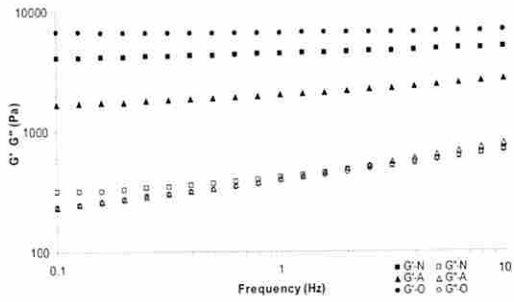


Figura 2. Barrido de frecuencia de geles de almidón a 25 °C, nativo (■), acetilado (▲) y oxidado (●).

Las diferencias encontradas en los geles de almidón pueden atribuirse a las características moleculares de la amilosa. El almidón acetilado formo un gel más débil, debido a la inhibición de las interacciones de las cadenas de amilosa, reduciendo así las zonas de unión. Durante la oxidación se lleva acabo una despolimerización lo cual retarda la recristalización del almidón provocando un sistema con mayor respuesta en G'.

CONCLUSIONES

Los cambios fisicoquímico encontrados en el almidón de plátano muestran que sus propiedades pueden ser mejoradas al modificarse químicamente sea por acetilación o por oxidación, permitiendo ampliar su uso en las diferentes industrias.
Durante la modificación química se produce una disminución en la entalpia de gelatinización. Los almidones presentaron comportamiento no–newtoniano del tipo reofluidizante. El almidón oxidado presentó valores mayores de G', conformando geles menos débiles. Es por ello que se sugiere que el almidón acetilado podría emplearse como espesante en repostería y el almidón oxidado por su estabilidad y claridad podría usarse en la elaboración de plásticos y/o películas biodegradables.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico recibido para la realización de este trabajo de la SIP-IPN, COFAA-IPN y EDI-IPN.

REFERENCIAS

[1] R. Hoover: Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches, a review. *Carbohydr. Polym.* 2001, 45, 253-267.
[2] L. A. Bello-Pérez, E. Agama-Acevedo, L. Sánchez-Hernández, O. Paredes-López: Isolation and partial characterization of banana starches. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 854-857.
[3] L. A. Bello-Perez, S. M. Contreras-Ramos, A. Jiménez-Aparicio, O. Paredes-Lopez: Acetylation and characterization of banana starch. *Acta Cientifica Venezolana* 2000, 51, 143-149.
[4] G. Fleche: Modifications chemiques de l'amidon. CPCIA. Centre de perfectionnement des cadres des industries agricoles et alimentaires. Session: Amidons et derives, Nantes, Francia, 1990.
[5] J. Van Der Bij: The Analysis of Starch Derivatives, in *Examination and Analysis of Starch.* (Ed. J. A. Radley) Applied Science Publishers, London, England, 1976.
[6] D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero, E. Cañizarez-Hernández: Acetylation and characterization of *Canavalia ensiformis* starch. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 378-382.
[7] Y. J. Wang, L. Wang: Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydr. Polym.* 2003, 53, 207-217.
[8] M. M. Sanchez-Rivera, F. J. L. Garcia-Suarez, M. Velazquez del Valle, F. Gutierrez-Meraz, L. A. Bello-Perez: Partial characterization of banana starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydr. Polym.* 2005, 62. 50-56.
[9] E. Flores-Gorosquera, F. J. García-Suárez, E. Flores-Huicochea, M. C. Núñez-Santiago, R. A. González-Soto, L. A. Bello-Pérez: Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana* 2004, 55, 86-90.
[10] O. B. Wurzburg: Acetylation, in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Eds. Whistler, Smith and Wolfrom) Academic Press, USA, 1964.
[11] O. Paredes-López, L. A. Bello-Pérez, M. G. López: Amylopectin: Structural, gelatinization and retrogradation studies. *Food chem.* 1994, 50: 411-418.
[12] E. Fox, K. Shotton, C. Urlich: Sigma Stat: Manual de Usuario, Versión 2.1 para Windows 95, NT y 3.1. Ed. Sandel Co., USA, 1995.
[13] W. M. Rutenberg, D. Solarek: Starch derivatives: Production and uses. in Starch Chemistry and Technology, (Eds. R.L. Wistler, J. N. BeMiller, E. F. Paschall) Academic Press, New York, USA, 1984.
[14] Y. J. Wang, L. Wang: Characterization of Acetylated Waxy Maize Starches Prepared under Catalysis by Different Alkali and Alkaline-Earth Hydroxides. *Starch/Stärke* 2002, 54, 25–30
[15] C. G. Biliaderis: The structure and interactions of starch with food constituents. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1991, 69, 60-78.

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE ALMIDÓN DE PLÁTANO OXIDADO

Sánchez-Rivera Mirna María; Méndez-Montealvo María Guadalupe; Núñez-Santiago, María del Carmen; Bello-Pérez, Luis Arturo.
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS – IPN. Km 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla, CP 62731. Tel. (52)-(735)-3941896; Fax: (52)-(735)-3942020. YAUTEPEC MORELOS, MÉXICO. labellop@ipn.mx,

Palabras clave: Biotecnología de alimentos, almidón oxidado, plátano, carboxilo.

RESUMEN

En este estudio, el almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) se sometió a un proceso de modificación por oxidación utilizando hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % de cloro activo; la oxidación se realizó a pH 7.5 y 11.5, a una temperatura de 35 °C y a diferentes tiempos de reacción (de 1 a 4 h). Se evalúo el contenido de grupos carboxilo (COOH) como producto final primario de la reacción de oxidación. Se utilizó un microscopio de luz polarizada para analizar la organización interna de los gránulos; se obtuvieron los patrones de difracción y el grado de cristalinidad con un difractómetro de rayos X y mediante espectroscopia de infrarrojo (IR) se obtuvo información de las regiones amorfa-cristalina. En un Reometro T.A. Instruments se determinó el comportamiento de flujo de los almidones oxidados y del nativo. Se observó que los COOH se incrementaron al aumentar la alcalinidad del medio de reacción. El ordenamiento interno de los gránulos así como los patrones de difracción de rayos X no fueron alterados en los almidones estudiados; sin embargo, se observaron diferencias en el grado de cristalinidad. Por espectroscopia de IR se observaron cambios en la relación entre las zonas amorfa-cristalina. El comportamiento de flujo de los almidones oxidados y sin modificar fue de tipo no-newtoniano; las viscosidades más bajas se observaron en los almidones oxidados a tres y cuatro horas de reacción a pH 11.5, relacionado con un mayor ablandamiento de los gránulos y disolución de las moléculas del almidón.

INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos, el uso del almidón oxidado se ha incrementado por sus propiedades funcionales únicas como baja viscosidad, alta estabilidad, claridad, formación de películas y propiedades de unión (Morton y Solarek, 1984; Autio y col., 1992). Los almidones oxidados se obtienen principalmente con hipoclorito de sodio (NaOCl) en condiciones controladas de pH y temperatura. Durante la oxidación, los grupos hidroxilo (OH^-) del almidón son oxidados primeramente a grupos carbonilo (C=O) y después a grupos carboxilo (COOH) (Wang y Wang, 2001); por lo que estos últimos, son considerados como los productos primarios de la reacción de oxidación, la cual toma lugar en los grupos alcoholes secundarios de los carbonos C2 y C3 así como en el grupo alcohol primario C6 de las unidades de glucosa. La oxidación también produce degradación del almidón al hidrolizar la amilosa y amilopectina en los enlaces glucosídicos α-1:4 y 1:6. Particularmente, la oxidación de los grupos alcoholes secundarios incluye la apertura y rompimiento de los anillos monoméricos, ocasionando pérdida de las propiedades de los polímeros como disminución de la viscosidad (Martínez-Bustos *et al.*, 2007). Por lo anterior, el contenido de C=O y COOH, especialmente éste último, así como el grado de despolimerización del almidón oxidado, son considerados como indicadores de la magnitud de oxidación. El nivel de oxidación puede ser afectado por el pH, temperatura, concentración del oxidante, estructura molecular y fuente de almidón (Chattopadhyay y col., 1997). Diversos estudios indican que tanto la fuente como la estructura de los gránulos de almidón, influyen directamente en el nivel de oxidación. Los gránulos de almidón oxidados con NaOCl, muestran la cruz de malta y patrones de difracción de rayos X no alterados, indicando que la oxidación toma lugar principalmente en la región amorfa de los gránulos (Autio y col., 1992). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes condiciones de reacción sobre la magnitud de oxidación del almidón de plátano (*Musa paradisiaca L.*). Se determinaron y compararon las propiedades fisicoquímicas de los almidones oxidados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del almidón

El almidón nativo de plátano (*M. paradisiaca* L.) se obtuvo aplicando un procedimiento a nivel de planta piloto (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004).

Almidones oxidados con NaOCl

Los almidones oxidados de plátano se obtuvieron mediante la técnica reportada por Wang y Wang, (2003) con ligeras modificaciones. Se hizo una dispersión al 40 % de almidón-agua destilada manteniéndose en agitación en un contenedor de 4 L con sistema de circulación de agua, la reacción se llevó a 35 °C y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 2 M; se adicionó una solución de NaOCl al 1 % de cloro activo durante 30 min (0.3 mL/min), manteniendo el pH con NaOH 1 N hasta finalizar la reacción; después, se dieron 30 minutos adicionales (1 h de reacción) y se tomaron 25 mL que se neutralizaron con H_2SO_4 1 N, dejándolos en agitación con 50 mL de metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$) al 5 % por 15 min; se centrifugó a 3500 *g* / 5 min para eliminar la mezcla de reacción y los sólidos se lavaron con agua destilada a 3500 *g* cada cinco minutos (4x); mismo procedimiento se aplicó a tiempos de reacción de 2, 3 y 4 horas y con pH de 11.5 a la temperatura de reacción antes mencionada. Los almidones oxidados se secaron a 40 °C por 24 horas, se molieron y tamizaron en malla No. 100 USA.

Contenido de grupos carboxilo

A los almidones oxidados se les determinó el contenido de grupos carboxilo, expresado como el grado de sustitución (GS. COOH/100 unidades de anhidroglucosa o UAG) (Kuakpetoon y Wang 2001).

Microscopía de luz polarizada

Se utilizó un microscopio de luz polarizada (Leitz, Wetzlar, Alemania) que contó con un objetivo 40 X y una cámara digital. La captura de las imágenes se realizó con el software pixela 3.0.

Difracción de RX y cristalinidad

Se utilizó un difractómetro de rayos-X (Bruker D5005) de ángulo ancho equipado con una fuente de cobre, operado a 40 KV y 40 mA que produjo una radiación de CuKα con una longitud de onda de 1.54 Å. Los datos se colectaron en un intervalo de 4-38° cada 0.1° con una velocidad de 60 s/°. La línea base del difractograma fue corregida en el intervalo de barrido y el vector fue normalizado utilizando el programa EVA 5.0 (Bruker, UK). Mediante esta técnica también se determinó el porcentaje de cristalinidad.

Espectroscopia de infrarrojo (IR)

La relación de la zonas amorfa-cristalina se obtuvo mediante un espectrofotómetro de IR (Bruker, UK) y una celda térmica de simple reflactancia con un diamante (Graseby-Specac Ltd., UK); el programa OPUS 3.0 (Bruker, UK) se utilizó para analizar los datos. A partir de las longitudes de onda 1045 y 1022 cm^{-1} se determinó la proporción de las regiones cristalina y amorfa.

Cuando el cociente 1045/1022 fue mayor a 1.0 se relacionó con una mayor cantidad de material cristalino y menor a 1.0 de material amorfo.

Propiedades de flujo

Se realizó la cocción del almidón *in situ* en un reómetro TA Instruments modelo AR 1000-N (New Castle, E.U.A.). A partir de una dispersión al 5 % (p/v) de sólidos, se colocó la muestra entre un sistema de placas paralelas de 40 mm y empleando un espesor de 1 mm entre las placas. Las muestras se sometieron a una velocidad de cizalla constante de 100 s^{-1} en un proceso de calentamiento-enfriamiento de 25 a 90 °C a una velocidad de calentamiento de 2.5 °C min^{-1}. Cuando llegó a 90 °C se mantuvo isotérmico por 10 minutos, luego se enfrió a 25 °C a una velocidad de enfriamiento de 2.5 °C min^{-1}. Se realizó una prueba de cizalla estacionaria a esta temperatura, realizando dos ciclos de cuatro barridos consecutivos ascendente y descendente de 0.04 a 100 s^{-1} y un quinto barrido descendente de 100 a 0.04 s^{-1}. Se reporta el último ciclo (descendente) como la viscosidad (η) en función de la velocidad de cizalla. Para una mejor interpretación de los resultados, se aplicó la ecuación de la Ley de la Potencia.

Análisis estadístico

Se realizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$) utilizando el programa estadístico Sigma-stat, version 2.1 [12]; cuando se encontraron diferencias significativas, se aplico un análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de grupos carboxilo

La **Figura 1** muestra el efecto del tiempo de reacción sobre el contenido de grupos carboxilo (COOH / 100 UAG) a pH 7.5 y 11.5 de almidones de plátano oxidados a 35 °C. Se encontraron diferencias estadísticas (α = <0.05) a pH 7.5 a los diferentes tiempos de reacción (1 – 4 h). Sin embargo, a pH 11.5 a partir de las 2-4 h no se encontraron diferencias significativas (α = <0.05). El contenido de COOH fue más alto a pH 11.5 a los diferentes tiempos de reacción que a pH de 7.5, estos resultados se atribuyen al efecto del pH sobre el GS, ya que al aumentar la alcalinidad del medio de reacción, se incrementa la producción de los COOH (Kuakpetoon y Wang, 2001). A pH 7.5 el contenido de grupos COOH se incrementó al aumentar el tiempo de reacción de 1 a 3 h y a cuatro horas de reacción disminuyó, a diferencia los almidones oxidados a pH 11.5 donde el GS se incrementó al aumentar el tiempo de reacción de 1-4 h obteniendo la producción más alta de COOH a cuatro horas de reacción. Comparando los tiempos de reacción, se encontró que existen diferencias significativas entre los diferentes tiempos de reacción de los almidones oxidados a pH 7.5; sin embargo, a pH 11.5 no se encontraron diferencias entre dos, tres y cuatro horas de reacción. Estos resultados muestran que el medio de reacción influye en mayor medida sobre el tiempo de reacción.

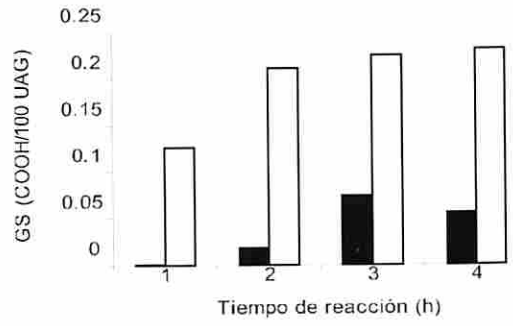


Figura 1. Efecto del tiempo de reacción sobre el contenido de grupos carboxilo (COOH) a pH 7.5 (columnas llenas) y 11.5 (columnas vacías) de almidones de plátano oxidados a 35 °C.

Caracterización morfológica

Las imágenes de microscopia de luz polarizada (no mostradas) de almidón de plátano oxidado a cuatro horas de reacción, indicaron que no hubo cambio en la birrefringencia de los gránulos a las condiciones de pH evaluados, mostrando que la oxidación ocurrió principalmente en la región amorfa de los gránulos (Kuakpetoon y Wang, 2001).

Caracterización molecular

Patrones de difracción de RX y grado de cristalinidad.

La **Figura 2** muestra los difractogramas de rayos X de los almidones nativo y oxidados a pH 7.5 y 11.5. El valor de cristalinidad mayor (21.03) se encontró en los almidones oxidados a pH 11.5 a diferencia del almidón oxidado a pH 7.5 (20.73) y del nativo (18.58). Los almidones oxidados se clasificaron como una mezcla de patrones de difracción tipo A- y B-; en los picos de difracción más altos no presentaron cambios significativos, indicando que la oxidación no alteró el grado de cristalinidad de los almidones y tomó lugar principalmente en la región amorfa de los gránulos (Kuakpetoon y Wang, 2006). De los almidones oxidados, el valor de cristalinidad mayor se obtuvo a pH 11.5 y el menor a pH 7.5 muestra la correlación entre la cristalinidad y la cantidad de amilopectina en ambos pH. Estos cambios observados en la cristalinidad muestran que el NaOCl oxidó la amilosa en la lamela amorfa, sugiriendo pequeñas despolimerizaciones en la lamela cristalina de los almidones oxidados de plátano.

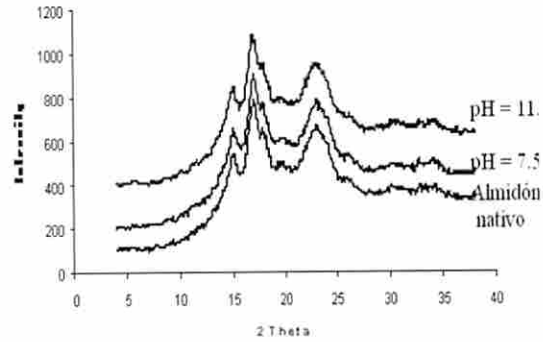


Figura 2. Patrones de difracción de rayos X de los almidones de plátano nativo y oxidados a cuatro horas de reacción, 35 °C a pH 7.5 y 11.5.

Espectroscopia de infrarrojo.

Mediante el estudio de IR se encontró que al incrementar la alcalinidad del medio de reacción, los valores de IR se aumentan de 1.57 a 1.58 para los almidones oxidados de plátano a pH 7.5 y 11.5 respectivamente; para el almidón nativo de plátano se ha reportado un valor de 1.12 (Millán-Testa et al., 2005). Estos estudios demuestran que la oxidación degradó la amilosa en mayor proporción a un pH de 11.5. Esto sugiere que la amilosa es más propensa a despolimerización que la amilopectina al incrementarse la alcalinidad del medio de reacción y por consiguiente la despolimerización oxidativa podría haber tomado lugar principalmente en la lamela amorfa. En este sentido, la amilosa por su estructura química lineal, sería más susceptible de reaccionar con el NaOCl (y así también a la degradación), por lo tanto, menos NaOCl estaría disponible para la oxidación de la amilopectina (Kuakpetoon y Wang, 2006). A pH 11.5, la mayor oxidación de la lamela amorfa -donde los puntos de ramificación de la amilopectina se encuentran localizados- se considera que hubo ligera penetración del hipoclorito en la lamela cristalina, así la lamela amorfa fue mayormente oxidada y degradada durante la oxidación; los valores más altos de IR a pH 11.5, explican que al NaOCl le es más fácil penetrar al interior y oxidar la lamela cristalina que a pH 7.5 (Kuakpetoon y Wang, 2001), este relacionado con el mayor contenido de grupos COOH formados a pH 11.5, permitiendo mayor accesibilidad del NaOCl a la región amorfa de los gránulos, donde principalmente reacciona.

De las curvas de fluidez (esfuerzo de corte *vs.* velocidad de deformación) se observó un comportamiento no-newtoniano en los almidones oxidados y sin oxidar. Los almidones oxidados a pH 7.5 mostraron viscosidades más bajas que el almidón nativo, y un adelgazamiento al cizallamiento a las velocidades de deformación más altas en comparación con los almidones oxidados a pH 11.5 los cuales presentaron viscosidades más altas que los oxidados a pH 7.5 **(Figura 3);** esta disminución se relaciona con un mayor ablandamiento de los gránulos y disolución de las moléculas del almidón (Parovuori y col., 1995). Este comportamiento también está relacionado con el debilitamiento entre las fuerzas de asociación entre las moléculas del almidón debido a la repulsión eléctrica de los grupos COOH formados, ya que a pH 11.5 donde se presentó mayor viscosidad se obtuvo mayor contenido de grupos COOH. Del análisis de índice de consistencia (k) el valor más bajo se obtuvo con los almidones oxidados a pH 11.5 **(Cuadro 1),** infiriendo una mayor degradación o hidrólisis parcial del almidón durante la oxidación a estas condiciones. Los valores del índice de comportamiento de flujo (n) fueron menores a uno (n>1) para todos los almidones oxidados, obteniendo un comportamiento de flujo de tipo reofluidizante **(Cuadro 1);** es decir, las viscosidades de las pastas no se mantuvieron constantes con la velocidad de deformación y este valor fue determinado por el esfuerzo de corte.

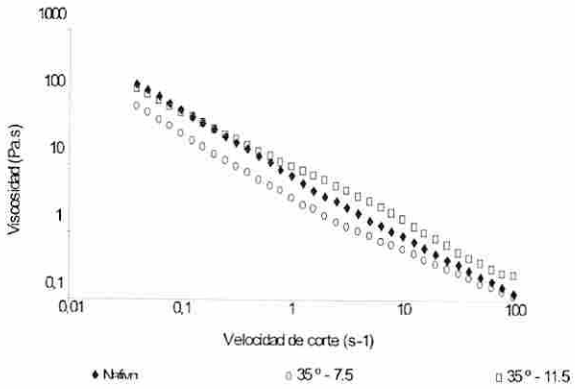


Figura 3. Curvas de flujo de almidones nativo (◆) y oxidados de plátano a pH 7.5 (○) y 11.5 ( ) a cuatro horas de reacción.

Cuadro 1. Comportamiento de flujo de almidones oxidados de plátano a 35 °C, pH 7.5 y 11.5 a cuatro horas de reacción.

pH	R	n	k
7.5	0.997	0.179	3.881
11.5	0.999	0.182	9.576

CONCLUSIONES

El pH tuvo un efecto marcado en la producción de grupos carboxilo. Al aumentarse la alcalinidad del medio de reacción, los COOH también se incrementaron. La oxidación con NaOCl a pH 7.5 y 11.5 no afectó el ordenamiento interno de los gránulos y tampoco los patrones de difracción, solamente se observaron ligeras variaciones en la cristalinidad. La viscosidad fue mayor a pH 11.5 que 7.5, relacionado con el contenido más alto de grupos COOH, que pudieron haber provocado un mayor número de entrecruzamientos hemiacetales en los gránulos de almidón (Kuakpetoon y Wang, 2006; Wang y Wang, 2001). El comportamiento de flujo de todos los almidones fue de tipo reofluidizante o pseudoplástico, confirmado con el modelo de Ley de la Potencia que permitió una mejor interpretación de los resultados obtenidos en los reogramas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la SIP-IPN, COFAA-IPN y EDI-IPN por los apoyos económicos otorgados para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) Autio, K., Suortti, T., Hamune, A. and Poutanen, K. 1992. Microstructural and physicochemical properties of oxidized potato starch for paper coating. *Starch/Stärke*. 44: 393-398.

2) Flores-Gorosquera, E., García-Suárez, F. J., Flores-Huicochea, E., Núñez-Santiago, M. C., González-Soto, R. y Bello-Pérez, L. A. 2004. Rendimiento del proceso de extracción de almidón de frutos de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*. 55: 86-90.

3) Kuakpetoon, D. and Wang, Y. 2001. Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. *Starch/Stärke*. 53:211-218.

4) Kuakpetoon D. and Wang Y. 2006. Structural characteristics physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amilosa content. *Carbohydrate Research*. 341: 1896-1915.

5) Martínez-Bustos, F. Amaya-Llano A.L., Carbajal-Arteaga J. A., Chang Y.K. and Zazueta-Morales J. J. 2007. Physicochemical properties of cassava, potato and jicama starches oxidised with organic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 1207-1214

6) Millán-Testa C. E., Méndez-Montealvo, M.G., Ottenhof, M-A, Farhat, I. A., and Bello-Pérez, L. A. 2005. Determination of the molecular and structural characteristics of okenia, mango, and banana starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:495-501.

7) Morton, R. W. and Solarek, d. 1984. Starch derivatives: production and uses. In: Starch Chemistry and Technology, 2nd Ed. (Eds. R. L. Wistler, J. N. BeMiller, E. F. Paschall), Academic, Press, New York; pp 311-366.

8) Parovuori, P., Hamunen, A. Forssell, P., Autio K., and Poutanen, K. 1995. Oxidation of potato starch by hydrogen peroxide. *Starch/Stärke*. 47:19-23.

9) Wang, Y. and L. Wang. 2003. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers* 52:207-217.

MICROBIAL AIR-PROCESSING IN A BRAZILIAN PRODUCE PLANT

Cruz, A.G.da[1]; Cenci, S.A.[2] and Maia, M.C.A.[3]
[1]Pos-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, UFRJ.
[2]Embrapa Agroindústria de Alimentos, CTAA/RJ
[3]Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, UFRJ.
Centro de Tecnologia, bloco A - 5° andar – Ilha do Fundão - Cep: 1949-900
Rio de Janeiro – Brasil. Email: food@globo.com

Keywords: air-processing, produce, contamination.

ABSTRACT

The microbial air-processing in a Brazilian Produce Plant was investigated. Ranges from 4.35 to 5.27 log CFU/cm^2/week for mesophilic bacteria count to 5.16 to 5.33 log CFU/cm^2/week for yeasts and moulds were reported along the processing steps. 100% of the values were above the APHA standards ones. The results reinforce the importance of air as a vehicle for microbial contamination in the food industry.

INTRODUCTION

Minimally processed vegetables are products requiring no additional preparation before consumption and do not suffer heat treatment during processing (Wattada and Qi 1999). Researches involving environmental contamination in produce plants are rare, and in the majority of cases, are limited to a sanitary evaluation of the utensils/equipment and handlers, not mentioning the microbiological status of the air in the industrial plant (Kaneko et al. 1999; Cruz et al. 2005). The importance of air as a source of contamination in a food industry can be resumed by four factors: the time of exposure of the food to the air, the level of contamination of the former, the aerodynamic behaviour of the particles and the area of the food product exposed (Salustriano et al. 2003). In this context, the objective of this study was to evaluate the microbial air-processing in a Brazilian Produce Unit identifying factors that could compromise final product quality and proposing corrective actions aimed at protecting the health of the final consumer.

MATERIAL AND METHODS

Microbiological analyses were carried out for mesophilic bacteria and yeasts and moulds in the environmental processing areas inside a Produce plant located in the State of São Paulo, Brazil: raw reception, 1st washing, 2nd washing, sanitation and packaged product. The technique of simple sedimentation was adopted, using, respectively, Plate Count Agar (PCA-Merck, Brazil) for aerobic mesophilic bacteria and potato dextrose agar (PDA-Merck, Brazil) acidified with tartaric acid, for yeasts and moulds. Duplicate plates, each containing approximately 20 mL of the respective culture media, were left open and placed in each of the above-mentioned areas cited for approximately 15 minutes. They were then closed and incubated according to the following criteria: 37°C/48 h for the mesophilic bacterial count and 25°C/3-5 days for yeasts and moulds. The results were expressed as CFU/cm^2/week, and analysed according to the standard values recommended by the American Public Health Association for aerobic mesophiles, 30 CFU/cm^2/week (1.5 log CFU/cm^2/week). In the absence of a standard value for yeasts and moulds, the same one cited for aerobic mesophilic bacteria was used. The experiment was repeated 3 times, with an interval of 10 days between each trial. The results of the microbiological analyses were transformed into logarithms (log CFU/cm^2/week) and submitted to a statistical analysis. The differences between the means were calculated using the Analysis of Variance followed by the Tukey Test. Probabilities ≥ 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the results of the microbiological analyses for aerobic mesophilic bacteria carried out in the air processing of the Produce Plant. A range of from 4.35 to 5.32 log CFU/cm^2/week was reported being the extreme values being observed for the 2nd washing step and final product, respectively. During the experiment, the 2nd washing and the raw reception area presented statistical significant difference ($p<0.05$). This could have been due to a variable raw material microbial load and the proximity of these two areas in the industrial unit without physical separation, allowing for the transference of microorganisms to the already sanitised product in water droplets suspended in the air, or transported by workers, who had free access to the various sectors of the factory and moved about numerous times, especially on maximum production days. In addition it could be related to the hygienic-sanitary quality of the water used in this stage, since this was only submitted to a single filtration stage before coming into contact wit the vegetables, with no sanitation stage.

Processing Steps	Trial 1	Trial 2	Trial 3
Raw reception	5.06^{abA}	5.01^{aAB}	5.15^{bA}
Washing 1	4.97^{aA}	4.89^{aAB}	4.88^{aA}
Washing 2	4.94^{acA}	4.35^{bA}	4.90^{cA}
Sanitation	5.10^{aA}	4.47^{aAB}	4.90^{aA}
Packing room	5.32^{aA}	5.07^{aB}	5.27^{aA}

*Different lowercase superscripts denote significant differences between the trials ($p<0.05$). Different superscripts capital letters denote significant differences between the processing phases ($p<0.05$)

Table 1. Microbiological Analysis for Mesophilic Bacteria Count

Between the processing phases, a significant difference was observed between the packaging room and the 2nd washing ($p<0.05$), which could also be attributed to transit of the workers in the production unit, since they had free access throughout the plant. According to Heldman (1967), a single handler is responsible for the dissemination of 20-70 microorganisms per minute. No significant reduction in the microbial counts was observed between the sanitation step and the packaged product ($p>0.05$), which could indicate the need to improve the Good Manufacturing Practices, with training programmes for the handlers involving standardisation of the activities related to this stage, such as contact time, temperature and concentration of the disinfectant used, or even deficiencies in the hygiene of the centrifuge, equipment located between the sanitisation tank and the packaging section, which could lead to the occurrence of a biofilm. A more detailed study is required to know the true causes of this problem.

Table 2 shows the results of the microbiological analyses for yeasts and moulds carried out in the air-processing of the Produce Plant. These results were higher than those obtained for the aerobic mesophilic bacteria, being registered a range from 5.16 to 5.33 log CFU/cm^2/week, the extreme values obtained referring to the stages of raw reception and sanitation step, respectively. Throughout the experiment, the 2nd washing stage presented a significant statistical difference ($p<0.05$). probably due to direct contact of the water with the air in the processing line, since this one had no protection from the outside and the treatment of the water before contact with the food was deficient. The persistence of high counts for this

microbial group in the final product packaging area – 5.18 to 5.28 log CFU/cm^2/week – indicates a potential danger for mycotoxin production, which could be present in the final product, apart from decreasing the time the product would be apt for consumption. The intrinsic characteristics of minimally processed vegetables, which require no further preparation before ingestion by the final consumer, make this situation even more worrying, representing an imminent risk to consumers. The wide range of results found reflects the total inadequacy of the environmental sanitation protocol employed inside the plant, made worse by some of the structural conditions observed, such as deficient ventilation and a total lack of unidirectional layout, becaming air circulation in the processing environment difficult. The immediate adoption of standardised sanitation procedures for the different areas of the processing unit is suggested, plus a programme to monitor the microbiological quality to check the efficiency of these operations, allied to structural modifications in the industrial unit allowing for a positive air pressure in the processing environment. In addition, the installation of physical separations between the processing areas, as well as the use of air filters and the adoption of a adequate sanitation at the water used to wash the vegetables.

Processing Steps	Trial 1	Trial 2	Trial 3
Raw reception	5.16^{aA}	5.16^{aA}	5.18^{aA}
Washing 1	5.27^{aA}	5.27^{aA}	5.29^{aA}
Washing 2	5.31^{aA}	5.17^{bA}	5.27^{abA}
Sanitation	5.27^{aA}	5.33^{aA}	5.22^{aA}
Packing room	5.24^{aA}	5.18^{aA}	5.28^{aA}

*Different lowercase superscripts denote significant differences between the trials ($p<0.05$). Different superscripts letters capital denote significant differences between the processing phases ($p<0.05$).

Table 2. Microbiological Analysis for Mould & Yeast Count

It is important to remember that throughout this experiment, 100% of the results found in all the areas of the processing plant were above the recommended standard value of 1.48 log CFU/cm^2/week for both aerobic mesophiles and yeasts & moulds. This highlights the importance of a unidirectional layout in food industries, minimising cross-contamination, and also the need for the involvement of professionals with knowledge of food safety right from the beginning, when the industrial unit is in the project stage. Fain (1996) reports centralisation of efforts by the processors to avoid product contamination, establishing a routine of cleaning and sanitisation of the along the processing plant, being the efficiency of the system tested by periodic microbiological analyses of the environment processing.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study indicated the existence of a high level of microbial load in the air processing of the produce plant. This suggests it should be considered as a potential source of contamination for the safety of the final product, and should compulsory be taken into consideration when establishing a formal protocol sanitation for it. Despite the limitations of the methodology used, it also served as a first report, exhibiting data that can be used in future studies on the microbiology of the air processing in Produce Plants.

REFERENCES

Cruz, A.G. da, Cenci, S.A. and Maia, M.C.A. 2005. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma unidade produtora de vegetais minimamente processados. *Anais do Terceiro Simpósio de Ciência de Alimentos. Florianópolis*, Brasil: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (cd-room)

Heldman, D.R. 1974. Factors influencing the air-borne contamination of foods. J. *Food Sci.*, 39, 962-969.

Fain, R. F. 1996. A Review of the Microbiological Safety of Fresh Salads. Dairy Food Envirom. Sanit., 16, 146-149.

Kaneko, K., Hayashidani, H., Takahashi, K., Shiraki, Y., Limawongpranee, S. and Ogawa, M. 1999. Bacterial contamination in the Environment of Food Factories Processing Ready-to-eat Fresh Vegetables. *J. Food Prot.*, 62, 800-804.

Salustriano, V.C.S., Andrade, N.J., Brandão, S.C.C., Azeredo, R.M.C. and Lima, S.A.K. 2003. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. 2003. *Braz. J. Microbiol.* , 34, 255-259.

Watada, A.E. and QI, L. 1999. Quality of fresh-cut produce. *Post. Harv.. Biol. Technol.*, 15, 201-205.

EFECTO DEL RECUBRIMIENTO CON QUITOSANO SOBRE EL DESARROLLO DE MOHOS Y LEVADURAS EN NARANJILLAS ALMACENADAS

Arancibia, Mirari Y. ; Almeida, Alba V. y Alvarado, Juan de Dios.
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO (UTA). Centro de Investigaciones (CENI).
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL). Ciudadela Huachi, Casilla 18-01-0334
AMBATO-ECUADOR y_arancibia@hotmail.com

Palabras clave: microbiología, quitosano, antimicótica, almacenamiento, naranjilla.

RESUMEN

Con el propósito de conocer el efecto del recubrimiento con una película de quitosano en el crecimiento de microorganismos, asociado con la conservación durante el almacenamiento de naranjillas (*Solanum quitoense)*, se trabajó con frutos fisiológicamente maduros, en su estado natural y recubiertos con quitosano extraído de caparazones de camarón (*Penaeus vannamei)*; los cuales se mantuvieron en cámaras a 7,0 ± 0,5°C; 20 ± 1,5°C; 30 ± 1°C y 40 ± 1°C, durante cuatro semanas. Las suspensiones para el recubrimiento fueron preparadas en solución de ácido acético al 3% con 0,75% (w/w) de quitosano obtenido por dos métodos, un método directo (QD), eliminando la obtención previa de quitina e indirecto (QI), con la obtención previa de quitina seguido de su desacetilación; en los dos casos se determinó el peso molecular viscosimétrico y el porcentaje de desacetilación.

Se realizaron recuentos microbiológicos de hongos y levaduras en la superficie de las frutas, con el fin de evaluar la actividad antimicótica del quitosano durante el tiempo de almacenamiento. El recubrimiento con quitosano (QD) y (QI) inhiben en forma significativa el crecimiento microbiano, presentándose las ecuaciones para el cálculo del número de hongos y levaduras que se esperaría encontrar conforme avanza el tiempo de almacenamiento a las distintas temperaturas. Los resultados obtenidos indican que la temperatura de refrigeración (7°C) y el recubrimiento (QD), mejora la apariencia de los frutos, les confiere luminosidad en el color y además los protege de la pérdida excesiva de humedad, ayudando a mantener la textura y forma; puede ser aplicado en la conservación de naranjillas durante el almacenamiento y comercialización pues permite prolongar el tiempo de almacenamiento hasta por un mes.

INTRODUCCIÓN

La naranjilla es una fruta exótica de sabor y aroma especiales, cuyo origen parece estar en las estribaciones orientales de la Cordillera de los Andes en Ecuador. Es una fruta redonda ovalada, internamente dividida en cuatro compartimentos separados por particiones membranosas, llenos de pulpa jugosa de color verde amarillento y numerosas semillas pequeñas. Es comercializada como fruto fresco en cajones de madera rústica desde los lugares de producción hasta los mercados previo a su consumo, requiriéndose un periodo de almacenamiento propio de las frutas climatéricas (Alvarado, 2002).

El quitosano es un polímero derivado de la quitina parcial o totalmente desacetilada. En la obtención del quitosano, el grupo N-acetilo debe ser removido sin la hidrólisis del polisacárido, por esto, los métodos alcalinos son los más empleados. Varios autores, entre ellos Pinelli Saavedra y colaboradores (1998), indicaron que la obtención de quitosano de cáscara de camarón es un proceso de modificación química de la quitina, en el cual las unidades acetilo son eliminadas con tratamientos prolongados en álcalis altamente concentrados.

Han y colaboradores (2004) señalaron que la calidad del quitosano está determinada principalmente por dos factores: el grado de desacetilación que depende del número de pasos involucrados de hidrólisis y la viscosidad, la cual refleja el peso molecular.

Knorr (1982), indicó que el quitosano posee grupos amino y esto genera propiedades policatiónicas, de gelación y de dispersión muy deseables para sus múltiples aplicaciones. Según lo recopilado por Devlieghere y colaboradores (2004), las películas y recubrimientos basados en quitosano protegen los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos. Las cubiertas de quitosano se usan en peras, naranjas, melocotón y ciruelas como barrera para el dióxido de carbono y el oxígeno.

Wills y colaboradores (1981) indicaron que la mayoría de los géneros de hongos que atacan a la fruta en postcosecha son patógenos débiles que invaden a los tejidos a través de heridas causadas por el mal manejo, sin embargo algunos patógenos son capaces de penetrar la epidermis del fruto y abren camino para un amplio espectro de patógenos débiles. El quitosano inhibe el crecimiento de una gran variedad de bacterias y hongos, además tiene varias ventajas sobre otros desinfectantes, ya que posee una alta actividad antibacterial y en un espectro muy amplio, elimina en un gran porcentaje a los microorganismos, tiene baja toxicidad para las células de los mamíferos (Takemono y colaboradores, 1989).

En general la actividad antimicótica del quitosano se debe a su naturaleza policatiónica, reacciona con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas de la superficie celular. Actualmente se conoce que las películas de recubrimiento de quitosano presentan una acción contra microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos, lo cual es interesante para la preparación de alimentos mínimamente procesados y productos frescos como las frutas, su acción antimicrobiana la realizan privando a los microorganismos de iones vitales como el cobre, bloqueando o destruyendo la membrana celular, filtrando constituyentes intracelulares, y formando complejos polielectrolíticos con polímeros ácidos y células de superficie (Lian-Ying y Jiang-Feng, 2003).

Según lo recopilado por Xiao y colaboradores (2000), el quitosano interactúa con la membrana celular alterando su permeabilidad, por ejemplo en la fermentación para la panificación, la levadura es inhibida por compuestos catiónicos que actúan sobre la superficie celular para prevenir la entrada de glucosa. Se han realizado estudios de absorción ultravioleta, los cuales indicaron que el quitosano causa la salida de material proteínico de las células bacterianas a pH 5,8, es decir el quitosano muestra actividad antibacterial en un medio ácido. Otro mecanismo, involucra el enlace del quitosano con el ADN de las células para inhibir la síntesis del ARN (Leuba y colaboradores, 1985).

El propósito principal del trabajo fue utilizar un recubrimiento de quitosano en frutas de naranjilla, para evaluar la actividad antimicótica durante el almacenamiento y analizar la conveniencia de su uso en la comercialización.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Preparación de Quitosano.

Se prepararon dos tipos de quitosano, el primero denominado (QI) obtenido por un método indirecto según la tecnología desarrollada por Almeida y Arancibia (2005), mediante la cual se extrae la quitina de caparazones de camarón desproteinizados, desmineralizados y decolorados, luego se la desacetila, para obtener el quitosano; el segundo denominado (QD) obtenido por un método directo según la tecnología utilizada por Alvarado y colaboradores (2005) a partir de caparazones de camarón, en la cual las etapas de desproteinización fueron eliminadas, es decir el quitosano se obtiene de los caparazones desmineralizados mediante un tratamiento alcalino severo utilizando una solución 50% (w/w) de hidróxido de sodio a 100° C por 60 minutos. En la Figura 1 se indican los principales procesos y las fórmulas químicas de los compuestos obtenidos.

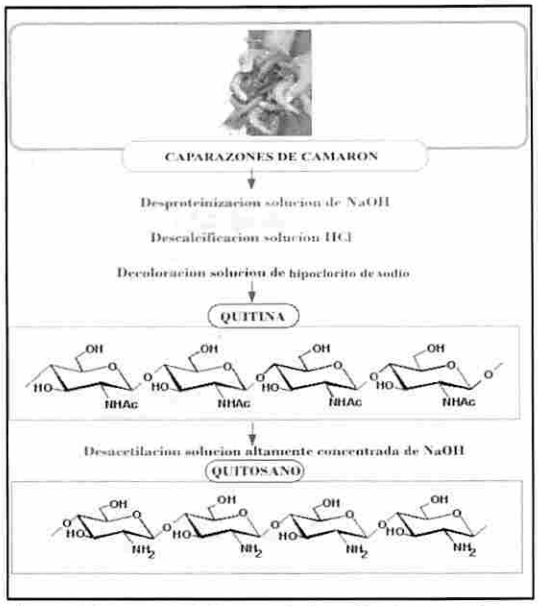


Figura 1. Esquema de la tecnología utilizada para obtener quitosano a partir de caparazones de camarón.

El peso molecular viscosimétrico del quitosano fue calculado por la ecuación de Mark-Houwink (Parada, 2004), las medidas de viscosidad en solución de acetato de sodio 0,2M y ácido acético 0,3 M se realizaron utilizando viscosimetros de Canon a 25°C, por duplicado. La ecuación utilizada es:

$$[\eta] = 0{,}074\ (M)^{0{,}76}$$

[η] es la viscosidad intrínsica y M es peso molecular viscosimétrico promedio.

El grado de desacetilación se determinó relacionando directamente el porcentaje de nitrógeno, determinado por micro Kjeldahl AOAC 14,068, mediante la ecuación presentada por Taboada (2003).

$$(\%D) = ((8{,}695 - N)/1{,}799)\ 100$$

(%D) es el porcentaje de desacetilación del quitosano y N es la cantidad de Nitrógeno expresada como porcentaje de la materia orgánica.

Preparación de la fruta.

Se utilizaron naranjillas (*Solanum quitoense)* variedad Agria, en la etapa de madurez fisiológica, sometidas a un periodo de preenfriado para evitar un posible deterioro después de la cosecha. Se seleccionó y eliminó aquellas frutas golpeadas, maltratadas o contaminadas y todas las impurezas existentes en la muestra. Las naranjillas seleccionadas se lavaron con agua fría clorada con una concentración de 300 ppm, con el fin de de remover impurezas y minimizar la carga microbiana. Luego se secaron a temperatura ambiente durante 3 horas y se colocaron en las cámaras de almacenamiento.

Preparación de las suspensiones para el recubrimiento de la fruta y condiciones de almacenamiento.

Las suspensiones para el recubrimiento de las frutas, se prepararon a partir de quitosano (QD) y (QI) al 0,75%, el quitosano se disolvió en una solución de ácido acético al 3% en los dos casos. Las suspensiones se calentaron hasta 60°C con agitación constante para disolver la mayor cantidad de quitosano, luego fueron enfriadas a temperatura ambiente y filtradas en lienzo fino para eliminar partículas suspendidas. El recubrimiento de las frutas se realizó por inmersión de éstas en la suspensión de quitosano a 20°C por 30 segundos y luego se secaron a temperatura ambiente por 24 horas.

Del lote de naranjillas se tomaron muestras para distribuirlas en cuatro temperaturas y humedades relativas (HR): 7,0 ± 0,5°C y 78 ± 1,6% HR; 20 ± 1,5°C y 66 ± 2% HR; 30 ± 1°C y 44 ± 1,5% HR; 40 ± 1°C y 37 ± 2 HR, en cada una de las cámaras se colocaron naranjillas con recubrimiento de quitosano obtenido por los dos métodos y naranjillas en su estado natural sin recubrimiento como control (SQ); todas las pruebas se realizaron con una réplica.

Recuentos de mohos y levaduras .

Se realizaron siembras en placas de Petrifilm para recuento de mohos y levaduras, cada siete días, según el método descrito en la Guía de Interpretación de 3M (1994), para el recuento de mohos y levaduras. Se pesó 1 g de cáscara de las naranjillas de todos los tratamientos y se realizaron diluciones (1:10 y 1:100) en agua peptonada esterilizada. Se realizó la siembra en placa de petrifilm específica para mohos y levaduras y se incubó a temperatura de 25±1°C durante 3 días. Finalmente se realizó el recuento en las placas con un contador de colonias estándar tipo Québec.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso viscosimétrico promedio del quitosano y grado de desacetilación.

La variación en los métodos de preparación de quitosano influye significativamente en el grado de desacetilación, la distribución de los grupos acetilo y la longitud y conformación estructural de la cadena polimérica, lo cual influye en la solubilidad y actividad antimicrobiana del quitosano (Tsai y colaboradores, 2002). Por ello se determinó el peso molecular viscosimétrico promedio del quitosano obtenido por el método directo, el cual fue de 2,13 * 10^5 g/mol, el doble que para el quitosano obtenido por el método indirecto 1,12 * 10^5 g/mol. Según estos valores el quitosano obtenido por el método directo posee un mayor número de unidades moleculares y consecuentemente una mayor cantidad de grupos amino que lo hacen más efectivo para reaccionar con otros constituyentes y favorece la acción antimicótica. En la Figura 2 se presenta la variación de la viscosidad específica sobre la concentración de la suspensión de quitosano (QI) a diferentes concentraciones, en dos solventes. Los valores del intercepto corresponden a la viscosidad intrínsica que conduce al cálculo del peso molecular.

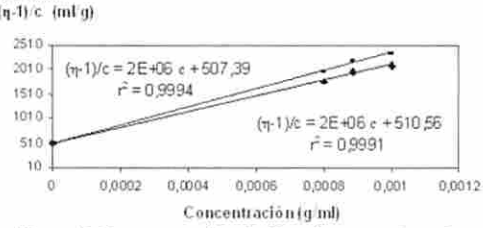


Figura 2. Representación de Huggins para datos de viscosidad a 25°C de soluciones de quitosano (QI), en acetato de sodio 0,2M y ácido acético 0,3M, para la determinación del peso molecular.

Las tecnologías utilizadas para la obtención de quitosano, provocan una muy alta desacetilación de la quitina, 99% en el caso (QD) y 95% en el caso (QI). Una mayor desacetilación hace que exista un mayor número de grupos amino libres, generándose un incremento de las propiedades policatiónicas, de gelación y de dispersión muy deseables para sus múltiples aplicaciones (Han y colaboradores, 2004).

Desarrollo de microorganismos

En la Figura 3 se presentan los resultados de las siembras en placa para recuento de mohos y levaduras, se observa que conforme aumenta el tiempo de almacenamiento se incrementa el número de unidades formadoras de colonias (UFC), a 7°C los recuentos son los más bajos y son mayores conforme aumenta la temperatura, registrándose los valores más altos a 30°C y 40°C.

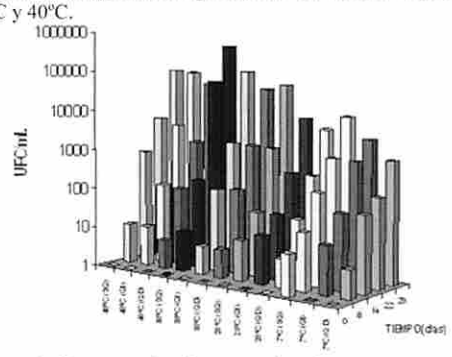


Figura 3. Recuento de hongos y levaduras en naranjillas almacenadas a cuatro temperaturas, recubiertas con quitosano obtenido por método directo (QD), indirecto (QI) y sin recubrimiento (SQ).

Hasta los 30°C las muestras recubiertas con una película de quitosano (QD) y (QI) presentan un número más bajo de hongos y levaduras cuando se las compara con las muestras control (SQ). Mediante análisis de varianza del número de [UFC/ml] se establecieron diferencias estadísticamente significativas para este factor, los contajes más altos corresponden a las muestras control, seguidos de las muestras (QI), contajes significativamente menores se registraron en las naranjillas recubiertas con quitosano obtenido por el método directo (QD), en consecuencia se comprueba que el quitosano tiene un efecto antimicótico observado por varios autores (Leuba y colaboradores, 1985; Takemono y colaboradores, 1989; Devlieghere y colaboradores, 2004; Han y colaboradores, 2004).

T [°C]	Quitosano Directo (QD)	Control (SQ)	Quitosano Indirecto (QI)
7	$N = 1{,}2701e^{0{,}2299\,t}$ $R^2 = 0{,}935$	$N = 3{,}0641e^{0{,}2731\,t}$ $R^2 = 0{,}9942$	$N = 1{,}9696e^{0{,}2597\,t}$ $R^2 = 0{,}9837$
20	$N = 0{,}3892e^{0{,}3166\,t}$ $R^2 = 0{,}9976$	$N = 0{,}2296e^{0{,}4053\,t}$ $R^2 = 0{,}9816$	$N = 0{,}9314e^{0{,}2939\,t}$ $R^2 = 0{,}9653$
30	$N = 0{,}249e^{0{,}4083\,t}$ $R^2 = 0{,}9906$	$N = 0{,}1416e^{0{,}5391\,t}$ $R^2 = 0{,}9791$	$N = 0{,}1361e^{0{,}454\,t}$ $R^2 = 0{,}9879$
40	$N = 0{,}1846e^{0{,}4225\,t}$ $R^2 = 0{,}995$	$N = 0{,}7754e^{0{,}4097\,t}$ $R^2 = 0{,}9594$	$N = 0{,}2748e^{0{,}4337\,t}$ $R^2 = 0{,}9989$

Tabla 1. Ecuaciones para el cálculo del número de hongos y levaduras (N en [UFC/ml]) a cuatro temperaturas como función del tiempo de almacenamiento de naranjillas (t en [días]).

En la Tabla 1 se presentan las ecuaciones exponenciales obtenidas por regresión con sus respectivos coeficientes de determinación, para el cálculo de mohos y levaduras según los datos obtenidos en naranjillas a distintos tiempos de almacenamiento para (QD), (SQ) y (QI). Fácilmente se puede calcular el número de unidades formadoras de mohos y levaduras por mililitro que es esperaría encontrar en naranjillas almacenadas a distintos tiempos o el tiempo en el cual se llegaría a un valor tope de éstos microorganismos. Así a 7°C fijando un valor de N = 10000 se obtiene: (QD) = 39,0 días, (QI) = 32,6 días y (SQ) = 29,6 días.

CONCLUSIONES

El recubrimiento con películas de quitosano tiene un efecto beneficioso para disminuir el crecimiento de mohos y levaduras, mejora la apariencia de los frutos, les confiere luminosidad en el color y además los protege de la pérdida excesiva de humedad, ayudando a mantener la textura y forma; puede ser aplicado en la conservación de naranjillas durante el almacenamiento y comercialización. La temperatura es el factor que más influye en el deterioro de los frutos, a la temperatura de refrigeración (7°C) las frutas mantienen su textura y conservan su forma hasta por un mes, sin que el crecimiento microbiano sea el factor determinante para definir el tiempo de almacenamiento.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato, Centro de Investigaciones y Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por el financiamiento a través de Proyectos Internos. Al Proyecto CYTED XI.20 por facilitar el intercambio de investigadores.

REFERENCIAS

- Almeida, A.V. y Arancibia, M.Y. 2005. Desarrollo de Tecnología para la Obtención de Quitina y Quitosano a partir del Caparazón de Camarón (Penaeus vannamei). Tesis para optar por el Título de Ingeniero en Alimentos. UTA-FCIAL. Ambato-Ecuador. 110p.
- Alvarado, J.de.D; Almeida, A.V. y Arancibia, M.Y. 2005. Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables. CIBIA V. Puerto Vallarta-México. 6p.
- Alvarado, J. de D. 2002. Propiedades físicas del fruto, pulpa y jugo de la naranjilla. *Ciencia y Tecnología*, 1:115-125.
- Devlieghere, F.; Vermeulen, A. and Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21:703-714.
- Guía 3 M Petrifilm. 1994. Placa para Recuento de Mohos y Levaduras. Guía de Interpretación.
- Han, C.; Zhao, Y. Lionard, SW. and Traber, M. 2004. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharv Biol Technol* 33(1):67–78.
- Knorr. D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *Journal of Food Science*. 47: 593-595
- Leuba, S. and Stossel, P. 1985. In Chitin in Nature and Technology. Muzzarelli, R. A. A.; Jeuniaux, C.; Gooday, C., Eds.; Plenum. New York. 217p.
- Lian-Ying Z. and Jiang-Feng , Z. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. China. *Carbohydrate Polymers* 54: 527–530.
- Parada, L.; Crespín, G. Miranda, R. Katime, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5(1).
- Pinelli Saavedra, A.; Toledo Guillén, A. Esquerra Brauer, I. Luviano Silva, A. e Higuera Ciapara, I. 1998. Métodos de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón. *Arch.. Latinoamer. Nutric.*, 48(1):58-61.
- Taboada, E. Cabrera, G. y Cardenas, G. 2003. Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *Journal of Chilean Chemical Society*. 48(1):7-12
- Takemono, K.; Sunamoto, J.; Akasi, M. *Polymers & Medical Care*; Mita: Chapter IV.
- Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C., Pan, C.L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from difference treatments and application of fish preservation *Fish Sci*. 68, 170-177.
- Wills, R. Lee, D, Graham, WB. MsGlason, and Hall, G. 1981. Postharvest and Introduction to the Physiology and Handling of Fruits and Vegetables. The AVI Publishing Co. Inc. Westport.
- Xiao, F.; Yun, L.; Dong, Z. Zhi, L. and Kang Y. 2000. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Polymeric Materials*, Tianjin University, China.

DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *BYSSOCHLAMYS FULVA* PRODUTOR DE PATULINA EM SUCO CLARIFICADO DE MAÇÃ

Sant´Ana, A.S.[1], Rosenthal, A.[2], Massaguer, P.R[1]

[1]UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos. Rua Monteiro Lobato. 80. CEP: 13083-862 - Caixa-Postal: 6121 - Campinas, SP - Brasil - Fone: (19) 3521-2174 - Fax: (19) 3289-4966. E-mail: asantana@fea.unicamp.br / esteril@unicamp.br

[2]Embrapa – CTAA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Palavras-chave: *Byssochlamys fulva*, resistência térmica, suco de maçã, patulina.

RESUMO

A resistência térmica de uma cepa de *Byssochlamys fulva* produtor de patulina foi determinada à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C em suco clarificado de maçã 11°Brix. Como o padrão observado de destruição térmica do microrganismo foi não logarítmico, utilizou-se a linearização de Alderton & Snell para determinação dos valores de k (D*) e Z*. Os valores de D* à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C foram respectivamente, 64,58 min, 16,68 min, 6,31 min e 3,1 min, enquanto o valor de Z* foi igual a 7,4°C, comprovando a elevada resistência térmica do microrganismo. Valores de F obtidos para as temperaturas de processo de 95°C, 98°C e 105°C foram respectivamente, 15,5 min, 6,1 min e 0,69 min, indicando que se houver contaminação por ascósporos de *B.fulva* produtor de patulina na matéria-prima, de resistência térmica equivalente à cepa estudada, o fungo sobreviverá ao processo térmico.

INTRODUÇÃO

Por definição, fungos termoresistentes produzem estruturas (ascos e ascósporos e estruturas com paredes espessas como clamidósporos, aleurosporos, esclerótios), que os permite sobreviver à exposição à 75°C por 30 minutos (Samson *et al.*, 2000). O solo representa o principal reservatório destes microrganismos (Jesenká, Piecková e Bernát, 1992) e desta forma, as frutas que têm contato com o solo são as mais susceptíveis a contaminação por *Byssochlamys* e outros fungos termoresistentes. A grande preocupação com a presença de bolores termoresistentes em frutas e derivados se deve ao fato de alguns gêneros como *Byssochlamys spp* serem capazes de crescer sob baixas tensões de oxigênio (Hocking e Pitt, 1984) e de produzirem micotoxinas, como patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina, variotina, fumitremorginas A e C, verrucológeno, fischerina e eupenifeldina, que apresentam diversos efeitos adversos aos animais e possivelmente ao homem (Tournas, 1994). Na prática industrial, a etapa de pasteurização é a principal responsável por assegurar a estabilidade microbiológica de produtos derivados de frutas e para determinação dos parâmetros de tempo/temperatura adequados, deve-se conhecer os valores D e Z dos microrganismos alvo. Este trabalho teve por objetivo determinar os parâmetros cinéticos de inativação em tubos TDT de uma cepa de *B.fulva* produtora de patulina à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C em suco clarificado de maçã 11°Brix e calcular o valor de F do processo nas condições de temperatura mais usadas pela indústria, considerando-se uma taxa de defeito de 1 embalagem não estéril em 10^4 produzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma suspensão de ascos/ascósporos de *B.fulva* IOC 4518 previamente preparada conforme Baglione (1998) foi utilizada no estudo. Dentre cepas produtoras de patulina, *B.fulva* IOC 4518 (212 ppb à 30°C/14 dias), foi selecionado em virtude de ter sido capaz de sobreviver após choque térmico de 95°C/5 min. A resistência térmica foi determinada utilizando-se tubos TDT estéreis (8mm x 6mm) preenchidos com 1,0 mL de suco clarificado de maçã (pasteurizado anteriormente à 105°C por 10 minutos) à 11°Brix e inoculados com 1,0 mL da suspensão de ascósporos com sua concentração ajustada em 10^7 esporos/mL. Após a homogeneização, os tubos foram selados com auxílio de maçarico e colocados em banho termostático (Polystat®, Poly Science, IL, USA, com ± 0,1°C de precisão), previamente ajustado às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C. A escolha destes valores é justificada pelo fato de representarem a faixa de temperatura de pasteurização de sucos de frutas (entre 85°C e 105°C). Aos tempos de aquecimento, acrescentou-se os tempos de atraso térmico, determinados com 1,0 mL de suco clarificado de maçã e 1,0 mL de água destilada. Após cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram rapidamente e resfriados em banho de gelo, até a temperatura ambiente e assepticamente abertos. Em seguida, diluições decimais sucessivas foram preparadas, sendo inoculadas em MEA formulado (g/L: ágar, 20; extrato de malte, 20; glicose, 20 e peptona, 1), 1 mL de alíquota, em profundidade. As placas em duplicata foram incubadas sem inverter à 30°C por até 10 dias e as contagens foram expressas como número de esporos/mL. Através do número de sobreviventes e dos respectivos tempos de aquecimento, foram construídas as curvas de sobreviventes regressionando os dados do logaritmo da população contra o tempo. Como o comportamento cinético de inativação observado foi não-logarítmico, utilizou-se a fórmula empírica $(\log N_0 - \log N_t)^a = kt + C$, de acordo com Alderton e Snell (1970), onde "N_0" é a contagem inicial de ascósporos ativada e "N_t" é o número de ascósporos sobreviventes por mL de suco aquecido por um dado tempo; "a" é o expoente para linearização obtido pelo inverso da inclinação de $\log(\log N_0 - \log N_t)$ contra $\log t$ e o valor de "a" obtido para a menor temperatura (85°C) foi utilizado para linearizar as curvas dos tratamentos mais severos (90°C, 92°C e 95°C); "C" é o intercepto e "t" é o tempo de aquecimento em minutos. Considerando-se que a taxa de destruição segue exatamente esta expressão e que não haja erros experimentais, o valor de C deveria ser zero. O valor $1/k$ é derivado da fórmula $1/k = t/(\log N_0 - \log N_t)^a$ e assumindo C=0, é igual a $D = t/(\log N_0 - \log N_t)$ em função. O valor $1/k$ (D*) é definido como a taxa de destruição não logarítmica e corresponde a D em cinéticas de destruição logarítmicas. O valor de $-(\log k)$, representado contra a temperatura pode fornecer um parâmetro comparável a Z, chamado Z*, calculado pelo negativo do inverso da inclinação desata curva. Posteriormente, calculou-se o valor F de esterilização para o suco clarificado de maçã, de maneira a se verificar se as condições de processo aplicadas industrialmente são suficientes para destruir ascósporos de *Byssochlamys fulva*. O valor F de esterilização foi calculado a partir da equação $F = \gamma D$, onde γ é o número de reduções decimais e D é equivalente à $1/k$. Como os processos comerciais mais comumente aplicados correspondem a 95°C/20 s e 95°C/30 s, utilizou-se o valor de $1/k$ obtido para esta temperatura para determinação do valor de F à 95°C. A temperatura de 98°C é também considerada referência para o tratamento térmico de sucos e como atualmente, algumas indústrias têm aplicado também o processo de 105°C/30 s, obteve-se o valor referente a $1/k$ para 98°C e 105°C, usando-se o valor de Z. O cálculo do valor F considerou 10 ascósporos de *B.fulva* para cada embalagem de 1 L (1 ascósporo/100 mL de suco), de acordo com a carga de contaminação encontrada comercialmente (Hocking e Pitt, 1984; Massaguer, 2003) e a taxa de defeitos foi fixada em 1 embalagem contaminada para cada 10^4 fabricadas (5 reduções decimais).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1 e 2 são mostradas as curvas de sobreviventes de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C. Como se podem observar, todas as curvas de sobreviventes são caracterizadas pela presença de ombro extenso seguido de queda rápida nas contagens de sobreviventes. À 85°C um ombro prolongado foi observado até o 60° minuto de aquecimento, seguindo-se uma

Hasta los 30°C las muestras recubiertas con una película de quitosano (QD) y (QI) presentan un número más bajo de hongos y levaduras cuando se las compara con las muestras control (SQ). Mediante análisis de varianza del número de [UFC/ml] se establecieron diferencias estadísticamente significativas para este factor, los contajes más altos corresponden a las muestras control, seguidos de las muestras (QI), contajes significativamente menores se registraron en las naranjillas recubiertas con quitosano obtenido por el método directo (QD), en consecuencia se comprueba que el quitosano tiene un efecto antimicótico observado por varios autores (Leuba y colaboradores, 1985; Takemono y colaboradores, 1989; Devlieghere y colaboradores, 2004; Han y colaboradores, 2004).

T [°C]	Quitosano Directo (QD)	Control (SQ)	Quitosano Indirecto (QI)
7	$N = 1{,}2701e^{0{,}2299\,t}$ $R^2 = 0{,}935$	$N = 3{,}0641e^{0{,}2731\,t}$ $R^2 = 0{,}9942$	$N = 1{,}9696e^{0{,}2597\,t}$ $R^2 = 0{,}9837$
20	$N = 0{,}3892e^{0{,}3166\,t}$ $R^2 = 0{,}9976$	$N = 0{,}2296e^{0{,}4089\,t}$ $R^2 = 0{,}9816$	$N = 0{,}9314e^{0{,}2939\,t}$ $R^2 = 0{,}9653$
30	$N = 0{,}249e^{0{,}4083\,t}$ $R^2 = 0{,}9906$	$N = 0{,}1416e^{0{,}5381\,t}$ $R^2 = 0{,}9791$	$N = 0{,}1361e^{0{,}454\,t}$ $R^2 = 0{,}9879$
40	$N = 0{,}1846e^{0{,}4228\,t}$ $R^2 = 0{,}995$	$N = 0{,}7754e^{0{,}4097\,t}$ $R^2 = 0{,}9594$	$N = 0{,}2748e^{0{,}4337\,t}$ $R^2 = 0{,}9989$

Tabla 1. Ecuaciones para el cálculo del número de hongos y levaduras (N en [UFC/ml]) a cuatro temperaturas como función del tiempo de almacenamiento de naranjillas (t en [días]).

En la Tabla 1 se presentan las ecuaciones exponenciales obtenidas por regresión con sus respectivos coeficientes de determinación, para el cálculo de mohos y levaduras según los datos obtenidos en naranjillas a distintos tiempos de almacenamiento para (QD), (SQ) y (QI). Fácilmente se puede calcular el número de unidades formadoras de mohos y levaduras por mililitro que es esperaría encontrar en naranjillas almacenadas a distintos tiempos o el tiempo en el cual se llegaría a un valor tope de éstos microorganismos. Así a 7°C fijando un valor de N = 10000 se obtiene: (QD) = 39,0 días, (QI) = 32,6 días y (SQ) = 29,6 días.

CONCLUSIONES

El recubrimiento con películas de quitosano tiene un efecto beneficioso para disminuir el crecimiento de mohos y levaduras, mejora la apariencia de los frutos, les confiere luminosidad en el color y además los protege de la pérdida excesiva de humedad, ayudando a mantener la textura y forma; puede ser aplicado en la conservación de naranjillas durante el almacenamiento y comercialización. La temperatura es el factor que más influye en el deterioro de los frutos, a la temperatura de refrigeración (7°C) las frutas mantienen su textura y conservan su forma hasta por un mes, sin que el crecimiento microbiano sea el factor determinante para definir el tiempo de almacenamiento.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato, Centro de Investigaciones y Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por el financiamiento a través de Proyectos Internos. Al Proyecto CYTED XI.20 por facilitar el intercambio de investigadores.

REFERENCIAS

- Almeida, A.V. y Arancibia, M.Y. 2005. Desarrollo de Tecnología para la Obtención de Quitina y Quitosano a partir del Caparazón de Camarón (Penaeus vannamei). Tesis para optar por el Título de Ingeniero en Alimentos. UTA-FCIAL. Ambato-Ecuador. 110p.
- Alvarado, J.de.D; Almeida, A.V. y Arancibia, M.Y. 2005. Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables. CIBIA V. Puerto Vallarta-México. 6p.
- Alvarado, J. de D. 2002. Propiedades físicas del fruto, pulpa y jugo de la naranjilla. *Ciencia y Tecnología,* 1:115-125.
- Devlieghere, F.; Vermeulen, A. and Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21:703-714.
- Guía 3 M Petrifilm. 1994. Placa para Recuento de Mohos y Levaduras. Guía de Interpretación.
- Han, C.; Zhao, Y. Lionard, SW. and Traber, M. 2004. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharv Biol Technol* 33(1):67–78.
- Knorr. D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *Journal of Food Science.* 47: 593-595
- Leuba, S. and Stossel, P. 1985. In Chitin in Nature and Technology. Muzzarelli, R. A. A.; Jeuniaux, C.; Gooday, C., Eds.; Plenum. New York. 217p.
- Lian-Ying Z. and Jiang-Feng , Z. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. China. *Carbohydrate Polymers* 54: 527–530.
- Parada, L.; Crespin, G. Miranda, R. Katime, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5(1).
- Pinelli Saavedra, A.; Toledo Guillén, A. Esquerra Brauer, I. Luviano Silva, A. e Higuera Ciapara, I. 1998. Métodos de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón. *Arch.. Latinoamer. Nutric.*, 48(1):58-61.
- Taboada, E. Cabrera, G. y Cardenas, G. 2003. Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *Journal of Chilean Chemical Society*. 48(1):7-12
- Takemono, K.; Sunamoto, J.; Akasi, M. *Polymers & Medical Care*; Mita: Chapter IV.
- Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C., Pan, C.L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from difference treatments and application of fish preservation *Fish Sci.* 68, 170-177.
- Wills, R. Lee, D, Graham, WB. MsGlason, and Hall, G. 1981. Postharvest and Introduction to the Physiology and Handling of Fruits and Vegetables. The AVI Publishing Co. Inc. Westport.
- Xiao, F.; Yun, L.; Dong, Z. Zhi, L. and Kang Y. 2000. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Polymeric Materials*, Tianjin University, China.

DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *BYSSOCHLAMYS FULVA* PRODUTOR DE PATULINA EM SUCO CLARIFICADO DE MAÇÃ

Sant´Ana, A.S.[1], Rosenthal, A.[2], Massaguer, P.R[1]

[1]UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos. Rua Monteiro Lobato. 80. CEP: 13083-862 - Caixa-Postal: 6121 - Campinas, SP - Brasil - Fone: (19) 3521-2174 - Fax: (19) 3289-4966. E-mail: asantana@fea.unicamp.br / esteril@unicamp.br

[2]Embrapa – CTAA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Palavras-chave: *Byssochlamys fulva*, resistência térmica, suco de maçã, patulina.

RESUMO

A resistência térmica de uma cepa de *Byssochlamys fulva* produtor de patulina foi determinada à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C em suco clarificado de maçã 11°Brix. Como o padrão observado de destruição térmica do microrganismo foi não logarítmico, utilizou-se a linearização de Alderton & Snell para determinação dos valores de k (D*) e Z*. Os valores de D* à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C foram respectivamente, 64,58 min, 16,68 min, 6,31 min e 3,1 min, enquanto o valor de Z* foi igual a 7,4°C, comprovando a elevada resistência térmica do microrganismo. Valores de F obtidos para as temperaturas de processo de 95°C, 98°C e 105°C foram respectivamente, 15,5 min, 6,1 min e 0,69 min, indicando que se houver contaminação por ascósporos de *B.fulva* produtor de patulina na matéria-prima, de resistência térmica equivalente à cepa estudada, o fungo sobreviverá ao processo térmico.

INTRODUÇÃO

Por definição, fungos termoresistentes produzem estruturas (ascos e ascósporos e estruturas com paredes espessas como clamidósporos, aleurosporos, esclerótios), que os permite sobreviver à exposição à 75°C por 30 minutos (Samson *et al.*, 2000). O solo representa o principal reservatório destes microrganismos (Jesenká, Piecková e Bernát, 1992) e desta forma, as frutas que têm contato com o solo são as mais susceptíveis a contaminação por *Byssochlamys* e outros fungos termoresistentes. A grande preocupação com a presença de bolores termoresistentes em frutas e derivados se deve ao fato de alguns gêneros como *Byssochlamys spp* serem capazes de crescer sob baixas tensões de oxigênio (Hocking e Pitt, 1984) e de produzirem micotoxinas, como patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina, variotina, fumitremorginas A e C, verrucológeno, fischerina e eupenifeldina, que apresentam diversos efeitos adversos aos animais e possivelmente ao homem (Tournas, 1994). Na prática industrial, a etapa de pasteurização é a principal responsável por assegurar a estabilidade microbiológica de produtos derivados de frutas e para determinação dos parâmetros de tempo/temperatura adequados, deve-se conhecer os valores D e Z dos microrganismos alvo. Este trabalho teve por objetivo determinar os parâmetros cinéticos de inativação em tubos TDT de uma cepa de *B.fulva* produtora de patulina à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C em suco clarificado de maçã 11°Brix e calcular o valor de F do processo nas condições de temperatura mais usadas pela indústria, considerando-se uma taxa de defeito de 1 embalagem não estéril em 10^4 produzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma suspensão de ascos/ascósporos de *B.fulva* IOC 4518 previamente preparada conforme Baglione (1998) foi utilizada no estudo. Dentre cepas produtoras de patulina, *B.fulva* IOC 4518 (212 ppb à 30°C/14 dias), foi selecionado em virtude de ter sido capaz de sobreviver após choque térmico de 95°C/5 min. A resistência térmica foi determinada utilizando-se tubos TDT estéreis (8mm x 6mm) preenchidos com 1,0 mL de suco clarificado de maçã (pasteurizado anteriormente à 105°C por 10 minutos) à 11°Brix e inoculados com 1,0 mL da suspensão de ascósporos com sua concentração ajustada em 10^7 esporos/mL. Após a homogeneização, os tubos foram selados com auxílio de maçarico e colocados em banho termostático (Polystat®, Poly Science, IL, USA, com ± 0,1°C de precisão), previamente ajustado às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C. A escolha destes valores é justificada pelo fato de representarem a faixa de temperatura de pasteurização de sucos de frutas (entre 85°C e 105°C). Aos tempos de aquecimento, acrescentou-se os tempos de atraso térmico, determinados com 1,0 mL de suco clarificado de maçã e 1,0 mL de água destilada. Após cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram rapidamente e resfriados em banho de gelo, até a temperatura ambiente e assepticamente abertos. Em seguida, diluições decimais sucessivas foram preparadas, sendo inoculadas em MEA formulado (g/L: ágar, 20; extrato de malte, 20; glicose, 20 e peptona, 1), 1 mL de alíquota, em profundidade. As placas em duplicata foram incubadas sem inverter à 30°C por até 10 dias e as contagens foram expressas como número de esporos/mL. Através do número de sobreviventes e dos respectivos tempos de aquecimento, foram construídas as curvas de sobreviventes regressionando os dados do logaritmo da população contra o tempo. Como o comportamento cinético de inativação observado foi não-logarítmico, utilizou-se a fórmula empírica $(\log N_0 - \log N_t)^a = kt + C$, de acordo com Alderton e Snell (1970), onde "N_0" é a contagem inicial de ascósporos ativada e "N_t" é o número de ascósporos sobreviventes por mL de suco aquecido por um dado tempo; "a" é o expoente para linearização obtido pelo inverso da inclinação de $\log(\log N_0 - \log N_t)$ contra $\log t$ e o valor de "a" obtido para a menor temperatura (85°C) foi utilizado para linearizar as curvas dos tratamentos mais severos (90°C, 92°C e 95°C); "C" é o intercepto e "t" é o tempo de aquecimento em minutos. Considerando-se que a taxa de destruição segue exatamente esta expressão e que não haja erros experimentais, o valor de C deveria ser zero. O valor $1/k$ é derivado da fórmula $1/k = t/(\log N_0 - \log N_t)^a$ e assumindo C=0, é igual a $D = t/(\log N_0 - \log N_t)$ em função. O valor $1/k$ (D*) é definido como a taxa de destruição não logarítmica e corresponde a D em cinéticas de destruição logarítmicas. O valor de $-(\log k)$, representado contra a temperatura pode fornecer um parâmetro comparável a Z, chamado Z*, calculado pelo negativo do inverso da inclinação desata curva. Posteriormente, calculou-se o valor F de esterilização para o suco clarificado de maçã, de maneira a se verificar se as condições de processo aplicadas industrialmente são suficientes para destruir ascósporos de *Byssochlamys fulva*. O valor F de esterilização foi calculado a partir da equação $F = \gamma D$, onde γ é o número de reduções decimais e D é equivalente à $1/k$. Como os processos comerciais mais comumente aplicados correspondem a 95°C/20 s e 95°C/30 s, utilizou-se o valor de $1/k$ obtido para esta temperatura para determinação do valor de F à 95°C. A temperatura de 98°C é também considerada referência para o tratamento térmico de sucos e como atualmente, algumas indústrias têm aplicado também o processo de 105°C/30 s, obteve-se o valor referente a $1/k$ para 98°C e 105°C, usando-se o valor de Z. O cálculo do valor F considerou 10 ascósporos de *B.fulva* para cada embalagem de 1 L (1 ascósporo/100 mL de suco), de acordo com a carga de contaminação encontrada comercialmente (Hocking e Pitt, 1984; Massaguer, 2003) e a taxa de defeitos foi fixada em 1 embalagem contaminada para cada 10^4 fabricadas (5 reduções decimais).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1 e 2 são mostradas as curvas de sobreviventes de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C. Como se podem observar, todas as curvas de sobreviventes são caracterizadas pela presença de ombro extenso seguido de queda rápida nas contagens de sobreviventes. À 85°C um ombro prolongado foi observado até o 60° minuto de aquecimento, seguindo-se uma

rápida queda da população de sobreviventes até o 95º minuto. À 90ºC, o ombro foi observado até sétimo minuto, a partir do qual observou-se uma queda rápida até o décimo oitavo minuto. À 92ºC, um ombro prolongado foi observado até 200 s, seguido de uma queda rápida até 340 s. Já a 95ºC, o ombro foi observado até 120 s, onde a população de sobreviventes era de 4,5 x 10^5 esporos/mL e foi seguida por uma queda extremamente rápida na população de sobreviventes (10^0 esporos/mL) até o tempo de 170 s. Apesar da redução do tamanho do ombro com o aumento da temperatura, uma tendência a linearização não foi observada nas temperaturas testadas, ao contrário do encontrado por Casella *et al.* (1990), trabalhando com *B.nivea* com o aumento da temperatura, principalmente em faixa próxima a 90ºC.

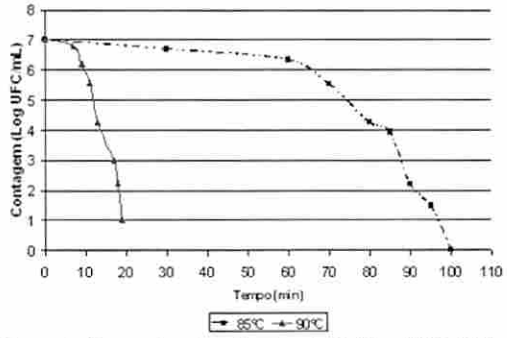


Figura 1. Curva de sobreviventes de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 85°C e 90°C.

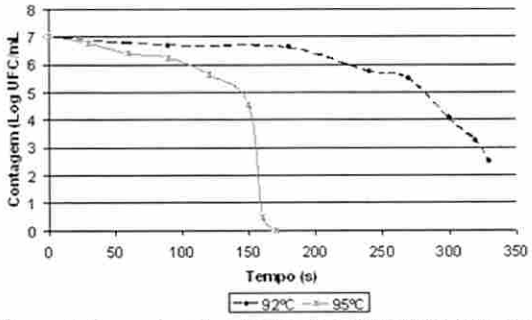


Figura 2. Curva de sobreviventes de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 92°C e 95°C.

Desta forma, utilizou-se a abordagem de Alderton e Snell (1970) para o tratamento dos dados. Na Figura 3 é mostrada a equação da reta e o valor do coeficiente de correlação para determinação do valor de "a" à 85ºC.

A partir da determinação do valor de "a" (0,220137592) à 85ºC, linearizou-se as demais curvas para determinação do valor de "k" (coeficiente angular da reta à 85ºC, 90ºC, 92ºC e 95ºC) (Figuras 4 e 5).

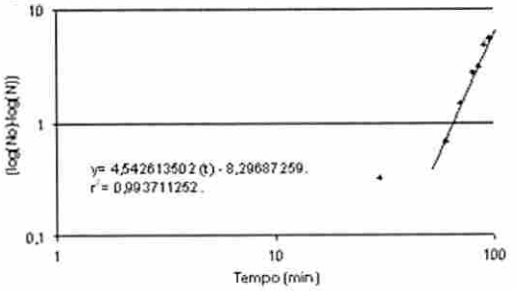


Figura 3. Determinação do valor de "a" para *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã à 85ºC.

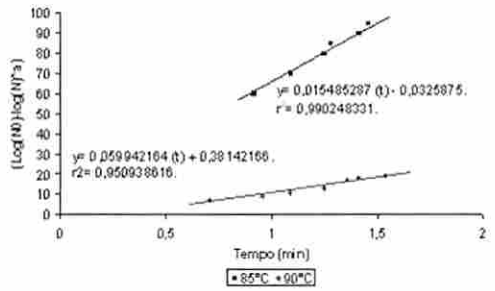


Figura 4. Curva de sobreviventes linearizada de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 85°C e 90°C.

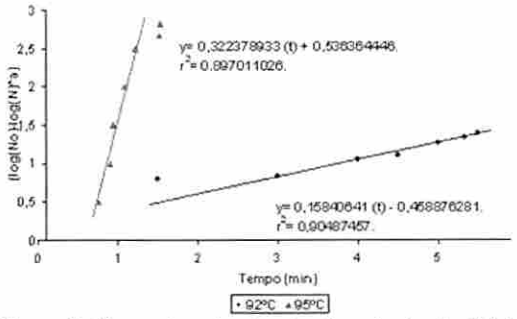


Figura 5. Curva de sobreviventes linearizada de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 92°C e 95°C.

Na Tabela 1 são mostrados os valores de "k" e D* para cada temperatura na qual se determinou a resistência térmica de *B.fulva* IOC 4518. Os valores de k e D* obtidos à 85ºC, 90ºC, 92ºC e 95ºC confirmam que a cepa de *B.fulva* estudada apresenta elevada resistência térmica (ver valores de k e D* na *Tabela 1*. King, Bayne e Alderton (1979), reportaram valores de k e C iguais a 0,040 e 0,292, respectivamente para *B.fulva*, tendo como meio de aquecimento uma solução de 0,5% ácido tartárico com 16% de glicose e pH 5,0. A maior resistência térmica do fungo obtida por estes autores (25 min contra 16,68 min do presente estudo, à 90ºC) pode dever-se ao fato do meio de aquecimento possuir concentração mais elevada de açúcares do que o suco de maçã (11°Brix), o que sabidamente protege os ascos/ascósporos dos efeitos deletérios do calor.

O valor de 1/k ou D* à 90ºC apresenta-se marginalmente superior em relação aos reportados por Bayne e Michener (1979), que encontraram um valor D observado experimentalmente para ascósporos de *B.fulva* variando entre 1,3 min e 15 min. Hoffmann (2004) determinou a resistência térmica de *B.nivea* em suco de maçã à 85ºC, obtendo um valor equivalente a D (1/k) para esta temperatura igual à 90,9 min. Recentemente, Houbraken *et al.* (2006), reportaram que os valores D à 85ºC para *B.spectabilis* podem variar entre 47 e 75 minutos e descrevem que esta espécie é uma das mais termoresistentes dentre os bolores termoresistentes.

Tabela 1. Valores de "k", D* (min) às temperaturas de 85ºC, 90ºC, 92ºC e 95ºC e valor de Z* (ºC) para *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã.

Temperatura	k	D* (min)
85ºC	0,015485287	64,58
90ºC	0,059942164	16,68
92ºC	0,15840641	6,31
95ºC	0,322378933	3,10
Z* (ºC)	7,4	

O valor de D* à 95°C (1/k) obtido foi igual 3,10 min, o suficiente para permitir que o fungo sobreviva às condições de pasteurização normalmente utilizadas pelas indústrias de sucos, nas quais tempos entre 10 e 30 s nesta temperatura são comumente aplicados. Já o valor Z* obtido (7,4°C) foi marginalmente superior ao reportado na literatura, que varia entre 4 e 7°C (valor médio de 5°C) (Tournas, 1994). Os valores de F para o processamento de suco clarificado de maçã, tendo como alvo *B.fulva* IOC 4518 e considerando-se as temperaturas de processo de 95°C, 98°C e 105°C são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de F (min) para pasteurização de suco clarificado de maçã à 95°C, 98°C e 105°C considerando-se *B.fulva* IOC 4518 como alvo e taxa de defeitos de 1 embalagem em 10^4 produzidas.

Temperatura (°C)	F (min)
95	15,5
98	6,09
105	0,69

Considerando-se que a temperatura mais comumente aplicada para pasteurização do suco de maçã é a de 95°C, pode-se afirmar que se um fungo com resistência térmica equivalente à de *B.fulva* IOC 4518 for contaminante da matéria-prima (fruta ou suco), o processo térmico não será capaz de causar nenhuma redução decimal na população do microrganismo o que culminará em surtos de deterioração dos produtos processados. Apesar disso, os poucos relatos de surtos de deterioração por estes microrganismos em sucos de frutas, podem ser explicados por uma combinação muito mais dependente da baixa freqüência de ocorrência destes microrganismos e das pequenas populações dos microrganismos (que podem conter ascósporos com elevada resistência térmica), do que da eficiência do processo térmico em garantir a eliminação de ascósporos de bolores termoresistentes. Considerando-se os parâmetros de inativação térmica da cepa de *B.fulva* IOC 4518 estudada, pode-se inferir que somente o binômio de 105°C por 42 s seria capaz de garantir que a probabilidade de deterioração de um lote com 10000 embalagens produzidas fosse igual a um. Apesar disso, é preciso avaliar-se com cuidado as perdas nutricionais e sensoriais do produto aquecido e para manutenção destas características mantendo a qualidade e segurança do produto, sugere-se o controle rigoroso da qualidade da matéria-prima no campo de maneira evitar-se o contato das frutas com o solo e na etapa de recepção, seleção e lavagem das frutas, para reduzir-se quaisquer contaminantes remanescentes e desta forma reduzir a probabilidade de deterioração dos sucos produzidos.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que cepas extremamente termoresistentes de *B.fulva* podem ocorrer nas matérias-primas e conseqüentemente serem capazes de sobreviverem aos processos térmicos comumente aplicados para garantir a estabilidade microbiológica dos sucos de frutas. Baseando-se nos valores D* e Z* obtidos, somente uma temperatura de processo de 105°C por no mínimo 42 s, seria capaz de garantir que se atingisse uma probabilidade de unidades não estéreis de 1 em 10000 embalagens produzidas, sugerindo que o controle de qualidade da matéria-prima e as boas práticas agrícolas são críticos para prevenir surtos de deterioração por bolores termoresistentes e ao mesmo tempo preservar os valores nutricionais e sensoriais dos sucos de maçã.

AGRADECIMENTOS

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPQ), *Fundação de Desenvolvimento da Unicamp* (Funcamp) (Processo 282/2006) e PRODETAB (EMBRAPA).

REFERENCIAS

Houbraken, J.; Samson, R.A.; Frisvad, J.C. *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. In: Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Samson, R.A.; Thrane, U. Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine Biology – v.571. New York:Springer, 2006, p.211-224.

Tournas, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. Critical Reviews in Microbiology, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. Introduction to food- and airborne fungi. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

Bayne, H.G.; Michener, H.D. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. Applied and Environmental Microbiology, v.37, n.3, p.449-453, 1979.

Hocking, A.D., Pitt, J.I. Food Spoilage fungi. II. Heat-resistant fungi. CSIRO Food Research Quaterly, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

King, A.D., Bayne, H.G., Alderton, G. Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssochlamys fulva* and other microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, v.37, n.3, p.596-600, 1979.

Massaguer, P.R. Relatório Parcial do Projeto "Segurança microbiológica de sucos e drinks envasados assepticamente". Projeto nº035-02/98 PRODETAB, 2003.

Alderton, J.; Snell, N. Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. Applied Microbiology, v. 19, p.565-572. 1970.

Casella, M.L.A., Matasci, F., Schmidt-Lorenz, W. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. LWT, v.23, p.404-411, 1990.

Jesenská, Z.; Piecková, E.; Bernát, D. Heat resistant fungi in the soil. International Journal of Food Microbiology, v.16, n.3, p.209-214, 1992.

Hofmann, M.V.G.S. Estudo de resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Baglione, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

USO DE LA TÉCNICA DE PCR PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE UNA LEVADURA CONTAMINANTE DE VINO

Claudio Martínez Fernández, Angélica Ganga, Angela Contreras Castro*
Universidad de Santiago de Chile, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Avanzada.
Obispo Manuel Umaña Nº 050. Santiago, Chile.

Palabras claves: *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*, Levaduras vínicas, PCR, microbiología clásica, secuencias nucleotídicas especie específicas.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Brettanomyces* son contaminantes frecuentes del vino y de entre éstas la especie *Brettanomyces bruxellensis* es predominante, siendo la causante de grandes pérdidas sufridas por esta industria. Dichas levaduras generan malos olores, descritos como olor a orina de caballo, olor a ratón mojado, entre otros (1). Su eliminación es compleja dado que normalmente esta presente en el ambiente viñero, siendo altamente resistente al sulfito y a altas concentraciones de etanol (2).

En Chile se ha estimado que el deterioro causado por *Brettanomyces bruxellensis*, sólo en vino embotellado, provocaría pérdidas que ascienden a US$ 30.000.000 anuales(3). Actualmente no existe un sistema de detección microbiológico específico para *Brettanomyces bruxellensis*, puesto que las características que pudiesen identificarla fisiológicamente están presentes también en otras levaduras vínicas, lo que lleva a errores en su determinación. Por ello el uso de técnicas genético moleculares de detección surgen como una alternativa confiable, al basarse éstas en la identificación de secuencias del genoma específicas de la especie. Debido a lo antes expuesto, en esta tesis se desarrolló un método de detección confirmatoria de *Brettanomyces bruxellensis* que utiliza la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), y que permite dar un resultado fiable, utilizando un menor tiempo de análisis que los métodos microbiológicos clásicos y a la mitad del costo de otras técnicas moleculares equivalentes.

METODOLOGÍA

Material biológico: Las cepas se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP-USACH) y correspondieron a: *Brettanomyces bruxellensis, Saccharomyces cerevisiae, Metschnikowia pulcherrima, Pichia anómala, Candida agresti* y *Torulaspora delbruckii*. Las cepas analizadas por el método desarrollado en este estudio correspondieron a 16 cepas *Brettanomyces bruxellensis* provenientes de distintas regiones de Chile y Argentina, *Brettanomyces anómala* (USA), *Pichia scolyti* y *Metschnikowia pulcherrima* (España), *Saccharomyces ayanus*, *Torulaspora delbruckii* y *Zygosaccharomyces bailli* (Chile). Todas las cepas de levaduras aisladas fueron crecidas en caldo YPD (0.5% extracto de levadura, 0.5 % peptona y 2% glucosa) a 28 ºC, en agitación durante una noche. Las cepas de levadura provenientes de muestras de vino fueron crecidas en agar YPD con 100 ppm de ciclohexamida y 50 ppm de estreptomicina, a 28 ºC por 7-10 días.

Partidores: Los partidores evaluados fueron obtenidos de estudios anteriores (Martínez, C. comunicación personal), y fueron los siguientes: **LAMAP 1 F** de 20 pb y 45% GC, **LAMAP 1 R** de 16 pb y 56% GC, **LAMAP 2 F** de 16 pb y 63% GC, **LAMAP 2 R** de 18 pb y 50% GC, **LAMAP 3 F** de 16 pb y 56% GC, **LAMAP 3 R** de 16 pb y 63% GC, **LAMAP 4 F** de 16 pb y 56% GC, y **LAMAP 4 R** de 18 pb y 50% GC.

Control interno: Se utilizó ADN del plasmidio pBluescript SK, el cual genera una banda electroforética de 165 pb al ser amplificado por PCR con los partidores T_3 y T_7.

Pre-optimización de la reacción de PCR: Las muestras de ADN fueron extraídas utilizando el protocolo *Wizard® (Promega)*. La mezcla de reacción fue de 50 µL, donde se incluyó: buffer 1x (KCl y Tris-HCl) y enzima *Pfu* polimerasa (0.2 ng/µL). Además, se utilizaron concentraciones de ADN (2-0.8 ng/µL), desoxinucleótidos trifosfato (0.1-0.4 mM), cloruro de magnesio (1.5-3.0 mM) y un par de partidores seleccionados en la etapa anterior (0.2-0.5 µM), concentraciones que fueron variadas en los rangos descritos en paréntesis. Por otra parte, se evaluaron las temperaturas de hibridación de 45-53ºC. El método estadístico utilizado para determinar los factores relevantes fue un diseño factorial 2^5, el cual arrojo 32 experimentos más dos puntos medios. El programa de PCR utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a una temperatura de 95ºC, durante 10 minutos. Además incluyó 40 ciclos consistentes en tres etapas, una primera etapa de desnaturalización a 95ºC por un minuto, una segunda etapa de hibridación a 45 ºC, 49ºC ó 53ºC, y una etapa de elongación a 72ºC, durante un minuto. Finalmente, se incluyo una etapa de 7 minutos a 72ºC. Los productos de la reacción de PCR fueron analizados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.4%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV *(Vilberlourmat)*

Optimización de la reacción de PCR: Los factores determinados como relevantes fueron ensayados utilizando el método estadístico Superficie de Respuesta (Compuesto central en tres bloques) (4) utilizando los valores óptimos de los factores restantes, siguiendo el mismo proceso descrito en el punto anterior. Para ello, los amplificados de PCR fueron evaluados bajo un criterio cualitativo (número de bandas amplificadas) y un criterio cuantitativo (cantidad del segmento amplificado de interés).

Análisis de muestras de vino y cepas de levaduras de interés: 100 mL de vino fueron filtradas en membranas de 0.45 µM, las células retenidas fueron colocadas en placas YPD con ciclohexamina y estreptomicina. Luego de 7 días, algunas de las colonias obtenidas fueron sembradas en caldo YPD, para ser analizadas por el método PCR desarrollado en este estudio, y también fueron sembradas en agar YPD con $CaCO_3$ donde se dejaron crecer 10-15 días a 25ºC, para ser analizadas por el método microbiológico actualmente en uso.

RESULTADOS

Elección de partidores: Los partidores fueron ensayados, siendo sometidos a reacciones de PCR donde se varió la temperatura de hibridación. De las temperaturas utilizadas, 53ºC presentó resultados sobresalientes, obteniéndose una banda nítida para *B. bruxellensis*, banda que se encuentra ausente en las restantes levaduras en análisis, obteniendo así la mejor evaluación tanto cualitativa como cuantitativamente, para el partidor LAMAP 1.

Concentración óptima de ADN plasmidial: Se determinó una concentración mínima de ADN plasmidial de 0.01 ng/µL, con la cual se aseguró que éste no interviniese en la amplificación del ADN de la levadura en estudio y al mismo tempo se verificara el correcto funcionamiento de la reacción de PCR.

Pre-optimización de los factores de influencia: Los resultados obtenidos del análisis estadístico para las variables de respuesta, Evaluación (cualitativa) y Cantidad de producto PCR (cuantitativa),determinaron que los factores concentración de cloruro de magnesio y concentración de desoxinucleótidos trifosfato, así como la interacción entre ambos, afecta significativamente a la variable Evaluación de la reacción de PCR, y de la misma forma se ve afectada la variable Cantidad de producto PCR obtenido. Con un ajuste de los datos de 72% y 69%, respectivamente.

Optimización de variables significativas: Considerando solamente los factores concentración de desoxinucleótidos trifosfato y cloruro de magnesio se realizó un análisis de optimización utilizando el método Superficie de Respuesta, Compuesto Central en 3 bloques. Para ello, se amplió el rango para cada concentración utilizando valores entre 0.1 a 0.8 mM y 1.0 a 2.0 mM, para la concentración de desoxinucleótidos trifosfato y cloruro de magnesio, respectivamente. Con el fin de determinar con mayor certeza los valores óptimos de cada factor, los óptimos de los otros factores permanecieron sin variación. El análisis estadístico determinó que la concentración óptima de desoxinucleótidos trifosfato y cloruro de magnesio correspondían a 0.8 mM y 1.9 mM, respectivamente, para las condiciones ensayadas. Finalmente, los valores óptimos de los factores restantes fueron los siguientes: 0.4 ng/µL de ADN y 0.2 µM de cada partidor (FyR). El análisis de los resultados y el programa utilizado fueron los mismos descritos anteriormente, con una temperatura de hibridación de 45ºC.

Evaluación de muestras reales: Seleccionados los partidores adecuados y optimizada la reacción de PCR, se construyó un protocolo de análisis con el cual se inició el proceso de evaluación del método planteado, por lo que se analizaron un total de 22 aislados, 12 levaduras extraídas de muestras de vino provenientes de diversas viñas, y 10 provenientes del cepario de LAMAP (Figura 1). Se puede observar en la figura que todas las muestras de vino

que presentaron contaminación por *B. bruxellensis* muestran una banda de 450 pb, en cambio no se observa esta banda en *B. anómala*, lo que determina la capacidad de determinación especie-específica del método desarrollado.

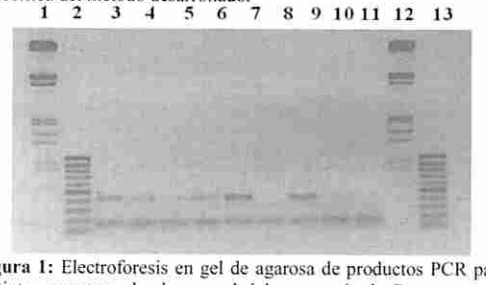


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR para distintas muestras, donde se evaluó la presencia de *Brettanomyces bruxellensis*. Los carriles 1 y 12 corresponden al patrón de tamaño molecular del fago λ digerido con *Hin*dIII y *Eco*RI, utilizado para cuantificación del producto PCR obtenido. Los carriles 2 y 13 corresponden al marcador de tamaño molecular de 100 pb, utilizado para determinar el tamaño del amplificado obtenido. Los carriles del 3 al 11 son reacciones de PCR (exceptuando el carril 8) y corresponden a muestras de vino, en tanto que el carril 8 corresponde a una cepa de la especie *Brettanomyces anómala*, obtenida desde el cepario del LAMAP.

Otra muestra de la especificidad del método desarrollado se observa en la Figura 2, donde las levaduras no *Brettanomyces*, presentes en vino, no presentan banda, salvo la banda de 165 pb producida por el control interno que confirma la ausencia de inhibidores en la reacción. La cepa *Brettanomyces bruxellensis*, en cambio, presenta además una banda de 450 pb que la hace diferenciable de las otras levaduras analizadas

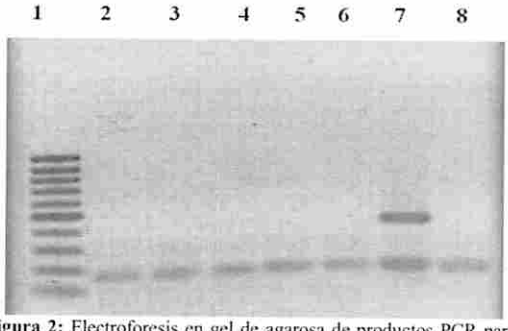


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de productos PCR para distintas levaduras, donde se evaluó la especificidad para *Brettanomyces bruxellensis*. El carril **1** corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, a la izquierda de la figura se indican los tamaños de banda en pares de bases (pb). Los carriles del **2** al **7** corresponden a las levaduras: *Pichia scolyti* (**2**), *Metschnikowia pulcherrima* (**3**), *Saccharomyces bayanus* (**4**), *Torulaspora delbruckii* (**5**) y *Zygosaccharomyces bailli* (**6**), *Brettanomyces bruxellensis* (**7**). El carril **8** corresponde al blanco.

La robustez del método desarrollado fue comparada con el método microbiológico clásico y un método recientemente desarrollado por laboratorios Roche y la USACH para PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos sugieren que el método desarrollado en este trabajo tiene una sensibilidad equivalente al método molecular y superior al método microbiológico, el cual no detectó muestras contaminadas con *B. bruxellensis*.

DISCUSIONES

De los partidores ensayados, el que presentó mayor especificidad fue el partidor LAMAP 1, puesto que se observó la presencia de una sola banda de un tamaño molecular de 450 pb ausente en las otras levaduras vínicas ensayadas. Dichas levaduras están presentes normalmente en mosto por lo cual es relevante esta alta especificidad para un análisis efectivo de detección de *B. bruxellensis* en muestras de vino. En este sentido, también es destacable que el amplificado corresponda a una sola banda, lo que permite mayor simpleza en el análisis.

Al evaluar muestras de vino, se determinó que en doce de éstas existía la presencia de *B. bruxellensis*, tanto por el método microbiológico como por el método PCR en estudio. En dos muestras el método PCR en estudio determinó que existía la presencia de *B. bruxellensis*, pero el método microbiológico determinó que ésta estaba ausente. Al ser analizadas por un método alternativo, PCR Tiempo-real (en proceso de validación por la Norma ISO 16140), éste ratificó el resultado de la presencia de *B. bruxellensis*, lo cual demostró la eficiencia del método desarrollado en este estudio por sobre el método microbiológico clásico. Por otra parte, la cepa de *Brettanomyces anómala*, fue analizada por el método microbiológico clásico y por el método PCR en estudio, dando un resultado positivo por el primer método mencionado, en cuanto al método PCR determinó que no existía presencia de *B. bruxellensis*, lo que confirmó la alta especificidad del método en estudio, que a pesar de la similaridad que poseen ambas especies, logró detectar la presencia de la especie *Brettanomyces bruxellensis* para la cual el método fue diseñado.

Finalmente, con el método optimizado se analizaron cinco cepas puras, no *Brettanomyces*, comúnmente presentes en vinos y que poseen características fisiológicas similares a *B. bruxellensis*. Estas cepas frecuentemente generan falsos positivos al ser analizadas por métodos microbiológicos convencionales. El método PCR desarrollado en este estudio dio como resultado la ausencia de *Brettanomyces bruxellensis*, comprobándose una vez más la especificidad de este método.

En cuanto al tiempo que requirió cada análisis, se comprobó que, una vez aisladas las colonias de levaduras, el método microbiológico clásico demoró de 10-15 días en arrojar resultados, en cambio el método PCR desarrollado demoró sólo 2 días, por lo que se redujeron considerablemente los tiempos de entrega de resultados.

En cuanto a los costos requeridos por cada método utilizado en este estudio es posible afirmar que el método microbiológico convencional resulta ser barato, pero posee un alto grado de error. El método PCR en tiempo real, requiere de un equipo sofisticado, por lo que el análisis tiene un costo elevado. El método PCR desarrollado en este trabajo requiere de un equipo PCR convencional que equivale a un quinto del valor del equipo necesitado para PCR en tiempo real y además no requiere de elementos sofisticados para la realización de la reacción.

CONCLUSIONES

El partidor LAMAP 1 presentó el mayor grado de especificidad para *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* al ser evaluado con distintas levaduras presentes en vino.

Las variables de mayor relevancia en la reacción de PCR resultaron ser las concentraciones de desoxinucleótidos trifosfato y cloruro de magnesio, siendo óptimos 0.8 mM y 1.9 mM, respectivamente

La técnica molecular de PCR convencional basada en la presencia o ausencia de bandas de un determinado tamaño molecular, demostró ser una herramienta eficaz para la detección de *Brettanomyces bruxellensis*, dado que se observa una sola banda, que no se encuentra en las otras levaduras presentes en vino ensayadas, y tampoco en aquellas con características bioquímicas similares a la de *B. bruxellensis*, inclusive si pertenecen al mismo género.

El método obtenido de este estudio, el cual utiliza la técnica de PCR convencional, es una alternativa asequible y confiable, debido a que se puede confirmar la presencia de *B. bruxellensis* eficazmente y a un bajo costo.

REFERENCIAS CITADAS

1.Ibeas, J. (1996). "Detection of *Dekkera-Brettanomyces* Strains in Sherry by a Nested PCR Method". Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62, Nº 3. P: 998-1003.

2 Cocolin, L. (2003). "Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/ Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/ Dekkera anomalus* in Spoiled Wines". Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70, Nº 3. P: 1347-1355.

3 Silva, P. (2004). "Studies on the Wine Spoilage Capacity of *Brettanomyces/ Dekkera spp*". American Society for Enology and Viticulture. Vol. 55, Nº1. P: 65-72.

4 Saavedra, D. (2005). "*Brettanomyces*,un Contaminante en Nuestras Viñas". Ciencia y Trabajo. Año 7, Nº 17. P: 93-96.

5 Montgomery, D. (1999). "Diseño y análisis de experimentos". Grupo Editorial Iberoamérica S.A. México. P: 241-338.

RADIAÇÃO GAMA NO CONTROLE DE FUNGOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM CAUPI

Freitas-Silva, O.[1], Cunha, F.Q.[1], Godoy, R.L.O.[1], Alvarenga, S.R.[2], Vaz, S.G[2], Lima, K.S.C.[3] e Lima, A.L.S[3]

[1]Embrapa Agroindústria de Alimentos – CTAA – RJ.
[2] Bolsista CNPq, Embrapa Agroindústria de Alimentos– CTAA – RJ.
[3]Seção de Engenharia Nuclear – Instituto Militar de Engenharia – IME.
[1]Av. das Américas, 29501 – Guaratiba.
CEP: 23020-470 Rio de Janeiro – RJ – Brasil
Tel. : (55-21) 2410-9645 - Fax: (55-21) 2410-1090
[3]Praça General Tibúrcio, 80, Urca.
CEP: 22.290-270 Rio de Janeiro – RJ – Brasil
e-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br, keila@ime.eb.br

Keywords: *Vigna unguiculata* , fungos toxigênicos e irradiação.

RESUMO

Foi avaliado o efeito da radiação gama no controle de fungos, em caupi (*Vigna unguiculata*). Os grãos de caupi foram submetidos a diferentes doses de radiação ionizante gama 0,0; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 kGy, em um irradiador de pesquisa que utiliza como fonte o Césio-137. A determinação da porcentagem fúngica foi feita utilizando-se a técnica do plaqueamento direto, nos meios de cultura AFPA e DG18. Em grãos de caupi irradiados, observou-se a redução da infecção fúngica a partir da dose de 1 kGy, para fungos produtores de aflatoxinas e ocratoxina A. A eliminação total de fungos foi evidenciada a partir na dose 5 kGy. A radiação gama, na dose de 5 kGy ou superior, demonstrou ser um processo eficaz na eliminação da microbiota fúngica de caupi.

INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata*), também conhecido por feijão-fradinho, feijão-de-corda, feijão-macassar, feijão-de-praia, feijão-miúdo, feijão-caupi, entre outros, pertence à família das leguminosas (*Fabaceae*). Acredita-se que seja procedente da África Tropical, de onde se dispersou para outras regiões com clima semelhante, como a Índia. É fonte de proteínas (entre 23-25%) apresentando aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras da dieta e baixa quantidade de gordura (cerca de 2%) (SOUZA *et al.*, 2007).

Devido a fácil adaptação à solos de baixa fertilidade e com períodos de seca prolongada, o Nordeste brasileiro é a principal região produtora e representa alimento básico para as populações de baixa renda dessa região.

A colheita constitui uma das etapas mais importantes no processo produtivo do caupi, já que altos teores de umidade nesta fase, compromete a qualidade final do produto, tanto para semente quanto para grão. Os grãos são, frequentemente, infestados por pragas, principalmente traças e caruncho-do-feijão, que provêm do campo por meio de ovos, larvas ou adultos, que juntamente com as vagens, grãos ou sacarias, chegam aos armazéns, infestando também os grãos já existentes. Outro fator que implica na produtividade do feijão é a presença de fungos, sendo *Aspergillus, Fusarium e Rhizopus* os gêneros mais comumente encontrados nas cultivares.

A radiação gama, um processo eficiente na conservação indicado para aumentar o período de conservação de alguns produtos, surge como opção por exercer um controle efetivo de pragas e doenças, inibindo o desenvolvimento de fungos e bactérias, desde que se administrem doses adequadas de radiação sem alterar características físicas, químicas e sensoriais do produto (DIEHL,1990; BEHARA *et al.*, 1991). Tendo em vista estes fatos, a radiação deve ser aplicada em doses controladas, de modo a não comprometer os atributos sensoriais, os constituintes funcionais e a qualidade nutricional. No Brasil, a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) autoriza o emprego da irradiação de alimentos com as seguintes fontes: os radioisótopos emissores de raios gama (Cobalto-60 e Césio-137), os raios X (energias de até 5 MeV) e os elétrons acelerados (energias de até 10 MeV) (LIMA *et al.*, 2003). Sendo assim objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da dose de radiação gama no controle de fungos potencialmente produtores de micotoxinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido por pesquisadores do Instituto Militar de Engenharia (IME) e do Laboratório de Micotoxinas e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Cem unidades de 500 gramas de caupi (feijão fradinho) embalados em saco plástico, todas com o mesmo lote, foram adquiridos, aleatoriamente, em vários mercados da cidade do Rio de janeiro. O caupi foi submetido a diferentes doses de radiação gama 0,0 (controle); 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 kGy no irradiador de pesquisa localizado no Centro Tecnológico do Exército. O irradiador é do tipo cavidade, com fonte de Césio-137 auto-recolhível, controlado por um sistema eletro-eletrônico dotado de duas câmaras de irradiaçãomcom portas blindadas móveis (LIMA *et al.*,2003; VITAL *et al.*, 2000).

Os grãos de caupi, após a irradiação foram plaqueados em dois meios de cultura DG 18 e AFPA, preparados segundo Sansom et all, 1996. O plaqueamento foi realizado de acordo com a técnica de plaqueamento direta (Pitt & Hocking, 1999; Taniwaki & Silva, 2001), utilizando pinça de metal estéril, sob fluxo laminar. Cada placa de Petri recebeu 10 grãos. Foram realizadas seis repetições por tratamento, grupo controle e os grãos irradiados nas diferentes doses, totalizando 60 grãos de caupi ensaiados.

As placas de Petri com o caupi foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 25 ± 1 °C, umidade de 85 ± 5 %, durante 7 dias. O resultado desta etapa foi expresso, através da quantificação dos fungos com crescimento sobre os grãos de caupi.Após, o crescimento micelial, os fungos foram observados em lupa, para confirmação de algumas características morfológicas. Os fungos suspeitos de serem potencialmente produtores de micotoxinas, foram isolados. Para sua identificação, além da visualização das características morfológicas em microscópio estereoscópio, foram preparadas lâminas, para visualização em microscópio óptico de acordo com Pitt & Hocking 1999 e Sansom et al., 2000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo de 7 dias/25°C, foram encontrados fungos potencialmente produtores de micotoxinas *Aspergillus* da seção Flavi, da secção Nigri e da Seção Circumdati, apenas nos grãos não irradiados ou seja no grupo controle. Estes fungos são

potenciais produtores de aflatoxinas e ocratoxina A. Outros fungos, também, foram observados como pertencentes aos gêneros *Penicilium, Fusarium* e *Rhizopus*. Nos grãos submetidos à irradiação todas as doses de radiação gama foram eficientes para inibição dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, potencialmente produtor de aflatoxinas e Ocratoxina A.

Estes resultados foram similares aos obtidos por Prado *et al.* 2006, onde foi verificado que a irradiação gama (^{60}Co) na dose de 5 kGy foi capaz de reduzir a porcentagem fúngica de amendoim em grão ate 180 dias, após o tratamento do grão, armazenado em temperatura ambiente. Para os outros gêneros de fungos a melhor dose de radiação ocorreu a partir de 5 kGy, tanto no meio de cultura AFPA **(Figura 1)** quanto no DG 18 **(Figura 2)**.

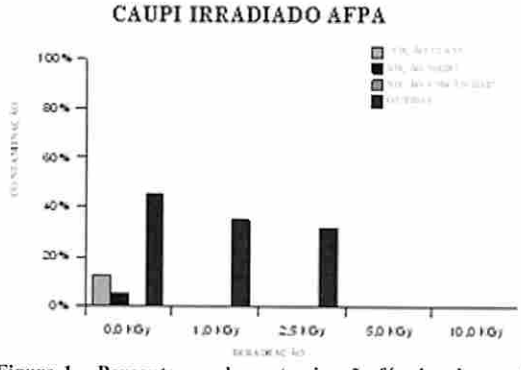


Figura 1 – Porcentagem de contaminação fúngica de caupi submetido a diferentes doses de radiação gama em meio de cultura AFPA.

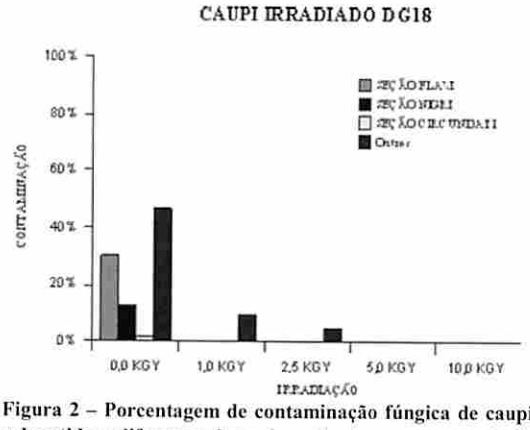


Figura 2 – Porcentagem de contaminação fúngica de caupi submetido a diferentes doses de radiação gama em meio de cultura DG18.

CONCLUSÕES:

A aplicação da radiação gama promoveu o controle de fungos do gênero *Aspergillus* em caupi a partir de 1 kGy.

Os meios de cultura AFPA e DG18, foram eficientes para o isolamento de fungos com potencial toxigênico em caupi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEHARA, L.; RAMSEY, G.B.; SMITH, M.A.; WRIGHT, W.R. Factors influencing the use of gamma irradiation to control decay of lemons and oranges. **Phytopathology**, v.49: p.91. 1991.

CARVALHO, M.R.B.; RODRIGUES M.A.A.P. S.; TAVARES, D.Q.; McGINNIS, J.; SGARBIERI, V.C. Efeitos da irradiação (raios γ) sobre as propriedades físicas, sensoriais e nutritivas dos grãos de feijão. Pesquisa agropecuária Brasil, Brasília, v.26, n. 10, p.1663-1672, out. 1991.

DIEHL, J.F. Safety of irradiated foods. Marcel Dekker Inc. v.36. New York and Basel. 345p. 1990.

LIMA, K. S. C.; LIMA, A. L. S.; LUCHESE, R. H.; GODOY, R. L. O.; SABAA-SRUR, A. U. O. Cenouras Minimamente Processadas em Embalagens com Atmosferas Modificadas e Tratadas com Radiação Gama: Avaliação Microbiológica, Físico-Química e Química. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 23, n. 2, p. 240-250, 2003.

OLIVEIRA, J.T.A. Mecanismos de defesa do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (l.) walp.] contra patógenos. http://www.cpamn.embrapa.br/anaisconac2006/Palestras/PalestraJTAOLIVEIRA.pdf. Acesso em : 23/07/07

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Methods for isolation, enumeration and identification. In: _____. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. p. 21-57.

PRADO, G.; CARVALHO E.P. ; MADEIRA, J. E. G.C.; MORAIS, V.A.D. ; OLIVEIRA, M.S.; CORRÊA, R.F.; CARDOSO, V.N. Efeito da irradiação gama (60Co) na freqüência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 930-936, set./out., 2006.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introdution to food-borne fungi**. 4. ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SILVA, G.C.; BRINGEL, J.M.M.; KRONKA, A.Z. e GOMES, D.P. Micoflora de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) provenientes do estado do Ceará. Disponível em: http://www.cpamn.embrapa.br/anaisconac2006/resumos/FS02.pdf Acesso: 23/07/2007.

SOUZA, L. B.; LIMA, K. S. C.; COELHO, M. J.; LIMA, A. L. S.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Avaliação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de Aminoácidos em Feijão-Fradinho *(Vigna* unguiculata (L.) Walp) Irradiado. Revista Higiene Alimentar, v. 21, n. 150, p. 326-327, 2007.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos:** ocorrência e detecção. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001. 82 p.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; CALDAS, M.T. Comportamento do Feijão-Fradinho na Primavera-Verão na Zona da Mata de Minas Gerais. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.35, n.7, p.1359-1365, jul. 2000.

VITAL, H.C.; PIRES, L.F.G.; VELLOZO, S.O.E; LIMA, R.Q., Experimentos Dosimétricos no Irradiador Gama do IPE. Anais do V ENAN, Rio de Janeiro, RJ. 15-20 Out. 2000.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATOGÉNICAS DE PRODUCTOS CARNICOS Y MARINOS

Ramos Moya Milton Rubén
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. Casilla 18-01-334, Teléfono 03-2400987, Fax (593) 03-2400998, E-mail: miltonramos8≅hotmail.com.

Palabras clave: microbiología, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*.

RESUMEN

Es reconocido que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un problema de salud pública. Uno de los factores para el desarrollo de una estrategia efectiva para reducir las ETA es la información relacionada con los peligros potenciales en el suministro de alimentos. Por tanto, se planteó un estudio para investigar la calidad microbiológica de algunos productos cárnicos y marinos crudos que se expenden en determinados sitios de la ciudad de Ambato. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, fueron aislados e identificados de 9 productos cárnicos y marinos crudos, y de muestras recogidas en 6 sitios de expendio, utilizando los medios de cultivo selectivos Chromocult Coliform Agar, Diasalm, Baird Parker Agar y Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (Merck), respectivamente. El patógeno involucrado más frecuentemente en los productos fue *S. aureus* (86.7%); seguido de *V. parahaemolyticus* (44.4%), *Salmonella* (31.5%) y *E. coli* (24.1%). *S. aureus* estuvo presente en chorizo (100%), seguido de carne de chancho, de res, pollo y salchicha (83.3%). Mientras que *V. parahaemolyticus* en camarón blanco y concha (100%), seguido de pescado (83.3%), carne de res y pollo (33.3%), y chancho, chorizo y salchicha (16.7%). *Salmonella* en mortadela (66.7%), seguido de chorizo (50.0%), carne de chancho, de res y camarón blanco (33.3%), y pollo, salchicha, concha y pescado pargo (16.7%). *E. coli* en carne de pollo (83.3%), seguido de carne de chancho (50.0%), carne de res (33.3%), y chorizo, salchicha y concha (16.7%). Los resultados evidenciaron que dichos alimentos pueden servir como vehículos de bacterias patogénicas y ser un factor de riesgo a la salud del consumidor.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de alimentos y las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen problemas de salud pública en el país. Estudios realizados por diferentes instituciones a nivel local y nacional reportan la deficiente calidad microbiológica de los alimentos; y por ende, el peligro para la salud del consumidor. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Ministerio de Salud Pública (MSP) han reconocido que las enfermedades infecciosas intestinales se encuentran entre las 10 principales causas de mortalidad en la población, categorizando a las enfermedades diarreicas, e.g. el cólera, como problemas principales de salud pública; e identificando a los alimentos y al agua contaminados como fuentes importantes de contagio. Se conoce que los causantes de las ETA, particularmente infecciosas intestinales, son los microorganismos patogénicos; y que de todos los microorganismos contaminantes que crecen en los alimentos, sólo unos pocos están involucrados en las ETA, e.g. especies de *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Yersinia*. Luego, las bacterias patogénicas son las que tienen verdadera importancia desde el punto de vista de la salud, y que requieren ser identificadas para establecer medidas de prevención, control o destrucción. De otro lado, tradicionalmente los laboratorios microbiológicos realizan análisis microbiológicos basados en microorganismos indicadores o pruebas relacionadas, e.g. contaje de aeróbicos en placa, coliformes, hongos y levaduras, con el propósito de evaluar la calidad microbiológica de los productos alimenticios e indicar el riesgo de origen microbiano. Sin embargo, estos análisis se limitan a señalar lo adecuado del alimento para ser consumido, y no representan un indicativo del riesgo directo a la salud; es decir, los análisis cuantifican la contaminación microbiana, pero no indican la presencia o ausencia de bacterias patogénicas. De aquí la necesidad de desarrollar protocolos microbiológicos rápidos y efectivos para el aislamiento e identificación de bacterias patogénicas asociados a infecciones e intoxicaciones alimentarias. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias patogénicas de productos cárnicos y marinos de amplio consumo en Ambato.

2. MATERIALES Y METODOS

Se consideraron 9 productos: 6 cárnicos (carne de chancho, de res, de pollo, chorizo, mortadela y salchicha) y 3 marinos crudos (camarón blanco, concha y pescado pargo). Se seleccionaron 6 lugares de expendio: 3 frigoríficos comerciales (La Dolorosa, DOL; La Fama, FAM; y Miraflores, MIR) de productos cárnicos; y, 2 mercados (Mercado Simón Bolívar, MSI y Mercado Central, MCE) y 1 frigorífico (La Posada de la Garza, GAR) de productos marinos. Se recogieron 54 muestras representativas: 36 de productos cárnicos (6 productos x 3 sitios x 2 réplicas) y 18 de productos marinos crudos (3 productos x 3 sitios x 2 réplicas). La cantidad mínima de cada muestra recogida fue de 454 g, en forma aleatoria. Colocada asépticamente en funda de polietileno estéril (RMC, Quito) apropiadamente identificada, introducida en una caja térmica aislante conteniendo envases de hielo para mantener un ambiente refrigerado, y transportada inmediatamente al laboratorio de la Unidad Operativa Investigación en Tecnología en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. En el laboratorio, todas las muestras fueron almacenadas en una refrigeradora a 5°C, y sometidas a análisis microbiológicos dentro de las 8 horas siguientes.

La preparación de muestras para análisis se realizó en un cuarto de aislamiento limpio y desinfectado, e involucró obtener 25 g de muestra representativa de cada producto mediante el método de Muestreo Diminutivo Cuadrático (Lyon, 1998), mismo que comprendió las siguientes acciones: tomar asépticamente la muestra; identificar 4 áreas opuestas en la muestra; cortar un pedazo de muestra de cada área; cortar cada pedazo en 4 sub-pedazos; tomar 1 sub-pedazo de cada uno de los pedazos; mezclar los 4 sub-pedazos; y finalmente de la mezcla, pesar 25 g de producto. Esta muestra representativa fue colocada en un vaso de licuadora, estéril y conteniendo 225 ml de Buffered Peptone Water (BPW; Merck, Darmstadt, Alemania); y mezclada en una licuadora marca Osterizer por 30 s a temperatura ambiente. Esta muestra homogenizada (10^{-1}) fue diluida en serie utilizando blancos de 9 ml BPW (Merck). A continuación, 0.1 ml de cada dilución fue sembrada en el medio de cultivo correspondiente mediante la técnica superficial en placas, y utilizando placas debidamente identificadas, por duplicado. Luego, las placas fueron incubadas a las temperaturas requeridas por cada medio de cultivo y en condiciones aeróbicas normales. Después de la incubación, se observó la presencia o ausencia de las bacterias patogénicas.

Los medios selectivos preparados fueron los siguientes: Chromocult Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Alemania) para la identificación simultánea de coliformes totales y *E. coli*; Diasalm (Merck, Darmstadt, Alemania) para *Salmonella* spp.; Baird-Parker Agar (BPA; Merck, Darmstadt, Alemania) para *S. aureus*; y, Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS, Merck, Darmstadt, Alemania) para *Vibrio* spp.

Chromocult Coliform Agar (Merck) fue preparado conforme a las instrucciones del fabricante y vaciado en cajas Petri. El medio solidificado presentó un color café-amarillento. Las placas apropiadamente inoculadas, se incubaron a 35-37°C durante 24 horas, aeróbicamente. A continuación, con el propósito de confirmar la presencia de *E. coli*, las colonias de color azul fuerte a violeta se cubrieron con el reactivo Indol

Kovacs (Merck, Darmstadt, Alemania). Cuando el color del reactivo cambió a un color rojo, se confirmó la presencia de *E. coli*.

Diasalm (Merck) presentó un color verde oscuro. Durante la experimentación para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en el producto, la muestra homogenizada de 25 g en 225 ml de BPW (Merck) fue incubada a 37°C durante 18-20 h con el propósito de enriquecer la muestra, es decir estimular el crecimiento de *Salmonella*. A continuación, una gota de 0.1 ml del cultivo pre-enriquecido fue inoculada en el centro de cada caja conteniendo el medio Diasalm. Las cajas fueron incubadas a 42°C por 24 h, y observadas por la presencia o ausencia de la bacteria.

BPA (Merck) presentó un color café-amarillento opaco (opaco por su contenido de yema de huevo). Las placas apropiadamente inoculadas, se incubaron a 35°C durante 24-48 h, aeróbicamente. Finalmente, TCBS (Merck) presentó un color azul-verdoso. Las placas apropiadamente inoculadas, se incubaron a 35°C durante 18-24 horas, aeróbicamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número y tipos de bacterias patogénicas

Cuatro aislados bacterianos patogénicos: *E. coli, Salmonella, S. aureus* y *V. parahaemolyticus* fueron identificados de 9 productos cárnicos y marinos crudos, y de muestras recogidas en 6 sitios de Ambato, utilizando los medios de cultivo selectivos Chromocult Coliform Agar, Diasalm, BPA y TCBS (Merck), respectivamente. Estas bacterias son ampliamente reconocidas como causantes de las ETA: gastroenteritis (*E. coli* y *V. parahaemolyticus*), salmonelosis (*Salmonella*) e intoxicaciones alimentarias y síntomas gastrointestinales (*S. aureus*). Sin embargo, la sola presencia de las bacterias patogénicas o sus toxinas en los alimentos, no es suficiente para provocar una ETA; pues también se requiere que se cumplan otros requisitos, tales como: ingestión de los patógenos o sus toxinas, condiciones de crecimiento de los patógenos (e.g., nutrientes, pH, aw, temperatura, oxígeno) o vencer el sistema inmunológico de la persona (FPI, 1995; Garbutt, 1997; Lyon, 1998). La presencia de los 4 patógenos, no excluye que se encuentren presentes otros patógenos.

Significación de las bacterias patogénicas

La presencia de las 4 bacterias patogénicas puede explicar la alta incidencia de enfermedades gastroentéricas (fiebre tifoidea, otras salmonelosis, enfermedades diarreicas e intoxicaciones alimentarias) ocurridas en Ecuador en la década del 90 (MSP, 2000), y lo que es más grave, constituye una evidencia de que aún están contaminando los alimentos, y que la tendencia lineal de incidencia de las ETA pudo haberse incrementado en los últimos años. En general, los productos presentan el más alto riesgo de contaminación con *S. aureus* que con el resto de patógenos encontrados en el estudio. Así, la bacteria patogénica involucrada más frecuentemente en los productos fue *S. aureus* (86.7%); seguido de *V. parahaemolyticus* (44.4%), *Salmonella* (31.5%) y *E. coli* (24.1%). La presencia *S. aureus, Salmonella* y *E. coli* en los productos cárnicos se corrobora con otros estudios microbiológicos realizados a nivel internacional. Por ejemplo, un estudio sobre la contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina (entre ellas Quito) demostró la presencia de *S. aureus, Salmonella, E. coli* O157:H7, *B. cereus* y *C. perfrings* (OPS, 1996). Otro estudio realizado en EE. UU. señala la alta incidencia de *S. aureus* y *Salmonella* spp. como patógenos predominantes de productos cárnicos y causantes de ETA; y además, que el consumo de alimentos contaminados con *S. aureus* puede provocar una alta patogenicidad (cantidad de infectados), pero el grado de virulencia (número de casos graves y fatales) es baja (Ray, 1996). Entonces, pese a que *S. aureus* presenta un riesgo porcentualmente mayor de contaminación de los alimentos, el patógeno de mayor riesgo a la salud del consumidor es *Salmonella*, por ser el más virulento; seguido de *E. coli* y *S. aureus*.

Con respecto a la contaminación de los productos con *V. parahaemolyticus*, se conoce que en EE. UU. éste patógeno produce anualmente más de 3 000 casos de gastroenteritis, 50 a 60 hospitalizaciones y 8 a 10 muertes (Almeida *et al.*, 2001). Algunos autores señalan la asociación existente entre el pescado contaminado con *Vibrio* spp., junto a *C. Botulinum, E. coli, L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (Farber, 1991; Jay, 1992). Además, en EE. UU. entre 1983 y 1987, los productos marinos contribuyeron con el 22.4% de los brotes ocurridos (Dillon y Patel, 1992). Debe señalarse que bajo las condiciones del presente estudio no se encontró presencia de *V. cholerae* en ninguno de los productos.

De otro lado, en lo que respecta al porcentaje de muestras positivas de un determinado patógeno por tipo de producto, se observa que *S. aureus* está presente en chorizo (100%), seguido de carne de chancho, res, pollo y salchicha (83.3%). Esto demuestra que existe una alta contaminación de los productos cárnicos con *S. aureus*. Este resultado se corrobora con los reportados por Silva (1997), en un estudio microbiológico realizado por la Dirección de Higiene Municipal de Ambato, quien señala que el 81% de las muestras de chorizo presentaban altas tasas de contaminación bacteriana en los lugares de elaboración y comercialización. También la OPS (1996) encontró *S. aureus* en los productos cárnicos expendidos en vías públicas, atribuyendo la alta contaminación a la alta manipulación de los productos durante su procesamiento, comercialización y manejo, a fallas en la higiene personal, a la deficiencia en la limpieza y desinfección de equipos y superficies, y a que los productos son ricos en proteína. Según Almeida *et al.* (2001), los productos que requieren mayor manipulación durante su preparación (como es el caso del chorizo) y que además se mantienen a temperaturas inadecuadas (sobre 10°C) son los que están asociados a intoxicación estafilocóquica. Vale señalar también que entre los alimentos involucrados en brotes de gastroenteritis estafilocóquica en EE. UU., entre 1973 y 1987, se incluyen: carne de chancho (aporta con el más alto porcentaje de brotes, 16.2%), carne de res (6.0%), pollo (3.8%) y pescado (1.3%) (Ray, 1996).

Con respecto a la contaminación de los productos con *V. parahaemolyticus*, los productos más frecuentemente involucrados con este patógeno fueron camarón blanco y concha (100%), seguido de pescado (83.3%), carne de res y pollo (33.3%), chancho, chorizo y salchicha (16.7%). Obviamente, este patógeno se encontró primordialmente en los productos marinos crudos dado que su habitat natural son los estuarios y áreas costeras (Jay, 1992; Ray, 1996). Además, la gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus* está asociada al consumo de pescado crudo (ceviche, sushi), ostras, langostas, cangrejos, camarón o langostinos (Almeida *et al.*, 2001). Según Ray (1996), los brotes producidos por este patógeno están asociados al consumo de productos marinos crudos, inadecuadamente cocidos o contaminados luego del cocido.

Todos los productos cárnicos y marinos resultaron contaminados con *Salmonella*. El producto involucrado más frecuentemente con *Salmonella* fue mortadela (66.7%), seguido de chorizo (50.0%), carne de chancho, res y camarón blanco (33.3%), y pollo, salchicha, concha y pescado pargo (16.7%). Estos resultados se corroboran con los señalados por la OPS (1996), que los alimentos expendidos en la vía pública a base de carne, seguido de frutas y verduras, pescados y mariscos, y jugos naturales, resultaron contaminados con *Salmonella*. Según Almeida *et al.* (2001) y Ray (1996), los alimentos asociados a contaminación con *Salmonella*, incluyen: carnes crudas (res, chancho, pollo, pavo), huevos, pescado y mariscos, leche y derivados, y otros.

Con respecto a la contaminación de los productos con *E. coli*, el tipo de producto involucrado más frecuentemente con este patógeno fue carne de pollo (83.3%), seguido de carne de chancho (50.0%), de res (33.3%), y chorizo, salchicha y concha (16.7%). Según Ray (1996), los alimentos de origen animal, incluyendo carne de res molida, chancho, pollo y leche han sido implicados en brotes de gastroenteritis por *E. coli;* como también los alimentos contaminados con excremento, directamente o a través de aguas contaminadas. En alimentos expendidos en la vía pública, los porcentajes más altos de contaminación con *E. coli* presentaron los pescados y mariscos, seguido de cárnicos, y granos y cereales (OPS, 1996).

Finalmente, en lo que respecta al porcentaje de muestras positivas a un determinado patógeno por sitio de expendio. El sitio involucrado más frecuentemente con *S. aureus* fue el MIR (100%), seguido de DOL (90%) y FAM (70%). Mientras que los sitios de venta involucrados más frecuentemente con *V. parahaemolyticus* fueron GAR y MCE (100%), seguido de MSI (83.3%), MIR (33.3%), y DOL y FAM (8.3%). Los sitios

involucrados más frecuentemente con *Salmonella* fueron DOL y MIR (41.7%), seguido de GAR y MCE (33.3%), FAM (25.0%), y MSI (0%). Estos resultados se contraponen a la creencia popular de que los sitios de expendio más contaminados son los mercados. Finalmente, el sitio de expendio involucrado más frecuentemente con *E. coli* fue el MIR (41.7%), seguido de FAM (33.3%), DOL (25.0%), MSI (16.7%), y GAR y MCE (0%). Relativamente, los sitios de expendio con mayor riesgo de contaminación de los productos con *E. coli* son los frigoríficos, y están asociados a la comercialización de productos cárnicos.

4. CONCLUSIONES

E. coli, Salmonella, S. aureus y *V. parahaemolyticus*, fueron aislados e identificados de 9 productos cárnicos y marinos crudos, y de muestras recogidas en 6 sitios de expendio de Ambato, utilizando los medios de cultivo selectivos Chromocult coliform agar, Diasalm, BPA y TCBS (Merck), respectivamente. Luego, es evidente el riesgo a la salud de los indicados productos crudos que se comercializan en Ambato. La información microbiológica generada por el estudio constituye un aporte para la implementación de medidas efectivas para garantizar la inocuidad de los alimentos, lo cual contribuirá a la seguridad alimentaria.

5. AGRADECIMIENTO

Un profundo agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato por el financiamiento del Proyecto de Investigación "Identificación de Bacterias Patogénicas Asociadas a Productos Cárnicos y Marinos- IBACAM".

6. REFERENCIAS

Almeida, C. R., Bejarano, N. D., Cuellar, J. A. y Moraes, S. 2001. *HACCP: Herramienta esencial para la inocuidad de alimentos*. Organización Panamericana de la Salud, Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud (Ed.). Buenos Aires, Argentina.

Dillon, R. and Patel, T. 1992. *Listeria* in seafoods: a review. J. Food Prot. 55: 1009-1015.

Farber, J. M. 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology: a review. J. Food Prot. 54: 58-70.

Food Processors Institute. 1995. *Establecimiento de programas de análisis de factores de peligros en puntos críticos de control*, 2da ed., Kenneth E. Stevenson y Dane T. Bernard (Ed.) Washington, D. C., Estados Unidos.

Garbutt, J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. Arnold, London, UK.

Jay, J. 1992. *Modern Food Microbiology*, 4th ed. Van Nostrand Reinhold, New York. NY, USA.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M. Schreckenberger, P. C., and Winn, W. C. 1992. *Diagnostic Microbiology*. 4ª ed. J. B. Lippincott Company. USA.

Lyon, W. J. 1998. *Food Microbiology 4162 (II)*. Louisiana State University, Baton Rouge. LA, USA.

Lyon, W. J. 1999. *HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Poim Curriculum*. The Louisiana Department of Agriculture and Forestry, Baton Rouge. LA, USA.

Ministerio de Salud Pública. 2000. Estadística de las enfermedades gastroentéricas. Quito, Ecuador.

Organización Panamericana de la Salud. 1996. *Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública*. Claudio R. Almeida, Dulce M. T. Schuch, Dilma S. Gelli, Juan A. Cuellar S., Ana V. Diez R. y José A. Escamilla (Ed.). Washington. Estados Unidos.

Peeler, J. T. and Maturin, L. J. 1992. Aerobic plate count. En *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 7ª ed., Ch. 3, AOAC International, Arlington, VA, p: 17-26.

Ray, B. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. USA.

Silva, A. 1997. Informe del control realizado a los lugares donde elaboran embutidos (chorizo). Dirección de Higiene Municipal. Ambato.

Yu, P. W. and Washington, J. A. 1985. Identification of aeróbic and facultatively anaerobic bacteria. En *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*, 2ª ed., John A. Washington (Ed.), Sprin-Verlag. USA.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA, PH Y ADICIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI EN FILETES DE RES ALMACENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE

Vásquez Grace Ing.,Cornejo Zúñiga Fabiola M.Sc
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción
Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo Velasco, Km. 30.5 Vía Perimetral, Apartado: 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.
Email: grakavas@espol.edu.ec, fcornejo@espol.edu.ec

Palabras clave: E.coli, carne de res, actividad de agua, pH, ácidos orgánicos,Tecnología de barreras.

RESUMEN

El presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto que produce la alteración de algunos factores de crecimiento microbiano, como: la actividad de agua (aw), el potencial de hidrógeno (pH) y adición de agentes antimicrobianos en el crecimiento del *Escherichia coli*. Con el fin de establecer métodos de preservación que retarden el proceso de deterioro de un alimento altamente perecible, como lo es carne de res. Durante el tratamiento se redujo la actividad de agua y el pH. Los agentes osmóticos utilizados fueron: cloruro de sodio y sacarosa en diversas proporciones y; en la acidificación del medio se emplearon ácidos orgánicos como: ácido láctico, ácido acético (vinagre) y ácido cítrico en diferentes concentraciones. El método utilizado para la aplicación de los tratamientos fue de Impregnación y deshidratación por inmersión (PIDR) en solución osmótica. Posteriormente, se inocularon los filetes de res tratados con cepas de *Escherichia coli* y se almacenaron a temperatura ambiente de 30± 2ºC por veinticuatro horas. Durante el almacenamiento se realizaron pruebas microbiológicas para determinar el grado se supervivencia del microorganismo. Finalmente, se estableció como el mejor tratamiento el 40C02 con actividad de agua de 0,93; pH de 5,18 y; un porcentaje de ácido no disociado de 0,0006; ya que permitió reducir los recuentos de *E. coli* en tres ciclos log. Los resultados de este estudio podrán servir en el desarrollo de metodologías de preservación para alimentos altamente perecibles. Además, aportaran información para el desarrollo de modelos predictivos de crecimiento de *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

El *Escherichia coli*, productor de verotoxina (VTEC), tiene considerable importancia en el área seguridad alimentaria. Este microorganismo ha sido implicado en numerosos casos de toxiinfecciones alimentarias donde el consumo de productos picados de vacuno, ha emergido como un factor de riesgo importante. Por lo tanto, el E. coli ha sido objeto de numerosas investigaciones, lamentable se conoce relativamente poco de su ecología y de su incidencia en la cadena de procesado de alimentos. Es así, que se han diseñado una amplia variedad de métodos de descontaminación de la carne, los cuales, podemos situar en tres categorías: inactivación o eliminación física, inactivación o eliminación química y radiación ionizante. En países Latinoamericanos como Colombia, Chile, Argentina, Brasil, Costa Rica, Cuba, México, Nicaragua, Puerto Rico y Uruguay, por medio del programa de CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) de Latinoamérica, han investigado sobre la aplicación de la tecnología de obstáculos (barreras) en productos autóctonos de estas regiones como frutas, vegetales y productos de panificación. Cerca de 260 productos microbiológicamente estables a temperatura ambiente han sido desarrollados. Esta tecnología se basa en producir pequeños cambios, como disminución de actividad de agua, acidificación, potencial redox, uso de preservantes, etc.; los cuales combinados adecuadamente incrementan el tiempo de vida útil del alimento, de tal manera que se obtiene un producto seguro, nutritivo, de sabor agradable con poca energía e inversión. El presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto que produce la alteración de algunos factores de crecimiento microbiano, como: la actividad de agua (a_w), el potencial de hidrógeno (pH) y adición de agentes antimicrobianos en el crecimiento del *Escherichia coli*. Con el fin de establecer métodos de preservación que retarden el proceso de deterioro de un alimento altamente perecible, como lo es carne de res. La intensidad de cada una de las barreras a aplicar, debe ser tal, que no modifique drásticamente la calidad sensorial y nutritiva del alimento. Los resultados de este estudio servirán en el desarrollo de una metodología de preservación para alimentos altamente perecibles.

MATERIALES Y MÉTODO

En este estudio se utilizó como muestra carne de res fresca y fileteada, la cual fue adquirida en el supermercado local. El corte empleado fue pulpa del tipo PSE: exudativa, blanda y pálida. Las dimensiones de los filetes fueron de 14 X 8 X 0,3 cm. y con un peso promedio de 40 ±2 g. La cepa de *Escherichia coli* utilizada en este estudio se obtuvieron inicialmente del suelo [1,2,3,]. El aislamiento e identificación de este patógeno, se realizo según los métodos descritos por la ICMSF. Para la conservación de las cepas de *E. coli* se realizaron siembras en tubo inclinado por estrías en agar PCA y se almacenaron a 5±2ºC. Se realizaron replicaciones cada 72 horas a fin de mantener la viabilidad, pureza y estabilidad genética del cultivo. Todos los procedimientos descritos anteriormente se realizaron por replica bajo condiciones asépticas. Para la elaboración de las soluciones ternarias se utilizaron como agentes osmóticos: cloruro de sodio (sal de mesa) y sacarosa (azúcar blanca) en solución acuosa, ambos adquiridos en un supermercado local. Se emplearon soluciones ternarias de 40, 50 y 60 °Brix. La relación cloruro de sodio / sacarosa utilizadas fueron 1:1; 1,5:1; 2:1 en porciento de solución osmótica (SO) respectivamente. La proporción de SO / producto fue de 4/1, con tiempos de inmersión de 2,5; 5; 10; 15; y 20 minutos. Los valores de actividad de agua, de los filetes de res con y sin tratamiento, se calcularon mediante la ecuación de Grover (Ec. 1) y para el cálculo de la actividad de agua de las soluciones osmóticas se empleó la ecuación de Ross (Ec. 2).

$$HRE\ (\%) = 104 - 10E^{o} + 0.45\,(E^{o})^{2} \qquad \text{(Ec. 1)}$$

$$E^{o} = \Sigma(E_i / mi)$$

Donde:
E_i : es el valor según tablas del ingrediente i,
m_i : es el contenido de humedad del ingrediente en gramos de agua por gramo de ingrediente.

$$A_f = A_i * A_{Hi} * A_{H2} * A_{H3} * \ldots\ldots A_{Hi} \qquad \text{(Ec. 2)}$$

Donde:
A_f = La actividad de agua final solución.
A_i = La actividad de agua antes de añadir los solutos i.
A_{Hi} = La actividad de agua del soluto i disuelto en toda el agua

En la acidificación se empleo vinagre comercial (ácido acético al 4% ≈) en concentraciones del 2, 4, 6 y 8% (v/v) ; ácido cítrico qp (Merck) en concentraciones del 0.2, 1, 2 y 3 % (p/V) y ácido láctico (grado alimenticio) al 0.5, 1 y 2% (v/v). Estos ácidos fueron incorporados al filete por inmersión durante 10 minutos. En la Figura 1 se indican los pasos seguidos en el desarrollo del experimento.

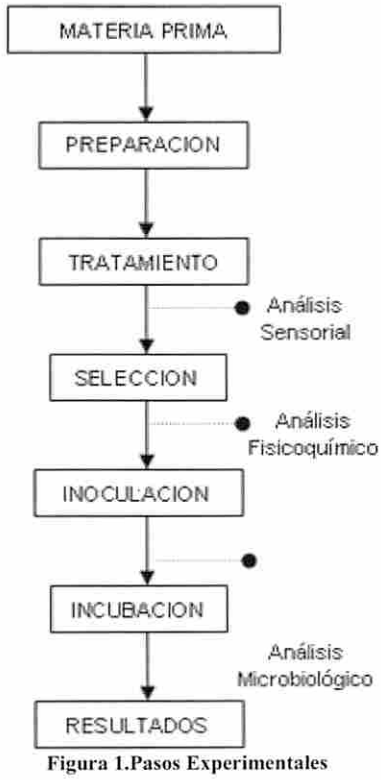


Figura 1.Pasos Experimentales

Análisis Sensorial. Para esta prueba sensorial se utilizo una escala hedónica de 5 puntos, donde 1 representó *Me disgusta mucho* y 5 representó *Me gusta mucho*. Los atributos evaluados fueron: sabor, color y textura Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza. Para propósitos de este estudio se utilizó un límite de confianza de 95%.

Análisis Físico-Químico. Los análisis practicados a las soluciones ternarias fueron: Sólidos solubles (°Brix), pH y Cloruros; y a la materia prima como a los filetes tratados se les determinó: humedad, acidez; y cloruros. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado de acuerdo a los métodos descritos por la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1990) con algunas modificaciones. En el análisis estadístico se utilizaron los promedios de las determinaciones realizadas.

Actividad de Agua. La isoterma de desorción fue determinada gravimétricamente, por exposición de la carne a diferentes atmósferas de humedades relativas (Aw) conocidas y controladas por medio de diferentes sales inorgánicas [4,5]. Las isotermas se realizaron a 7±2°C a fin de evitar el deterioro de la muestra durante el análisis. Las muestras fueron pesadas sistemáticamente cada 72 horas hasta peso constante.

Análisis Microbiológico. En el aislamiento e identificación de la Escherichia coli se siguieron los protocolos recomendados por ICMSF [3,6]. La técnica empleada fue del Número Mas Probable (NMP) y posterior aislamiento en agar EMB (Merck); para la identificación se realizó tinción Gram y las pruebas bioquímicas respectivas para este tipo de microorganismo. A fin de cuantificar la carga microbiana inicial de Escherichia coli a inocular se empleo el estándar MacFarland (Carpenter, 1969; Koneman et al., 1987; Gerhardt et al., 1994) [7]. Finalmente la cuantificación de E. coli tanto en los filetes con y sin tratamientos se empleo Petrifilms E.coli™ (medio fluorogénico de 3M basado en β-glucuronidasa). Todas las determinaciones descritas se efectuaron por duplicado, paralelamente se realizaron blancos a fin de comprobar la idoneidad de los medios de cultivo y de las condiciones de trabajo empleadas.

Preparación e Inoculación de cepas de Escherichia coli. Cinco tubos con cepas de Escherichia coli fueron preparados y usados para la inoculación. Los aislados de Escherichia coli se sembraron en agua de peptona estéril al 0,1 % (Merck) y se incubaron a 37°C por 4-6 horas (tiempo en el cual se establece la fase logarítmica, OD 600 nm ≈ 0,5). La inoculación de los filetes tratados se realizó por inmersión durante cinco minutos en un caldo de cultivo de E.coli (OD=0,50), y se almacenaron en fundas estériles a 30 °C por 24 horas. Se realizaron recuentos de E.coli (Petrifilms, 3M) para t = 0, 2, 4 y 8 horas. Todos los tratamientos se realizaron por replica y duplicado, además se realizaron en paralelo un blanco (muestra con tratamiento y sin inocular) y un testigo (muestra sin tratamiento y sin inocular). A fin de evitar, algún tipo de contaminación cruzada que pueda afectar en el resultado de los ensayos se procedió a desinfectar todos los utensilios empleados con agua clorinada con 5 -10 ppm de cloro residual [8].

Análisis y Resultados

Selección de las concentraciones de agentes osmóticos, pH y ácidos orgánicos.

La selección de las concentraciones de agentes osmóticos y ácidos orgánicos se realizó por medio de un análisis sensorial en el que se determinó el grado de satisfacción (gusto o disgusto) que produce la muestra, los atributos evaluados fueron: sabor, color y textura.

De las soluciones osmóticas ternarias estudiadas se determinó, con (P<0.01), que concentraciones del 40, 50 y 60 °Brix con proporciones de cloruro de sodio / sacarosa de (1.5:1); (2:1) y tiempos de inmersión superiores a 2,5 minutos resultaron indeseables sensorialmente, debido al predominio del sabor salado. Por el contrario, los tratamientos en los que se empleó soluciones osmóticas de 40 y 50 °Brix con proporción de NaCl / Sacarosa de (1:1), y tiempos de inmersión de 2,5 a 20 minutos y, de 2,5 a 5 minutos, respectivamente, no presentaron entre sí diferencias significativas en las puntuaciones obtenidas en la evaluación sensorial, resultando ser aceptables para los panelistas.

Además, se determinó que con la solución osmótica de 40° Brix (1:1) y t = 10 minutos, se obtuvo una reducción del contenido de agua desde 75% (Aw ≈0,999) hasta 68% (Aw ≈0,93) en la carne. Lográndose, valores de actividad de agua por debajo del mínimo permisible (Aw= 0,95) para el desarrollo de E.coli.

Como beneficio adicional del tratamiento osmótico se obtuvo un brillo en el producto que mejoró notablemente su apariencia (color) respecto del original. Esto se debió a que la inmersión en solución osmótica proporciona condiciones reductoras que minimizan la formación de metamioglobina [4,9,10]

Basándose en el análisis anteriormente descrito, se escogió como el tratamiento idóneo para la reducción de la actividad de agua, la solución osmótica ternaria de 40° Brix (1:1) con un tiempo de inmersión de 10 minutos, debido a que se obtuvo una reducción de la actividad de agua suficiente para inhibir el crecimiento de E. coli, sin modificar, notablemente las características sensoriales del alimento.

Tomando como referencia el tiempo de inmersión del experimento anterior (t = 10 min.), se procedió a estudiar el efecto del pH y concentración de ácidos orgánicos utilizados, sobre los atributos sensoriales del filete de res; comprobándose con (P<0.01) que la puntuación sensorial decrecía linealmente con la reducción en el pH. Este desmerecimiento en la puntuación se atribuyó principalmente a los cambios en las propiedades físicas de las proteínas que conllevaron a un endurecimiento de la textura acompañado de un pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard), donde el colágeno y las hemoproteínas parecieron ser los más afectados post-cocción.

Lo antepuesto se fundamenta en el efecto que tiene el pH sobre la capacidad de retención de agua (CRA) en carnes tratadas con cloruro sódico. Si el pH es mayor que 5 la CRA se mejora notablemente y si el pH es menor de 5 la CRA disminuye al añadir cloruro sódico [9,11]. Esto se debe a que el ión Cl- es mucho más activo que el Na+ y capaz de

neutralizar las cargas positivas del músculo a pH menor que 5. A pH mayor que 5 el músculo esta cargado negativamente, por lo que el ión Cl- resulta inactivo. De este hecho experimental, dependen propiedades sensoriales de la carne como: color, terneza y jugosidad. Por otro lado, concentraciones de ácido cítrico superiores al 1% ocasionaron decoloración y un ligero sabor ácido en el producto. En cuanto a la terneza y jugosidad, estas decrecieron linealmente con el aumento en la concentración del ácido. Resultando el tratamiento con 0,2 % de ácido cítrico el más aceptable.

Respecto al ácido láctico, si bien es cierto tiene magnificas cualidades como conservante natural, su aplicación en productos cárnicos crudos fue poco satisfactoria sensorialmente, ya que resaltó el sabor salado, además de que oscureció notablemente el color de los filetes de res. Se recomienda utilizar como máximo un 0,5 % en solución acuosa.

En cuanto al uso de ácido acético se estableció que concentraciones superiores al 4% resultaron desagradables para los panelistas. La principal razón se atribuyó a la perdida de jugosidad y terneza (textura reseca) y a un color levemente parduzco post-cocción.

En definitiva, la desnaturalización y pérdida de la capacidad de retención del agua, que se observó en los tratamientos, es menos intensa en muestras de carne con un valor de pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas que a un valor más bajo.

A continuación en la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos
en los análisis físico-químicos realizados a los tratamientos seleccionados.

40C02 = Ac. Cítrico 0.2%; 40C2 = Ac. Cítrico 2%; 40L05 = Ac. Láctico 0.5%; 40L1 = Ac. Láctico 1%; 40AC2 = Ac. Acético 2%; 40AC4 = Ac. Acético 4%

Tabla 1. Parámetros físico-químicos de los tratamientos seleccionados, mediante evaluación sensorial.

Ensayos	Humedad (%)	Aw	pH	Acidez (%)	NaCl (%)
Blanco	74.74	1	5.30	0	0
4000	68.28	0.92	5..23	0	7.42
40C02	68.22	0.93	5.18	0.17	5.80
40C2	66.07	-	4.75	0.40	-
40L05	68.33	0.93	5.21	0.38	6.13
40L1	66.44	-	4.89	0.68	-
40AC2	67.54	0.94	5.70	0.21	5.22
40AC4	67.96	0.95	5.49	0.48	4.50

Efecto de la reducción de actividad de agua

Tabla 2. Efecto de Actividad de Agua en el Crecimiento de E. coli a Temperatura de 30 ±2 °C.

Ensayo	Aw	E. coli [a] Log_{10}	E. coli [b] Log_{10}	E. coli c Log_{10}
Materia prima	0.99	1.84	MNC	MNC
4000[d]	0.92	8.03	6.36	6.96

Como se observa en la Tabla 2, una reducción substancial de la actividad de agua de 0,99 a 0,93 tuvo un efecto marcado en el decrecimiento de la Escherichia coli inoculada. Por ejemplo, se observa una reducción en la carga microbiana de tres ciclos log, después de 2 horas de incubación de la muestra con tratamiento. Por el contrario, en los filetes de res sin tratamiento los recuentos al cabo de 2 horas resultaron muy numerosos para contar (MNC).

Lo anteriormente descrito se debió a que a valores de actividad de agua inferiores a 0.95, la velocidad de crecimiento y la masa celular final disminuye y la fase de latencia aumenta. Esto se debe al efecto que proporciona el cloruro de sodio no sólo en la reducción de la actividad de agua en el alimento, sino también al encogimiento que produce en el volumen celular del E. coli, debido a la perdida de agua a nivel citoplasmático [4, 12,13, 14].

Al cabo de cuatro horas de incubación se realizó un nuevo recuento y se observó un leve incremento del mismo. Sin embargo, este valor se mantuvo dentro del ciclo logarítmico obtenido en el recuento anterior. Este ligero repunte tiene su explicación a través de los mecanismos homeostáticos; mediante los cuales, los microorganismos sobrevivientes tratan de sobreponerse al medio inhóspito, acumulando suficientes solutos compatibles a nivel citoplasmático (mecanismo de osmoregulación). Por medio de este mecanismo, el Escherichia coli contrarrestó el gradiente de concentración entre el medio interno y el externo de la membrana celular; logrando un efecto protector en la actividad enzimática del mismo [15,16, 17].

Subsiguientemente, el continuo mantenimiento de los gradientes de concentración de soluto a través de la membrana celular terminan provocando reacciones de stress, que disminuyen la tasa de crecimiento microbiano y prolongan la fase lag. De esta forma, es como, la tecnología de obstáculos (barreras) logra retardar el deterioro de los alimentos. Además, este efecto puede incrementarse aplicando otras barreras.

Efecto de la reducción de pH y adición de ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos empleados fueron incorporados en la carne a través de la solución osmótica; y su efecto inhibitorio se valoró por la concentración de acido no disociado presente, el cual a su vez dependió del pH. Esta fracción de ácido no disociado es 60 a 100 veces más inhibidor que el ácido disociado; su eficacia en la reducción del pH y su aporte de ácidos no disociados en los tratamientos se puede observarse en la Tabla 3.

Durante los ensayos, se observó que tanto el ácido cítrico al 2% (p/v) como el ácido láctico al 1% (v/v) tuvieron un efecto desagradable (decoloración) en la apariencia de la carne cruda, luego de 4 horas de exposición al ambiente. Este cambio desfavorable en la apariencia de la carne cruda se debió a una desnaturalización proteica, producto de un descenso en el pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína cárnica, como se explicó anteriormente. Contrariamente, la adición de ácido cítrico al 0.2% (p/v) y ácido láctico 0,5% (v/v) no tuvieron efecto en la apariencia del producto; por ello, estos fueron considerados en las experimentaciones con Escherichia coli.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos evaluados en la carne de res, luego de la acidificación.

Ensayos	% de acido no disociado	% acido no disociado mínimo inhibitorio	E coli [a] Log_{10}	E coli [b] Log_{10}	E coli [c] Log_{10}
Blanco [d]	0	----	8..03	6.36	6.96
40C02	0.0006	0.0005	8.03	6.97	6.63
40L05	0.019	0.01	8.03	6.30	6.77
40AC2	0.003	0.05	8.03	6.58	6.76
40AC4	0.097	0.05	8.03	6.49	6.41

40C02 = Ac. Cítrico 0.2%; 40C2 = Ac. Cítrico 2%; 40L05 = Ac. Láctico 0.5%; 40L1 = Ac. Láctico 1%; 40AC2 = Ac. Acético 2%; 40AC4 = Ac. Acético 4%.

En la Tabla 4 se puede observar, que las muestras tratadas con ácido cítrico al 0,2 % y acético al 4%, el crecimiento del E. Coli se mantuvo en descenso, luego de cuatro horas. Esto indicaría que el microorganismo realmente no pudo sobreponerse al medio inhóspito, debido a que el porcentaje de ácido no disociado en la carne fue mayor al mínimo requerido para la inhibición de este tipo de microorganismo. Lo que no ocurrió en el ácido acético al 2%, donde la concentración de ácido no disociado fue menor a la mínima inhibitoria [13,18, 19].

En el caso específico del ácido láctico 0,5 %, a pesar de que la concentración de ácido no disociado fue mayor al mínimo inhibitorio, su débil efecto se debió a su interacción con el cloruro de sodio. Es conocido que la mayor parte de los

microorganismos, a excepción de los ácido-sensibles, pueden desarrollarse en un amplio intervalo de pH. Cabría pensar, que el E. coli dispone de mecanismos eficaces para estabilizar su pH interno. Por lo tanto, el efecto inhibitorio observado posiblemente este dado por la fracción no disociada de los ácidos.

Tabla 4. Efecto de la concentración de ácido no disociado en la inhibición del E.coli a 30± 2°C.

Ensayos	pH	% Acidez	Proporción de acido no disociado	% de acido no disociado
40C02	5.18	0.17	0.0034	0.0006
40C2	4.75	0.40	0.050	0.020
40L05	5.21	0.38	0.049	0.019
40L1	4.89	0.68	0.097	0.066
40AC2	5.70	0.21	0.14	0.003
40AC4	5.49	0.48	0.203	0.097

40C02 = Ac. Cítrico 0.2%; 40C2 = Ac. Cítrico 2%; 40L05 = Ac. Láctico 0.5%; 40L1 = Ac. Láctico 1%; 40AC2 = Ac. Acético 2%; 40AC4 = Ac. Acético 4%

a = recuento en t=0 horas; b = recuento en t=2 horas; c = recuento en t=4 horas; d = tratamiento con solución osmótica sin acidificación.

Efecto Sinérgico de las Barreras Seleccionadas

En la Tabla 5 se puede observar que la concentración de cloruro de sodio disminuyó al adicionar un ácido cualquiera, esto influyó directamente en los valores de actividad de agua. Este fenómeno puede deberse a un cambio en las difusividades de los componentes de la solución osmótica, los cuales compiten entre sí para ingresar en la carne [5]. Consecuentemente, al adicionar el ácido en la solución osmótica la difusividad del cloruro de sodio a través del alimento disminuyó, este efecto es mayor si adicionalmente incrementamos la concentración del ácido.

Con respecto al crecimiento de Escherichia coli, se pudo observar que todos los tratamientos aplicados redujeron los recuentos en tres ciclos log. Si comparamos el tratamiento 4000, en el cual sólo se aplicó una reducción de la actividad de agua, con los demás tratamientos en los que la acidificación constituyó una barrera más, se puede observar que en el primero el crecimiento de E. coli fue mayor. Demostrando así, que la combinación de barreras produce una mejor inhibición microbiana y como consecuencia una mayor estabilidad del alimento [12].

Tabla 5. Efecto sinérgico de los tratamientos aplicados en la inhibición del E. coli a 30 ±2 °C.

Ensayos	Aw	pH	% de acido no disociado	E. coli Log_{10}^{a}	E. coli Log_{10}^{b}
Materia Prima	0.99	5.30	0	1.84	MNC
4000[c]	0.92	5,.23	0	8.03	6.96
40C02	0.93	5.18	0.0006	8.03	6.63
40L05	0.92	5.21	0.019	8.03	6.77
40AC2	0.94	5.70	0.067	8.03	6.76
40AC4	0.95	5.49	0.043	8.03	6.41

a = recuento en t=0 horas; b = recuento en t=4 horas; c = tratamiento con solución osmótica sin acidificación

En el caso particular del ácido láctico al 0,5 % (v/v), su débil efecto en la inhibición microbiana se debió a su combinación con el cloruro de sodio. Según estudios realizados [13,18, 19], se ha podido establecer que la combinación simultánea de cloruro de sodio y ácido láctico incrementan la tasa de supervivencia del E. coli. Este efecto protector es debido principalmente a un incremento del pH citoplasmático de la célula bacteriana. De tal manera, que lo observado en los experimentos con ácido láctico comprobaría los estudio in Vitro realizado por Casey and Condon (2002). Por otro lado, contradice el criterio generalizado de otros autores de que mezclas de cloruro de sodio con ácidos orgánicos tienen muy poco efecto en la inhibición del E.coli. En definitiva, se obtuvieron mejores efectos inhibitorios sobre el E. coli con los tratamientos 40AC4 y 40C02. Si analizamos el hecho que el tratamiento 40AC4 produjo una ligera decoloración en la carne, podríamos sugerir como el mejor tratamiento 40C02.

CONCLUSIÓN

En este estudio se comprobó que la combinación de mínimos procesos de preservación como la reducción de la actividad de agua y la acidificación con ácidos orgánicos débiles, produjeron un efecto inhibitorio en el crecimiento del *Escherichia coli.*

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Centro de Investigación Científica y Tecnológica de la ESPOL, por su invalorable aporte al desarrollo del presente trabajo.

REFERENCIAS

[1] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, ICMSF, Microorganismos De Los Alimentos: Métodos De Muestreo Para Análisis, Acribia. Zaragoza- España, 1981.

[2] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, ICMSF, Microorganismos De Los Alimentos: Su Significado y Métodos de Enumeración, Acribia, Zaragoza- España, 2000.

[3] KARTHIKEYAN, J; KUMAR SUSHIL, ANJANEYULU, A.S.R: RAO, K..H, Application of Hurdle Technology for the development of Caprine Keema and its stability at ambient temperature. Meat Science, Volumen 54, págs. 9 -15, 2000.

[4] Comaposada, J.; Gou, P.; Arnau, J., The effect of Sodium Chloride content and temperature on pork meat isotherms. Meat Science. Volumen 55, págs. 291-295, 2000

[5] Labuza T. Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use, American Association of cereal Chemists, St. Paul-Minnesota – EEUU, 1984

[6] Mountney, G., Practical Food Microbiology and Technology, Avi, New York., 1998

[7] Arcos, M.L.; Ossa, F.; Díaz, T., Criopreservación de aislados nativos de bactérias. Articulo Científico. Revista Corpoica, Volumen 5 N°1, págs. 60-63, 2004.

[8] Hayes, P. R., Microbiología E Higiene De Los Alimentos, Acribia, Zaragoza, 1993.

[9] López De La Torre G., Carballo B., Madrid A., Tecnología de las Carnes y de los Productos Cánicos, 1° Edición, Editorial Mundi Prensa y AMV, Madrid –España, 2001.

[10] Salguero, F.; Gomez, R.; Carmona, M., , Water Activity in Selected High-Moisture Foods, Journal of Food Composition and Analysis, Volumen 6, págs. 364-369, 1993.

[11] Girard, J., Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos, Editorial Acribia Zaragoza - España, 1991.

[12] Albrighta, S.; Kendalla, P.; Avensa, J.; Sofosb, J., Pretreatment effect on inactivation of Escherichia coli O157:H7 inoculated beef jerky, lwt, Volumen 36, págs. 381-389, 2003

[13] Casey, Pat; Séamus Condon, Sodium Chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on Escherichia coli O157:H45. International Journal of Food Microbiology, Volumen 76, págs. 199-206, 2002.

[14] Leistner L., Grahame W. Gould, Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability Safety and Quality, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York- EEUU, 2002.

[15] Carneya, E.; O'briena, S.B.; Sheridana, J.J.; Mcdowellb, D.A.; Blairb, I.; Duffya, G., Prevalence and level of Escherichia coli O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant, Food Microbiology, Volumen 23, págs. 52-59, 2006.

[16] Coia, J.; Johnston, Y.; Steers, N.; Hanson, M., A survey of the prevalence of Escherichia coli O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland, International Journal of Food Microbiology, Volumen 66, págs. 63-69, 2001.

[17] Qiongzhen Li; Sherwood, J.; Logue, C., The prevalence of Listeria, Salmonella, Escherichia coli and Escherichia coli O157:H7 on bison carcasses during processing. Food Microbiology, Volumen 21, págs. 791-799, 2004.

[18] Hajmeer, M.N.; Marsden, J.L.; Fung, D.Y.C.; Kemp, G.K., Water. Sodium chloride and acidified sodium chlorite effects on Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus on beef briskets. Meat Science, Volumen 68, págs. 277 – 283, 2004.

[19] Mellefont, L.A.; Memeekin, T.T.; Ross, T., Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of Escherichia coli, International Journal of Food Microbiology, Volumen 82, págs. 45-58, 2003.

EFECTO DEL ÁCIDO LÁCTICO, BAJAS TEMPERATURAS Y PELÍCULAS DE DIFERENTE PERMEABILIDAD AL OXÍGENO SOBRE LA FLORA MICROBIANA DE CARNES. APLICACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS.

Coll Cárdenas, Fernanda[1]; Giannuzzi, Leda[1]; Zaritzky, Noemí[1, 2].
[1]CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, CIDCA, [2]FACULTAD DE INGENIERÍA, Depto Ing. Química, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
Calle 47 y 116, 1900. E-mail: zaritzky@volta.ing.unlp.edu.ar
LA PLATA, ARGENTINA

Palabras claves: microbiología predictiva, carnes bovinas, refrigeración, ácido láctico, películas de envase

RESUMEN

La necesidad de ampliar la vida útil de las carnes, haciéndola accesible para el consumo en condiciones higiénico sanitarias adecuadas ha llevado al empleo de tecnologías como refrigeración, envasado al vacío y agregado de preservadores químicos.

La microflora bacteriana habitual está formada por *Pseudomonas, Enterobacterias y Lactobacillus,* que dependiendo de su número pueden causar alteraciones e intoxicaciones.

Los objetivos de este trabajo fueron analizar el efecto de la temperatura (0, 4 y 10ºC), la permeabilidad gaseosa (polietileno y envasado al vacío con EVA SARAN EVA, ESE) y el agregado de ácido láctico como preservador, sobre el crecimiento de bacterias inoculadas (Enterobacterias, específicamente *E. coli; Pseudomonas y Lactobacillus*) en carne bovina molida de pH alto, consideradas de baja calidad. El crecimiento microbiano fue modelado mediante la ecuación de Gompertz y ecuaciones lineales. Se calcularon los parámetros derivados: fase de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y máxima densidad poblacional (MDP). Los mayores valores de μ, resultaron para *E. coli* (1.30 log (UFC/g) días^{-1} a 10°C) en polietileno y para *Lactobacillus* (0.79 log (UFC/g) días^{-1} a 10°C) en ESE. En tanto, para LPD, los mayores resultados correspondieron a *Pseudomonas* a 0°C, en polietileno (10 días) y a *E. coli,* en ESE, a 0 y 4°C (50 días). Se observó que los parámetros cinéticos obtenidos para las muestras con agregado de láctico, no mostraron diferencias significativas con los de las muestras de pH original 5.6. También se determinó el efecto de la temperatura sobre los valores de μ y LPD, calculándose mediante una ecuación tipo Arrhenius, las energías de activación correspondientes, Eμ y $E_{1/LPD}$ correspondiendo los mayores valores de Eμ a *Lactobacillus* (53.01 KJ/mol) en polietileno y a *E. coli* (331.90 KJ/mol) en ESE, en tanto que de $E_{1/LPD}$ correspondieron a *Pseudomonas* (92.12 KJ/mol) en polietileno y *Lactobacillus* (172.18 KJ/mol) en ESE.

INTRODUCCIÓN

Después de ocurrida la muerte del animal, el glucógeno se convierte en ácido láctico por vía glucolítica, y si las reservas del glucógeno son altas, se producirá una concentración de ácido láctico tal que permitirá valores de pH bajos en las carnes. El pH del músculo a las 24 horas post mortem es un factor importante que influye sobre ciertos aspectos de la calidad de la carne, como por ejemplo la inhibición del crecimiento microbiano (Mariño A., 2005; Sánchez, 1999). Los estudios sobre producción in situ de ácido láctico en carnes, se enfocan así en dos aspectos: inhibir el crecimiento de la flora patógena y de descomposición como *E. coli; Enterobacteriaceae; Serratia sp; Brochotrix thermosphacta y Pseudomonas* (Minor-Pérez, H. y col., 2002; Guerrero y col, 1995) y evitar efectos negativos sobre las propiedades funcionales como el color, la textura y el sabor (Guerrero y col, 1995; Ogden y col, 1995).

El pH es diferente dependiendo del músculo bovino del cual se trate, algunos tales como el grupo de extensores y flexores de los miembros, tienen un pH natural de 6.1, considerándose como carnes de baja calidad. Por lo tanto es interesante desde el punto de vista tecnológico, aumentar el valor de estos cortes mediante el agregado de un compuesto metabólico natural, como el ácido láctico, con el fin de mejorar la calidad.

Otras técnicas usadas para extender la vida útil de los cortes de carne fresca son la refrigeración y el envasado al vacío mediante películas de baja permeabilidad al oxígeno (Osmanagaoglu, 2002), tales como EVA SARAN EVA.

Los modelos matemáticos permiten cuantificar y predecir el crecimiento microbiano bajo ciertas condiciones ambientales, determinando así también su vida de almacenamiento. El modelo de Gompertz, es uno de los más utilizados y permite determinar parámetros tales como duración de la fase de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y máxima densidad poblacional (MPD) de los microorganismos.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) Analizar el efecto de la temperatura (0, 4 y 10°C) y de la permeabilidad gaseosa de la película de envase (polietileno y EVA-SARAN-EVA con envasado al vacío) en el crecimiento de *Pseudomonas sp, Escherichia coli y Lactobacillus sp*, aisladas de carne bovina e inoculadas en carne picada. b) Modelar el crecimiento microbiano y determinar el efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos correspondientes: duración de la fase de latencia y velocidad específica de crecimiento. c) Analizar la influencia del ácido láctico, agregado en la carne picada para disminuir el pH de 6.1 a 5.6, en los parámetros microbianos y comparar con los resultados obtenidos en muestras de carne con pH natural 5.6.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Adición de ácido láctico:

Muestras cárnicas de 1000g de osobuco, con pH original 6.1, fueron picadas y tratadas con ácido láctico (87.5% P/P) (Merck) en concentraciones de 5.6 mmoles de ácido por kg de carne. Esto, se realizó con el fin de disminuir el pH de 6.1 a 5.6. Se inocularon *E. coli, Pseudomonas sp. y Lactobacillus sp.* en forma individual, en una concentración de 10^5 UFC/g para evaluar el efecto del ácido láctico en su desarrollo. Estas muestras se dividieron en submuestras de 20 g, y se envasaron en polietileno (película de alta permeabilidad al oxígeno, OTR= 5000 cm^3 m^{-2} atm^{-1} día^{-1} a 23°C) y en EVA SARAN EVA (película de baja permeabilidad, OTR= 50 cm^3 m^{-2} atm^{-1} día^{-1} a 23°C) almacenadas a 0, 4 y 10ºC durante un tiempo máximo de 50 días.

Análisis microbiológicos:

A diferentes períodos de almacenamiento (entre 0 a 50 días), se tomaron muestras y se sembraron en medios selectivos específicos para cada microorganismo: Agar EMB (37°C, 24-48hs) para *E coli* , Agar MRS (37°C en anaerobiosis, 24-48hs) para *Lactobacillus* y Agar Masurovsky (37°C, 24-48hs) para *Pseudomonas sp* (Masurovsky et al., 1963).

Modelado matemático:

Los modelos matemáticos permiten describir el efecto de los factores que afectan los parámetros del desarrollo microbiano. Uno de los más recomendados es la ecuación de Gompertz cuya expresión es:

$$\log N = a + c.\exp(-\exp(-b(t-m))) \quad (1)$$

donde: log N es el log. de los recuentos microbianos [log (UFC/ml)] al tiempo t, dado en días; a es el log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aprox. equivale al log de los niveles iniciales de bacterias) [log (UFC/ml)]; a+c es el log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (c es el número de ciclos log de crecimiento) [log (UFC/ml)]; m es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [días]; b es la velocidad de crecimiento correspondiente al tiempo m $[días]^{-1}$. De estos parámetros, derivan la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b \cdot c / e$) [log (UFC/ ml)/días], (e = 2,7182); la duración de la fase de latencia (LPD = m-1/b) [días] y la máxima densidad poblacional (MPD = a + c) [log UFC/ml]. La ecuación fue ajustada a los datos experimentales mediante regresiones no lineales con el programa Systat.

En otros casos, cuando el número de microorganismos se mantuvo estable o decreció durante el almacenamiento, se utilizó el modelo de regresión lineal. La ecuación, en ese caso se expresa como:

$$\log N_t = \log N_0 + r\,t \qquad (2)$$

donde: log N_t es el log. de los recuentos microbianos finales [log (UFC/ml)] al cabo del tiempo t, dado en [días]; log N_0 es el log. de los recuentos microbianos iniciales [log (UFC/ml)] y r corresponde a la pendiente de la regresión $[(UFC/ml)^{-1}\ días^{-1}]$ que es negativa cuando hay efecto bactericida.

Se consideró que los microorganismos están en fase de latencia si la pendiente r adquiere un valor menor a 0.01 $(UFC/ml)^{-1}$ $días^{-1}$, o si la diferencia entre los recuentos finales y los iniciales son menores a 0.5 ciclos log. Se calculó la fase de latencia como el tiempo requerido a partir del cual el desarrollo microbiano aumentó 0.5 log del nivel inicial (LPD = 0.5/ r). El análisis de la varianza y el test de Fisher (LSD) fueron aplicados con un nivel de significación de 0.05 y 0.01. Se utilizó el programa estadístico SYSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del ácido láctico agregado

Se analizó el efecto del agregado de ácido láctico sobre el desarrollo de las bacterias inoculadas *(E. coli, Lactobacillus y Pseudomonas sp)* en muestras de carne picada cuyo pH inicial era 6.1 y que fueron llevadas a pH 5.6, almacenadas a 0, 4 y 10°C y envasadas con las diferentes películas (poletileno y ESE). También se estudió el efecto de este ácido sobre la estabilidad del pH.

Se observó que las muestras de carne envasadas en polietileno se mantuvieron a pH=5.6 durante el tiempo en el cual las bacterias se presentaron en fase exponencial; cuando los recuentos resultaron con valores superiores a 7 log UFC/g, el pH aumentó superando las 6 unidades de pH, indicando que en estas condiciones la capacidad tampón de la carne fue superada por los productos metabólicos bacterianos. En las muestras en ESE, en tanto, el pH alcanzado de 5.6 se mantuvo constante durante el tiempo que duró la experiencia.

En la Tabla 1 se presentan los parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento bacteriano. Puede observarse que para el caso de las muestras cárnicas envasadas en polietileno, los mayores resultados de la velocidad específica de crecimiento correspondieron a *E. coli*, con valores entre 0.99 a 1.61 log $UFC/g\ días^{-1}$. En cuanto a la fase de latencia, *Pseudomonas* fue el microorganismo que presentó los valores de LPD más altos (2.3 a 11 días).

Para las muestras envasadas con la película de ESE, al vacío, se observó que *E. coli* presentó los menores resultados de μ y las fases de latencia más largas con una duración máxima de 50 días, tiempo límite que duró la experiencia. Es importante destacar que en las carnes con agregado de ácido láctico para llegar a pH 5.6, no se observaron diferencias significativas en el desarrollo microbiano con respecto a las muestras con pH original 5.6.

Tabla 1: Parámetros cinéticos μ, LPD y MPD de *E. coli*, *Pseudomonas sp y Lactobacillus* en muestras cárnicas con pH 6.1 y agregado de ácido láctico (LA), envasadas en polietileno y ESE.

E. coli. POLIETILENO				
T°C	pH	μ	LPD	MPD
0	5.6	0.99±0.51	3.78±0.74	8.01
	6.1+LA	0.83±0.05	3.45±0.09	7.00
4	5.6	1.58±0.41	3.22±0.38	9.01
	6.1+LA	1.41±0.54	3.26±0.99	7.64
10	5.6	1.61±1.20	2.89±1.48	9.23
	6.1+LA	1.30±0.38	2.79±1.04	7.83
E. coli. ESE				
T°C	pH	μ	LPD	MPD
0	5.6	0.01	50	----
	6.1+LA	0.03	50	----
4	5.6	0.001	50	----
	6.1+LA	0.001	50	----
10	5.6	0.17±0.13	11.37±2.07	6.92
	6.1+LA	0.22±0.05	6.68±2.13	7.16
Pseudomonas. POLIETILENO				
T°C	pH	μ	LPD	MPD
0	5.6	0.40±0.17	11.00±3.04	7.47
	6.1+LA	0.39±0.11	10.00±1.92	7.50
4	5.6	0.74±0.09	4.51±0.83	8.44
	6.1+LA	0.75±0.20	4.71±0.84	8.31
10	5.6	0.75±0.28	4.50±1.02	9.67
	6.1+LA	0.75±0.18	2.30±1.24	9.80
Pseudomonas. ESE				
T°C	pH	μ	LPD	MPD
0	5.6	0.05±0.02	10.85±0.03	5.33
	6.1+LA	0.05±0.01	12.90±1.69	5.29
4	5.6	0.13±0.64	8.71±1.57	6.25
	6.1+LA	0.12±0.27	9.96±1.65	6.15
10	5.6	0.22±0.04	1.87±1.03	7.69
	6.1+LA	0.26±0.03	2.73±1.83	6.98
Lactobacillus. POLIETILENO				
T°C	pH	μ	LPD	MPD
0	5.6	0.24±0.03	3.66±0.71	5.20
	6.1+LA	0.26±0.02	4.70±1.70	5.75
4	5.6	0.29±0.09	1.92±1.21	5.80
	6.1+LA	0.36±.08	3.40±1.50	5.85
10	5.6	0.55±0.04	0.03±0.56	6.50
	6.1+LA	0.60±0.13	1.20±0.24	6.46
Lactobacillus. ESE				
T°C	pH	μ	LPD	MPD
0	5.6	0.19±0.04	18.86±1.99	5.90
	6.1+LA	0.23±0.09	22.8±3.34	6.00
4	5.6	0.38±0.06	5.38±0.64	6.70
	6.1+LA	0.38±0.02	6.70±1.01	6.26
10	5.6	0.75±0.09	0.32±0.62	7.00
	6.1+LA	0.79±0.17	1.50±0.70	6.93

μ: $log(UFC/g)días^{-1}$, MPD: (log(UFC/g), LPD: (días).

Efecto de la temperatura sobre los parámetros de Gompertz (μ y LPD) de los microorganismos inoculados

La acción de la temperatura sobre la velocidad específica del crecimiento (μ) fue interpretada mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\mu = A.\exp(-E\mu/RT) \quad (3)$$

donde T es temperatura en K, Eμ es la energía de activación de la velocidad específica de crecimiento (KJoule/mol), A es un factor preexponencial y R es la constante de los gases (8.31 KJoule/°K mol). La energía de activación puede ser considerada como la sensibilidad de los microorganismos a los cambios de temperatura.

$$\ln \mu = \ln A - E\mu/RT \quad (4)$$

El efecto de la variación de la temperatura sobre la fase de latencia (LPD) fue considerada como un mecanismo de adaptación por parte de los microorganismos. La velocidad de adaptación se consideró proporcional a la recíproca de LPD (Li y Torres, 1993) y fue modelada usando una ecuación tipo Arrhenius:

$$1/LPD = B.\exp(-E_{1/LPD}/RT) \quad (5)$$

donde: T es la temperatura en K, $E_{1/LPD}$ es la energía de activación (KJoule/mol) para la velocidad de adaptación, B es un factor preexponencial y R es la constante de los gases (8.31 KJoule/°K mol). Luego:

$$\ln(1/LPD) = \ln B - E_{1/LPD}/RT \quad (6)$$

Los resultados de Eμ y $E_{1/LPD}$ se presentan en la Tabla 2; donde puede observarse que cuando las muestras se envasaron en polietileno, *Lactobacillus* presentó los mayores valores de Eμ, siendo considerado por lo tanto, como el microorganismo más sensible a la variación de temperatura, en estas condiciones; en ESE, *E. coli*, resultó ser el de mayor valor (331.90 KJ/mol). Con respecto a $E_{1/LPD}$ en polietileno, los mayores valores correspondieron a *Pseudomonas*, en tanto que en ESE, *Lactobacillus* mostró los más altos valores.
Los coeficientes de determinación (r^2) obtenidos estuvieron comprendidos entre 0.97 y 0.99.

Tabla 2: Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y sobre la fase de latencia (LPD) Las energías de activación se obtuvieron a partir del desarrollo de *Lactobacillus sp, E. coli y Pseudomonas sp* en muestras de carne de pH 6.1 con agregado de ácido láctico para llegar a pH 5.6, envasadas en películas de polietileno y al vacío Eva Saran Eva.

E_{LPD}[Kjoule/mol]	Eμ[Kjoule/mol]
Polietileno	
Lactobacillus sp	
88.83	**53.01**
Escherichia coli	
15.53	**34.90**
Pseudomonas sp	
92.12	**37.89**
EVA SARAN EVA	
Lactobacillus sp	
172.18	**78.36**
Escherichia coli	
136.11	**331.90**
Pseudomonas sp	
102.53	**103.04**

CONCLUSIONES

No se observaron diferencias significativas en el desarrollo microbiano de *E. coli, Pseudomonas sp y Lactobacillus* entre las muestras originales de pH 5.6, con aquellas de pH original 6.1 a las que se les adicionó ácido láctico hasta llegar a pH= 5.6, pudiéndose concluir que este ácido puede ser utilizado como un buen agente preservador de la carne fresca, aumentando la extensión de su vida útil.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las contribuciones a este trabajo realizadas por el CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina y la Universidad Nacional de La Plata.

REFERENCIAS

-Guerrero, I; Mendiolea, R; Ponce, E y Prado, A. (1995). Inoculation of Lactic Acid Bacteria on meat surfaces as a means of decontamination in Semitropical Conditions. *Meat Science*, 40, 397-411.
-Li, K. Y. & Torres, J. A. (1993). Microbial growth estimation in liquid media exposed to temperature fluctuations. *J Food Sci. 58*. 644-648.
-Mariño A., G.; Vilca L., M. y Ramos D., D. (2005) Evaluación del pH en canales de toros Holstein (Bos taurus) y Nelore (Bos indicus). *Rev. investig. vet. Perú*, vol. 16, no.1, 90-95.
-Masurovsky, E. B., Goldblith, S. A. & Voss, J. (1963). Differential medium for selection and enumeration of members of the *Pseudomonas*. *J. Bacteriol. 85*, 722.
-Minor-Pérez, H; Ponce-Alquieira, E; Macías Bravo, S; Guerrero Legarreta, I (2002) Conservación de carne fresca de cerdo por fermentación láctica: efecto sobre el color, latextura y la formación de los ácidos grasos libres. *Revista mexicana de Ingeniería Química*, vol 1, no. 1-2, 73-80.
-Ogden, S. K; Taylor, A.J; Guerrero, I; Escalona, H y Gallardo, F (1995). Changes in odour,colour and texture during the storage of acid preserved meat. *Lebensmittel Wissenscheft una Technologie*, 28, 521-527.
-Osmanagaoglu, O. (2002). Behaviour and biological control of bacteriocin-producing Leuconostocs associated with spoilage of vacuum-packaged sucuk. *Turk. J. Vet. Anim.* 27, 471-480.
-Sánchez. G. 1999. Ciencia básica de la carne. Fondo Nacional Universitario. Santafé de Bogotá , pp 229-233.

EVALUACIÓN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS CONTAMINANTES DE PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS.

Galvalisi, U., S.Lupo y L.Bettucci. Laboratorio de Micología. Facultad de Ingeniería. Universidad de la República. Montevideo-Uruguay.

RESUMEN

El proceso conocido como emplume o cobertura por hongos filamentosos tiene como objetivo producir una película blanca uniforme de mohos sobre la superficie de ciertos embutidos fermentados secos, dentro de los que se destaca el salamín tipo italiano. El emplume obtenido mediante inoculación espontánea o natural que es la empleada en Uruguay, puede poseer especies productoras de micotoxinas. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las especies fúngicas presentes en el emplume natural del salamín tipo italiano con la finalidad de obtener cepas apropiadas para el desarrollo de cultivos iniciadores. Las cepas fúngicas aisladas en su mayoría correspondieron a especies del género *Penicillium*, algunas de ellas potencialmente toxicogénicas tales como: *Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium chrysogenum* y otras benéficas como *Penicillium nalgiovense*, que es la especie más utilizada en Europa para realizar el emplume artificial. Estos resultados reflejan la necesidad de establecer controles más eficaces sobre la población fúngica en este tipo de embutidos mediante la utilización de cultivos iniciadores de superficie atoxicogénicos pero capaces de aportar las actividades enzimáticas adecuadas.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de elaboración de los productos embutidos fermentados secos se producen cambios físicos, químicos y bioquímicos que son los responsables de la obtención de un producto inocuo (1). Este proceso consta de tres etapas:

a) picado y mezcla de los ingredientes, b) fermentación y c) secado (1).

En dicho proceso intervienen de forma decisiva varios grupos de microorganismos, entre los cuales se destacan los hongos filamentosos. Éstos al igual que las levaduras colonizan con frecuencia la superficie de los embutidos, siempre que la humedad relativa de la cámara de maduración no sea demasiado baja (2).

Los requisitos que un cultivo de hongos filamentosos debe cumplir para su utilización en la industria alimentaria son: capacidad toxicogénica nula o muy reducida "in vitro" y en el producto, velocidad de germinación y crecimiento rápida, actividades proteolítica y lipolítica óptimas según el producto, no producción de antibióticos y color del micelio uniforme en el producto (2).

Los efectos positivos que confiere al producto la presencia de una flora superficial de hongos filamentosos durante la maduración son:

a) tienen efecto antioxidante, debido a que provocan la baja de la tensión superficial de oxígeno en la superficie.

b) regulan la salida de agua del embutido.

c) presentan la capacidad de actuar sobre las proteínas y la grasa de la masa, lo que contribuye de una manera importante al desarrollo del aroma del producto final.

d) protegen frente al crecimiento de microorganismos indeseables en la superficie (1, 2).

Sin embargo dos efectos pueden ser desfavorables: la producción de micotoxinas y provocar un aumento en el pH hasta valores cercanos a 7. En estas condiciones de pH pueden desarrollarse microorganismos patógenos como *S.aureus*, dado que esta bacteria es bastante resistente a condiciones de a_w reducidas (2).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras correspondieron a productos cárnicos fermentados secos (salamines tipo italiano) elaborados sin la utilización de cultivos iniciadores de superficie y embutidos en tripas naturales. Se adquirieron tres lotes de muestra de dos de las principales empresas frigoríficas de nuestro país, inmediatamente después de culminada su manufacturación. En todos los casos, el primer lote tenía una semana de secadero, mientras que el segundo y tercer lote tenían dos semanas de secadero. De cada uno de éstos, se estudiaron tres salamines.

Aislamiento e identificación de los hongos

El aislamiento de los hongos se realizó a partir de la superficie de cada uno de los salamines. Se seccionaron pequeños fragmentos de 1 cm^2 de cada uno de los extremos y del centro del salamín (superficie total: 3 cm^2). Con la finalidad de realizar un buen barrido de la superficie de cada fragmento, éstos fueron colocados en una solución de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,1% y agitados durante un minuto en vórtex. A partir de ésta, se realizaron diluciones seriadas con las que se inocularon las placas con el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA, pH: 4,5). La incubación de las mismas se realizó a 25° C durante 5 días. A partir de una dilución adecuada se realizó el recuento total de colonias. La identificación de los aislamientos a nivel de género se realizó de acuerdo a sus características morfológicas. La identificación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al género *Penicillium* se realizó siguiendo el protocolo de Pitt (3).

Capacidad toxicogénica

La capacidad toxicogénica de las distintas especies identificadas se determinó mediante un ensayo biológico como la prueba de mortalidad de larvas de *Artemia salina* (2). Las distintas especies fúngicas fueron inoculadas en matraces conteniendo 25 ml del medio de cultivo líquido Extracto de levadura-Sacarosa (YES) con una suspensión de 10^7 esporas/ml. Los matraces se incubaron en un agitador a 25° C, 15000 rpm durante 7 días. De cada uno de los matraces se tomaron alícuotas de 3 ml del medio y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos, a los efectos de eliminar el micelio. El sobrenadante fue filtrado utilizando filtros millipore 0.22. Una vez obtenidos los distintos filtrados, se realizaron las siguientes diluciones 1/10, 1/50 y 1/100 en agua destilada estéril.

Los huevos de *A. salina* se colocaron en una cubeta con agua destilada estéril y NaCl (2.4 %) e incubaron durante 24 horas a 25° C. Una vez eclosionadas las larvas, éstas se colocaron en placas de cultivo de células (20 a 30 larvas por pocillo) en un volumen de 2 ml y fueron expuestas a 0,1 ml de las distintas diluciones de los filtrados de cada uno de los hongos (se realizaron 6 réplicas). Se utilizó el medio de cultivo YES sin inocular como control. Luego de incubadas 24 horas a 25° C se determinó la mortalidad de las mismas, mediante la observación bajo microscopio estereoscópico. El porcentaje de mortalidad se calculó en relación al control de la siguiente manera:

$$\% \text{ mortalidad} = 100 - \left(\frac{\% \text{ de larvas vivas tratadas}}{\% \text{ de larvas vivas control}} \times 100\right)$$

La toxicidad de las cepas se consideró de acuerdo al siguiente criterio: 0-9 % de mortalidad: no tóxica, 10-49 % de mortalidad: débilmente tóxica, 50-89 % de mortalidad: tóxica y 90-100% de mortalidad: muy tóxica (4).

Producción de micotoxinas

La capacidad de producción del Ácido ciclopiazónico (ACP) y Patulina de las distintas especies se determinó por cromatografía en capa fina (TLC). Las distintas especies fúngicas fueron crecidas en el medio de cultivo Agar Extracto de levadura-Sacarosa (Agar YES) a 25° C y 14 ° C durante 10 días.

Para la evaluación de la producción de ACP se utilizaron cromatoplacas de aluminio con sílicagel 60 como fase estacionaria y sin indicador de fluorescencia. Las cromatoplacas fueron sumergidas en una solución de ácido oxálico al 2 % en etanol y secadas en estufa a 80° C durante una hora. Posteriormente se realizó la inoculación de las cromatoplacas en una línea trazada a 1,5 cm de la base de las mismas, en las que se colocaron tres discos de agar de 0,5 cm de diámetro, obtenidos mediante sacabocados del centro de las colonias de cada una de las cepas crecidas en YES (5). La fase móvil estuvo compuesta por benceno: ácido acético: metanol en las siguientes proporciones (90:5:7).

Una vez terminada la corrida, las placas se extrajeron de la cubeta y se dejó evaporar el exceso de la fase móvil. El ACP fue visualizado al rociar las placas con p-dimetilaminobenzaldehído al 1 % en 75 ml de etanol y 25 ml de ácido clorhídrico, detectándose como una banda de color azul (6).

Para la evaluación de la producción de Patulina, pasado los 10 días de incubación se retiró todo el agar de cada una de las placas de Petri y se homogeneizó con 100 ml de acetato de etilo. Posteriormente se filtró, se tomaron 50 ml del filtrado y se evaporaron hasta un volumen de 10 ml. Luego se sembraron 50 µl de cada extracto fúngico sobre las placas cromatográficas. Estas placas a diferencia de las utilizadas para la determinación de ACP tenían un indicador de fluorescencia UV_{254}. Las placas se desarrollaron utilizando la fase móvil constituida por tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en las siguientes proporciones (6:3:1). Luego que se desarrollaron las placas, las mismas se extrajeron de la cubeta y fueron secadas a temperatura ambiente. Las placas se revelaron con una solución acuosa de metil benzotiazolinona hidrazona al 0,5% (MBTH) y finalmente las placas se secaron en estufa a 130° C durante 15 min. La Patulina se visualizó como una banda de color amarillo (7).

Características de crecimiento

Se determinó el efecto de la temperatura (14° C y 25° C) y la actividad de agua (a_w: 1.00, 0.95 y 0.90) sobre la velocidad de crecimiento de las distintas especies fúngicas aisladas mediante la medida del diámetro de las colonias. Se utilizó MEA como medio basal de crecimiento. Para ajustar la actividad hídrica del medio de cultivo se agregaron distintas cantidades de glicerol. Para cada especie fúngica, a partir de un cultivo de siete días en MEA se realizó una suspensión de esporas (10^4/ml), a partir de la cual se realizó la inoculación de las placas con MEA con una aguja estéril. El diámetro de las colonias fue medido diariamente durante 7 días. Se realizaron tres réplicas (8).

Actividad proteolítica

Para determinar la producción de proteasas extracelulares se utilizó el medio de cultivo Agar Leche (5%). Las placas con el medio de cultivo fueron inoculadas utilizando una aguja estéril, partiendo de una suspensión de esporas (10^4/ml). Las placas fueron incubadas a 14° C y 25° C durante 7 días. Se realizaron tres réplicas. La actividad proteolítica se detectó como áreas claras alrededor de las colonias (8).

Actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó utilizando un medio de cultivo constituido por un sustrato lipídico (Tween 20, 1%) que se esteriliza en autoclave durante 15 min. Luego se le agrega al medio base estéril y templado. El medio base se compone de 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0.1 g de $CaCl_2$.2H2O, 20 g de agar, pH: 6. Estas cantidades son necesarias para un litro de medio. Se evaluó dicha actividad a 14° C y 25° C respectivamente y se realizó por triplicado. La producción de enzimas lipolíticas se detectó por la formación de cristales de sales de calcio del ácido láurico liberado por la enzima, o también por un precipitado que aclara alrededor de la colonia debido a la completa degradación del ácido graso (9).

Producción de penicilina

Todas las especies fúngicas fueron evaluadas en su capacidad de producir penicilina. Para esto, las distintas especies fueron crecidas en MEA durante 7 días a 25° C. A partir de esto se cortaron discos de agar con micelio del centro de la colonia y se colocaron en placas con Agar Nutriente previamente sembradas como tapiz con 0.1 ml de un cultivo de 24 horas de una cepa de *Escherichia coli* sensible a la penicilina y otras con 0.1 ml de una suspensión de una cepa resistente al mismo metabolito. Las placas fueron incubadas a 4° C durante 6 horas y luego se incubaron a 37° C durante 24 horas. Dicho ensayo se realizó por triplicado (2). Como control positivo se utilizó una cepa de *P.chrysogenum* productora de penicilina.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de los hongos.

A partir del análisis de 18 salamines provenientes de dos frigoríficos se aislaron e identificaron diez especies pertenecientes al género *Penicillium* y una al género *Cladosporium* (Tabla 1).

Se observaron diferencias en el número de aislamientos y especies de hongos entre los salamines de las dos fábricas, así como entre productos pertenecientes al mismo frigorífico y sometidos a las mismas condiciones de elaboración.

Las especies fúngicas aisladas en su mayoria correspondieron al género *Penicillium*, algunas de ellas potencialmente toxicogénicas tales como: *Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium chrysogenum* y otras benéficas como *Penicillium nalgiovense*, que es la especie más utilizada en Europa para realizar el emplume artificial.

Se aisló *P.nalgiovense* en salamines provenientes de los dos frigoríficos

Capacidad toxicogénica

El ensayo de toxicidad general realizado con los filtrados de cada una de las especies contra las larvas de *Artemia salina*, mostró que las dos cepas de *P. nalgiovense*, *P. minioluteum* (c), *P. brevicompactum*, *P.puberulum* y *C.cladosporioides* no fueron tóxicas. Por otra parte las especies de *P.pinophilum*, *P.griseofulvum*, *P. aurantiogriseum* y *P.expansum* fueron débilmente tóxicas, mientras que *P.chrysogenum*, *P.minioluteum* (a) y *P.corylophilum* fueron tóxicas (Tabla 2).

Tabla 1. Densidad de las especies fúngicas aisladas e identificadas a partir de embutidos secos fermentados de dos frigoríficos.

Frigorífico A		Frigorífico C	
Especie	Densidad (%)	Especie	Densidad (%)
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries	0.68	*Penicillium brevicompactum* Dierl	6.85
Penicillium aurantiogriseum Dierckx	1.20	*Penicillium chrysogenum* Thom	2.37
Penicillium expansum Link	0.33	*Penicillium corylophilum* Dierckx	1.69
Penicillium minioluteum Dierckx	1.76	*Penicillium griseofulvum* Dierckx	5.60
Penicillium nalgiovense Laxa	96.03	*Penicillium minioluteum* Dierckx	80.75
		Penicillium nalgiovense Laxa	1.09
		Penicillium pinophilum Hodges	0.04
		Penicillium puberulum Bain	1.61

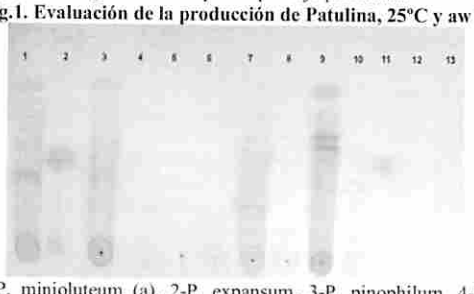
Tabla 2. Toxicidad de los filtrados de las especies fúngicas aisladas de embutidos fermentados secos frente a larvas de *A.salina*.

Especie	Mortalidad larvas (%)	Toxicidad
P.nalgiovense (c)	0	No tóxica
P.minioluteum (c)	0.65	No tóxica
P.nalgiovense (a)	1.6	No tóxica
P.brevicompactum	2.35	No tóxica
C.cladosporioides	2.53	No tóxica
P.puberulum	7.05	No tóxica
P.griseofulvum	18.7	Débilmente tóxica
P.aurantiogriseum	19.4	Débilmente tóxica
P.pinophilum	23.7	Débilmente tóxica
P.expansum	33.8	Débilmente tóxica
P.chrysogenum	62.02	Tóxica
P.minioluteum (a)	71.50	Tóxica
P.corylophilum	74.70	Tóxica

Producción de metabolitos secundarios

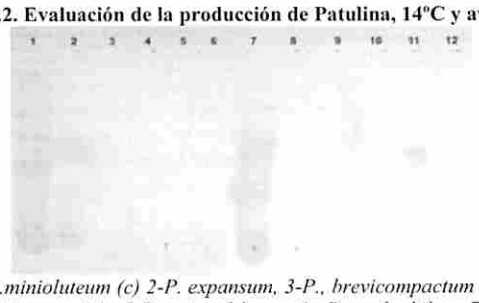
P. expansum fue la única especie capaz de producir Patulina tanto a 25° C como a 14° C y a una actividad hídrica de 1 (Fig.1-2). Por su parte, *P.griseofulvum* fue la única especie capaz de producir ACP a 25 °C y una actividad hídrica de 1 (Fig.3-4). Ninguna de las especies produjo penicilina.

Fig.1. Evaluación de la producción de Patulina, 25°C y aw 1



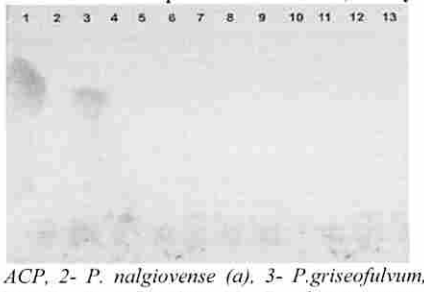
1-P. minioluteum (a), 2-P. expansum, 3-P. pinophilum, 4-P. brevicompactum 5-P. nalgiovense (a), 6-P. griseofulvum, 7-P. corylophilum, 8-P.chrysogenum 9 P. puberulum 10- P. aurantiogriseum, 11-Std. Patulina, 12-P. minioluteum (c), 13-P. nalgiovense(c)

Fig.2. Evaluación de la producción de Patulina, 14ºC y aw 1



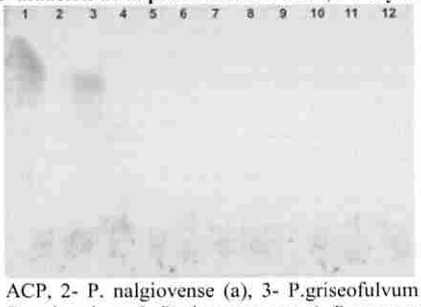
1-P.minioluteum (c) 2-P. expansum, 3-P., brevicompactum 4-P. nalgiovense (a), 5-P. griseofulvum, 6- P.corylophilum 7- P. chrysogenum 8- P. puberulum, 9- P.aurantiogriseum, 10- P. nalgiovense(c), 11- Std.Patulina

Fig.3. Evaluación de la producción de ACP, 25ºC y aw 1



1- Std. ACP, 2- P. nalgiovense (a), 3- P.griseofulvum, 4- P. pinophilum 5- P. puberulum, 6- P. chrysogenum, 7- P. expansum, 8- P. nalgiovense (c), 9- P. minioluteum (a) 10-P. brevicompactum, 11- P. aurantiogriseum, 12- P. corylophilum, 13- P.minioluteum (c)

Fig.4. Evaluación de la producción de ACP, 14ºC y aw 1



1- Std. ACP, 2- P. nalgiovense (a), 3- P.griseofulvum 25º C, aw1, 4- P. puberulum, 5- P. chrysogenum, 6- P.expansum, 7-P. nalgiovense (c), 8- P. brevicompactum, 9- P. aurantiogriseum, 10- P. corylophilum, 11-P.griseofulvum a 14ºC, 12- P.minioluteum (c)

Características de crecimiento

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento, cuando se mantiene la disponibilidad hídrica fija, todas las cepas mostraron una mayor tasa de crecimiento a 25º C (Fig.5-6, Fig.7-8). Respecto al efecto de la actividad hídrica, en general, se observa una mayor tasa de crecimiento cuando la disponibilidad de agua es mayor (Fig.5-7, Fig.6-8). Sin embargo, las dos cepas pertenecientes a la especie *P. nalgiovense* presentaron una mayor tasa de crecimiento a 25º C cuando la disponibilidad de agua fue de 0,95 (Fig.7). A aw de 0.90 no se observó crecimiento en ninguna de las temperaturas ensayadas.

Fig.5. Curvas de crecimiento de las especies fúngicas a 25º C y aw 1

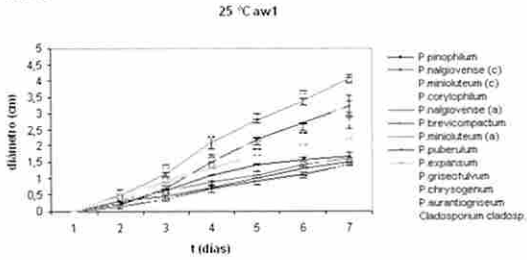


Fig.6. Curvas de crecimiento de las especies fúngicas a 14º C y aw 1

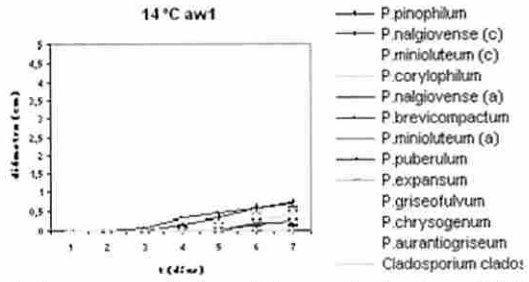


Fig.7. Curvas de crecimiento de las especies fúngicas a 25º C y aw 0.95

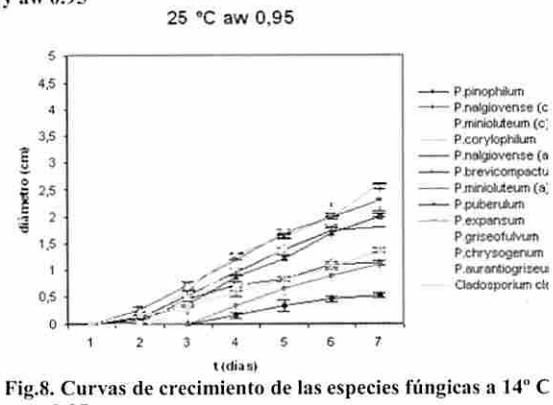
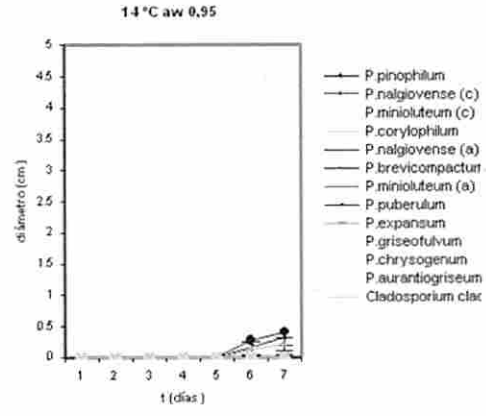


Fig.8. Curvas de crecimiento de las especies fúngicas a 14º C y aw 0.95



Actividad proteolítica

De acuerdo con los índices obtenidos se pudo comprobar que las especies que presentaron actividad proteolítica a 25º C fueron: *P.brevicompactum*, *P.nalgiovense (c)*, *P.pinophilum* y *P.griseofulvum*. Entre éstas la que presentó mayor capacidad de producción de proteasas extracelulares fue *P.brevicompactum* y la que presentó menor capacidad de producción fue *P.griseofulvum* (Tabla 3).

A 14º C, la única especie capaz de producir proteasas extracelulares fue *P. brevicompactum*. En todos los casos la actividad proteolítica fue mayor a 25º C que a 14º C (Tabla 3).

Tabla 3. Determinación de la producción de proteasas extracelulares por parte de las distintas especies fúngicas, a 25° C y 14° C

Especies	Act.proteolítica 25° C	Act.proteolítica 14° C
P.pinophilum Hedgcock	**1.05**	x
P.nalgiovense (c) Laxa	**1.08**	1
P.minioluteum Dierckx	1	1
P.corylophilum Dierckx	1	1
P.nalgiovense (a) Laxa	1	1
P.brevicompactum Dierckx	**1.25**	**1.11**
P.minioluteum Dierckx	1	1
P.puberulum Bain	1	1
P.expansum Link	1	1
P.griseofulvum Dierckx	**1.04**	1
P.chrysogenum Thom	1	1
P.aurantiogriseum Dierckx	1	1
C.cladosporioides (Fres)ex de Vries	1	1

Especies	Act.lipolítica 25° C	Act.lipolític a 14° C
P.pinophilum Hedgcock	**1.22**	x
P.nalgiovense (c) Laxa	1	x
P.minioluteum Dierckx	1	x
P.corylophilum Dierckx	1	x
P.nalgiovense (a) Laxa	**1.23**	x
P.brevicompactum Dierckx	1	1
P.minioluteum Dierckx	1	x
P.puberulum Bain	**1.63**	x
P.expansum Link	**1.41**	x
P.griseofulvum Dierckx	**1.27**	x
P.chrysogenum Thom	**1.32**	x
P.aurantiogriseum Dierckx	**1.26**	x
C.cladosporioides (Fres)ex de Vries	1	x

La actividad proteolítica está expresada como el cociente entre los diámetros de las zonas degradadas y los de las colonias. Valores menores o iguales a 1 indican zonas degradadas solamente debajo de la colonia, valores mayores a 1, indican la secreción de enzimas al medio, resultando en una zona degradada alrededor de la colonia. Las x significan que no se registró crecimiento fúngico a dicha temperatura al cabo de 20 días, por lo cual obviamente no se determinó la actividad proteolítica.

Actividad lipolítica

En cuanto a la actividad lipolítica, a 25° C encontramos un grupo de especies que no fueron capaces de producir lipasas extracelulares y otro que sí produjeron. En este último están las especies: *P.puberulum*, *P.expansum*, *P.chrysogenum*, *P.aurantiogriseum*, P.*griseofulvum*, *P.nalgiovense (cepa a)* y *P.pinophilum*, ordenadas de mayor a menor teniendo en cuenta su índice. A 14° C ninguna especie fue capaz de producir lipasas extracelulares

La actividad lipolítica está expresada como el cociente entre los diámetros de las zonas degradadas y los de las colonias. Valores menores o iguales a 1 indican zonas degradadas solamente debajo de la colonia, valores mayores a 1, indican la secreción de enzimas al medio, resultando en una zona degradada alrededor de la colonia. Las x significan que no se registró crecimiento fúngico a dicha temperatura al cabo de 20 días, por lo cual obviamente no se determinó la actividad lipolítica.

al género *Penicillium*.

Se aisló *P.nalgiovense* en salamines provenientes de dos fábricas de chacinados diferentes, lo que tendría particular importancia puesto que ésta es la especie más utilizada como cultivo iniciador en

Europa para lograr las características deseadas en este tipo de alimentos.

La presencia de varias especies cuya densidad es distinta en los salamines de los dos frigoríficos hacen dudar en cuanto a la obtención de productos uniformes con respecto a sus propiedades organolépticas (sabor, aroma, textura y apariencia). lo que justificaría la utilización de cultivos iniciadores en el proceso de elaboración de estos productos cárnicos.

BIBLIOGRAFÍA

1-Bengoa, Ma.Soledad, 2002 El salame y la tecnología aplicada en la elaboración de crudos madurados. Revista Prinal, págs 20-23.

2-López-Díaz, Teresa-María, J.A.Santos, M.L.García-López and A.Otero, 2001. Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. International Journal of Food Microbiology 68: 69-74.

3-Pitt, J.I, 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic status *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Ed.. London.

4-Harwig, J, and P.M.Scott. 1971. Brine shrimp (*A.salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. Applied Microbiology. 21:1011-1016

5-Paterson, R.R.M and P.D. Bridge. 1994. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. International Mycological Institute. Págs. 55-56

6-Horn, B.W and J.W. Dorner. 1999. Regional differences in production of Aflatoxin B1 and Cyclopiazonic acid by soil isolated of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. Appl.Environ.Mycorbiol. 65:1444-1449.

7-Frisvad, J.C, 1988. Fungal especies and their specific production of mycotoxins. En Samson, R.A., Van Reenen-Hoekstra, E.S (Eds), Introduction to Foodborne Fungi. 3rd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands. págs 239-249.

8-Ludemann, V and G. Pose. 2004. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of Penicillium strains isolated from Argentinean salami. Int. Journal of Food Microbiol. 96:1318

9-Hankin, L and S.L. Anagnostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Págs. 597-607

AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus* COAGULASA POSITIVO EN PULPA DE CANGREJO *(Ucides occidentalis)* OFERTADA EN LA LOCALIDAD DE TUMBES

Guzmán Tripul, Víctor y Saly Rosas Solano, José Luís
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA Y BIOQUIMICA
TUMBES-PERU
E.mail : vicgutri@hotmail.com

Palabra clave: *Ucides occidentalis, Staphylococcus aureus*

RESUMEN

El presente estudio se realizó con los objetivos de determinar la presencia y cuantificar *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en pulpa de cangrejo *(Ucides occidentalis)* ofertada en la ciudad de Tumbes. El Trabajo de investigación es aplicada-descriptivo y transversal; para lo cual se tomaron cinco muestras al azar a diez establecimientos de mayor concurrencia poblacional.

Se encontró la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en el 100% de las muestras analizadas. El recuento de las unidades formadoras de colonias, comparados con la norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano demostró que el producto de pulpa de cangrejo ofertado en los locales estudiados no cumplen los estándares establecidos para el consumo humano.

Los resultados, generaron una preocupación respecto a la calidad higiénica de los manipuladores artesanales de los productos marinos y el control de enfermedades transmitidas por dichos alimentos contaminados, por lo cual se requiere de la coparticipación del Ministerio de Salud, Universidad, Gobierno Regional y Municipalidad en la perspectiva de mejorar la Salud Pública de la región.

INTRODUCCIÓN

Con la introducción de alimentos preparados o procesados en la dieta del hombre, aparecieron los problemas de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) las que constituyen un problema de Salud Pública. Dentro del amplio grupo de enfermedades provocadas por el consumo de bebidas o alimentos contaminados, una de las más comunes es la llamada intoxicación alimentaria estafilocócica, que es causada por la ingestión de alimentos contaminados con una enterotoxina producida por *Staphylococcus aureus*, carácter fundamental de algunas cepas coagulasa positivo (Frazier y Westhoff, 1985; Stanier y Col. 1992). Puesto que existe un elevado porcentaje de personas portadoras de *S. aureus* (entre 39-50%), la contaminación por manipuladores de alimentos probablemente también es un hecho corriente.

Ucides occidentalis conocido comúnmente como "cangrejo de los manglares" es utilizado en la alimentación diaria del poblador Tumbesino y tiene mucha aceptabilidad en los mercados del norte y de la capital de la república (Poma, 1995). El manejo y "tratamiento tecnológico" que le da el pescador artesanal al cangrejo no es el más adecuado. Motivo por el cual el objetivo de estudio de la presente investigación fue aislar al *Staphylococus aureus* coagulasa positivo como un microorganismo indicador de higiene de la pulpa de cangrejo que se ofertan en la principales picanterías de la ciudad de Tumbes y comparar los resultados de los análisis con los límites referidos a la norma sanitaria establecida por el Ministerio de Salud sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano especificado por la Dirección General de Salud Ambiental. Los resultados obtenidos indican que todos los establecimientos muestreados ninguno cumple con las especificaciones establecidas, lo cual es alarmante ya que la pulpa de cangrejo es un peligro potencial para que ocurra un brote de intoxicación alimentaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de la Muestra

La población y muestra a la vez en estudio estuvo constituida por 10 establecimientos donde se oferta el producto.

Toma de Muestra

En cada uno de los establecimientos, se tomaron cinco muestras de aproximadamente 50 g cada una, guardando en todo momento las debidas condiciones asépticas, las cuales se colocaron en bolsas plásticas de primera mano debidamente codificadas, las muestras se enfriaron con hielo en una caja térmica hasta su llegada al laboratorio de biología y bioquímica de la Universidad Nacional de Tumbes, para su respectivo análisis teniendo en cuenta que para tal análisis no transcurra más de 24 horas de su recolección.

MÉTODOS

PREPARACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Inicialmente se realizó la Preparación del diluyente: Agua peptonada 0,1%, y luego la Preparación Del Agar Baird Parker según las indicaciones del manual de Merk.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Homogenización de la muestra

Se procedió a abrir asépticamente la bolsa que contenían la muestra para extraer y pesar 25 g. en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 225 mL del diluyente de tal forma que se obtuvo directamente la primera dilución 10^{-1}, Se homogenizó por un tiempo de un minuto; luego se prepararon las diluciones 10^{-2} y 10^{-3}, utilizando 9 mL del diluyente y 1 mL de la dilución anterior con la ayuda de pipetas estériles.

Siembra y aislamiento

Se transfirió asépticamente 1 mL de la dilución 10^{-1} a la superficie de tres placas Petri estériles conteniendo agar Baird Parker, distribuyéndolo equitativamente (0,3 mL, 0,3 mL y 0,4 mL.) procediendo luego extender el inóculo con la ayuda de un asa Drigalsky hasta que fue absorbido por el medio, se efectuó el mismo procedimiento para las diluciones 10^{-2} y 10^{-3}. Luego se colocaron las placas a incubar en posición invertida por un periodo de 45 a 48 horas a 35°C.

Transcurrido el periodo de incubación se realizó la lectura de las colonias presuntivas: circulares, lisas, convexas, húmedas, de color gris a negro azabache, frecuentemente con un margen de color claro (blancuzco), rodeado de un halo nacarado y con frecuencia una zona externa clara; las colonias tienen una consistencia mantecosa a gomosa al tocarlas con una agua de inoculación.

Cuantificación y registro de Colonias

Se seleccionaron las placas que contenían entre 20 y 200 UFC sospechosas. Se sometiéndose (no menor a 5 de cada placa contada) a los ensayos confirmatorios como son la coloración Gram, prueba de la coagulasa y catalasa.

Coloración Gram.

Se realizó según manual de Merck. Diferenciando las Bacterias Gram. – Positivas: violeta oscuro; y Gram.- Negativos: rojas a rosadas.

Identificación

Prueba de la Coagulasa

Las colonias seleccionadas se sembraron en Agar Soya Tripticasa (TSA) llevándose luego a incubar a 35°C por 24

horas, transcurrido el tiempo se adicionó 0.5 ml. del cultivo a tubos de 10 x 75 mm que contenían 5 cm^3 de plasma oxalatado de conejo. Luego se incubó a 37°C, transcurridas 4 horas de incubación, se observó la pérdida de fluidez o si había formación de coágulos en el plasma. Si la reacción era negativa, se incubaron los tubos por 24 horas y se observó detalladamente.

Prueba de La Catalasa

En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se transfirió 0,5 cm^3 de agua oxigenada y con una torunda estéril se llevó una pequeña proporción de una de las colonia presuntivas seleccionada. El microorganismo es catalasa positivo si se observa una efervescencia.

PROCESAMIENTO Y ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS:

Los resultados del estudio se presentaron en tablas estadísticas y para el análisis de los mismos se aplicó el plan de tres clases. El número de unidades de muestra **n** y el criterio de aceptación o rechazo **c** son determinantes para la decisión de aceptación o rechazo del alimento en cuestión, basándose en los resultados de los ensayos de laboratorio, la aceptación o el rechazo estuvieron definidos por **n (n=5), m, M y c**, donde **c (c=2)** teniendo como limites **m (m=10) y M** ($M=10^2$). Se rechazaron todos los resultados cuyos valores fueron superiores a M. Las determinaciones analíticas se realizaron mediante recuentos de colonias de microorganismos y los resultados se expresaron en UFC/g ó ml. (Normas sanitarias sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, 2004).

RESULTADOS

En la siguiente tabla, se observa que la picantería Buenos Aires 3 presenta el recuento más alto con un promedio de 708 UFC/g. así también la picantería Buenos Aires 2 presenta los recuentos mas bajos con un promedio de 28 UFC/g.

En la tabla 2, al realizar la comparación de los resultados obtenidos con los criterios microbiológicos establecidos por la norma sanitaria del Ministerio de Salud se aprecia que en nueve de las diez picanterías sus cinco muestras superan el límite máximo de 100 UFC/g. Solo una presenta valores inferiores al limite máximo, pero al aplicar la prueba de tres clases se observa que tres de sus muestras están entre mayor de 10 y menos de 100 UFC/g. y solo se aceptan dos en este rango por lo que tampoco cumple con la norma sanitaria.

Tabla 1. Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en pulpa de cangrejo precocida y congelada ofertada en las picanterías de la localidad de Tumbes. Marzo – Agosto 2005

EXP	CONVENCION	MATERIA PRIMA	PRETRATAMIENTO DE MATERIA PRIMA
1	E-Enzima	carnaza entera húmeda	Encalado con adición de esperasa
2	E-No Enzima	carnaza entera húmeda	Encalado sin adición de enzima

PICANTERIAS	m	c = 2	M		
	0 ------	<10	>= 10	<100	>=100
Buenos Aires 1	0		0		5
Buenos Aires 2	2		3		0
Buenos Aires 3	0		0		5
Buenos Aires 4	0		0		5
Panamericana	0		0		5
Puyando	0		0		5
El Pacifico 1	0		0		5
El Pacifico 2	0		0		5
Las Palmas	0		0		5
24 de Julio	0		0		5

n = número de unidades de muestras a ser examinadas.
m = valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.
c = número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre "m" y "M" para que el alimento sea aceptable.
M = valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.
Categoría de riesgo: la relación entre el grado de peligrosidad que representa el alimento para la salud en relación con las condiciones posteriores de manipulación.

CONCLUSIONES

1. En las muestras de pulpa de cangrejo precocida y congelada ofertada en picanterías de Tumbes se encontraron valores altos (hasta 900 UFC/g) de *Staphylococcus aureus*
2. De las 50 muestras analizadas 48 excedieron los limites establecidos por el Ministerio de Salud
3. La frecuencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en pulpa de cangrejo pre-cocida y congelada ofertada en la ciudad de Tumbes fue de un 100 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dirección General de Salud Ambiental; 2004, *Normas sanitarias sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*. Lima - Perú

FAO. 1996. *Guía didáctica para la capacitación en protección de alimentos, de los vendedores callejeros de alimentos. Ministerio de Salud. Lima*, Perú.

Frazier, W.C. y D.C. Westhoff. 1985. *Microbiología de alimentos*. 2da Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.

Mossel, B y Moreno B. 1996; *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Ordoñes, J; y Diaz M. 1987. *Microorganismos de los alimentos*. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza, España.

Poma, C. 1995. *Dinámica Poblacional y Nivel de Explotación del "Cangrejo de los Manglares" Ucides occidentalis, Tumbes – Perú*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Escuela de Post Grado de la Universidad Nacional de Trujillo.

Ratto, M; Vega C y Garrido T. 1982. *Control microbiológico de la leche y productos lácteos. Métodos recomendados. Lima – Perú.*

STUDIES ON THE INHIBITION OF THE GROWTH OF *ESCHERICHIA COLI* BY LACTIC ACID BACTERIA: QUORUM SENSING SIGNALS INVOLVED?

Aguilar, Catalina. and Klotz, Bernadette
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
ENGINEERING FACULTY
Campus Puente del Común, Autopista Norte km 21. E. mail. bernadette.klotz@unisabana.edu.co
CHÍA, CUNDINAMARCA, COLOMBIA

Keywords: Biology, cocultures, growth inhibition, quorum sensing.

SUMMARY

The growth of co-cultures of *Lactobacillus plantarum* WS4174 or *Lactobacillus plantarum* LB279 with *Escherichia coli* starting at different initial cell concentrations in MRS was investigated. The presence of lactic acid bacteria (LAB) reduced the growth of *E. coli* in 3 logarithmic cycles. The growth of the LAB was not altered by the simultaneous growth with *E. coli* suggesting an interaction of amensalism. This study established that the inhibition of the growth of *E. coli* by LAB was not directly correlated with nutrient depletion or low pH. Undissociated lactic acid and/or bacteriocins seemed to be involved in the mechanism of growth-inhibition of the food-borne pathogens. However, the results obtained showed that quorum sensing (QS) could be an additional important factor governing the restrained growth of *E. coli*.

INTRODUCTION

In recent years bacterial antagonism has received more scientific attention as a consequence of the modern trend towards less processed and healthy food. LAB protect food directly from spoilage and pathogenic microorganisms through producing acids, hydrogen peroxide, diacethyl (Messens and De Vugst, 2002), antifungal compounds (Corsetti *et al.*, 1996; Magnusson *et al.*, 2003) and phenyllactic acid (Lavermicocca *et al.*, 2000; Ström, 2005), and bacteriocins (De Vugst and Vandamme, 1994). The last ones are potentially useful as natural substitutes for chemical preservatives in the context of food-biopreservation. However, there is growing evidence that a density-dependent cell population behavior also named QS (autoinduction) might also be involved. Physiological cell activities regulated by quorum sensing are bioluminescence (Engebrecht *et al.*, 1983; Lilley and Bassler, 2000), spore formation (Li *et al.*, 1992), motility (Elvers and Park, 2002; Giron *et al.*, 2002), competence (Magnuson *at al.*, 1994), conjugation (Fuqua and Winans, 1994), antibiotic synthesis (Bainton *et al.*, 1992; Derzelle *et al.*, 2002), virulence (Miller *et al.*, 1972; Passador *et al.*, 1993; Sperandio *et al.*, 1999), bacteriocin production (Eijsink *et al.*, 2002) and biofilm formation (Davies *et al.*, 1998; Prouty *et al.*, 2002). In order to contribute to the understanding of the antagonistic effect of LAB against pathogenic and spoilage microflora in food, the purpose of this study was to determine the effect of cell-population density on the group behavior in bacterial populations of cocultures of LAB and *E. coli*, starting cocultures at different initial cell concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Selection of bacterial strains and inoculum

Lactobacillus plantarum WS4174, *L. plantarum* LB279, and *E. coli* ECO25 were isolated from dairy products. The antimicrobial activity of the LAB against the indicator bacteria was determined by the "spot-on-lawn" method (Cintas *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 2003; Eppert *et al.*, 1997). Supernatants of single cultures of *L. plantarum* WS4174 showed bacteriocinogenic activity meanwhile the antimicrobial activity of *L. plantarum* LB279 was only present in supernatants of cocultures. A stationary-phase culture (24 h) in MRS containing 1.0 x 10^9 to 1.6 x 10^9 cells/mL was used as inoculum.

Generation of growth curves

Colonies of appropriate dilutions on MRS agar were counted after incubation at 37°C for 24 and 48 h. The growth curves, containing 54 data points, were constructed from at least three independent time course experiments over 34 h in MRS. The mean data of the coculture growth curves of *E. coli* and *L. plantarum* WS4174 and with *L. plantarum* LB279 presented standard deviations between 0.16 and 0.246 and 0.009 and 0.151 respectively.

Statistical analysis

Experimental data were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$) and the test of Tukey (5% level of significance). The analyses were performed with the SPSS statistical program(Release 13.0, SSPS Inc, Chicago).

RESULTS AND DISCUSSION

Previous studies established that *L. plantarum* WS4174 and *L. plantarum* LB279 limited the growth of *E. coli* in coculture by approximately 3 logarithmic cycles. The pH profile was mostly determined by the action of the LAB in cocultures. *L.actobacillus plantarum* LB279 showed a higher acidification power compared to *L. plantarum* WS4174. Challenge tests at low pH in MRS showed that the viability of *E. coli* diminished to almost 100% at pH 4.0. The composite Fig.1 showed the premature entrance to stationary phase of *E. coli* in coculture that could not be correlated to low pH or nutrient depletion suggesting undissociated lactic acid and/or bacteriocins as direct factors for the limited growth of *E. coli*.

In order to determine the involvement of quorum sensing in the mechanism of restrained growth of *E. coli* in the presence of LAB. cocultures were started with different initial cell concentration ratios (LAB:*E. coli*). Figure 2 showed bacterial population behaviors that could not be explained directly by the generally recognized antagonistic factors produced by LAB as acids, pH decrease and/or bacteriocins. The simultaneous growth of *E. coli* with LAB reduced the growth of the pathogenic strain but the initial LAB density did not significantly affect the growth pattern of *E.coli*. When starting at initial cell concentrations of around 2.5 and 4.5 $\log_{10}$ CFU/mL of *E. coli*, the bacterial population grew to a maximum of almost 6 $\log_{10}$ CFU/mL with a tendency to decrease in density after 15 h of incubation. This death phase was more markedly observed when the coculture was started at *E. coli* concentrations of around 6.5 $\log_{10}$ CFU/mL. In this case *E. coli* showed a slight growth to almost 7 $\log_{10}$ CFU/mL after 5 h of incubation but started to die more pronouncedly after this peak.

The results obtained showed (1) that the growth of *E. coli* was restrained directly or indirectly by LAB and (2) that *E. coli* seemed to have a defined own group response relying upon the interaction of a small diffusible signal molecule (autoinducer) that allowed intercellular communication (Gray 1997). These autoinducers diffuse from bacterial cells and accumulate in the environment as function of cell growth. Once a threshold concentration is reached (bacterial concentration 5-6 $\log_{10}$ CFU/mL), these signals serve as co-inducers to regulate the transcription of target genes. The entrance to stationary phase is governed in large part by the transcriptional regulator σ^s, which positively or negatively affects the expression of > 50 genes (Loewen *et al.*, 1998). In this case stationary phase is not induced by starvation but by a factor associated to the physiology of LAB or of *E. coli* in coculture and changing environmental conditions.

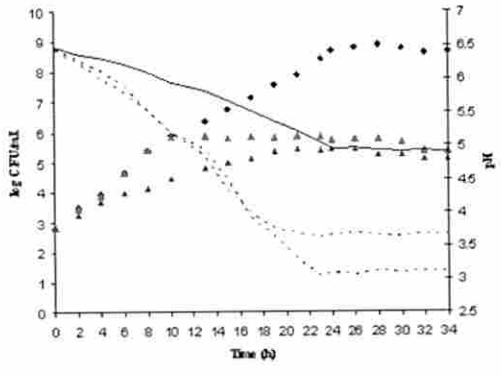


Figure 1: Growth curves of *Escherichia coli* in single and coculture in MRS and pH profiles. ♦ Single culture, ▲ Coculture with *L. plantarum* WS4174, ▲ Coculture *L. plantarum* LB279, — pH single culture, -- pH coculture *L. plantarum* WS4174 — pH coculture *L. plantarum* LB279.

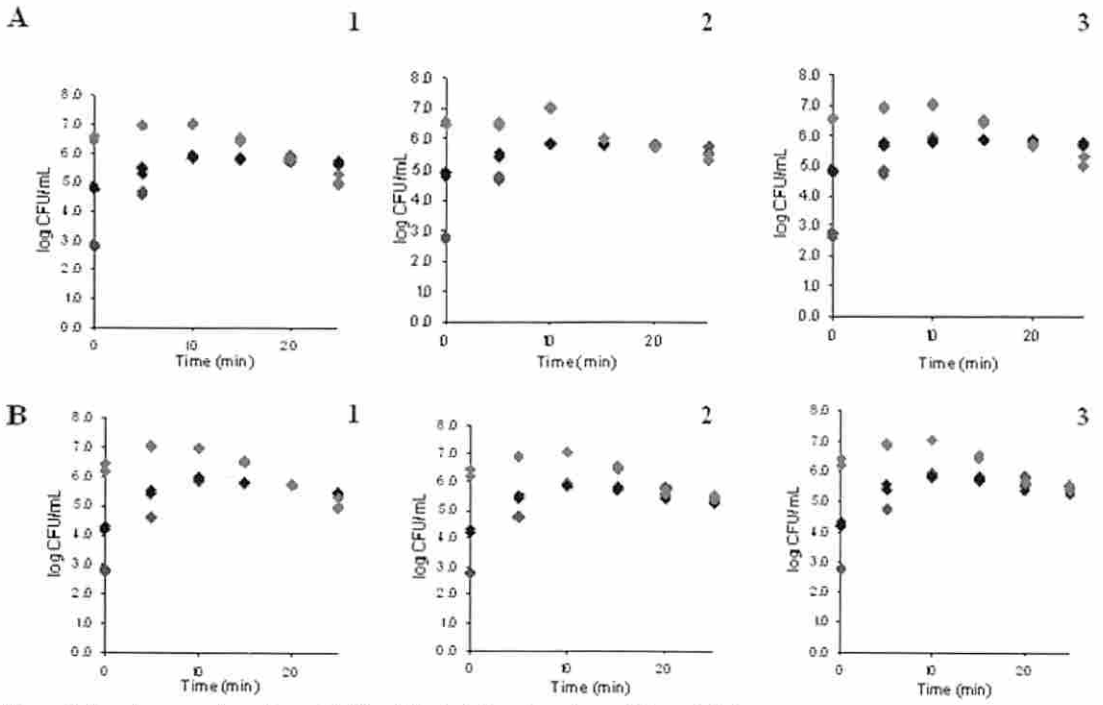


Figure 2: Growth curves of cocultures of LAB and *Escherichia coli* starting at different initial concentration. **A**: Cocultures with *L. plantarum* WS4174 (s.d. 0.016-0.247). **B**: Cocultures with *L. plantarum* LB279. (s.d. 0.009-0.151). **1**: Initial cell concentration (IC) of LAB 2 $\log_{10}$ CFU/mL. **2**: IC of LAB 4 $\log_{10}$ CFU/mL. **3**: Ic of LAB 6 $\log_{10}$ CFU/mL. ♦ : IC of *E. coli* 2 $\log_{10}$ CFU/mL, ♦ IC of *E. coli* 4 $\log_{10}$ CFU/mL, ♦IC of *E. coli* 6 $\log_{10}$ CFU/mL. (s.d.: standard deviation)

CONCLUSIONS

The exact mechanism of growth inhibition and the totality of the factors involved in each case studied remained not completely elucidated. It is generally recognized that factors like acid and bacteriocin production by LAB are direct inhibitors of the growth of pathogens. However, other systems like quorum sensing signals seemed to be involved too. Amensalism was the interaction established in cocultures between the LAB and the pathogenic strain but further research has to be done in order to confirm it. The results obtained in this study support once again the usefulness of LAB for biopreservation purposes in the food industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Fondo Patrimonial Especial of the Universidad de La Sabana for supporting this study and the Universidad de Los Andes for providing two of the bacterial strains.

REFERENCES

Bainton N.J., Bycroft B.W., Chhabra S.R., Stead P., Gledhill L., Hill P.J., Rees C.E., Winson M.K., Salmond G.P., Stewart G.S. and et al. (1992) *A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signaling: control of antibiotic biosynthesis in Erwinia*, Gene, 116, 87-91. In: Autoinducer-2(AI-2) mediated quorum sensing in *Escherichia coli*, Wang L. (2004), Doctoral Thesis University of Maryland.

Cintas L., Casaus P., Fernandez F. and Hernandez P.E. (1998) *Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A. and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria.* Food Microbiology 15, 289-298.

Corsetti A., Gobbetti M. and Smacchi E. (1996) *Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from Lactobacillus sanfrancisco C57*. Food Microbiology 13(6), 447-456.

Davies D.G., Parsek M.R., Pearson B H., Iglewski B.H, Costerton J.W. and Greenberg E.P. (1998) *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*, Science, 280, 295-298.

De Vugst L. and Vandamme E.J. (1994) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Microbiology, Genetics and Applications London: Blackie Academic and Professional. ISBND-75140174-9.

Derzelle S., Duchaud E., Kunst F., Danchin A. and Bertin P. (2002) *Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in Photorhabdus luminescens*, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3780-3789.

Eijsink V., Axelsson L., Diep, D., Havarstein L., Holo H. and Nes I. (2002) *Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication.* Antonie van Leeuwenhoek, 81, 639-654.

Elvers K.T and Park S.F. (2002) *Quorum sensing in Campylobacter jejuni: detection of a luxS encoded signaling molecule*, Microbiology, 148, 1475-1481. Engrebrecht J., Nealson K. and Silvermann M. (1983) *Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri.* Cell, 32, 4154-4158. In: Autoinducer-2(AI-2) mediated quorum sensing in Escherichia coli, Wang L. (2004), Doctoral Thesis University of Maryland.

Eppert I., Valde's-Stauber N. and Scherer S. (1997) *Growth reduction of Listeria spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing Brevibacterium linens as evaluated in situ on soft cheese.* Applied and Environmental Microbiology 63, 124812-4817.

Fuqua W.C and Winans S.C. (1994) *A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite*, Journal of Bacteriology, 176, 2796-2806.

Giron J.A., Torres A.G., Freer E. and Kaper J.B. (2002) *The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediated mediated adherence to epithelial cells. Molecular* Microbiology, 44, 361-379.

Gray K.M. (1997) *Intercellular communication and group behavior in bacteria*, Trends in Microbiology, 5(5), 184-188.

Lavermicocca P., Valeria F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A. and Gobbetti M. (2000) *Purification and characterization of novel antifunfal compounds by sourdough Lactobacillus plantarum 21B*, Applied and Environmental Microbiology 66, 4084-4090.

Li S., Lee B.U. and Shimkets L.J. (1992) *csgA expression entrains Myxococcus xanthus development*, Genes and Development 6, 401-410. In: Autoinducer-2(AI-2) mediated quorum sensing in Escherichia coli, Wang L. (2004), Doctoral Thesis University of Maryland.

Lilley B.N. and Bassler B.L. (2000) *Regulation of quorum sensing in Vibrio harveyi by LuxO and sigma-54*, Molecular Microbiology, 36, 940-954.

Loessner M., Guenther S., Steffan S. and Scherer S. (2003) *A pediocin-producing Lactobacillus plantarum strain inhibits Listeria monocytogenes in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium.* Applied and Environmental Microbiol.ogy. 69, 1854-1857.

Loewen P.C., Hu B., Strutinsky J. and Sparling R. (1998) *Regulation in the rpoS regulon of Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology, 44, 707-717.

Magnuson R., Solomon J., Roos S. and Grossman A.D. (1994) *Biochemical ana genetic characterization of a competence pheromone from Bacillus subtilis*, Cell, 77, 207-216.

Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjörgren J. and Schnürer J. (2003) *Broad ana complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria.* FEMS Microbiology Letters, 219(1), 129-135.

Messens W. and De Vugst L. (2002) *Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs*, International Journal of Food Microbiology 72, 31-43.

Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K. and Bassler B.L. (2002) *Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence un Vibrio cholerae*, Cell, 110, 303-314.

Passador L.J., Cook J.M., Gambello M.J., Rust L. and Iglewski B.H. (1993) *Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication*, Science, 260, 1127-1130. In: Autoinducer-2(AI-2) mediated quorum sensing in *Escherichia coli*, Wang L. (2004), Doctoral Thesis University of Maryland.

Prouty A.M., Schwesinger W.H. and Gunn J.S. (2002) *Biofilm formation ana interaction with the surfaces of gallstones by Salmonella spp.*, Infection and Immunity, 70, 2640-2649.

Sperandio V., zmellies J.L., Nguyen W., Shin S. and Kaper J.B. (1999) *Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli*, Proceedings of the National Academic of Sciences USA 96, 15196-15201.

Ström K. (2005) *Fungal inhibitory lactic acid bacteria*, Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

ESTUDIOS CUANTITATIVOS EXTENDIDOS DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Aguilar, Catalina.[1], Vanegas, Consuelo.[2] y Klotz, Bernadette[1]
[1] UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
Campus Puente del Común, Autopista Norte km 21, Chía. E.mail. bernadette.klotz@unisabana.edu.co
[2] UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Laboratorio de Ecología Microbiana de Alimentos
Carrera 1 No. 18 A 10, Bogotá
COLOMBIA

PALABRAS CLAVE: Biología, biopreservación, co-cultivos, bacterias ácido lácticas, patógenos.

RESUMEN

Se estudió cuantitativamente el crecimiento en co-cultivo de *Lactobacillus plantarum* WS4174 y *Lactobacillus plantarum* LB279 con los patógenos asociados a alimentos, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Se generaron curvas de crecimiento de los co-cultivos de 82 h en MRS y leche entera UHT a 37°C. En presencia de las bacterias ácido lácticas (BAL), *E. coli* y *L. monocytogenes* redujeron su crecimiento al menos en 3.0 y casi 4.5 ciclos logarítmicos respectivamente en comparación con su crecimiento en cultivos individuales. El crecimiento de las BAL no se modificó en presencia de las cepas patógenas por lo cual se propone una relación de amensalismo para este tipo de cepas bacterianas en co-cultivo. En comparación con los cultivos individuales las cepas patógenas entraron de forma prematura a la fase estacionaria y después de aproximadamente 35 h de incubación su población empezó a descender hasta por debajo del limite de detección para los co-cultivos con *L. plantarum* WS4174 en 70 h y hasta aproximadamente 2 $\log_{10}$ UFC/mL para los co-cultivos con *L. plantarum* LB279 en 82 h. Factores como el pH y la presencia de compuestos antagónicos producidos por las BAL como ácido láctico no disociado y bacteriocinas parecen estar relacionados con el mecanismo de inactivación. Estos resultados confirman otra vez más el potencial y por lo tanto para biopreservación de las BAL y su importancia para la industria de alimentos.

INTRODUCCIÓN

La fermentación de alimentos, es una práctica antigua presente en todas las culturas, sencilla de realizar y económica. Los alimentos fermentados involucran en su procesamiento, el crecimiento de microorganismos como las BAL. Durante el proceso de fermentación ácido láctica se llevan acabo complejas reacciones y transformación hacia un producto con nuevas características físico-químicas, nutricionales y con beneficios para la salud. Se reconoce, además, que los alimentos fermentados de manera artesanal o semi-industrial, que se producen generalmente en pobres condiciones higiénicas, garantizan su inocuidad por la actividad antagónica de las BAL.

Actualmente los consumidores, más concientes de su salud, exigen alimentos naturales con todo su valor nutricional, sanos e inocuos. Es así como la actividad antimicrobiana de las BAL se constituye una herramienta para la industria de alimentos para la producción de alimentos microbiológicamente seguros y de alimentos con mayor vida útil. Las BAL producen compuestos antimicrobianos como ácidos, peróxido de hidrógeno (Messens y De Vugst, 2002), antifúngicos (Corsetti *et al.*, 1996; Magnusson *et al.*, 2003) o acido fenil-láctico (Lavermicocca *et al.*, 2000; Ström, 2005) y bacteriocinas (De Vugst y Vandamme, 1994).

Los estudios cuantitativos sobre la dinámica e interacciones entre poblaciones bacterianas son muy escasas. La base de datos ComBase incluye algunos datos experimentales relacionados con el crecimiento de BAL en presencia de otras bacterias en productos de mar en donde solamente se investigó el comportamiento de las BAL (ComBase 2007: Yamazaki *et al.*, 2003 and Koutsoumanis *et al.*, 2000; Pin, 1998). Datos de crecimiento de *L. plantarum* en asocio con *E. coli* o *L. monocytogenes* no han sido reportados. Feresu and Nyati (1990), Buchanan *et al.* (1991), Jeppesen y Huss (1993), Breidt y Fleming (1998), Schillinger *et al.* (2001), Ogwaro *et al.* (2002), Amézquita y Brashears (2002), y Gimenez and Dalgaard (2004) estudiaron la viabilidad y prevalencia de cepas patogénicas de *E. coli* y *L. monocytogenes* en productos lácteos fermentados, alimentos refrigerados y caldos. Todos estos autores establecieron la actividad antagónica de las BAL contra las cepas patógenas y sugirieron como factores de inhibición la acumulación de ácido láctico sin disociar, bajo pH y presencia de bacteriocinas. Sin embargo, ninguno de estos reportes incluye estudios extendidos en el tiempo que permita determinar el comportamiento de co-cultivos de BAL y patógenos y permita conocer el real potencial de inhibición de estas BAL. Este estudio pretende determinar el tipo de interacción que se establece en co-coltivos de *L. plantarum* con *E. coli* y con *L. monocytogenes* y la dinámica de poblaciones en tiempos extendidos de fermentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las cepas bacterianas e inóculo

Lactobacillus plantarum WS4174, *L. plantarum* LB279, *L. monocytogenes* y *E. coli* ECO25 fueron aisladas de derivados lácteos. La actividad antimicrobiana de las BAL se determinó mediante el método de "spot-on-lawn" (Cintas *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 2003; Eppert *et al.*, 1997). Los sobrenadantes crudos neutralizados de cultivos individuales de *L. plantarum* WS4174 presentaron actividad antagónica que solo se hizo presente en los sobrenadantes crudos neutralizados de co-cultivos de *L. plantarum* LB279. Como inóculo se utilizaron cultivos en fase estacionaria de 1.0×10^9 to 1.6×10^9 cells/mL.

Generación de las curvas de crecimiento

Se contaron colonias de las diluciones apropiadas después de 24 y 48 h de incubación a 37°C. Se construyeron curvas de crecimiento en MRS y leche entera UHT con al menos 90 datos experimentales provenientes de tres experimentos independientes. La concentración inicial de cada cepa bacteriana en la curva de crecimiento fue igual a 2.55 ± 0.26 UFC/mL ($p < 0.05$).

Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA ($p < 0.05$) y test de Tukey (nivel de significancia de 5%) con el programa estadístico SPSS (versión 13.0, SSPS Inc, Chicago).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

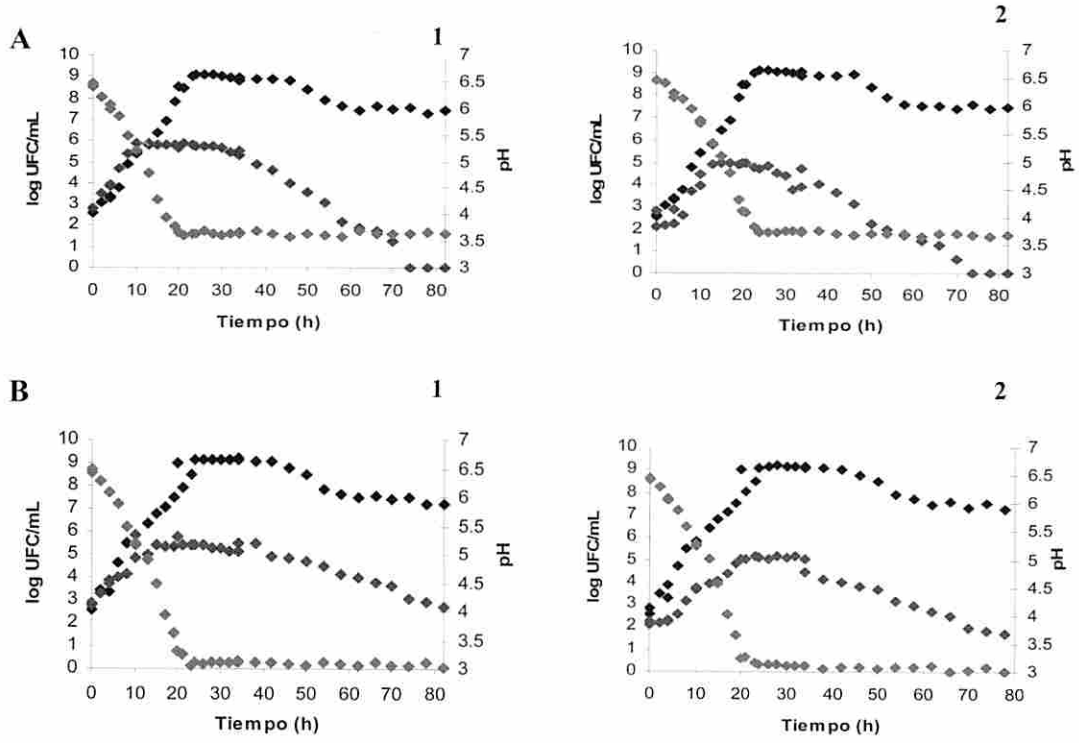


Figure 1: Curvas de crecimiento de cocultivos de BAL y patógenos en leche entera UHT. **A**: Cocultivos con *L. plantarum* WS4174. **B**: Cocultivos con *L. plantarum* LB279. **1**: *Escherichia coli*, **2**: *Listeria monocytogenes*. ♦ Cepas BAL, ♦ Cepas patógenas, ♦ pH.

Estudios previos habían determinado que *L. plantarum* WS4174 y *L. plantarum* LB279 limitaban el crecimiento de *E. coli* y *L. monocytogenes* en 3.0 y 4.5 ciclos logarítmicos respectivamente. Adicionalmente las cepas patógenas entraban prematuramente a fase estacionaria (aprox. 10 h de anticipación con respecto a su comportamiento en cultivo individual). En co-cultivo las BAL determinaron el perfil de pH siendo *L. plantarum* LB279 la cepa con la mayor tasa de acidificación. Ensayos de reto a pH bajos en MRS y leche establecieron que el crecimiento de *E. coli* se redujo en casi 100% a pH 4.0. La viabilidad de *L. monocytogenes* decreció en 99% a pH 4.5.

La Fig. 1 muestra el crecimiento de co-cultivos de las dos cepas de *L. plantarum* con *E. coli* o con *L. monocytogenes* y el perfil de pH correspondiente. Las BAL entraron a fase estacionaria sobre las 25 h mientras que las cepas patógenas lo hicieron de 5 a 15 h antes e iniciaron su fase de muerte después de las 35 h de incubación. En co-cultivo con *L. plantarum* WS4174 las cepas patógenas en estudio cayeron al límite de detección en 72 h de incubación (Fig.1A); con *L. plantarum* LB279 estas decrecieron a aproximadamente 2 ciclo logarítmicos (Fig.1B). En co-cultivo las BAL iniciaron su fase de muerte después de las 45 h de incubación y en casi 40 h solo disminuyeron 1.5 ciclos logarítmicos su población. Estos resultados demostraron que el pH no fue un factor determinante para inducir prematuramente la fase estacionaria de los patógenos en co-cultivo con *L. plantarum* WS4174. Para el caso de los co-cultivos con *L. plantarum* LB279 el pH si podría estar limitando el crecimiento de *L. monocytogenes* ya que a las aproximadamente 18 h de incubación el pH presentaba un valor por debajo de 4. Sin embargo, para el co-cultivo con *E. coli* el pH (=5) no presentaba valores inhibitorios al entrar esta cepa a su fase estacionaria.

Este estudio evidenció, una vez más, el gran potencial de uso de las BAL como biopreservantes y su capacidad para extender la vida útil de productos alimenticios. Factores como la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas logran restringir de manera efectiva el crecimiento de patógenos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que con el tiempo aumenta el nivel antagónico de las BAL, lo cual favorece su aplicación en la industria de alimentos, asegurando su calidad microbiológica durante el procesamiento y almacenamiento. Sin embargo, es importante continuar con el estudio del mecanismo antagónico de las BAL, así como de los factores ambientales involucrados para comprender mejor la ecología de esta interacción.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Patrimonial Especial de la Universidad de La Sabana por apoyar económicamente este estudio y a la Universidad de Los Andes por la donación de tres de las cepas investigadas.

REFERENCIAS

Amézquita A. and Brashears M.M. (2002) *Competitive inhibition of Listeria monocytogenes in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria*, Journal of Food Protection 65, 316-325.

Breidt F. and Fleming H.P. (1998) *Modeling of the competitive growth of Listeria monocytogenes and Lactococcus lactis in vegetable broth*. Applied and Environmental Microbiology 7, 3159-3165.

Buchanan R.L. and Klawitter L.A. (1991) *Effectiveness of Carnobacterium piscicola LK5 for controlling the growth of Listeria monocytogenes Scott A in refrigersted foods*. Journal of Food Safety 12, 219-236.

Cintas L., Casaus P., Fernandez F. and Hernandez P.E. (1998) *Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A, and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria*. Food Microbiology 15, 289-298.

ComBase, Combined Database of Microbial Responses to Food Environments. (2006) http://www.combase.cc/.

Corsetti A., Gobbetti M. and Smacchi E. (1996) *Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inihibitory substance from Lactobacillus sanfrancisco C57*, Food Microbiology 13 (6), 447-456.

De Vugst L. and Vandamme E.J. (1994) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Microbiology, Genetics and Application London: Blackie Academic and Professional. ISBND-75140174-9.

Eppert I., Valde's-Stauber N. and Scherer S. (1997) *Growth reduction of Listeria spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing Brevibacterium linens as evaluated in situ on soft cheese*. Applied and Environmental Microbiology 63, 124812-4817.

Feresu S. and Nyati H. (1990) *Fate of pathogenic and non-pathogenic Escherichia coli strains in two fermented milk products*. Journal of Applied Bacteriology 69, 814-821.

Giménez, B.C. and Dalgaard, P. 2004. *Modelling and predicting the simultaneous growth of Listeria monocytogenes and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon*. Journal of Applied Microbiology 96, 96-109.

Giron J.A., Torres A.G., Freer E. and Kaper J.B. (2002) *The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediated adherence to epithelial cells*. Molecular Microbiology, 44, 361-379.

Gray K.M. (1997) *Intercellular communication and group behavior in bacteria*, Trends in Microbiology, 5(5), 184-188.

Jeppesen V.F. and Huss H.H. (1993) *Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica in a model fish product at 5°C*. International Journal of Food Microbiology 19, 179-186.

Lavermicocca P., Valeria F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A. and Gobbetti M. (2000) *Purification and characterization of novel antifunfal compounds by sourdough Lactobacillus plantarum 21B*, Applied and Environmental Microbiology 66, 4084-4090.

Loessner M., Guenther S., Steffan S. and Scherer S. (2003) *A pediocin-producing Lactobacillus plantarum strain inhibits Listeria monocytogenes in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium*. Applied and Environmental Microbiology. 69, 1854-1857.

Loessner M., Guenther S., Steffan S. and Scherer S. (2003) *A pediocin-producing Lactobacillus plantarum strain inhibits Listeria monocytogenes in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium*. Applied and Environmental Microbiol.ogy. 69, 1854-1857.

Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjörgren J. and Schnürer J. (2003) *Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 219(1), 129-135.

Messens W. and De Vugst L. (2002) *Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs*. International Journal of Food Microbiology 72, 31-43.

Ogwaro B.A., Gibson H., Whitehead M. and Hill D.J. (2002) *Survival of Escherichia coli O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation*. International Journal of Food Microbiology 79, 105-112.

Schillinger U., Becker B., Vignolo G. and Holzapfel W.H. (2001) *Efficacy of nisin in combination with protective cultures against Listeria monocytogenes Scott A in tofu*. International Journal of Food Microbiology 71, 159-168.

Sperandio V., zmellies J.L., Nguyen W., Shin S. and Kaper J.B. (1999) *Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli*, Proceedings of the National Academic of Sciences USA 96, 15196-15201.

Ström K. (2005) *Fungal inhibitory lactic acid bacteria*, Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances) POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: UNA ALTERNATIVA DE BIOCONTROL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

AGUILAR, CATALINA y KLOTZ, BERNADETTE
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
Campus Puente del Común, Autopista Norte Km21. bernadette.klotz@unisabana.edu.co
Chía, Cundinamarca, Colombia.

PALABRAS CLAVE: Control de calidad, biocontrol, bacterias ácido lácticas, bacteriocinas, patógenos.

RESUMEN

La interacción de microorganismos benéficos como las bacterias ácido lácticas (BAL), que hacen parte normal de la microbiota de muchas matrices alimentarias y que además poseen propiedades antagónicas con otras bacterias, pueden ser consideradas como excelente alternativa para inhibir el crecimiento de patógenos a nivel industrial dentro del contexto de biopreservación o bioconservación En este trabajo se retaron nueve cepas patógenas (tres de *Escherichia coli*, tres de *Staphylococcus aureus* y tres de *Listeria monocytogenes*) aisladas de alimentos, muestras clínicas provenientes de manipuladores de alimentos y del ceparío de referencia, con 68 sobrenadantes diferentes obtenidos a partir del crecimiento individual de las BAL (*Lactobacillus plantarum* WS4174, *Lactobacillus plantarum* LB279 y *Pediococcus acidilacti* P120) y sus cultivos mixtos mediante la técnica de difusión en placa "Spot on the Lawn". Ocho de las nueve cepas patógenas estudiadas fueron sensibles a la acción de los sobrenadantes. *Lactobacillus plantarum* LB279 sólo produjo sustancias BLIS cuando creció en co-cultivo con las cepas patógenas, indicando la posible participación del Quórum Sensing en el mecanismo interactivo. De los 68 sobrenadantes evaluados, el 70,5% generó un nivel de inhibición alto con halos entre 16 y 20mm de diámetro y el otro 29,5% solo produjo un nivel medio con halos entre 10 y 15mm de diámetro. Las cepas patógenas aisladas de alimentos presentaron mayor susceptibilidad a la acción de las BLIS, lo cual representa una importante oportunidad para implementar su aplicación en las industrias de alimentos como efectivos inhibidores naturales.

INTRODUCCIÓN

En busca de nuevos mecanismos para ejercer control de patógenos en la industria alimentaria se ha encontrado que muchas bacterias ácido lácticas (BAL) que incluyen los géneros *Lactococcus, Lactobacillus, Carnobacterium, Enterococcus y Pediococcus*, entre otros, secretan pequeños péptidos de síntesis ribosomal con actividad antimicrobiana, a los cuales se les ha llamado bacteriocinas (Jack, 1995; Ray, 2001; Rodríguez, 2002). Una ventaja de emplear estas bacteriocinas es que debido a que las BAL se han usado por siglos para la elaboración de alimentos fermentados, han sido consideradas GRAS (Generally regarded as safe) por la FDA (Food and Drug Administration). Adicionalmente, su mecanismo de acción y su espectro de inhibición relativamente cerrado, hace que la aparición de cepas resistentes sea menos frecuente en comparación con otros métodos de limpieza y desinfección empleados en la industria (Schillinger, 1996). Estas ventajas han hecho que las bacteriocinas sean consideradas como compuestos importantes en la prevención de toxiinfecciones alimentarias, donde patógenos como *L monocytogenes, E. coli y S. aureus* son actualmente una preocupación para la salud pública tanto a nivel nacional (SIVIGILA, 2004) como mundial (FAO, 1998).

Se han realizado diferentes estudios que demuestran la efectividad de las bacteriocinas provenientes de BAL contra cepas de *L. monocytogenes, E. coli* y *S. aureus*: Kalmokoff, (1999), Eppert (1997) y Muriana (1996), han reportado el uso y la aplicación de la pediocina producida por *L. plantarum* para el control de cepas de *S. aureus* y *Listeria spp.* resistentes a temperaturas de refrigeración y a tratamientos con desinfectantes convencionales en la industria alimentaria. Murry *et al.* (2004) también reportaron la inhibición en el crecimiento de cepas de *E. coli, Salmonella spp.* y *Clostridium spp.* debida a la presencia de *L. plantarum* y *L. salivarius* en el medio. Sin embargo no se han encontrado estudios de inhibición *in vitro*, donde se reten sobrenadantes obtenidos a partir de diferentes cócteles bacterianos con cepas patógenas aisladas de diversos orígenes. Con este estudio se pretende demostrar el gran potencial de las BAL como productoras de sustancias BLIS dentro del contexto de biocontrol y cómo dicha producción está ligada a la presencia o a la ausencia de otros microorganismos en el medio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y mantenimiento de las cepas bacterianas

Se trabajaron 12 cepas diferentes: tres bacterias ácido lácticas de origen alimentario, tres cepas de *E. coli*, tres cepas de *L. monocytogenes* y tres cepas de *S. aureus*, aisladas de alimentos, muestras clínicas obtenidas de manipuladores de alimentos y ceparios de referencia (Tabla 1). Todas las cepas fueron confirmadas por microbiología tradicional y por PCR y se conservaron a -70°C en perlas CryoBank™ según instrucciones del fabricante (COPAN, 2005).

Ensayos reto de inhibición

Para la obtención de los sobrenadantes reto, se realizaron cultivos individuales de las BAL (*L. plantarum* WS4174, *L. plantarum* LB279 y *P. acidilacti P120*) en 5mL de caldo MRS a 37°C por 24 horas, hasta alcanzar concentraciones aproximadas del orden de 10^9 UFC/mL. De igual forma, con las BAL estudiadas se realizaron cultivos mixtos como se muestra en la Tabla 2. A todos los cultivos se les determinó el pH final y los inóculos que presentaron pH menores a 6,0 fueron neutralizados con NaOH 0.1N hasta obtener valores entre 6,0 y 6,5. Todos los cultivos (neutralizados y sin neutralizar) se centrifugaron a 9335,3 xg por 10 minutos y los sobrenadantes recolectados se incubaron a 37°C durante una semana para su concentración.

La producción de BLIS por parte de las BAL se evaluó mediante la técnica de difusión en placa "Spot on the lawn" (Cintas, 1998; Loessner, 2003; Eppert, 1997), donde se midió el potencial antagónico de los 68 sobrenadantes (Tabla 2) previamente obtenidos. Para esto, las nueve cepas patógenas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones que las cepas reto y a partir de sus cultivos en caldo se transfirió de manera independiente 1mL de inóculo a 100mL de medio Mueller Hinton. En las placas homogenizadas y solidificadas se realizaron micropozos donde se inocularon 40µL de cada uno de los sobrenadantes. Todas las placas, se incubaron por 48 horas a 37°C. Las lecturas se efectuaron midiendo el diámetro de los halos de inhibición. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA ($p < 0.05$) y test de Tukey (nivel de significancia de 5%) con el programa estadístico SPSS (versión 13.0, SSPS Inc, Chicago).

Tabla 1: Cepas bacterianas estudiadas y su fuente de aislamiento

	CEPA	FUENTE
A)	*L. plantarum* WS4174	Queso semigraso
B)	*L. plantarum* LB279	Producto autóctono colombiano fermentado artesanalmente
C)	*P. acidilacti* P120	Crema de leche
D)	*E. coli* ECO26	Jamón
E)	*E. coli* ECO233	Heces fecales de manipulador de alimentos
F)	*E. coli* ATCC 10536	Cepario de referencia
G)	*L. monocytogenes* LMO26	Leche cruda
H)	*L. monocytogenes* LMO124	Heces fecales de paciente
I)	*L. monocytogenes* ATCC7644	Cepario de referencia
J)	*S. aureus* STA67	Crema de leche
K)	*S. aureus* GGT11	Garganta de manipulador de alimentos
L)	*S. aureus* ATCC 25923	Cepario de referencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ocho de las nueve cepas patógenas estudiadas fueron sensibles a la acción de los sobrenadantes. La cepa de *E. coli ECO233*, presentó resistencia a todos los tratamientos, lo cual es consistente con otros estudios (Cintas, 1998; Mah, 2001) que demuestran que las bacterias Gram negativas no son muy sensibles a la acción de metabolitos tipo bacteriocinas, y en especial si las cepas circulantes están en frecuente contacto con antibióticos agresivos y son formadoras de biofilms como puede ser el caso de esta cepa de origen clínico. Las cepas de *S. aureus* estudiadas, presentaron una mejor respuesta a la acción antagónica de los sobrenadantes con halos máximos de 20mm de diámetro, frente a las cepas de *L. monocytogenes* y *E. coli* con halos máximos de 17 y 14mm de diámetro, respectivamente (Tabla 2).

Se obtuvieron diferencias significativas al comparar los resultados presentados por las cepas de origen clínico frente a las de origen alimentario, siendo estas últimas las más sensibles, en todos los casos, a los tratamientos realizados con los 68 sobrenadantes (halos de inhibición entre 14mm y 20mm de diámetro).

A nivel estadístico se determinó que los sobrenadantes no neutralizados presentaron un mayor poder inhibitorio frente a las cepas patógenas que los neutralizados, lo cual puede deberse a la acción conjunta de las BLIS y el ácido láctico en el medio. Así mismo se encontraron diferencias significativas entre las respuestas generadas por las tres BAL, siendo *L. plantarum* WS4174 la cepa con mejor potencial antagónico (Tabla 2), donde los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos individuales y mixtos de esta cepa (1-8, 15-20, 33-38, 51-56), produjeron halos de inhibición de mayor tamaño (16,4mm de diámetro en promedio, siendo 0,07 la máxima desviación estándar obtenida).

Tabla 2: Resultados de los ensayos de inhibición. TTO: Tratamiento, **SN:** Sin neutralizar, **N:** Neutralizado,

			Distribución de las cepas patógenas según el tamaño de los halos de inhibición obtenidos						Distribución de las cepas patógenas según el tamaño de los halos de inhibición obtenidos		
	Sobrenadante	TTO	0 mm de diámetro	10 a 15 mm de diámetro	16 a 20 mm de diámetro		Sobrenadante	TTO	0 mm de diámetro	10 a 15 mm de diámetro	16 a 20 mm de diámetro
1	A	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L	35	A + K	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L
2	A + B	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L	36	A + E	N	E	F, H, K	D, G, I, J, L
3	A + C	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L	37	A + H	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L
4	A + B + C	SN	E	/	D, F, G, H, I, J, K, L	38	A + K	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L
5	A	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	39	B + E	SN	E	F, H, K	D, G, I, J, L
6	A + B	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	40	B + H	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
7	A + C	N	E	D, F, G, H, I, K, L	J	41	B + K	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
8	A + B + C	N	E	/	D, F, G, H, I, J, K, L	42	C + E	SN	E	F, H, K	D, G, I, J, L
9	B	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	43	C + H	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
10	B + C	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	44	C + K	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
11	C	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	45	B + E	N	E	F, H, K	D, G, I, J, L
12	B	N	D, E, F, G, H, I, J, K, L	/	/	46	B + H	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
13	B + C	N	E	D, F, G, H, I, K, L	J	47	B + K	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
14	C	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	48	C + E	N	E	F, H, K	D, G, I, J, L
15	A + F	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	49	C + H	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
16	A + I	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	50	C + K	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
17	A + L	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	51	A + D	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L
18	A + F	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L	52	A + G	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L
19	A + I	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L	53	A + J	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L
20	A + L	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L	54	A + D	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L
21	B + F	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	55	A + G	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L
22	B + I	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	56	A con J	N	E	F, H, I, K	D, G, J, L
23	B + L	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	57	B con D	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
24	C + F	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	58	B con G	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
25	C + I	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	59	B con J	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
26	C + L	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L	60	C con D	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
27	B + F	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	61	C con G	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
28	B + I	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	62	C con J	SN	E	D, F, H, I, K	G, J, L
29	B + L	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	63	B con D	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
30	C + F	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	64	B con G	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
31	C + I	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	65	B con J	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
32	C + L	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/	66	C con D	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
33	A + E	SN	E	F, H, K	D, G, I, J, L	67	C con G	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/
34	A + H	SN	E	F, H, I, K	D, G, J, L	68	C con J	N	E	D, F, G, H, I, J, K, L	/

Se observó que en todos los casos, el sobrenadante 12 correspondiente al cultivo de *L. plantarum* LB279 neutralizado, no presentó ninguna actividad antagónica frente a las nueve cepas patógenas estudiadas. Sin embargo, los sobrenadantes obtenidos a partir de sus cultivos mixtos con *E. coli, L. monocytogenes* y *S. aureus*, sí generaron halos de inhibición, lo cual sugiere que la producción de BLIS por esta BAL está ligada al crecimiento en co-cultivo con otras cepas. Estos resultados se sustentan en trabajos como el de Maldonado *et al.* (2003) quienes reportaron que la presencia de bacterias como *E. coli* y *Streptococcus pneumonie* en co-cultivo con *L. plantarum*, actúa como señalización ambiental que induce en la BAL el mecanismo de producción de bacteriocinas a través de quorum sensing, proceso durante el cual las sustancias liberadas al medio pueden interferir con el desarrollo normal de las otras bacterias.

Por otro lado, se comprobó que los sobrenadantes 4 y 8, que corresponden a los cultivos mixtos de las tres BAL, presentaron un mejor desempeño a nivel de inhibición que el resto de los sobrenadantes (halos entre 16 y 20mm de diámetro), lo cual sugiere que cuando las BAL crecen de manera simultánea en el mismo medio, se produce una acción sinérgica en la actividad de las BLIS.

A nivel estadístico se determinó que los sobrenadantes 33, 36, 39, 42, 45 y 48 correspondientes a los cultivos mixtos de la cepa de *E. coli ECO233*, presentaron mayor poder inhibitorio

que los demás sobrenadantes obtenidos a partir de los co-cultivos entre las BAL y las patógenas. Estos resultados sugieren la producción de sustancias tipo colicinas por parte de *E. coli,* las cuales además de ser parte de su naturaleza primaria, le sirven como mecanismo de defensa para contrarrestar las condiciones adversas que le representan los ambientes mixtos, lo cual la hace más resistente (Boyce, 1995).

Finalmente y como se observa en la Tabla 2, se encontró que de los 68 sobrenadantes evaluados, el 70,5% generó un nivel de inhibición alto con halos entre 16 y 20mm de diámetro y el otro 29,5% solo produjo un nivel medio con halos entre 10 y 15mm de diámetro. Estos resultados tienen un gran impacto a nivel industrial porque permiten establecer que las BAL aisladas de productos de la región poseen importantes propiedades antagónicas que podrían ser aplicadas para controlar patógenos en alimentos dentro del contexto del biocontrol.

CONCLUSIONES

Se comprobó la efectividad de las BLIS como importantes inhibidoras de algunas de las cepas patógenas que se encuentran actualmente circulando en la industria de alimentos de nuestra región. Estos resultados representan una gran oportunidad para implementar a nivel industrial estrategias como el biocontrol, donde las sustancias tipo bacteriocinas, pueden utilizarse como conservadores biológicos que en un momento dado podrían reemplazar a los preservativos químicos, pues tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios y no ocasionan efectos colaterales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Ingeniería de La Universidad de La Sabana por apoyar y financiar este trabajo. A la Universidad de Los Andes por la donación de algunas de las cepas evaluadas y a los estudiantes de Ingeniería de Producción Agroindustrial de la Universidad de La Sabana: Andrés Alvarez, Maria Claudia Barrera, Liliana Parada, Laura Natalia Ramirez, Paola Romero, Andrés Satizabal y Andrey Camilo Vargas por la colaboración en el laboratorio de microbiología.

REFERENCIAS

Boyce, T.G., Swerdlow, D.L. y Griffin, P.M. 1995. *E. coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome. *New England Journal of Medicine*, 10: 364-368.

Cintas, L., Casaus, P., Fernandez, F. and Hernandez, P. E. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A, and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. Food Microbiology. 15:289–298.

COPAN Diagnostics Inc. (USA). 2005. Sistema CryoBankTM para conservación de cepas. Consultado de la red mundial el 9 de Marzo de 2006. Disponible en http://www.copanusa.com/html/spanishCryo.html.

Eppert, I., Valde´s-stauber, N., and Scherer, S. 1997. Growth Reduction of *Listeria spp.* Caused by Undefined Industrial Red Smear Cheese Cultures and Bacteriocin-Producing Brevibacterium linens as Evaluated In Situ on Soft Cheese. Applied And Environmental Microbiology. 63: 124812–4817

Jack, R. Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Microbiological Reviews. 59: 171-200.

Kalmokoff, M. L., E. Daley, J. W. Austin y J. M. Farber. 1999. Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of Listeria. International Journal of Food Microbioly. 50:191–201.

Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S. and Scherer, S. 2003. A Pediocin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strain Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Multispecies Cheese Surface Microbial Ripening Consortium. Applied And Environmental Microbiology. 69:1854–1857.

Mah, T. and G.A. O'Toole. 2001. Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents. TIMS. 9: 34-39.

Maldonado, A., Jiménez, R. Ruiz, B. 2004. Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism. *Journal of Bacteriology*. 186: 1556-1564

Muriana, P. M. 1996. Bacteriocins for control of Listeria spp. in food. International Journal of *Food Microbioly. Prot. Suppl.* 59:54–63.

Murry, A.C., Hinton, A. y Morrison, H. 2004. Inhibition of growth of *Escherichia coli, Salmonella typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science*, 3: 603-607.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 1998. Problemas relativos a la calidad e inocuidad de los alimentos y su repercusión en el comercio. Boletín del Departamento de Agricultura. Bioseguridad, Nutrición y Protección del Consumidor. Consultado de la red mundial el 17 de Agosto de 2006. Disponible en http//:www.fao.gov//foodcontrol.htm.

Ray, B. 2001. Bacteriocin-Based Biopreservatives Control Growth of Pathogenic and Spoilage Bacteria in Vacuum-Packed Refrigerated Low-Heat Processed Meat Products. Meat Science/Food Microbiology. University of Wyoming Annual Science Research Report.

Rodriguez, J. M., Martinez, I. M. and Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42:91–121.

Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends of Food Science Technology. 7: 158–164.

SIVIGILA. Ministerio de la Protección Social - Institute Nacional de Salud. 2004. Reporte Epidemiológico de ETAs en Colombia. Consultado de la red mundial el 14 de abril de 2005. Disponible en http//:www.sivigila.ins.co/repepidem/2004/pdf

ANÁLISIS DE PELIGROS Y PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL (HACCP) EN UNA LÍNEA DE BEBIDA EN POLVO TIPO MERENGADA

Alberto Mieres-Pitre, Beatriz Ramos
Universidad de Carabobo. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.
Valencia - Venezuela
albertopitre@intercable.net.ve

Palabras clave: puntos críticos de control, bebida, inocuidad.

RESUMEN

El análisis de peligros y puntos críticos de control, es un método sistemático, preventivo, dirigido a la identificación, evaluación y control de los peligros asociados con las materias primas, ingredientes, procesos, comercialización y su uso por el consumidor, a fin de garantizar la inocuidad del alimento (COVENIN 3802, 2002). El objetivo de este estudio fue establecer un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP), en el proceso de elaboración de una bebida en polvo tipo merengada a base de arroz, en una empresa venezolana, ubicada en el estado Aragua, con la finalidad de resguardar la calidad e integridad del producto.

INTRODUCCIÓN

La seguridad de los alimentos es un requisito imprescindible en la elaboración de productos, ya que estos son de consumo masivo y el objetivo principal es garantizar que los productos manufacturados se encuentren en óptimas condiciones para el consumo humano (Larrañaga y col., 1999). El HACCP es un sistema de carácter preventivo y está enfocado hacia el control de las etapas críticas para la inocuidad del alimento a diferencia del control tradicional que se basa en la inspección de las instalaciones y el análisis del producto final. El sistema HACCP es un documento formal que contiene básicamente dos componentes: el análisis de peligros y el plan, donde se presentan todos los detalles de las etapas del proceso donde existen puntos críticos de control (PCC), los límites críticos, los procedimientos de vigilancia, las acciones correctivas y la verificación del mismo (Dávila y col., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para una correcta implementación del plan HACCP, es primordial tener en funcionamiento los programas básicos de seguridad y sanidad en la planta, principalmente en la línea de producción a la cual se le aplicará el sistema. El primer paso en el establecimiento del plan HACCP, fue diseñar un formato en base a los documentos de cada pre-requisito que permita evaluarlos constantemente, y aplicarlo mediante una auditoria, para realizar un diagnóstico preliminar de los mismos en la línea de producción (Mortimore y Wallace, 1994).

Para el establecimiento de la documentación del plan HACCP se aplicaron los siete principios establecidos en el Codex Alimentarius (Figura 1) y se siguieron las etapas señaladas en la norma COVENIN 3802 (2002). Utilizando el diagrama de flujo como guía (Figura 2), se identificaron todos los peligros potenciales biológicos, químicos y físicos, se efectuó un análisis de peligros para determinar si el peligro identificado era significativo para la inocuidad del alimento. Mediante la aplicación del árbol de decisión se determinó los PCC en el proceso de elaboración de la merengada, se fijaron los límites críticos para cada PCC. Se estableció la vigilancia, generando un registro exacto que sería usado en la etapa de verificación. La vigilancia en la línea fueron mediciones de humedad, temperatura, presión de aire, entre otros. Se establecieron las acciones correctivas a adoptar en caso de alguna posible desviación. Finalmente se presentaron los procedimientos para verificar que el sistema funcione correctamente (Dávila y col., 2006).

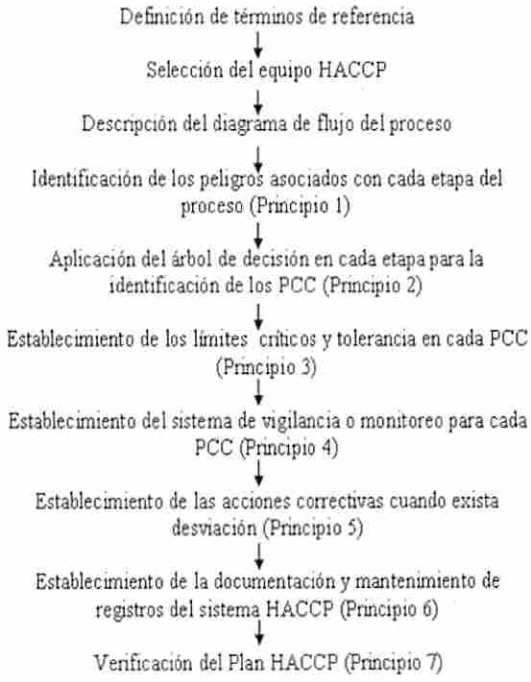


Figura 1. Secuencia lógica para la implementación de un sistema HACCP

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la empresa existen cuatro programas de pre-requisitos: buenas prácticas de manufactura, limpieza y fumigación, control de sustancias químicas y control de plagas y roedores. Como se muestra en la figura 3, los porcentajes de eficiencia de los prerrequisitos son bastante altos; esto significa que las actividades que se llevan a cabo en cada uno de estos programas se cumplen casi a cabalidad. El pre-requisito que presenta menor grado de aplicación es el de buenas prácticas de manufactura (75,47%), debido a que no se realiza un control de la magnitud del ruido (medida en decibeles) presente en cada una de las áreas de trabajo, no existen lavamanos en el área de producción, el personal no es motivado ni capacitado para que tenga buenos hábitos de higiene, el personal no utiliza el rayado peatonal y maneja de forma imprudente los montacargas, por otra parte, la línea de producción no cuenta con un sistema o equipo para detectar las materias extrañas que puedan afectar y/o contaminar el producto final.

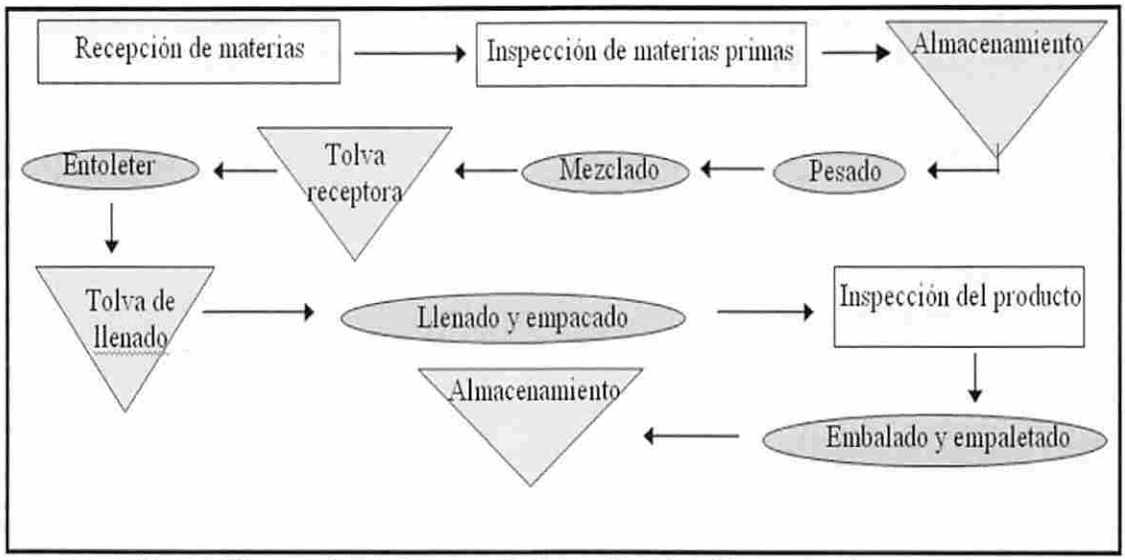


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida en polvo tipo merengada

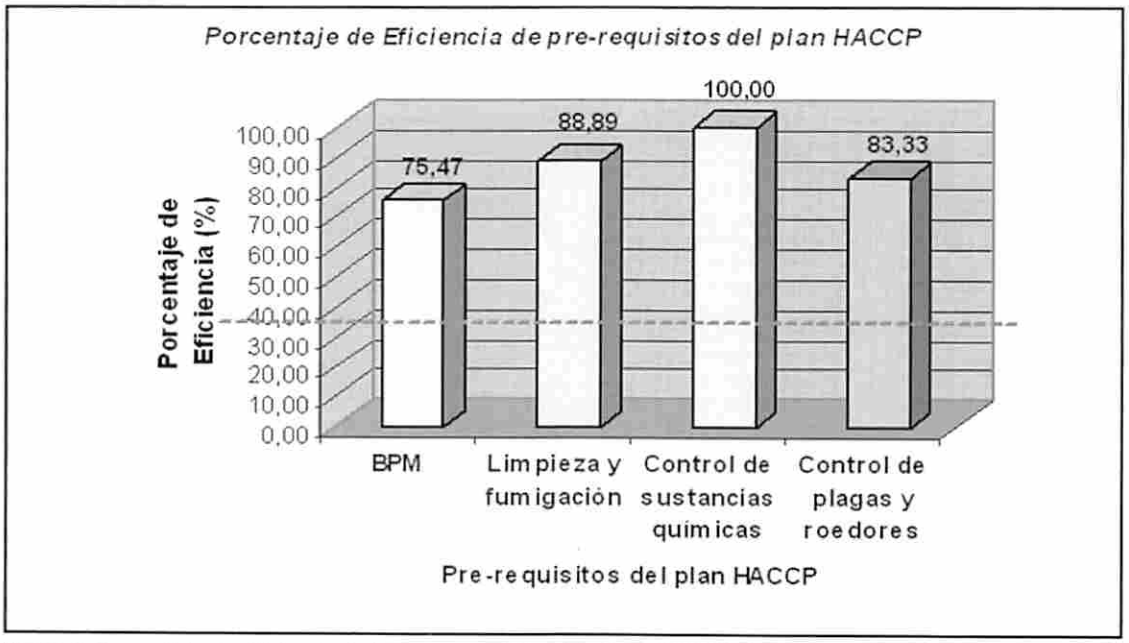


Figura 3.Porcentaje de eficiencia de los pre-requisitos del plan HACCP obtenidos en la evaluación diagnóstico realizada

El pre-requisito de control de plagas y roedores obtuvo el segundo valor más bajo de porcentaje de eficiencia (83,33%), debido a la falta de fumigación (uso de plaguicidas) al ambiente tanto interna como externamente en la planta y las aves no son controladas por exclusión (redes, mallas, trampas mecánicas). En los programas de limpieza, fumigación y control de sustancias químicas se obtuvo los valores más altos de porcentajes de conformidad (88,89% y 100%, respectivamente), ya que las no conformidades detectadas en el pre-requisito de limpieza y fumigación fueron de poca relevancia, como por ejemplo: la falta de formato para registro y verificación de las actividades de limpieza y no existe una acción documentada del retiro diariamente de los desechos de basura. En la figura 2 se presenta el diagrama de flujo de proceso, el cual comienza desde la recepción de la materia prima, la cual pasa por rigurosas pruebas de calidad, entre las cuales se encuentran los análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Esta materia prima consta principalmente de harina de arroz instantánea, sabores, azúcar refinada, aromas, espesantes y estabilizantes. Posteriormente cada uno de los ingredientes pasa a un proceso de pesado, para luego ser adicionados a un mezclador, en donde se garantiza la homogeneidad del producto. La mezcla resultante es llevada a una tolva receptora y seguidamente es pasada por un limpiador centrífugo (entoleter), cuyo objetivo principal es destruir cualquier larva o huevo que pueda quedar en el producto final. Posteriormente se realiza el proceso de llenado y empacado y colocado en cajas. Finalmente es distribuido a los centros de ventas locales. En cada una de las etapas que conforma la línea, se identificaron 12 peligros que pueden afectar la inocuidad del producto, siendo los más relevantes: la proliferación de microorganismos patógenos que producen la contaminación del producto final, la contaminación física en el producto terminado, por la presencia de impurezas extrañas (vidrios, piedras, metales, etc) en los ingredientes. Una vez enumerados todos los peligros de la línea, se aplicó el árbol de decisión, dando como resultado la identificación de cuatro puntos críticos de control, en las etapas de recepción y almacenamiento de materias primas y en el llenado y empacado del producto final, los cuales son para la primera etapa, el alto contenido de humedad en las materias primas y la presencia de impurezas y materias extrañas en los ingredientes y para la etapa de llenado y empacado la temperatura en las resistencias vertical y horizontal y la presión de aire en la llenadora. Finalmente la documentación del plan HACCP, se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Plan HACCP de la línea de bebida en polvo tipo merengada

PCC	Límite crítico	Vigilancia				Acción correctiva	Registro	Verificación
		¿Qué?	¿Cómo?	Frecuencia	¿Quién?			
Alto humedad en M.P	H. Arroz Máx. 8,5 % Cacao y maltodex-trina. Máx 5,0 %	Humedad de la H. Arroz, cacao y maltodex.	Análisis de humedad	Cada lote que llegue a la planta	Inspector de calidad y analista	• Rechazar insumo	• Formato de inspección de M.P recibidas	• Revisión de registro y certificados
Presencia de mat. extraña	Ausencia	Las materias extrañas en los ing.	Detector de metales y tamices	Cada producción	Operador de producción	• Rechazar producto final	• Formato de pro-ducto termina-do	•Revisión de registros
Temp. Resistencias vert. y horiz..	Resist. V (155-160) °F Resist. H. (150-160)°F	Temp. Resist. Vert. y horiz..	Registrador de temp. de maquina	Cada hora	Operador de producción	• Revisar sistema de control Automát. de temp.	• Formato y gráficas de control	•Revisión de registros
Presión de aire	6 bar	Presión de aire en equipo	Manómetro	Cada hora	Operador de producción	• Revisar suministro de aire	• Formato y gráficas de control	• Revisión de registros

CONCLUSIONES

El análisis de peligros para el proceso de producción de la bebida en polvo, arrojó que los peligros físicos y biológicos son los que principalmente afectan la inocuidad del producto final. Los pre-requisitos existentes en la planta reportan valores de porcentajes de eficiencia iguales a 75,47 % en buenas prácticas de manufactura, 88,89 % en limpieza y fumigación, 100 % en control de sustancias químicas y 83,33 % en control de plagas y roedores. Se identificaron 12 peligros siendo los más relevantes: la proliferación de microorganismos patógenos y la presencia de impurezas extrañas en los ingredientes. Finalmente se identificaron cuatro PCC, en las etapas de recepción y almacenamiento de materias primas y en el llenado y empacado del producto final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana Covenin: 3802. Directrices generales para la aplicación del sistema HACCP en el sector alimentario. 2002. 37 p

Dávila, J; Reyes, G y Corzo, O. Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda. Revista ALAN. 2006; 56(1).

Larrañaga, I., Carballo J., Rodríguez M. y Fernández J. (1999). *Control e Higiene de los Alimentos* (Primera edición). Madrid. Mc Graw Hill.

Mortimore, S y Wallace, C. (1994). HACCP enfoque práctico. (1a. ed.). Acribia. Zaragoza, España.

PROPOSICIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR LA PROTEÍNA DE LECHE DE VACA POR MEDIDA DE LA GRAVEDAD ESPECÍFICA

Alvarado, Juan de Dios y Pujos Al., Maritza Isabel.
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Centro de Investigación Científica (CENI – Proyecto PMVL-UTA)
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
Ciudadela Huachi. Av. Los Chasquis. Casilla 18-01-0334
AMBATO – ECUADOR
E-mail: fcial@uta.edu.ec

Palabras clave: control de calidad, leche, proteína, caseína, gravedad específica.

RESUMEN

Mediante el desarrollo de un modelo matemático lineal que supone un efecto aditivo de los componentes en la leche de vaca, se establece la relación entre la gravedad específica y el contenido de sólidos totales, que conduce al cálculo del porcentaje de proteína a partir del intercepto.

Para probar la aplicación del modelo se trabajó con muestras de leche entera proporcionadas por 10 productores distintos, en las que se determinaron: sólidos totales y proteína bruta según Normas Ecuatorianas INEN. En todos los casos se prepararon siete submuestras mediante la adición de cantidades conocidas de caseinato de calcio comercial "Casec", termostatizadas a 15°C para medir la gravedad específica por quintuplicado y en tres réplicas mediante un hidrómetro. Se establece el cumplimiento de la linealidad prevista por el modelo, de la función sólidos totales contra gravedad específica.

Las diferencias en el contenido de proteína bruta registradas entre los valores experimentales, los calculados con el modelo y los calculados mediante el uso de las ecuaciones obtenidas mediante análisis de regresión, indican que para utilizar el método por medida de la gravedad específica, se requiere disponer de ecuaciones específicas para muestras definidas con el propósito de obtener resultados válidos.

El método y las ecuaciones presentadas son útiles para determinar el porcentaje de proteína en leche entera, mediante la determinación de la gravedad específica o de los grados lactodensimétricos, con las ventajas que se requiere poca cantidad de muestra, menos tiempo para la medida, es más económica y asequible a los productores, comercializadores y procesadores de leche. El método previa estandarización y por su simpleza puede ser utilizado como herramienta de control de calidad para la recepción y pago de la materia prima según el contenido de proteína.

1. INTRODUCCIÓN

Conocer las características de los alimentos mediante el estudio de sus propiedades físicas, no solo presenta un interés intrínseco, puramente teórico, sino que aparece también un componente de aplicación práctica, derivado del hecho de que son estas propiedades las que, en definitiva, van a gobernar de una u otra forma los procesos tecnológicos a los que se someten los alimentos para su acondicionamiento o transformación. Estas propiedades sirven como índices de control de calidad y en muchos casos orientan criterios con relación a la composición química y a los rendimientos que se esperan (Fernández, 1982).

Según lo anterior, no es extraño que se realicen numerosos esfuerzos para establecer correlaciones entre propiedades físicas y componentes químicos, tendientes a establecer la composición o elucidar la estructura de los componentes mayores de la leche. La mayor parte de los trabajos están orientados hacia el componente grasa Alvarado (1996, 2003). Muy poca información se encuentra con relación a la proteína, posiblemente debido a la baja solubilidad de la caseína; sin embargo Alvarado (2007) indicó la posibilidad de trabajar con caseinato de calcio, demostrando el cumplimiento de ecuaciones modelo de tipo lineal que relacionan a la gravedad específica con el contenido de sólidos totales y de proteína.

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche presenta gran complejidad, pudiéndose definir como un sistema heterogéneo formado por diferentes fases en equilibrio inestable. La fase mayoritaria acuosa contiene moléculas como la lactosa e iones como el Ca^{2+} disueltos. Los coloides dispersos en la fase continua están constituidos por las proteínas séricas, los complejos micelares de caseína. La grasa en forma de glóbulos en forma de emulsión (Guervilla, 2001).

Walstra y Jenness (1987) señalaron que las ecuaciones para estimar el extracto seco a partir de la densidad y del contenido graso de leches, presentan la dificultad que la densidad del extracto seco magro varía al hacerlo la composición, por ello la ecuación puede ser distinta para cada lote de muestras o siempre que exista variación en la composición lo cual ocurre por múltiples causas. Lo anterior también ocurre en el caso del extracto seco libre de nitrógeno, por ello será necesario disponer de ecuaciones específicas para lotes o muestras definidas.

La búsqueda de métodos sencillos, rápidos y baratos para estimar la composición de la leche, como son las determinaciones físicas, es una necesidad creciente para los productores, comercializadores e industrias que procesan leche o elaboran productos lácteos, que actualmente utilizan como criterio para el pago, además del contenido de grasa, el contenido de proteína de la materia prima y justifica la realización del presente trabajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de muestras y submuestras

Se trabajó con leche fresca de vaca suministrada en forma directa por productores de la localidad. Se obtuvieron muestras de aproximadamente 10 litros de leche entera cruda de vaca. De cada muestra se prepararon submuestras con la adición de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 y 3,0% [w/w] de caseinato de calcio de la Casa Novartis (Casec con 88% de proteína como caseinato de calcio lecitinado, 2% de grasa), en las que se realizaron las determinaciones de gravedad específica con las muestras termostatizadas a 15°C.

La incorporación de caseinato de calcio se realizó a temperatura ambiente aplicando una ligera agitación que permite mezclar las fases, se calentó la mezcla hasta 28°C por 2 minutos, se enfrió hasta 15°C con agitación constante y se dejó en reposo por 10 minutos antes de hacer las determinaciones.

2.2. Métodos físicos

La gravedad específica se midió en probetas de 250 ml con un hidrómetro calibrado y con una precisión de 0,0005, según el método indicado por Alvarado y Aguilera (2001).

2.3. Análisis químicos

2.3.1. Determinación de sólidos totales.

Según la Norma INEN 14 (1982), se desecó la muestra en estufa a 103°C por tres horas, previa exposición de la cápsula, por treinta minutos, al vapor de un baño de agua en ebullición y se pesó el residuo que corresponde a los sólidos totales de la leche, por diferencia se establece la humedad.

2.3.2. Determinación de proteína.

Según la Norma INEN 16 (1983), se determinó el contenido de nitrógeno total por el método micro Kjeldahl mediante digestión de la muestra, seguido de destilación y neutralización, utilizando el factor N * 6,38 para expresarlo como proteína bruta.

2.4. Desarrollo de una ecuación modelo para cuantificar el contenido de proteína.

2.4.1. Para leche entera en base a los valores de densidad.

Si se asume que las contribuciones de las densidades de los componentes mayores, son aditivas para la densidad de la leche, se puede escribir:

$\rho_{leche} = (H + P + R)/((H/\rho_H) + (P/\rho_P) + (R/\rho_R))$ (1)

Siendo ρ la densidad [kg/m^3]; H, P y R los componentes mayores agua, proteína y sólidos no proteínicos o extracto libre de nitrógeno, respectivamente [g/100 g].
Se conoce que:
$H + P + R = 100$ (2)
$H = 100 - S$ (3)
$S = P + R$ y $R = S - P$ (4)

S es el contenido de sólidos totales [g/100 g], por reemplazo en la ecuación (1).

$\rho_{lech} = (100)/(((100 - S)/\rho_H) + (P/\rho_P) + ((S - P)/\rho_R))$ (5)

Por reemplazo en la ecuación anterior, si la densidad del agua a 15°C es 999,14 [kg/m^3], utilizando el valor de 1050 [kg/m^3] aceptado para caseína y 1500 [kg/m^3] para el extracto libre de nitrógeno, se establece:
$\rho_{leche} = (100)/(((100 - S)/999,14) + (P/1050) + ((S - P)/1500))$ (6)
$\rho_{leche} = (100)/((100/999,14) - (S/999,14) + (P/1050) + (S/1500) - (P/1500))$ (7)
$\rho_{leche} = (100) / ((0,1001) - (0,0010\ S) + (0,000952\ P) + (0,000667\ S) - (0,000667\ P))$ (8)
$\rho_{leche} = (100)/(0,1001 - 0,000333\ S + 0,000285\ P)$ (9)

Como:
$\rho_{leche} = G_{leche,}\ (\rho_H) = G_{leche} * 999,14$ (10)
Donde G_{leche} es la gravedad específica de la leche, por reemplazo:
$G_{leche}\ 999,14 = (100)/(0,1001 - 0,000333\ S + 0,000285\ P)$ (11)
$G_{leche} = (100)/(100,01 - 0,3327\ S + 0,2848\ P)$ (12)

Utilizando los valores inversos y ordenando la ecuación:
$(1/G_{leche}) = (100,01 - 0,3327\ S + 0,2848\ P)/100$ (13)
$(1/G_{leche}) = 1 - 0,003327\ S + 0,002848\ P$ (14)
$(1/G_{leche}) - 1 = -0,003327\ S + 0,002848\ P$ (15)
$((1 - G_{leche})/ G_{leche}) = -0,003327\ S + 0,002848\ P$ (16)
$0,003327\ S = -((1 - G_{leche})/ G_{leche}) + 0,002848\ P$ (17)
$S = -300,6\ ((1 - G_{leche})/ G_{leche}) + 0,856\ P$ (18)

La ecuación que relaciona a la gravedad específica medida a 15°C con el contenido de sólidos totales, y que conduce al cálculo del contenido de proteína expresado en [g/100 g], es:
$S = 0,9\ P + 301\ ((G_{leche} - 1)/ G_{leche})$ **(19)**

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa la relación existente entre la gravedad específica expresada como ((G – 1)/G), de la muestra original y de las seis submuestras obtenidas con la adición de caseinato de calcio, con el correspondiente contenido de sólidos totales (S). En todas los réplicas se observa que se cumple la linealidad prevista por el modelo previamente desarrollado, al graficar ((G – 1)/G) contra S [g/100 g] se obtienen líneas rectas bien definidas, los coeficientes de determinación son próximos a 1 en todos los casos.
Para confirmar el cumplimiento de la función lineal entre ((G – 1)/G) y (S), en las ecuaciones empíricas de las tres réplicas se aplicó una prueba de hipótesis del coeficiente de correlación, aceptándose la hipótesis alternativa H_1: $r \neq 0$, porque el t calculado es mayor que el t de tablas ($t_{n-2} = 3,18$), demostrándose que el coeficiente de correlación (r) es significativamente diferente de 0 y por lo tanto la ecuación es lineal, con una variación de los datos pequeña alrededor de la línea de regresión ajustada.
Según lo indicado, la contribución de los componentes mayores a la gravedad específica de la leche es aditiva, suposición básica para el desarrollo del modelo y que conduce a la obtención de ecuaciones lineales; la estructura físico-química de emulsión, suspensión coloidal y solución verdadera, sufre variaciones en especial en la suspensión; sin embargo los cambios lineales de la gravedad específica se mantienen al adicionarse Casec, lo que posibilita el cálculo de la proteína a partir del intercepto de ecuaciones empíricas de regresión lineal las cuales pueden ser obtenidas con la muestra original y una submuestra.

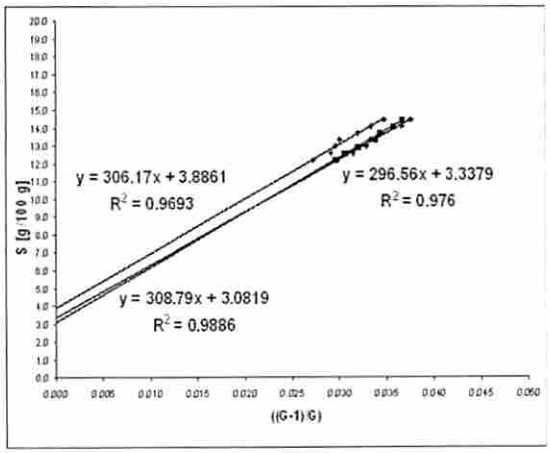


Figura 1. Relación entre la gravedad específica de leches a 15°C con el contenido de sólidos totales en muestras obtenidas con la adición de caseinato de calcio.

El valor de la pendiente de la ecuación modelo, es muy próximo a los valores de las ecuaciones empíricas de regresión correspondientes a las tres réplicas, las diferencias son mínimas inferiores al 1,5%. Los valores de los interceptos cambian, lo que está asociado con la variabilidad natural del contenido de proteína de las muestras de leche para las tres réplicas presentadas. En el caso de utilizar el factor 0,9 de la ecuación modelo para calcular el contenido de proteína se obtiene: 4,3; 3,7 y 3,4 [g/100 g], únicamente el último valor compara con el valor real.
Pruebas adicionales realizadas con muestras de leche cruda comercial y con la adición de dos niveles de caseinato de calcio, demostraron un comportamiento similar al observado previamente. Los datos experimentales de proteína bruta (N*6,38) en las muestras naturales sin la adición de Casec. fueron: 4,0; 3,6 y 2,5 [g/100 g], para las rectas ubicadas en la parte superior, media e inferior de la Figura 2. Según la ecuación desarrollada, el intercepto es 0,9 P, en cuyo caso los valores calculados no corresponden al valor real, en consecuencia la ecuación modelo no es adecuada para calcular la proteína de leches, cuya variación es notoria según los valores del intercepto que van desde 5,4 en la muestra con el más alto contenido de proteína, hasta 0,2 en la muestra con el menor contenido de proteína.
La alternativa que se propone es hacer pruebas con lotes de muestras homogéneos, medir la gravedad específica en la leche natural a 15°C y en otra submuestra con la adición de caseinato de calcio (1-2%). En los dos casos determinar sólidos totales y proteína mediante métodos normalizados. Establecer la ecuación de regresión lineal y a partir del intercepto establecer la constante numérica apropiada para calcular el contenido de proteína.

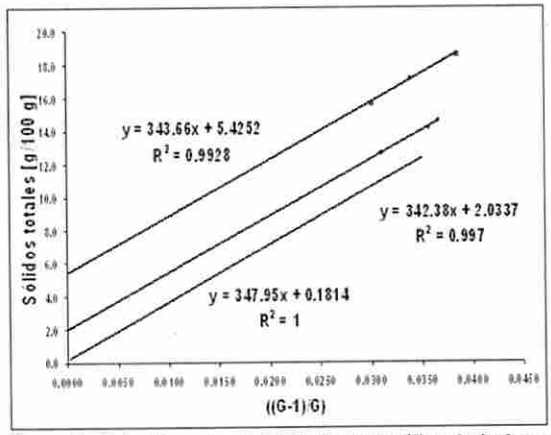


Figura 2. Relación entre la gravedad específica de leches a 15°C con el contenido de sólidos totales para calcular el contenido de proteína bruta.

Según las ecuaciones de regresión indicadas en la Figura 2, las constantes numéricas son: $A_1 = 5,4252/4,0 = 1,3563$; $A_2 = 2,0337/3,6 = 0,565$ y $A_3 = 0,1814/2,5 = 0,073$.
Las ecuaciones modificadas presentan la forma siguiente:

$S = 1,3563\ P + 343,66\ ((G - 1)/G)$
$S = 0,565\ P + 342,38\ ((G - 1)/G)$
$S = 0,073\ P + 347,95\ ((G - 1)/G)$

Estas ecuaciones servirían para cuantificar la proteína de muestras del mismo origen. En consecuencia, para utilizar este método se requiere disponer de ecuaciones de regresión específicas para las distintas muestras, lo que sería equivalente a realizar una curva de calibración muy utilizada en los análisis químicos, establecer la constante numérica del intercepto que conduzca al valor real de la proteína bruta. Estas ecuaciones luego servirían para cuantificar la proteína de muestras de proveedores conocidos o de lugares específicos, mediante la medida de la gravedad específica y la determinación de sólidos totales mediante desecación.

4. CONCLUSIONES

El uso de caseinato de calcio comercial (Casec) posibilita obtener ecuaciones lineales que relacionan a la gravedad específica con la materia seca o sólidos totales de muestras de leche de vaca, a partir del intercepto se puede calcular el contenido de proteína bruta. Según lo indicado, se presentan las bases de un método económico y sencillo para determinar mediante cálculo el contenido de proteína de leches por medida de la gravedad específica, el cual una vez estandarizado para muestras específicas minimizando la variación natural del producto, puede ser utilizado en forma rutinaria por productores, comercializadores e industrias lácteas.

5. AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por el financiamiento a través del Proyecto interno PMVL-CENI del Centro de Investigaciones y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por las facilidades para la realización de los trabajos.

6. REFERENCIAS

Alvarado, Juan de Dios y Pujos Al., Maritza Isabel. 2007. Desarrollo y validación de ecuaciones que relacionan a los sólidos totales y a la proteína de leche de vaca con la gravedad específica. Presentado en el VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Ambato. Ecuador.

Alvarado, J.de D. 2003. Métodos para cuantificar la grasa de leche de vaca por medida de la gravedad específica. PF-112. Libro de Resumenes CIBIA IV. Valparaíso. Chile. p:183.

Alvarado, J.de D. 2001. Densidad y gravedad específica. En: "Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos". Alvarado, J. de D y Aguilera, J.M.(Eds.). Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. pp:1-28.

Alvarado, J. de D. 1996. "Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos". Quito, Ecuador. Radio-Comunicaciones. 524p.

Choi, Y. and Okos, M.R. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods. In: "Food Engineering and Process Applications". V.1. Transport Phenomena. Le Maguer, M. and Jelen, P. (Eds). England. Elsevier Applied Science. Pub. pp: 93 – 101

Fernández, F. 1982. Las propiedades físicas de los alimentos y la ingeniería de procesos. I. Productos lácteos. Alimentación Equipos y Tecnología. 6:55–63.

Gervilla, Ramón. 2001. Estudio de los tratamientos por lata presión hidrostática en la leche de oveja. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra (Cerdanyola del Vallés).

INEN. 1983. Determinación del contenido de proteína. Norma Ecuatoriana 16. Quito, Ecuador. 4 p.

INEN. 1982. Determinación de sólidos totales y cenizas. Norma Ecuatoriana 14. Quito, Ecuador. 4p.

Walstra, P. y Jenness, R. 1987. "Química y Física Lactológica". Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. pp:340-342.

ELABORACIÓN DE UNA MERMELADA DE MORA AZUL (*Vaccinium corymbosum*) CON CHIA (*Salvia hispanica*) RICA EN ANTIOXIDANTES Y FIBRA.

Ramírez Martínez María de Lourdes; Beltrán Orozco María del Carmen; Teodoro Pineda Santiago, Ayala Camarillo Karla Cristal
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO EN ALIMENTOS
Plan de Ayala y Carpio, col Santo Tomás, cbeltran@encb.ipn.mx
MÉXICO, D.F.

Palabras clave: fibra, antioxidantes, mermelada, chía, mora azul

RESUMEN

El estado nutricional de la población metropolitana de la Ciudad de México, muestra desequilibrios importantes, siendo los relacionados con el consumo de fibra y de antioxidantes, de los más relevantes, puesto que se incluyen en la dieta de manera deficiente (Olaiz-Fernández, 2006). Es importante diseñar alimentos que puedan proporcionar al mismo tiempo fibra y antioxidantes para poderlos incluir en la dieta. Se ha encontrado que las semillas de chía (*Salvia hispanica)* constituyen una fuente importante de fibra tanto soluble como insoluble; entre sus propiedades funcionales tiene alta capacidad de absorción de agua y de formar geles gracias al mucílago que posee, por lo que es posible sustituir la pectina por la chía en la preparación de mermeladas (Salgado-Cruz y cols., 2006). La mora azul (*Vaccinium corymbosum)* posee una alta capacidad antioxidante, y al incluirse en la dieta de forma cruda o en mermeladas y jugos, transfiere esta capacidad antioxidante al plasma, proporcionando los beneficios que esto conlleva a las personas que la consumen. Además, se ha encontrado que la mermelada de mora azul mantiene su capacidad antioxidante, incluso después de hornearse. (Kalt y cols., 2000; Sánchez , 2002).

En el presente trabajo, se realizó un diseño de mezclas para determinar la concentración adecuada de fruta, pectina y chía para obtener una mermelada de mora azul rica en fibra y antioxidantes que tenga características adecuadas para emplearse en panificación. Se encontró que la mermelada con mejores características tiene una proporción de chía, pectina y fruta de 03:05:44.

INTRODUCCION

En América Latina, en los últimos años, la salud pública ha experimentado una importante transformación relacionada con cambios sociales, crisis económicas de diversa naturaleza, modificaciones en la estructura y distribución demográfica de la población y transformaciones en las políticas públicas de salud y bienestar social. Esto ha transformado en forma radical los estilos de vida de los diversos grupos sociales, lo que ha dado lugar a iimportantes cambios en su perfil epidemiológico (Yamada, 2003). En nuestro país, la disminución de la mortalidad a causa de enfermedades transmisibles, se debe en gran medida a la extensión de servicios de salud, agua potable, drenaje y el mejoramiento de las condiciones de vivienda, así como a la mayor disposición de alimento en el medio urbano (Olaiz-Fernández, 2006). En contraste, el estilo de vida asociado con los procesos de urbanización, explica la creciente epidemia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) en las sociedades urbanizadas (Uauy, 2001).

Está ampliamente documentada la relación que existe entre estas enfermedades y ciertos hábitos alimentarios muy extendidos entre todos los estratos sociales de la población urbana (Campbell y cols., 1994; Olaiz-Fernández, 2006, St-Onge y cols., 2003; Galobardes y cols., 2003), el patrón alimentario en la población urbana de la Ciudad de México está caracterizado por un bajo consumo de frutas y verduras, lo que se traduce en un pobre consumo de fibra dietética y antioxidantes, así como un alto consumo de azúcares y harinas refinadas y grasas saturadas (Olaiz-Fernández, 2006), y las tendencias actuales apuntan hacia el agravamiento del problema en el futuro inmediato, si no se ponen en marcha acciones de salud pública para prevenir y limitar el daño (Dowse, 1995, Olaiz-Fernández, 2006).

La fibra dietaria es la porción de plantas comestibles que no puede ser digerida por el intestino delgado del humano con parcial o completa fermentación en el intestino grueso (Spiller, 2000; AACC, 2001). La deficiencia en la ingesta de fibra se ha asociado con constipación, diverticulosis, enfermedades vasculares y ciertos tipos de cáncer (Spiller, 2000), estos datos sea poyan en estudios epidemiológicos. En los últimos años, muchas formas de fibra se han utilizado para incrementar su participación en la composición de alimentos. Entre estas diversas formas de fibra se encuentran el salvado, el arroz, fibra de manzana, etc. La incorporación de la semilla de chía (*Salvia hispanica L)* a la dieta humana ofrece grandes beneficios a la salud, debido a que este cultivo milenario es también un alimento excepcional debido a su composición y estabilidad, ya que aporta fibra dietaria soluble, antioxidantes, ácidos grasos w-3, además de una importante cantidad de proteínas. Una vez que el aceite se ha extraído de la semilla de chía, el material remanente contiene un 50 - 60% de fibra. La semilla posee un 5% de fibra soluble que aparece como mucílago al colocarla en agua y es útil como fibra dietética (Bushway y Belya, 1981). Romero y Beltrán-Orozco realizaron un trabajo de caracterización de la semilla de la chía y evaluaron su efecto en excreción de ratas, encontrando el mejor efecto cuando el contenido de la dieta contaba con fibra proveniente de la chía al 5% (Romero y Beltrán-Orozco, 2003). En 2006 Salgado-Cruz y cols. determinaron algunas propiedades funcionales de la chia, encontrando que tiene capacidad de absorción de agua y de formar geles gracias al mucílago que posee, por lo que es posible sustituir la pectina por la chía en la preparación de mermeladas (Salgado-Cruz y cols., 2006). Los resultados obtenidos a la fecha sugieren que las semillas de la chía son un excelente ingrediente en alimentos horneados y en mermeladas, a los que eleva el contenido de fibra y aporta características nutricias benéficas (Ayerza 2002; Romero, 2005: Salgado-Cruz, 2006; Ayala, 2006).

La mora azul (*Vaccinium angustifolium*) es una de las moras más populares y se consumen frescas, u horneadas para utilizarse como relleno de pay, de muffins, de bizcochos, etc. Contiene una gran cantidad de antioxidantes comparados con otras frutas, verduras y cereales (Halvorsen, y cols., 2002, Wu y cols, 2004), además se ha reportado que la capacidad antioxidante del suero se incrementa con el consumo de moras (Cao y cols, 1998). La mora azul contiene 0.04 mg de β caroteno, 13 mg de vitamina C y 1 mg de vitamina E por 100 g, también contienen 10 ER (equivalentes de retinol) de vitamina A por 100 gramos. Además, contiene antocianinas y compuestos fenólicos que también actúan como antioxidantes. (Halvorsen, 2002). En 2002, Sánchez y Beltrán-Orozco, optimizaron la fórmula de una mermelada de mora azul para utilizarla de relleno en una empanada, determinando la capacidad antioxidante del fruto fresco, y de la mermelada obtenida antes y después del horneado, concluyendo que la actividad antioxidante de la mora azul no cambia con el procesamiento.

En el presente trabajo, se pretende preparar una mermelada de mora azul adicionada de semillas de chía rica en fibra y antioxidantes que tenga características adecuadas para emplearse en panificación; el pan puede utilizarse para aumentar la ingesta de nutrientes específicos a determinadas poblaciones, como es el caso de los niños en edad escolar, donde un pan relleno con mermelada rica en antioxidantes y fibra puede ser una alternativa atractiva para el desayuno escolar.

MATERIALESY METODOS

Materiales

En este trabajo se probaron semillas de chía (*Salvia hispanica*) provenientes de Puebla, obtenidas en el mercado de "La Merced" de la Ciudad de México, mora azul proveniente de Querétaro obtenida en la Central de Abastos de la Ciudad de México, se utilizó azúcar refinada estándar, pectina cítrica Rapiset 150. Se determinaron análisis proximales de la chía y de la mora azul, utilizando los métodos AACC 2000.

Métodos

Diseño de mezclas: A partir de una formula base para preparar mermelada de mora azul utilizada por Sánchez en 2002, se realizó un diseño de mezclas utilizando el programa Design Expert 5, considerando tres variables: la fruta, la pectina y la chía. Se variaron las proporciones para poder evaluar el efecto de estas en la calidad final de la mermelada.

Características de calidad: Se evaluaron de cada tipo de mermelada, de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas relacionadas:

- pH utilizando un potenciómetro.
- Sólidos solubles con un refractómetro.
- La consistencia, utilizando un consistómetro de Bostwick, el cual tiene un mecanismo muy sencillo con el cual se observa el desplazamiento de la mermelada con respecto al tiempo; a mayor tiempo requerido para recorrer la misma distancia, mayor consistencia.

Prueba de horneado: Se elaboraron panes rellenos con las 18 diferentes mermeladas en idénticas condiciones experimentales para evaluar su comportamiento durante el horneado.

Evaluación sensorial: 10 jueces semientrenados probaron las 18 mermeladas y una mermelada de mora azul disponible en el mercado para comparar las características sensoriales que presentan. También se realizó una evaluación sensorial con jueces entrenados a panes rellenos con estas mermeladas.

RESULTADOS

Diseño de mezclas:

El diseño arrojó 18 experimentos, donde se variaron las proporciones de chía, mora azul y pectina en la elaboración de mermeladas de acuerdo con la formula base. Todas se prepararon en las mismas condiciones experimentales y se envasaron en caliente en frascos de vidrio estériles. Estos frascos se etiquetaron y se conservaron en refrgeración.

Características de calidad:

Los resultados muestran poca variabilidad en el pH (Figura 1), dentro de un rango de 3.1-3.4; sólidos solubles de 65-72°Brix (Figura 2); estos valores están dentro de las especificaciones de calidad para mermeladas según las Normas Oficiales Mexicanas y el 100% de las mermeladas donde se variaron las proporciones de pectina, fruta y semillas de chía cumplen con estos requisitos.

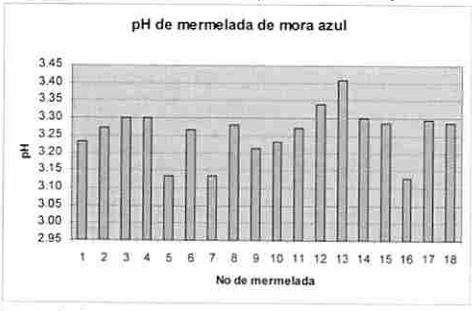


Figura 1. Grafica del pH de 18 diferentes formulaciones de mermelada de mora azul.

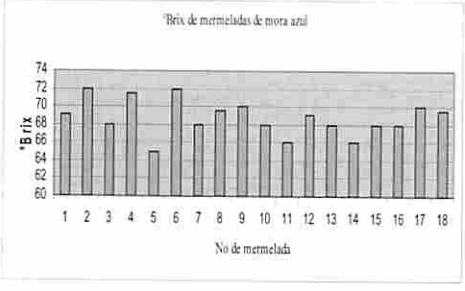


Figura 2. Gráfica de °Brix de 18 diferentes mermeladas de mora azul

En cuanto a la consistencia, sin embargo, a mayor proporción de semillas de chía sustituyendo pectina y/o fruta, se encuentra una consistencia de las mermeladas más firme. En un trabajo similar, donde a una mermelada de fresa se le adiciona fibra obtenida de frutas sustituyendo ésta por porciones de pectina, se observan resultados similares, donde la cantidad de sólidos solubles y el pH pueden considerarse en todas las mermeladas preparadas con diferente proporción de pectina y fibra de frutas, dentro de las características de calidad; pero la consistencia sí cambia, a mayor proporción de fibra de frutas, se obtiene una consistencia más firme (Grigelmo-Miguel y Martín-Belloso , 1999); en las mermeladas de mora azul probadas se aprecia que la mermelada con 100% de sustitución de pectina por semillas de chía está dentro de todos los rangos de las características de calidad, aunque el gel es más firme, y por tanto, las características sensoriales cambian.

Prueba de horneado:

Las 18 mermeladas se sometieron a una prueba de horneado, utilizándose como relleno de pan de dulce tipo cubilete, que tiene un amplio espacio interior y se cubren. En esta prueba, se observó que las mermeladas se expandían durante el horneado, y algunas salían del pan. La mermelada que mostró ser adecuada de acuerdo la prueba de horneado en el pan fue la que contiene 3 partes de pectina y cinco de chía.

Evaluación sensorial:

Los jueces semientrenados encontraron que las mermeladas probadas eran adecuadas y aceptables, aún cuando detectaron algunas diferencias en cuanto a la consistencia, dependiendo de la proporción de chía empleada.

En la evaluación de los panes rellenos con las diferentes mermeladas, no se detectaron diferencias, y resultaron con buena aceptación por parte de los jueces.

CONCLUSIONES.

La chía tiene capacidad de absorción de agua que le permite la formación de geles, propiedad funcional que puede aprovecharse en la elaboración de mermeladas.

Todas las mermeladas preparadas variando las proporciones de fruta, pectina y semillas de chía cumplen con los requisitos de calidad de las Normas Oficiales Mexicanas relacionadas.

La mermelada considerada como la mejor opción, utilizada como relleno en panes horneados, contiene de mora azul 44 partes, 5 de chía y 3 de pectina.

La mermelada resultante es rica en fibra proveniente de la semilla de chía y en antioxidantes provenientes de la mora azul.

Esta mermelada resultó con buenas características para utilizarse en productos de panificación. El pan relleno con esta mermelada obtuvo buena aceptabilidad con los jueces semientrenados que la evaluaron.

BIBLIOGRAFIA.

- American Association of Cereal Chemists (AACC) (2000). Approved Methods of American Association of Cereal Chemists, 10th ed., St. Paul, Minn., USA.
- American Association of Cereal Chemists (AACC) (2001). The definition of dietary fiber. A report. Cereal Foods World, 46(3), 112–129.
- Ayala Camarillo Karla Cristal. 2006. Utilización de productos gras como imitadores de grasa, y semillas de chía en la elaboración de un producto de panificación:"donas". Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Ayerza, R. W. Coates and M. Lauria. 2002. Chia Seed (Salvia hispanica L.) as an ω-3 Fatty Acid Source for Broilers: Influence on Fatty Acid Composition, Cholesterol and Fat Content of White and Dark Meats, Growth Performance, and Sensory Characteristics. 2002 Poultry Science 81:826–837.
- Beltrán-Orozco MC y Romero MR, 2003. La Chía, Alimento Milenario. Industria Alimentaria, México 25(5):20-29.
- Bushway A, Belya (1981) Chia seed as a source of oil, polisaccharide and protein. J Food Sciense, 46:1349-1356
- Campbell TC and Junshi C, 1994 Diet and chronic degenerative diseases: perspectives from China. Am J Clin Nutr 59:1153-1161
- Cao G, Booyh Sarah L., Sadowski James A, and Prior Ronals L 1998. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. Am J Clin Nutr 68: 1081-7
- Djoussé L, Arnett DK, Coon H, Province MA, Moore LL, Ellison RC, 2004.Fruit and vegetable consumption and LDL cholesterol: the National Hearth, Lung and Blood Institute Family Hearth Study. Am J Clin Nutr. 79(2):213-217
- Galobardes B, Costanza MC, Bernstein MS, delhumeau C and Morabia A. 2003 Trends in risk factors for lifestyle related diseases by socioeconomic position in Geneva, Switzerland, 1993-2000: Health inequalities persist. Am J Public Health, 93(8):1302-1309.
- Grigelmo-Miguel N and Martín-Belloso O. Influence of fruit dietary fibre addition on physical and sensorial properties of strawberry jams. Journal of Food Engineering Volume 41, Issue 1, July 1999, Pages 13-21.
- Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerod H, Andersen LF, Moskaug JO, Jacobs DR and Blomhoff R. 2002 A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. J Nutr 132:461-471.
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (2003). Resultados de la encuesta urbana de alimentación y nutrición de la zona metropolitana de la ciudad de México. ENURBAL 2002.
- Kalt, W, McDonald, JE, y Donner, H.(2000). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *JFS* 65 (3): 390-393.
- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- Romero Manilla Rhebeca. 2005. Evaluación bioquímica y nutricia de las semillas de chía (Salvia hispanica L.) y su incorporación a una barra de cereales. Tesis de Maestría en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Salgado-Cruz, MP, Cedillo-López D, Beltrán-Orozco, MC, 2006. Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chía (*Salvia hispanica*) y de la fibra dietaria obtenida de la misma. *VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato, Universidad Autónoma de Nuevo León y Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato. Guanajuato, Gto, 1-3 junio 2005. pag-358-366.
- Sánchez Oropeza Roberto, 2002 Desarrollo de productos de panificacion enriquecidos con nutraceúticos naturales. Tesis Licenciatura Ingeniero Bioquímico ENCB IPN.
- Spiller, G.A 2000. CRC Handboock of Dietary Fiber in Human Nutrition. 3th. Ed. CRC Press, London, 2000.
- St-Onge M-P, Keller K L and Heymsfield S.B. 2003 Changes in childhood food consumption pattterns: a cause for concern in light of increasing body weights. 2003, Am J Clin Nutr 78:1068-1073.
- Uauy R, Albala C and Kain J, 2001. Obesity trends in Latin America: Transiting from under to overweigth. J Nutr 131:893-899.
- Wu X, Beecher GR Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE and Prior RI. 2004. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. J Agric Food Chem. 2004, 52, 4026-4037.
- Yamada S 2003 Latin America social medicine and global social medicine Am J Public Health 93(12):1994-1996

CONTENIDO DE METALES EN INFUSIONES DE HIERBAS POR ABSORCIÓN ATÓMICA

[1]Jiménez-Vieyra, M. E.,[2] Zambrano-Zaragoza M. L.*, [1]Naranjo-Martínez, A, [1]Cabrera-Sierra R.
(1) Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, I.P.N. Unidad Profesional Adolfo López Mateos. Edificio 7, Zacatenco, C.P. 07738, México, mejimenezv@gmail.com
(2) Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Departamento de Ingeniería y Tecnología, Av. 1ro. de Mayo s/n, Col. Atlanta, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54740. e- mail luz.zambrano@correo.unam.mx

Palabras clave: nutrición y control de calidad, absorción atómica, infusiones de te, microondas, concentración de metales.

RESUMEN

El té instantáneo es un extracto seco de diversas plantas o hierbas, pero el término de "té" solo es aplicable a las infusiones que proceden del té negro, del te verde o del te long. Están disponibles en el mercado diversas marcas de te instantáneo. El consumo de estas infusiones proporciona beneficios como ser un simple estimulante por el contenido de cafeína, la presencia de fenoles, los cuales participan como antioxidantes, el contenido de algunos metales en estas infusiones como el zinc es parte de beneficios poco conocidos favorece el crecimiento, evita la anemia, participa en la síntesis y almacenamiento de la insulina en ciertas células del organismo. El objetivo del presente trabajo fue analizar el contenido de diferentes metales traza, cobre, plomo, fierro y zinc en 9 tipos de infusiones de hierbas instantáneas. Se utilizó la técnica de absorción atómica por flama, utilizando una lámpara de catado hueco para cada elemento y obteniéndose las ppm interpolando la absorbancia en la curva de calibración, encontrándose que las infusiones de árnica abango y jamaica contienen mayor contenido de Zn, 0.57, 0.42 y 1.0 ppm respectivamente, el té verde contiene 0.40 ppm de Cu; la infusión de jamaica con un contenido de 3.0 ppm de Fe; todas las infusiones tienen < 0.001 ppm en Pb. De acuerdo a los niveles de metales permitidos ninguna de las infusiones rebasa los valores especificados por la norma.

INTRODUCCIÓN

El té instantáneo es un extracto seco de diversas plantas o hierbas, pero el término de "té" solo es aplicable a las infusiones que proceden del té negro, del te verde o del te long. Están disponibles en el mercado diversas marcas de te instantáneo. La presencia de los trazas de metales en la composición de los alimentos es importante debido a su naturaleza toxica como en el caso del plomo, níquel, mercurio, y cadmio, mientras que otros como el cobre, fierro zinc, y manganeso son esenciales (Onianwa, P.C. y col, 1999). El consumo de estas infusiones proporciona beneficios como ser un simple estimulante por el contenido de cafeína, la presencia de fenoles, los cuales participan como antioxidantes, el contenido de algunos metales en estas infusiones como el zinc es parte de beneficios poco conocidos favorece el crecimiento, evita la anemia, participa en la síntesis y almacenamiento de la insulina en ciertas células del organismo los niveles permitidos en los alimentos son; el cobre es un elemento que es de esperarse su presencia debido a que participa en las reacciones de oscurecimiento que se llevan lugar en la misma planta, su límite tolerado es de 1.5 ppm. Las infusiones son fuentes significativas de manganeso, pero la hoja actúa como retenedor de elementos tóxicos como el plomo, aunque actualmente ya no se utiliza papel de plomo para recubrir los arcones en que se almacena el té, ahora se utiliza papel de aluminio. En estudios recientes hechos por Street, R. y col.(2007), reportó el contenido de aluminio en hojas de té utilizado para infusiones, especialmente para té verde y té negro, encontró que la adición de jugo de limón puede favorecer el tipo de especie de complejo de aluminio presente en estas infusiones, de acuerdo al tipo de complejo puede variar su toxicidad. Cortes Toro y col. (1994) llevaron a cabo la determinación de trazas de metales tóxicos de diversos alimentos, dada la importancia de la presencia de estos en relación con las alteraciones de que se pueden presentar en la salud. Olong, T. y col (2005) presenta una exhaustiva investigación de trazas de metales en miel, por espectroscopia de fluorescencia, y manifiesta la importancia del conocimiento integral de la miel de abeja.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el contenido de diferentes metales pesados, cobre, plomo, fierro y zinc en infusiones de hiervas o tipos de té instantáneo utilizando la técnica de absorción atómica por flama, debido a la importancia que se le asignas a estas infusiones en cuanto los beneficios a la salud

MATERIALES Y METODOS

Materiales.

Se utilizaron infusiones de diferentes tipos de te, seleccionados por su frecuencia de consumo en Latinoamérica: de **(1)** limón *(Citrus limonum Risso)*, **(2)** árnica *(Árnica montana L)*, **(3)** abango, **(4)** canela *(Cinnamomum verum)* con manzana, **(5)** samadhi que es una mezcla de hiervas *(Hypericum silenoides Jass, Smilax cordifolia, Cymbopogan ciltratus, Hibiscus sabdariffa, (Citrusslimetta Risso);* **(6)** jamaica *(Rosa sinesis)*. **(7)** boldo *(Peumus boldus Mol)*, **(8)** manzanilla *(Matricaria Chamomilla)*, **(9)** verde *(Camellia sinensi)s*. Se utilizaron 3g de té instantáneo disueltos en 100 mL de agua destilada y a una temperatura de 92 °C, con un reposo de 60 min.

Métodos.

Con la finalidad de obtener las curvas de calibración necesarias para la cuantificación de los metales trazas en ppm se elaboraron las diluciones correspondientes y determinó la absorbancia a cada concentración conocida. Obteniéndose las ecuaciones de regresión para cada metal y considerando además la dilución realizada para el tratamiento de cada infusión. obteniendo los totales de acuerdo con la siguiente relación.

$$ppm\ \ Metal\ \ = ppm\ \ grafica\ \ \times \frac{Vaforo}{Valicuota}$$

La longitud de onda a la que se midió el Cu^{++} fue de 324.8 nm. Fe^{++} de 248.3 nm, Zn^{++} de 213.9 nm y Pb^{++} a 283.3 nm.

Después de obtenidas las curvas de calibración se procedió a cuantificar el contenido de metales en cada infusión, tomándose 40 mL de cada infusión y digiriéndolas en 10 mL de ácido nítrico concentrado con calentamiento suave por 2 h y con reflujo para evitar perdidas de la solución, las muestras una vez digeridas fueron filtradas y aforadas a 100 mL para determinar por absorción atómica por flama los metales de: cobre, plomo, fierro y zinc, de los cuales se prepararon los estándares respectivos y utilizando las lámparas de cátodo hueco para cada elemento de acuerdo a la NOM-117-SSA1-1994.

RESULTADOS

En las figuras 1 a 4, se muestran las curvas de calibración obtenidas, así como sus ecuaciones y coeficientes de regresión, con las que se llevó a cabo el cálculo de la concentración de las trazas de metales cuantificados en cada una de las infusiones seleccionadas.

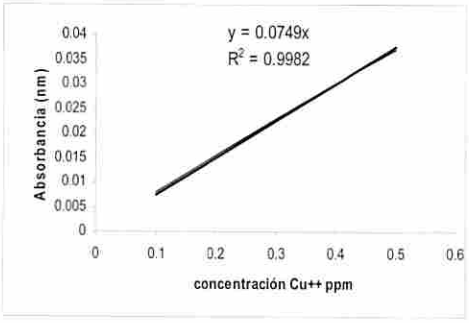


Figura 1. Curva de calibración Cu

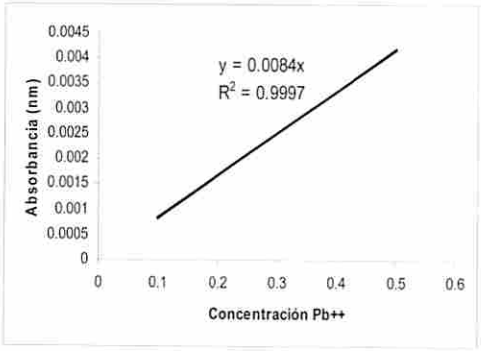


Figura 2. Curva de calibración pH

En la Figura 5, se muestran las concentraciones en ppm de Fe cuantificadas por Absorción atómica, así como su correlación en función al volumen de muestra utilizada para la determinación de acuerdo con lo descrito en la metodología. Resaltándose que la infusión de jamaica, es la que presenta el mayor contenido de hierro, esto debido a que las betalaínas presentes, tienen Fe, que contribuye a color característico y al oscurecimiento. Además de acuerdo con el ANOVA realizado (α=0.05), existe diferencia significativa entre las infusiones y de acuerdo con la prueba de Tuckey's, no existe diferencia la infusión de boldo y té verde con un promedio de 0.91 ppm.

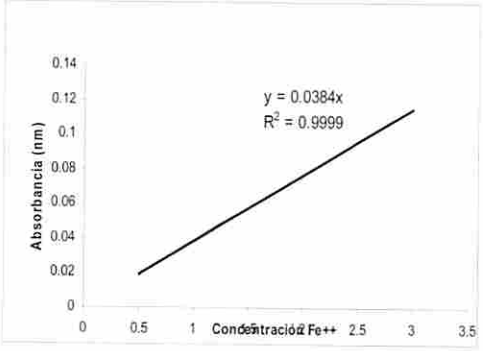


Figura 3. Curva de calibración Fe

Los menores contenidos de Fe, se presenta en las infusiones de árnica, canela-manzana y manzanilla.

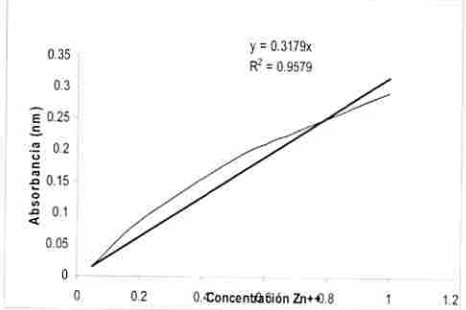


Figura 4. Curva de calibración Zn

En la figura 6, se muestra el contenido de Zn, en las infusiones estudiadas, determinándose que el de jamaica es el que muestra un mayor contenido de este elemento 1.0 ppm, seguida de la infusión de árnica con 0.571 pmm, ambas muy por debajo de la cantidad máxima permitida que es de <5.00 ppm. Además es necesario mencionar que el Zn, tiene actividad fisiológica influyendo en su absorción la interacción con otros elementos como el Fe, Mn y Cu, los niveles máximos de tolerancia al zinc se encuentran alrededor de los 300 ppm (Samudralwar and Garg, 1996; Sheded, Pulford and Hamed, 2006).

El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa entre el contenido de Zn de las nueve infusiones estudiadas, no encontrándose diferencia entre las infusiones verde y abango con un promedio de 0.175 ppm, ni entre las de limón, manzanilla, boldo, canela-manzana y samdhi con un promedio de 0.276 ppm.

En la figura 7, se muestra el contenido de Cobre cuantificado en las infusiones de hierbas analizadas, en este caso la elaborada con té verde tiene el mayor contenido de este elemento con 0.306 ppm, no encontrándose diferencia significativa en el contenido de este metal para samadhi, manzanilla, canela-manzana y boldo con un contenido de cobre de 0.0302 ppm en promedio. Así mismo entre las infusiones de abango y árnica con un promedio de 0.057 ppm, el menor contenido de cobre se presentó en la infusión de limón con un valor de 0.0027 ppm. Cabe además mencionar que en ninguno de los casos se sobrepasa la cantidad permitida por norma que es de <1.00 ppm, siendo hoy dia el cobre un elemento importante en la función enzimática de las plantas, encontrándose asociadas a los polifenoles, responsables del poder antioxidante de las plantas cuando estas son utilizadas como sustancias nutraceúticas.

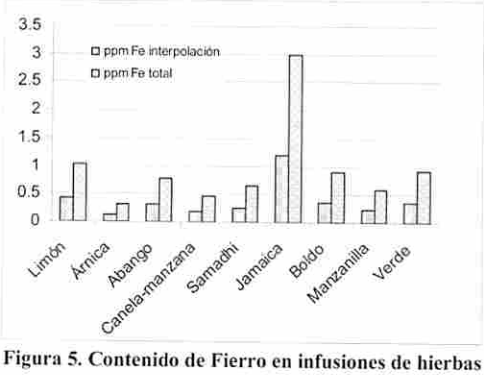


Figura 5. Contenido de Fierro en infusiones de hierbas

En cuanto al contenido de plomo cuantificado y al ser este el elemento que presenta mayor problemática de salud y puesto que la norma establece que su contenido no debe ser mayor a 0.01 ppm, en las determinaciones realizadas a las infusiones se determinó que este no se encuentra por encima de especificaciones.

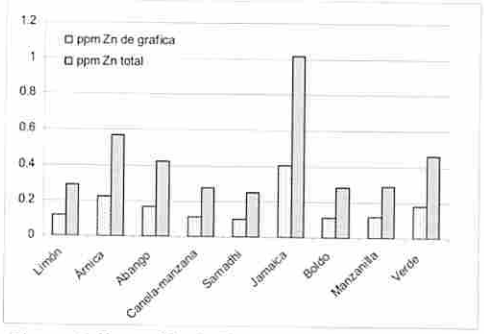


Figura 6. Contenido de Zinc en infusiones de hierbas

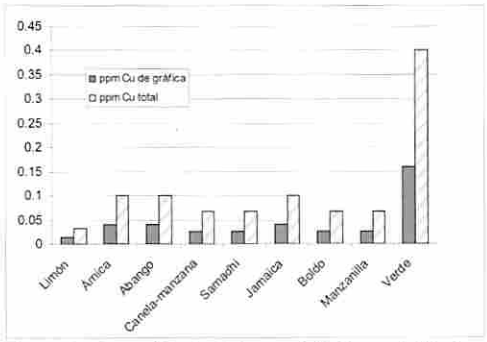


Figura 7. Contenido de Cobre en infusiones de hierbas.

CONCLUSIONES

Las infusiones de jamaica son las que tienen un mayor balance de elementos trazas zinc, cobre y fierro, importantes para el buen funcionamiento fisiológico y que además tienen un papel importante en la acción nutraceútica de muchas de las plantas utilizadas actualmente.

También las infusiones de árnica y abango tienen un alto contenido de zinc, sirviendo estas principalmente como antinflamatorios y relajantes.

Es de todos conocido el efecto que produce tan solo la idea de ingerir una taza de té, que en Latinoamérica es relacionado con las infusiones de ciertas hierbas naturales de las cuales se esperan beneficios especiales; pero uno de los más importantes es el relajamiento en el estrés, y se puede asegurar que además se ingiere uno de los elementos importante en el metabolismo que es el Zn.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC. Official methods of analysis (1990). Association of official analytical chemists 15th edition USA Vol. 1 chapter 9 p 234-273
- Cortes Toro, E.,Das, H.A., Fardy, J.J. Bin, Y.Parr, R.M. (1994). Toxic heavy metals in foodstuffs from 12 different countries. Biol. Trace Elem 43-45, 415-422.
- Golob, T, Dobersek, U., Kump, P. Necemer, M. (2005). Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by reflection X-ray fluorescence sprectroscopy. Food Chemestry 91, 593-600
- Onianwa, P.C., Adetola, L.G., Iwegbue, M.F., Ojo, M.F., Tella, O.O. (1999). Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. Food Chemestry 66, 275-279
- Samudralwar, D.L., Garg, A.N., (1996). Minor and trace elemental determination in the Indian herbal and other medicinal preparation. Biological Trace Element Research 54:113–121.
- Sheded M. G., Pulford I. D., Hamed I. A., (2006) Presence of major and trace elements in seven medicinal plants growing in the South-Eastern Desert, Egypt. Journal of Arid Environments 66:210–217.
- Street, R., Drábek, O., Szákova, J.Mládkova, L. (2007). Total content and speciation of aluminium in tea leaves and tea infusions. Food Chem. 10.016/j.foodchem.2007.03.019.

EXTRUDIDOS DE HARINAS DE MAÍZ DE ALTA CALIDAD PROTEÍNICA (*Zea mays* L.) Y FRIJOL ENDURECIDO (*Phaseolus vulgaris* L.): EVALUACIÓN FÍSICA Y CARACTERIZACIÓN NUTRIMENTAL.

Ruiz-Ruiz, J.[1]; Martínez-Ayala, A.[2], González, R.[3]; Betancur-Ancona, D.[1]; Chel-Guerrero, L.[1]
[1]Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Av. Juárez No. 421, Cd. Industrial. C.P. 1288, Apdo. Postal 26, Suc. Las Fuentes. Mérida, Yucatán, México. E-mail: jor_ruiz74@yahoo.com.mx
[2]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.
[3]Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Palabras clave: Nutrición, extrusión, maíz QPM, frijol endurecido.

RESUMEN

En el presente trabajo se determinaron las mejores condiciones de extrusión de una mezcla 60/40 (p/p) de maíz de alta calidad proteínica (QPM) y frijol endurecido. Se realizó el proceso empleando un modelo 3^2 con tres puntos centrales, en donde los factores y niveles evaluados fueron: temperatura (155, 170 y 185 °C) y contenido de humedad (15.5, 17.5 y 19.5%) con una velocidad de tornillo de 130 rpm. Los productos extrudidos obtenidos a 155 °C y 170 °C con un contenido de humedad del 15.5%, presentaron las mejores características físicas. Comparados con la mezcla de harinas (MH), el proceso no modificó la composición proximal de los productos. La digestibilidad *in vitro* de la proteína fue mayor en los productos, que en la MH. Sin embargo, el cPER disminuyó debido a la pérdida de aminoácidos. La digestibilidad *in vitro* del almidón fue mayor en los productos, que en la MH. El proceso modificó los contenidos de fibra dietética, observándose disminuciones en los productos extrudidos, respecto de la MH.

INTRODUCCIÓN

Los frijoles almacenados en condiciones de alto contenido de humedad (> 75%) y temperatura elevada (30-40 °C), desarrollan el proceso de endurecimiento, el cual causa cambios en la adherencia de las células del gano, inhibiendo la separación de las mismas durante la cocción, lo que repercute en la textura final del grano cocido y limita la disponibilidad de las proteínas al causar su desnaturalización e hidrólisis, reduciendo así su aporte nutrimental (García y col., 1998). La extrusión ha sido empleada para incorporar el grano endurecido a cereales, obteniéndose productos con ventajas en sus características nutrimentales, al incrementarse el aporte proteínico y el balance de aminoácidos de los mismos (González y col., 2002). Durante la extrusión la desnaturalización de la proteína; probablemente incrementa la exposición de sitios susceptibles a la actividad enzimática, mejorando de esta forma la digestibilidad *in vitro*. El incremento de la digestibilidad de la proteína se atribuye también a la eliminación o reducción de factores antinutricios, tales como los inhibidores de tripsina y quimiotripsina. Si bien el incremento en la susceptibilidad enzimática del almidón después del proceso de extrusión es causado principalmente por la gelatinización del mismo; estudios han demostrado que la inactivación de inhibidores de α–amilasa influye también en la digestibilidad (Alonso y col., 2000). La extrusión cambia el contenido, la composición y los efectos fisiológicos de la fibra dietética en varias maneras. 1) el almidón sufre modificaciones y forma fracciones resistentes al ataque enzimático, que actúan *in vivo* como fibra dietética. 2) la degradación de la fibra dietética a fragmentos de menor peso molecular, disminuye su contenido. 3) la degradación macromolecular de la fibra, incrementa la solubilidad y cambia sus efectos fisiológicos (Lue y col., 1991). En México, la dieta se basa en el consumo de un cereal, por lo general maíz y de una leguminosa, principalmente frijol. El maíz tiene un elevado contenido de carbohidratos, mientras que su contenido de proteínas es significativamente menor, con un bajo nivel de lisina y triptófano. Para subsanar estas deficiencias se desarrollaron híbridos, denominados de alta calidad proteínica, en los que los niveles de lisina y triptófano se encuentran en doble proporción respecto del maíz común. Una mezcla de maíz de alta calidad proteínica y de frijol endurecido se plantea como una opción para proveer un producto con una composición balanceada de aminoácidos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones de extrusión más adecuadas para una mezcla de harinas de maíz de alta calidad proteínica y de frijol endurecido, en la obtención de un producto expandido tipo snack con adecuadas características físicas y nutrimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Granos

El maíz de alta calidad proteínica (S00TLWQ-TO) de grano blanco dentado, fue proporcionado por el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, México. El frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Querétaro, se obtuvo en el mercado local de la ciudad de Mérida, Yucatán, México proveniente de la cosecha del 2004.

Métodos

Obtención y preparación de la mezcla de harinas

Los granos se procesaron en un molino de rodillos, reduciendo progresivamente la distancia entre rodillos desde 2 mm hasta 0.25 mm. Las harinas se hicieron pasar a través de tamices de malla 14, 20, 40 y 70 para separar la cáscara y el germen; el material empleado para la extrusión fue el retenido en los tamices 40 y 70. Se determinó el contenido de humedad de las harinas para establecer la cantidad de agua que sería necesario agregar para alcanzar la humedad requerida para el proceso. Se pesaron las cantidades de harina de maíz y frijol necesarias para obtener 500 g de una mezcla en proporción 60/40 (p/p), se mezclaron, se agregó agua hasta alcanzar la humedad requerida y se homogenizó la mezcla durante 10 min; esta operación se efectuó 1 h antes de llevar a cabo la extrusión

Proceso de extrusión y evaluación física de los productos

Se empleó un extrusor monotornillo con sensor de presión y temperatura, dos zonas de calentamiento, tornillo con razón de compresión 4:1 y dado de 3.5 mm de diámetro x 20 mm de largo. Se evaluaron las condiciones del proceso empleando un modelo 3^2 con 3 puntos centrales, los factores y niveles evaluados fueron: temperatura (155, 170 y 185 °C) y contenido de humedad (15.5, 17.5 y 19.5%). La velocidad del tornillo se mantuvo a 130 rpm.

Evaluación física de los productos

La selección de las condiciones de extrusión más adecuadas, se hizo evaluando las características físicas de los productos (índice de expansión, densidad y fuerza máxima de ruptura por compresión) y el consumo específico de energía mecánica.

El índice de expansión (IE) se determinó de acuerdo con Gujska y Khan (1990) dividiendo el diámetro del extrudido entre el diámetro del orificio de la boquilla.

La densidad se determinó con la técnica de Wang y col. (1993), a partir del diámetro (d), la longitud (l) y el peso de cada extrudido (Pm). Usando la expresión: $\text{Densidad} = Pm/\pi\,(d/2)^2\,l$.

La fuerza máxima de ruptura por compresión (FMRC) se

utilizando una máquina universal Instron modelo 4411, comprimiendo a 10 mm/min con una probeta de 8 mm de diámetro y una celda de carga de 500 kgf.
Se calculó el consumo específico de energía mecánica (CEEM) con la metodología de González y col. (2000) midiendo el torque (T) durante el proceso, calculando el caudal de alimentación (Q_A) considerando el caudal de salida (Q_S), la humedad del extrudido (H_M), la humedad del material (H_C) y la velocidad del tornillo durante el proceso. El cálculo se efectuó empleando las siguientes formulas:

$$Q_A \text{ (g totales/min)} = \frac{Q_S (100 - H_M)}{100 - H_C}$$

$$\text{CEEM (J/g)} = \frac{(61.6 \times 10^{-3})(T)(\text{rpm})}{Q_A}$$

Caracterización nutrimental de los productos

Composición química. Se determinó el contenido de humedad, cenizas, proteína, fibra y grasa cruda, de acuerdo a los procedimientos oficiales descritos por la AOAC (1997) (métodos 925.09, 923.03, 954.01, 962.09 y 920.39, respectivamente). Los carbohidratos totales se estimaron por diferencia al 100 % como extracto libre de nitrógeno.

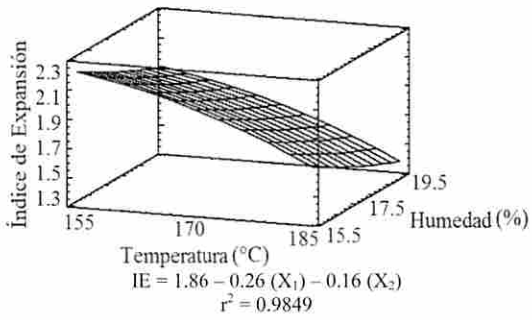
Cambios nutrimentales en proteína. La digestibilidad *in vitro* de la proteína se determinó por el método propuesto por Hsu y col. (1997). El perfil de aminoácidos de los extrudidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, según el procedimiento de Alaiz y col. (1992). El contenido de lisina disponible se realizó de acuerdo con el método de Hurrel y col. (1979). El cPER de las muestras se calculó de acuerdo con el método de la AOAC (1997).

Cambios nutrimentales en almidón. La digestibilidad *in vitro* de almidón se determinó mediante una cinética de hidrólisis de acuerdo al método de Holm y col. (1986). El contenido de almidón total se realizó mediante una adaptación de la técnica de Tovar y col. (1990). El contenido de almidón digerible se cuantificó de acuerdo a una adaptación de la metodología descrita por Holm y col. (1986), mientras que el contenido de almidón resistente se calculó según Tovar y col. (1990), por diferencia entre los contenidos de almidón total (AT) y de almidón disponible (AD):
%AR = %AT – %AD.

Cambios nutrimentales en fibra. Los contenidos de fibra dietética total e insoluble se determinaron por el método enzimático gravimétrico planteado por Prosky y col. (1989). El contenido de fibra dietética soluble (FDS) se calculó por diferencia entre los contenidos de fibra dietética total (FDT) y de fibra dietética insoluble (FDI): %FDS = %FDT – %FDI

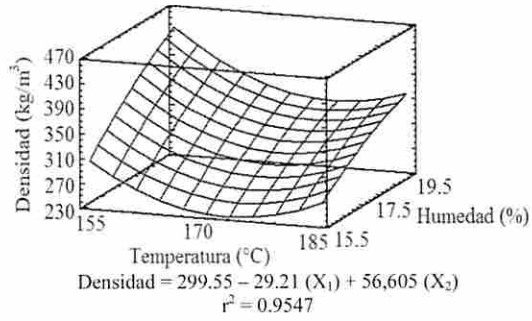
RESULTADOS

Evaluación física de los productos
El análisis multivariado de los resultados de la evaluación física indicó que tanto la temperatura, como la humedad influyeron significativamente ($P<0.05$) en el IE, la densidad y el CEEM de los productos, no así en la FMRC; el efecto de la interacción de ambos factores no fue significativo ($P>0.05$) para las variables.
Los resultados del análisis de regresión para el IE indicaron que la temperatura (X_1) y la humedad (X_2) influyeron significativamente ($P<0.05$), ambos factores tuvieron un efecto negativo en la variable (Figura 1). Al incrementarse la humedad su efecto lubricante provocó una disminución de la fricción dentro del barril y con el aumento de la temperatura la vaporización final fue menos intensa, ambos efectos obstaculizaron la expansión.
Los resultados del análisis de regresión para la densidad indicaron que la temperatura (X_1) y la humedad (X_2) influyeron significativamente ($P<0.05$), la temperatura tuvo efecto negativo y la humedad positivo, en la respuesta de la variable (Figura 2). La densidad esta relacionada con el IE, productos con menor expansión presentan mayor densidad. La proporción de frijol (40%) presente en la mezcla de harinas influyó en esta característica física, ya que los productos extrudidos con elevados contenidos de proteína son más densos y rígidos, debido a que durante la extrusión la fricción y los esfuerzos de corte causan la texturización de las mismas (Casanova, 2003).



$IE = 1.86 - 0.26\,(X_1) - 0.16\,(X_2)$
$r^2 = 0.9849$

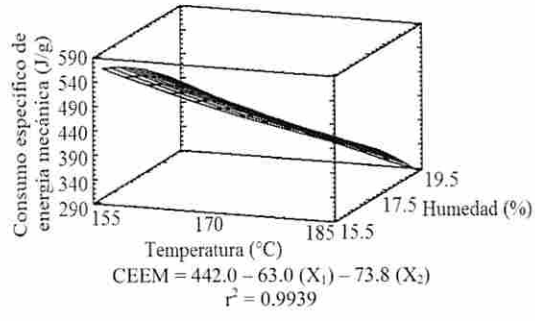
Figura 1. Efecto de la temperatura y la humedad sobre el índice de expansión de los productos extrudidos.



$Densidad = 299.55 - 29.21\,(X_1) + 56{,}605\,(X_2)$
$r^2 = 0.9547$

Figura 2. Efecto de la temperatura y la humedad sobre la densidad de los productos extrudidos.

Los resultados del análisis de regresión para la FMRC indicaron que la temperatura y la humedad no influyeron ($P>0.05$), en la variable.
Los resultados del análisis de regresión para el CEEM indicaron que tanto la temperatura (X_1) como la humedad (X_2) influyeron significativamente ($P<0.05$) en la variable; ambos factores tuvieron un efecto negativo (Figura 3). La elevada temperatura facilitó la transformación del flujo sólido a un fluido viscoelástico y la humedad tuvo un efecto lubricante que disminuyó la fricción generando un menor consumo de energía.



$CEEM = 442.0 - 63.0\,(X_1) - 73.8\,(X_2)$
$r^2 = 0.9939$

Figura 3. Efecto de la temperatura y la humedad sobre el CEEM de los productos extrudidos.

Los extrudidos con mejores características físicas, fueron los obtenidos a 155 °C y 170 °C, con 15.5% de humedad.

Caracterización nutrimental de los productos

Composición Química
La extrusión no afectó la composición proximal de los productos seleccionados, con respecto de la mezcla de harinas (Tabla 1).

Tabla 1. Composición proximal de la mezcla de harinas y de los extrudidos (%b.s.).

Componente	Mezcla Harinas	Extrudido 155 °C	Extrudido 170 °C
Humedad	(11.5 ± 0.01)	(8.9 ± 0.03)	(8.6 ± 0.05)
Proteína cruda	15.7 ± 0.03	15.5 ± 0.04	15.4 ± 0.02
Grasa cruda	2.6 ± 0.02	2.5 ± 0.03	2.3 ± 0.01
Fibra cruda	2.4 ± 0.01	2.6 ± 0.06	2.7 ± 0.04
Cenizas	2.3 ± 0.09	2.3 ± 0.02	2.4 ± 0.06
E.L.N.	77.0 ± 0.01	77.1 ± 0.06	77.2 ± 0.03

Cambios nutrimentales en proteína

La digestibilidad *in vitro* de la proteína (DP) de los extrudidos se incrementó con respecto a la mezcla de harina sin procesar (Tabla 2), dicho incremento pudo ser causado por la desnaturalización de la proteína que tiene lugar durante el tratamiento térmico, lo que incrementa la exposición de sitios susceptibles a la actividad enzimática; la extrusión reduce también la actividad de los inhibidores de tripsina y quimiotripsina, incrementando la digestibilidad.

El contenido de lisina disponible (LD) de los extrudidos disminuyó con respecto al contenido de la mezcla de harinas (Tabla 2), las condiciones de temperatura (155 y 170 °C) y el contenido de humedad (15.5%) que se emplearon durante la extrusión pudieron favorecer las reacciones de Maillard, en este aspecto, la lisina es más susceptible a reducir su disponibilidad biológica debido a que su grupo amino en posición ε la hace más reactiva y tiende a interactuar con los azúcares reductores producidos durante el proceso.

La pérdida de aminoácidos durante el proceso causó un decremento en el cPER de los productos extrudidos (Tabla 2), repercutiendo en el valor nutritivo de la proteína.

Tabla 2. Caracterización nutrimental de la mezcla de harinas y de los extrudidos.

Componente	Mezcla harinas	Extrudido 155 °C	Extrudido 170 °C
DP (%)	76 ± 0.05	80 ± 0.03	79 ± 0.01
LD (g/Kg proteína)	5.2 ± 0.02	4.3 ± 0.07	3.8 ± 0.05
cPER	1.62 ± 0.01	1.55 ± 0.03	0.94 ± 0.04
AT (%)	49.1 ± 0.03	48.8 ± 0.04	48.9 ± 0.09
AD (%)	41.3 ± 0.07	46.2 ± 0.04	46.9 ± 0.01
AR (%)	7.8 ± 0.01	2.6 ± 0.02	2.1 ± 0.09
DA (%)	12 ± 0.02	89 ± 0.05	92 ± 0.08
FDT (%)	27.5 ± 0.05	17.0 ± 0.09	15.0 ± 0.06
FDI (%)	23.1 ± 0.01	13.6 ± 0.02	11.6 ± 0.03
FDS (%)	4.4 ± 0.02	3.5 ± 0.04	3.4 ± 0.02

Cambios nutrimentales en almidón

Los contenidos de almidón total (AT) de la mezcla de harinas y de los extrudidos fueron similares (Tabla 2); durante la extrusión la degradación molecular del almidón esta en función de la temperatura, la humedad y la velocidad del tornillo, ya que el incremento de dichos parámetros puede producir una severa degradación de dicho componente, obteniendo moléculas de menor peso molecular. Sin embargo, las condiciones de extrusión (150 y 170 °C, 15.5% H y 130 rpm), no causaron dicha degradación.

El contenido de almidón disponible (AD) se incremento en los extrudidos (Tabla 2) con respecto a la mezcla de harinas; durante la extrusión, el almidón experimenta la pérdida de su estructura cristalina quedando de esta manera sus moléculas disponibles para la hidrólisis.

En el presente estudio el contenido de almidón resistente (AR) disminuyó, probablemente porque las condiciones del proceso (150 y 170 °C, 15.5% H y 130 rpm) actuaron como un fenómeno de cocción, incrementando la disponibilidad de este componente.

A diferencia de la mezcla de harinas sin procesar, en los extrudidos, el almidón se gelatinizó; quedando sus moléculas disponibles para la hidrólisis presentándose el aumento de la digestibilidad *in vitro* del almidón (DA) (Tabla 2).

Cambios nutrimentales en fibra

Las condiciones del proceso modificaron los contenidos de fibra dietética total (FDT) en los extrudidos, observándose disminuciones (Tabla 2), con respecto al contenido de la mezcla de harinas. La extrusión cambió el contenido total de fibra, al degradarla a fragmentos de peso molecular bajo, causando una considerable solubilización de sus componentes, particularmente polímeros pécticos y celulosa. Cabrejas y col. (1999), indican que la temperatura es la variable que causa dichos cambios, lo que coincide con lo observado en este estudio, donde la mayor disminución del contenido de fibra ocurrió a 170 °C. Los resultados concuerdan con la disminución de la fracción insoluble (FDI) y el aumento de la fracción soluble (FDS).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron productos extrudidos con adecuadas características físicas a partir de una mezcla 60:40 de maíz QPM y harina de frijol endurecido, procesándola con una humedad del 15.5% a temperaturas de 155 y 170 °C. En estas condiciones se obtuvieron los mayores índices de expansión (2.1 y 2.06), las menores densidades (307.61 y 237.17 Kg/m^3) y los mayores valores de CEEM (564 y 502 J/g). Los productos extrudidos tuvieron una buena calidad nutrimental ya que el contenido de proteína se incrementó hasta un valor cercano al 15% debido a la incorporación de la leguminosa. La digestibilidad *in vitro* de la proteína aumentó después de la extrusión, aunque los contenidos de aminoácidos de los extrudidos disminuyeron con respecto al contenido de la mezcla de harinas, lo que repercutió en la disminución de los valores de cPER, sobre todo en el extrudido a 170 °C. El contenido de almidón total de la mezcla de harinas y de los productos extrudidos no se modificó. Tanto el contenido de almidón disponible como la digestibilidad *in vitro* del almidón se incrementaron por efecto de la extrusión. Los contenidos de FDT y FDI disminuyeron en los extrudidos en comparación con la mezcla de harinas, contrariamente la FDS se incrementó. Por lo anterior, el proceso a 15.5% de humedad y 155 °C arrojó un producto de adecuada calidad física y nutrimental usando maíz QPM y harina de leguminosa de nulo valor comercial y bajo valor nutritivo.

REFERENCIAS

- Alaiz, J.; Navarro, L.; Girón J. y Vioque, E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. J. Chrom. 591,181-186.
- Alonso, R.; Aguirre, A.; Marzo, F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. Food Chem. 68, 159-165.
- Asp, N. G. y Björck, I. 1989. Nutritional Properties of Extruded Foods. En: Extrusion Cooking. Ed. Mercier, C., Lindo, P. Harper, J.M. American Association of Cereal Chemists. Inc. St. Paul Minnesota, USA pp. 398-415
- Association of Official Analytical Chemistry. 1997. Official Methods of analysis. Horwitz, W. Washington.
- García, E.; Filisetti, T.; Udaeta, J.; Lajolo, F. 1998. Hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Involvement of phenolic compounds and pectates. J. Agric. Food Chem. 46, 2110-2116.
- González, R.; Torres, R.; Degreef, D. 2002. Extrusión-cocción de cereales. Bol. SBCTA, Campinas. 36(2), 104-115.
- Gujska, E. y Khan K. (1990). Effect of temperature on properties of extrudates from high starch fractions of navy, pinto and garbanzo beans. J. Food Sci. 55(2): 466-469.
- Holm, J.; Björck, I.; Drews, A. y Asp, N.G. 1986. A rapid method for the analysis of starch. Starch/Stärke. 38: 224-226.
- Hsu, H.; Vavak, D.; Satterlee, L., y Miller, G. 1997. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci. 42, 1269-1279.
- Hurrel, R. F.; Lerman, P. and Carpenter, K.J. 1979. Reactive lysine in foodstuffs as measured by rapid dye-binding procedure. J. Food Sci. 1979, 44, 221- 227.
- Lue, S.; Hsieh, F. and Huff, H. E. 1991. Extrusion expansion properties, starch gelatinization, and dietary fiber content. Cereal Chem. 68(3): 227-234.
- Park, J.; Rhee, K. S. y Rhee, K. C. 1993. Single-screw extrusion of defatted soy flour, corn starch and raw beef blends. J. Food Sci. 58(1), 9-19.
- Prosky, L. 1989. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: Interlaboratory study. AOAC. 71: 1017-1023.
- Tovar, J.; Björck, I. and Asp, N. G. 1990. Starch content and a-amylolysis rate in precooked legumes flours. J. Agric. Food Chem. 38(9), 1818-1823.
- Wang, W.; Klopfenstein, C. F. y Ponte, J. 1993. Effects of twin-screw extrusion on the physical properties of dietary fiber and other components of whole wheat bran and on the baking quality of the wheat bran. Cereal Chem. 70(6), 707-711.

POTENCIAL NUTRICIONAL DE TRES ACCESIONES DE FRIJOL ZARAGOZA (*Phaseolus lunatus*) Y ESTIMACION DE LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA "*in vitro*".

Marlene Duran Lengua, Piedad Montero Castillo, Carmiña Vargas Zapata, Rusbel Coneo Rodríguez Yesid Marrugo Ligardo, Edilbert Torregroza Fuentes. Grupo de Investigación PROAL- e mail proalunicartagena@gmail.com. Programa Ingeniería de Alimentos – Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias – Colombia.

Palabras claves: Phaseolus lunatus, accesiones, anti-nutricionales, digestibilidad proteíca in vitro, zaragoza

RESUMEN

Mediante el presente estudio se realizó la caracterización del contenido de algunos inhibidores de proteasas, ácido cianhidrico y el análisis proximal de la harina integral de tres accesiones de frijol zaragoza (*Phaseolus lunatus*) provenientes de la municipalidad de Turbaco (Bolívar – Colombia). De igual forma se estimo la digestibilidad proteíca "*in vitro*" . Las accesiones estudiadas fuerón: roja, blanca y moteada. Los resultados de la composición fisico química muestran algunas diferencias significativas entre los valores enconcontrados de: proteína, fibra bruta, ceniza y humedad. No se evidencio presencia de inhibidores de tripsina en las muestras analizadas. La digestibilidad in vitro de la proteína muestra diferencias importantes entre las accesiones: 68,71 accesión moteada y 70,70 la accesión roja, estos valores fueron bajos si se compara con el patrón de caseína (89,71) pero mucho mayores que otras leguminosas como la *Canavalia ensiformis* (57,52). El contenido de acido cianhídrico se encontró por debajo de las dosis peligrosas para el hombre.

ABSTRACT

The present paper planned in orden to determine the content of protease inhibitors (trypsin inhibitor activity), cianide and proximal analysis of the whole flour in the tree accessions of Phaseolus lunatus, collected in Turbaco – Bolívar (Colombia). Addicionally, the *in vitro* protein digestibility and the presence of antinutritional factor of these accessions was determined . The accessions studied were: red, white and speckle. The results of chemical composition, showed significance between them found the following average a value: Protein , fiber, ash, and moisture. The *in vitro* protein digestibility of the raw meals showed significance differences between the accessions, it changed between 68,17 (speckle accessions) and 70,70(red accessions) , these values were lower than the casein (89.71) but higher than other legumes *Canavalia ensiformis* (57,52). Cyanide levels showed light proportion.

Key word: *Phaseolus lunatus*, accessions, anti-nutrients, *in vitro* protein digestibility, zaragoza

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas en general son consideradas una importante fuente de proteína por su alto contenido proteico, superior al 20%, además constituyen en la Región Caribe de Colombia uno de los grupos alimenticios de mayor consumo en forma directa. En ese mismo sentido, se ha indicado que las leguminosas tropicales de grano constituyen una de las alternativas de mayor importancia para resolver el problema de la dependencia alimentaria (León, et al ., 1992).

De hecho, se reporta que el *Phaseolus lunatus* es una leguminosa de grano que ha estado ligada a la cultura y a las tradiciones indígenas y mestizas de esta región de Colombia (Ballesteros *et al*, 1999). De otra parte, el conocimiento sobre las características nutricionales de la zaragoza (*Phaseolus lunatus*) es realmente poco en nuestra región, muy a pesar de su intenso consumo en el Caribe Colombiano.

De igual manera, es importante tener presente que la calidad proteíca de un alimento es un factor determinante en su valoración nutricional ya que esa calidad establece los aportes de nitrógeno y aminoácidos esenciales en un organismo, siendo la estimación del coeficiente de digestibilidad un elemento importante para resolver ese interrogante.

También es de gran interés establecer los posibles factores antinutricionales en los alimentos de consumo cotidiano, como es el caso de la zaragoza (*Phaseolus lunatus*), dado que estos factores podrían incidir negativamente en la nutrición y por tanto en la salud misma de los seres humanos, esto último cobra mayor importancia si se tiene en cuenta la necesidad de contar con alimentos sanos para una población en aumento que urge seguridad alimentaria.

El presente estudio busca determinar las características físicas y químicas de la harina integral en tres variedades de *Phaseolus lunatus*: blanca, roja y moteada; que se consumen en el Caribe Colombiano; así como evaluar la calidad proteíca mediante la estimación de la digestibilidad "*in vitro*" en dichas variedades de zaragoza. De igual manera, el trabajo pretende determinar y cuantificar algunos posibles factores antinutricionales en las variedades de *Phaseolus lunatus* objeto de estudio, tales como: inhibidores de tripsina y ácido cianhídrico de fuerte impacto en el potencial nutricional dada los efectos tóxicos y antifisiológicos a nivel nutricional que pueden ejercer en los consumidores

Materiales y Métodos

El material vegetal utilizado fue Zaragoza (*Phaseolus lunatus*) , proveniente de la zona rural del Municipio de Turbaco (Bolívar - Colombia), en la cosecha de los meses de Febrero a Marzo, siendo las siguientes accesiones:

Variedad roja
Variedad blanca
Variedad moteada

La obtención de Harina Integral se efectuara mediante proceso de molienda de granos.

Determinación fisicoquímica de las accesiones de *Phaseolus lunatus* estudiados se efectuaron según los protocolos experimentales detallados según la AOAC 1990

El proceso para la determinación del coeficiente de digestibilidad se desarrolló según el protocolo de Hsu, H.W. *et al*, 1977.

El proceso de determinación cuantitativa de los niveles de ácido cianhídrico HCN (cianida) fue realizado según el método AACC 1983.

La determinación de la actividad antitripsina se efectuó de acuerdo con Kakade *et al* (1969)

Análisis estadístico de datos: Los datos obtenidos fueron expresados como la media más o menos la desviación estandar . Todos los datos fueron evaluados por homogeneidad de varianza usando el test de Barlett y normalidad empleando Kolmogorov-Smirnov (Walpole *et al.*, 2001. El software empleado para el análisis estadistico fue INSTAT 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se muestra las características físicas de los granos. La accesión blanca y la accesión moteada presentan un peso de 100 semillas mucho mayor que la accesión roja lo cual sugiere para estas accesiones eventuales ventajas comerciales en cuanto a su industrialización y mercadeo.

Tabla 1: Características morfológicas de las semillas de fríjol zaragoza (*Phaseolus lunatus*) estudiadas.

ACCESIÓN *P. Lunatus*	Color de grano	Peso de 100 semillas (g) *
Accesión Blanca	Blanco	43,58 ± 0.48
Accesión Roja	Rojo claro	39,45 ± 0.10
Accesión Moteada	Blancos con marrón	47,42 ± 0.41

*Se reporta valor promedio de triplicado

Los resultados obtenidos a nivel de composición proximal de las diferentes accesiones de Zaragoza se muestran en la Tabla 2

Tabla 2: Determinación física y composición química proximal de la harina integral de Zaragoza (*Phaseolus lunatus*) en las tres accesiónes estudiadas.

Parámetros Accesión	*Blanca*	*Moteada*	*Roja*
*Fibra (%)**	3,72 ± 0,39	3,03 ± 0,14	4,09 ± 0,38
*Cenizas (%)**	3,42 ± 0,05	3,76 ± 0,07	3,74 ± 0,04
*Proteínas (%)**	21,28 ± 0,36	20,24 ± 0,35	19,60 ± 0,18
*Humedad (%)**	8,97 ± 0,39	8,58 ± 0,33	8,47 ± 0,20
*Grasa (%)**	0,87 ± 0,20	0,95 ± 0,07	0,96 ± 0,08
*Carbohidratos (%)***	61.74	63.44	63,14

*Pruebas realizadas por triplicado (se reporta promedio)
**Determinación obtenida por diferencia

Ahora bien, si tenemos en cuenta las accesiones estudiadas entre si podemos señalar que el contenido graso es relativamente similar para las accesiones roja y moteada (0,96% y 0,95% respectivamente) y algo menor, pero no significativo, para la accesión blanca (0,87%).

Los contenidos de Proteína bruta encontrados son similares a los del Garbanzo (19,6 %) y *Phaseolus vulgaris* (20,4%), pero distan mucho a los de la soja *Glicine max* (34%). Vemos entonces que para el caso de las accesiones de *Phaseolus lunatus* estudiadas, el contenido proteico es aceptable desde el punto de vista nutricional, tratándose que son proteínas de origen vegetal las cuales podrían no solo tener un papel muy importante desde el punto de vista nutricional sino también funcional en los consumidores.

Ahora bien, si tenemos en cuenta las accesiones estudiadas entre sí podríamos señalar que el contenido graso es más similar para las accesiónes roja y moteada (0,96% y 0,95% respectivamente) y algo menor, pero de cualquier forma no significativo, para la accesión blanca (0,87%). En general el porcentaje de grasa para las accesiones objeto de estudio es bajo, lo cual es coincidente para arverja (0,8%), lenteja (0,6%) y fríjol rojo (1,2%) siendo superados ampliamente por el contenido reportado para soja (16,1%).

Los resultados obtenidos en cuanto a fibra cruda nos muestran valores similares a los reportados para garbanzo (3,4 %) y lenteja (4,4%) , mientras que para soja se informa 7,3% (ICBF, 1996). Siendo el valor más alto para el caso de nuestro estudio, el reportado para la *P. lunatus* accesión roja (4,09 %).

Esto indica que la accesión roja ofrece alguna ventaja funcional en cuanto a fibra dado que favorecería un mejor funcionamiento en cuanto al transito del contenido intestinal. Considerando la accesión roja como la más funcional con respecto a las otras accesiones.

El contenido de humedad de las accesiones de *Phaselus lunatus* es bastante similar; la P: 0,54 lo cual no es significativo ya que la establecida fue P 0,05. Los porcentajes de cenizas de las accesiones blanca moteada y roja arrojaron una P de 0,003 lo que indica una significancia muy alta con respecto a la establecida P 0,05. La accesión que presentó el menor contenido de cenizas fue la accesión blanca.

En la Tabla 3 se muestran los valores de digestibilidad proteica de las diferentes zaragozas estudiadas junto con el de la proteína patrón. Esta última no solo sirve para evaluar la eficiencia de las enzimas si no también como un factor de corrección para el laboratorio, por lo cual se incluye en dicha tabla la digestibilidad corregida. De igual manera, se presenta en la Tabla 3 la proteína bruta de cada accesión y el porcentaje de proteína disponible que se deriva de la digestibilidad encontrada.

Tabla 3: Digestibilidad "*in vitro*" de la proteína presente en las accesiones de *Phaseolus lunatus* estudiadas

Muestra	Coeficiente de Digestibilidad	Digestibilidad Corregida	Proteína Bruta (%)	Proteína Disponible (%)
Accesión Blanca	70,34 ±0,51	70,56	21,28 ± 0,36	15,01
Accesión Moteada	68,17 ±0,67	68,39	20,24 ± 0,35	13,84
Accesión Roja	70,70 ±0,01	70,92	19,60 ± 0,18	13,90
Casilan sustancia patrón	89,71	90,00	-	-

*Pruebas realizadas por triplicado (se reporta promedio)

De las Zaragoza estudiadas la accesión roja y la accesión blanca presentan los mayores valores de digestibilidad (70,70 y 70,34 respectivamente), mientras que el porcentaje de proteína bruta y proteína disponible se presentan con valores mucho más altos en la accesión blanca (15,01% de proteína disponible). Los valores de proteína disponibles expresan el contenido de proteína bruta corregido por digestibilidad (Ver tabla 3).

La accesión de Zaragoza que presenta el menor valor de digestibilidad fue la accesión moteada (68,39), así como también la de menor proteína disponible (13,84%) lo cual contrasta con su apreciable contenido de Proteína bruta (20,24).

La tabla 3 nos muestra comparativamente los coeficientes de digestibilidad de las accesiones blanca, moteada y roja de la Zaragoza *Phaseolus lunatus* indicando un porcentaje general alrededor del 70 % sin embargo la accesión que presentó el menor porcentaje del coeficiente de digestibilidad fue la accesión moteada y la de mayor coeficiente resultó ser la accesión blanca. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa, sugiriendo con esto que las accesiones estudiadas son de una aceptabilidad muy buena en cuanto a la facilidad con que los nutrientes pueden ser aprovechados por los consumidores.

Los resultados encontrados, en cuanto a digestibilidad, concuerdan con los reportados por Laurena *et al*, 1991, quienes al realizar un estudio de valoración nutritiva y digestibilidad *in Vitro* de leguminosas nativas en Filipinas reportaron una digestibilidad proteica *in vitro* para *Phaseolus lunatus* entre el rango de 70-71. En ese mismo sentido, la digestibilidad proteica *in vitro* reportada para las accesiones roja y blanca de *P. lunatus* tienen niveles similares a los reportados en la leguminosa *Dolichos biflorus* (71) por parte de Rajyalakshmi and Geervani, 1990 y en *Glycine max* (71,10) reportado por Gross 1982.

De otra parte, los resultados encontrados para todas las accesiones de *Phaseolus lunatus* estudiadas superan a los reportados para la leguminosa *Canavalia ensiformis* la cual se estimó en 57,52 +/- 1,01 datos obtenidos por Zamora N, *2003* , en un estudio sobre recursos alimenticios alternativos con gran potencial para la alimentación animal y humana. Este último aspecto abre posibilidades para considerar el *Phaseolus lunatus*, por lo menos en cuanto a las accesiones estudiadas, como recurso alimenticio alternativo en nuestra región.

La Tabla 4 nos muestra el contenido de HCN para las accesiones de Zaragoza en p.p.m. Como ya se ha referenciado uno de los problemas del Fríjol Zaragoza, en general, lo constituye su contenido de cianuro, por causa del glicérido phaseolunatina, el cual entre otras cosas le da su sabor característico.

Tabla 4: Determinación del contenido de HCN en harina integral de la zaragoza (*Phaseolus lunatus*)

ACCESIÓN *P. Lunatus*	Contenido de HCN (p.p.m)
Accesión Blanca	3,6±3,5
Accesión Roja	14,4±3,6
Accesión Moteada	28,8±3,6

*Pruebas realizadas por triplicado (se reporta promedio)

Los resultados encontrados en el presente estudio se enmarcan dentro del rango reportado por Ruiz Camacho, 1975 y Torres *et al,* 1999 según los cuales, en general, los reportes para fríjol carauta ó Zaragoza se sitúan entre 25 a 55 ppm (partes por millón) expresado en ácido cianhídrico (HCN), muy por debajo de las dosis peligrosas para el hombre, en la que generalmente se acepta una concentración límite de 100 a 200 ppm de HCN. Como se puede apreciar el rango encontrado en los ensayos efectuados va de 3,6 ppm en la accesión blanca a 28,8 ppm en la accesión moteada (Ver Tabla 4).

Algunos estudios también reportan, que por lo general, las semillas coloreadas de *Phaseolus lunatus* tienen un alto contenido de glucósidos (Torres et Ballesteros, 1999), para nuestro caso ello coincide y eventualmente se correlaciona con lo hallado: 3,6 ppm para la accesión blanca y mayores valores para la roja y moteada (14,4 ppm y 28,8 ppm respectivamente).

Tabla 5. Porcentajes de actividad de tripsina de las accesiones de Zaragoza (*Phaseolus lunatus*)

ACCESIÓNES DE ZARAGOZA (*Phaselus lunatus*)	Porcentaje de actividad de tripsina
Blanca	101,7±
Moteada	101,9±
Roja	99,5±
Patrón	100

La Tabla 5 nos muestra la relación de porcentajes de actividad de tripsina para las accesiones de Zaragoza evaluadas en el estudio, comparando dicho porcentaje con el patrón de 100 % de actividad enzimática.

Teniendo en cuenta los diferentes porcentajes de actividad de tripsina de las accesiones de Zaragoza *Phaseolus lunatus,* al compararse con un patrón cuya actividad corresponde al 100%, podríamos concluir que las accesiónes estudiadas no contienen inhibidores de tripsina. En ese mismo orden de ideas, podríamos indicar que al evaluar la actividad de la tripsina se muestra una nula inhibición de la actividad proteolítica de la misma. Este resultado nos sugiere proyectar estudios posteriores con inhibidores enzimáticos del tipo alfa-quimotripsina, quimotripsina o plasmina que también pueden incidir como factores antinutricionales en leguminosas del género *Phaseolus*.

CONCLUSIONES

La accesión blanca de *Phaseolus lunatus* muestra una mejor correlación entre el porcentaje de proteína (21,28%) y el coeficiente de digestibilidad (70,34); en comparación con las otras accesiones estudiadas.

Las accesiones roja y blanca presentaron los mayores valores de digestibilidad proteíca por estimación "in Vitro" ; 70,70 y 70,34 respectivamente.

No se evidencio presencia del inhibidor enzimático tripsina en las tres accesiones estudiadas.

El contenido de HCN para las accesiones de Zaragoza expresado en p.p.m. se encontró muy por debajo de las dosis peligrosas para el hombre, siendo el valor promedio más alto de 28,8 ppm para el caso de la accesión moteada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo económico dado por la Universidad de Cartagena a través del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas CICTE para el desarrollo del presente proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

American Association of Cereal Chemists (1983): *Approvea Methods of the AACC.* St Paul, MN: AACC.

A.O.A.C. 1990. Oficial methods of análisis. 15 Edition, Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.c. , USA.

GEORGINA GÓMEZ; SILVIA QUESADA CLARA I. NANNE. Efecto de factoresantinutricionales en el pejibaye (Bactris gasipaes) sobre el metabolismo de ratas jóvenes. Agronomía Costarricense 22(2): 191-198. 1998

GROSS, R. 1982. Composition and protein quality of winged bean (*Phaseolus tetragonolobus). Qual. Plant* – Plant Foods for Human Nutrition. 32: 117-124.

KAKADE, D, SOUSA, M, MORHY, L . 1995. Purification, characterization, sequence determination and mass spectrometric analysis of a trypsin inhibitor from seeds of the brazilian tree Dipteryx alata (Leguminosae) Journal of Protein Chemistry 14: 685- 693.

HARTMAN, A. 1995. Der nachweis von Trypsin und Cathepsin D-Inhibitoren infr die versuchstieremahrung bestimmten einzel und alleinfuttermittein. Tesis Doctorado en medicina veterinaria, Alemania Freien Universitt Berlin. P. XX.

HSU, H. W., VAVAK, D. L., SATTERLEE, L. D. & MILLER, A. (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci. 42: 1269-1273.

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar –ICBF, Tabla de composición de Alimentos Colombianos. ICBF 7° Edición, 1996.

LAURENA AC, RODRIGUEZ F, SABINO N, ZAMORA A , MENDOZA EM. Amino acid composition, relative nutritive value and *in vitro* protein digestibility of several Philippine indigenous legumes. Plant Foods for Human Nutrition. 41: 59-68. 1991.

LEON R., ANGULO I., JARAMILLO F., REQUENA F., CALABRESE H., FONAIAP- CENIAP. Zootecnia Tropical Vol XI N°2. 1992.

LIENER, IE. 1973. Toxic factors associated with legume proteins. Indian Journal of Nutrition and Dietetics. 10: 303-322.

OYENUGA, V.A. 1968. Nigeria's foods ad foodstuffs. Ibadan, University Press

RAJYALAKSHMI, P , GEERVANI, P 1990. Studies on tribal food of South India: Effect of processing methods on vitamin and *in Vitro* protein digestibility (IVPD) of cereal/ millets and legumes. Journal of Food Science and Technology. 27: 260 – 263.

RAMIREZ A, ORTIZ L. 1997. Características químicas y nutricionales del grano de cinco (5) genotipos de *Canavalia ensiformis*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Volumen 47 N° 3.

RUIZ CAMACHO, RUBEN . El cultivo del fríjol. Temas de Agropecuaria Editores, 1975.

TORRES, A; BALLESTEROS P., BARRERA, M. 1999 Reincorporación del frijol carauta (*Phaseolus lunatus* L.) la agricultura tradicional en el resguardo indígena de San Andrés de Sotavento (Córdoba, Colombia).

WALPOLE, R.E.; MYERS, R.H. y MYERS, S.L. (1999): "Probabilidad y Estadística para Ingenieros". Prentice Hall. 6ª ed.

ZAMORA N. 2003. Efecto de la extracción sobre la actividad de factores antinutricionales y digestibilidad *in Vitro* de proteínas y almidón en harinas de *Canavalia*

INCORPORACIÓN DE PULIDO DE ARROZ COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL DESARROLLO DE GALLETAS

SAMALVIDES, HELBERTH[1], ESTÉVEZ, ANA MARIA[1], FIGUEROLA, FERNANDO[2] MASSON, LILIA[3] Y NÚÑEZ, HUGO[1]

[1]Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, Santiago, Chile. aestevez@uchile.cl

[2]Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.

[3] Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Palabras Claves: Procesamiento de subproductos, afrechillo de arroz, tocoferoles, tocotrienoles, fibra dietética.

RESUMEN

El pulido de arroz, subproducto de la molienda de arroz, presenta importantes contenidos de compuestos bioactivos; sin embargo, muestra inestabilidad frente a la rancidez. Esta investigación tuvo como objetivos, caracterizar algunos de los compuestos bioactivos del pulido de arroz, y evaluar su reemplazo, entre 10 y 25% de la harina de trigo, en la elaboración de galletas. Se utilizó pulido de arroz estabilizado por microondas (3 minutos a 21% de humedad). Al pulido sin estabilizar (PSE) y al pulido estabilizado (PE) se les determinó contenido de, fibra dietética, tocoles, lisina disponible y actividad de agua (Aw). Para la elaboración de galletas se prepararon 10 tratamientos (diseño de mezclas), utilizando como ingredientes variables: PE, harina de trigo y miel de abeja. En las galletas se determinó: dimensiones, color, Aw y rendimiento; composición proximal, fibra dietética, tocoles y lisina disponible; calidad y aceptabilidad sensorial (panel entrenado de 12 personas; y 12 entrenadas y 12 sin entrenar, respectivamente). En el PSE y en el PE, el contenido de fibra dietética total fue 35,8% y la Aw de 0,69. Los tocoles totales fluctuaron entre 951 y 1041 mg/kg de aceite (PSE y PE, respectivamente) En las galletas, el tratamiento T10 (25% PE de la harina de trigo) tuvo, fibra dietética total: 13,0%; tocoferoles totales: 319 mg/kg de aceite; tocotrienoles totales: 321 mg/kg de aceite; lisina disponible: 0,54 g/100g ms. A mayor nivel de PE, mejora la apariencia, aumenta la luminosidad, disminuye la dureza y la crocancia e incrementa las partículas residuales. Todos los tratamientos cayeron dentro de la zona de aceptación, siendo los tratamientos T1, T6 y T10 (11%, 20% y 25% PE), los de mayor aceptabilidad. Se concluye que la sustitución de harina de trigo por PE hasta 25% de la harina de trigo total, permite obtener galletas con buenos atributos sensoriales, altos contenidos de FDT y de tocoles.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, últimamente, las personas están tomando conciencia que muchas enfermedades (cardiovasculares, diabetes, constipación y algunos de tipos de cáncer), pueden prevenirse con el consumo de alimentos adecuados (Recio, 2004). Debido a ello, existe una creciente tendencia a desarrollar alimentes diseñados o funcionales, que sean de bajo aporte calórico, bajos en grasas y colesterol, además de contener diferentes nutrimentos bioactivos (vitaminas, fibra dietética, antioxidantes y aminoácidos esenciales). Para desarrollar este tipo de productos, la industria de alimentos está centrando esfuerzos en la búsqueda de materias primas, que contengan compuestos biológicamente activos y que además sean de bajo costo. El pulido de arroz es un subproducto subutilizado de la molienda del arroz. Está formado por la cáscara, parte del endospermo y el embrión que se separan durante su pulido y descascarado (Juliano, 1994). El pulido de arroz está compuesto principalmente por fibra dietética, lípidos, vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), esteroles y proteínas, todos éstos considerados como compuestos beneficiosos. El total de fibra dietética puede variar entre 20-27%, con menos de 2% de fibra dietética soluble; el contenido de proteínas se encuentra entre 12 y 16%, las cuales tienen una alta tasa de digestibilidad con un alto valor nutricional (Kahlon y Smith, 2004). Es una muy buena fuente de vitamina E, conteniendo más de 300 mg/kg. La mayor parte de los componentes de vitamina E en el pulido de arroz son, α-tocoferol, α-tocotrienol, γ-tocoferol y γ-tocotrienol. Los tocoferoles y los tocotrienoles son uno de los más eficientes antioxidantes para romper la cadena de formación de radicales libres (Zhimin *et al.*, 2001). Además, el pulido de arroz contiene entre 22-29% de aceite con ácidos grasos monoinsaturados, poliinsaturados y saturados (oleico, linoleico y palmítico, respectivamente) (Kahlon y Smith, 2004). En el proceso de molienda, las células se dañan y los lípidos presentes en el pulido entran en contacto con enzimas altamente reactivas que inician su deterioro hidrolítico y oxidativo (Champagne y Horn, 1992), por lo que su vida útil es corta (Barnes y Gaillard, 1991; Ramezanzadeh *et al.*, 2000). Uno de los métodos de estabilización más estudiados últimamente es la inactivación de las enzimas precursoras de la rancidez (lipasa, lipoxigenasa) por microondas (Ramezanzadeh *et al.*, 1999a, b).

Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar algunos de los compuestos bioactivos del pulido de arroz, y evaluar su reemplazo, entre 10 y 25% de la harina de trigo, en la elaboración de galletas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó con pulido de arroz, con menos de 24 horas de obtención, la variedad Diamante, proveniente de la VII Región, Chile. La estabilización se efectuó mediante la aplicación de microondas, siguiendo el método propuesto por Ramezanzadeh *et al.* (1999). Para corroborar la adecuada inactivación de la lipasa se midió la producción de ácidos grasos libres e índice de peróxidos, en la semana 1 (tiempo "0") y las semana 2 y 4 (tiempo 1 y 2 respectivamente) por los métodos propuestos por la AOCS (1993). En el pulido sin estabilizar (PSE) y al pulido estabilizado (PE) se determinó contenido de fibra dietética (Lee *et al.*, 1992); composición proximal (AOAC, 1995); tocoferoles y tocotrienoles por HPLC utilizando como solvente isopropanol en hexano al 0,5% (AOAC, 1995); lisina disponible (Hurrell *et al.*, 1979); color (con colorímetro de reflectancia Minolta CR-200b; actividad de agua (AW – WERT messer. Marca Luft, modelo 5803); e índice de peróxidos (AOCS, 1993).

Se elaboraron galletas usando una formulación base (tratamiento control), según la AACC (1989), modificada por Valenzuela (1997), incluyendo la utilización de miel de abeja en reemplazo de una parte de azúcar. Se realizó un Diseño de Mezclas Simplex Lattice Cúbico Especial, en el que se utilizó una matriz fija de ingredientes, la cual representó un 60% del total; y una matriz variable con una participación de 40%, compuesta por tres ingredientes (miel de abejas entre 25,0 y 31,0%; harina de trigo entre 4,0 y 10,0%; y, PE entre 5, 0 y 11,0%). En las galletas de determinó: peso, diámetro y altura de 10 unidades; color; actividad de agua; composición proximal; tocoferoles y tocotrienoles; fibra dietética; y lisina disponible. Además, 24 horas después de la elaboración, se evaluó aceptabilidad y calidad sensorial empleando, el método de la Escala Hedónica, con un panel compuesto por 24 evaluadores, 12 entrenados y 12 no entrenados; y, el método Descriptivo – Cuantitativo, con un panel de 12 evaluadores, entrenados, respectivamente (pauta no estructurada de 0 a 15 cm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de ácidos grasos libres y de peróxidos se mantuvieron sin variación en PE después de 15 días de almacenamiento, en tanto que en PSE aumentaron desde 7,4% a 10,0%; y desde 3,5 hasta 8,2 meq peróxido /kg de aceite, respectivamente. Estos valores indican que el proceso de inactivación enzimática fue efectivo.

La composición química no sufrió variaciones con la inactivación por microondas (Tabla 1). Es importante destacar el alto contenido de proteínas, lípidos y fibra dietética que presenta el pulido, valores que están de acuerdo con informado por Kahlon y Smith (2004)

Tabla 1 Composición química del pulido de arroz

Compuesto	PE (%)	PSE (%)
Humedad	9,4 ± 0,1a	8,4 ±0,2b
------Expresado en 100% base seca-----		
Proteína [3]	13,0 ±0,4a	13,0 ± 0,8a
Lípidos	19,8 ± 0,3a	20,4 ± 0,5a
Cenizas	8,9 ± 0,2a	8,7 ± 0,4a
Fibra dietética total	35,8 ± 1,1a	35,9 ± 1,3a
Fibra dietética insoluble	33,2 ± 1,3a	33,3 ± 0,9a
Fibra dietética soluble	2,6 ± 0,1a	2,6 ± 0,1a
FDI/FDS	12,8:1a	12,8:1a
Extracto No Nitrogenado (ENN)	13,1 ± 0,7a	13,6 ± 0,7a
Valor calórico (kcal/100g)	282 ± 1,3a	290 ± 2, a

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

La estabilización por microondas produjo una disminución de 14% en el contenido de lisina disponible (desde 0,84 a 0,72 g/100 g ms), que es un aminoácido muy susceptible al daño durante el tratamiento térmico y a participar en reacciones de pardeamiento no enzimático.

En relación al contenido de tocoles, los valores obtenidos permiten considerar al pulido de arroz como una excelente fuente de estos componentes, los cuales estuvieron dentro de los rangos encontrados por Xu *et al.* (2001); no hubo un efecto importante del tratamiento por microondas (Tabla 2). Los menores valores obtenidos en α- Tocoferol, α- Tocotrienol y β-Tocotrienol en PSE, pudieron deberse al efecto de oxidación enzimática de las lipoxigenasas presentes en éste.

Tabla 2 Concentración de tocoferoles y tocotrienoles presentes en el aceite de PSE Y PE y

Tocoferoles (mg/kg)		
Compuesto	Tratamiento	
	PSE	PE
α- Tocoferol	267 ± 6,2 a	297 ± 1,2 b
β- Tocoferol	13 ± 1,5 a	12 ± 0,4 a
γ- Tocoferol	3 ± 0,2 a	4 ± 0,1 a
δ- Tocoferol	80 ± 4,0 a	91 ± 3,8 a
Tocoferoles Totales	363	404
Tocotrienoles (mg/kg)		
Compuesto	Tratamiento	
	PSE	PE
α- Tocotrienol	226 ± 5,4 a	255 ± 2,1 b
β- Tocotrienol	23 ± 1,0 a	30 ± 0,1 b
γ- Tocotrienol	308 ± 7,2 a	319 ± 6,7 a
δ- Tocotrienol	31 ± 1,5 a	33 ± 1,2 a
Tocotrienoles Totales	588	637
Tocoles Totales	951	1041

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

El color del pulido es tostado claro, con una alta luminosidad y participación de amarillo y mediana participación de rojo (Tabla 3). En el caso del PE presentó mayor luminosidad (mayor proporción del parámetro L*) y una menor tendencia al rojo (a*); esto indica que el PE tuvo una coloración mas oscura y rojiza producto del tratamiento por microondas, lo que concuerda con la disminución de lisina disponible encontrada.

Tabla 3 Parámetros de color de pulido de arroz

Parámetro	PSE (%)	PE (%)
L*	66,2 ± 0,4 a	62,8 ± 0,4 b
a*	4,0 ± 0,2	4,4 ± 0,1 b
b*	19,9 ± 0,4 a	20,5 ± 0,5 a
H*	78,6 ± 0,3 a	77,9 ± 0,2 b
C*	20,3 ± 0,4 a	20,9 ± 0,5 b

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

La actividad de agua encontrada en el Pulido de arroz fue de 0,69, sin diferencias entre PE y PSE. Si bien este valor es seguro desde el punto de vista microbiológico, Cheftel y Cheftel (1981), mencionan que valores entre 0,5 y 0,75 propician reacciones de oxidación de lípidos lo que se pudo observar en PSE.

En las galletas elaboradas se observó que aquéllas que tienen una mayor proporción de miel de abeja en su formulación, presentaron una menor expansión del radio, respecto a las que no tienen niveles altos ya que las azúcares provocan un incremento en la densidad de la masa y una disminución del radio de expansión de la galleta (Tabla 4). Además, los tratamientos con mayor contenido de PE (T10, T9, T6) tuvieron menor peso en relación a aquellos que presentaron menor sustitución y mayor adición de miel (T1, T2, T4 y T7). A medida que se va incrementando el porcentaje de sustitución, las galletas que contienen la mayor cantidad de PE (T10), registran la mayor reducción del peso lo que se debería a la menor capacidad de retención de agua que presenta el PE, por su alto contenido de fibra dietética insoluble.

El espesor de las galletas fluctuó entre 0,75 y 0,80 cm, no presentando diferencias significativas entre los tratamientos. La actividad de agua fluctuó entre 0,58 y 0,63, correspondiendo los valores más altos a los tratamientos con mayor contenido de miel.

Tabla 4 Diámetro y peso de galletas elaboradas con pulido de arroz

Tratamiento	Diámetro (cm)	Peso (g)
T1	5,2 ± 0,08 **a**	8,4 ±0,13 **a**
T2	5,2 ± 0,04 **a**	8,4 ±0,08 **a**
T3	5,3 ± 0,13 **b**	8,3 ± 0,15 **ab**
T4	5,2 ± 0,20 **a**	8,4 ± 0,21 **a**
T5	5,3 ± 0,14 **b**	8,3 ± 0,07 **ab**
T6	5,4 ± 0,11 **b**	8,2 ± 0,24 **b**
T7	5,2 ± 0,07 **a**	8,3 ± 0,14 **a**
T8	5,3 ± 0,04 **b**	8,3 ± 0,10 **ab**
T9	5,3 ± 0,06 **b**	8,2 ± 0,13 **b**
T10	5,3 ± 0,08 **b**	8,2 ± 0,09 **b**

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

Según el diagrama de color L*, a* y b*, las galletas tuvieron una tonalidad amarillo – rojo claro. Las que tuvieron mayor inclusión de miel de abejas, presentaron color más oscuro (L* entre 59,4 y 60,3) y mayor contribución de rojo (a* entre 13,8 y 14,5) lo que indica que los azúcares presentes en la miel participaron en reacciones tipo Maillard y de caramelización, que se favorecieron durante el horneado.

La incorporación de PE influye de manera significativa el contenido FDT, existiendo una relación directamente proporcional entre el nivel de inclusión y el porcentaje de FDT en las galletas (Tabla 5). Se pudo observar que el índice entre FDI/FDS se incrementó marcadamente para los tratamientos 5, 6, 9 y 10, con respecto a los demás; esto indica que el contenido de FDI se incrementa, pero si bien el porcentaje de FDT también aumenta, el contenido de FDS decae, no siendo significativa esta reducción.

Tabla 5 Fibra dietética total y relación fibra insoluble/fibra insoluble en galletas con pulido de arroz

Tratamientos	Fibra Dietética (g/100 g base seca)	
	FDT	FDI/FDS
T1	8,6 ± 0,49 a	2,3 : 1
T2	9,5 ± 0,56 ab	2,9 : 1
T3	11,00 ± 1,04 abc	3,7 : 1
T4	10,4 ± 0,81 abc	3,2 : 1
T5	10,9 ± 1,30 abc	4,4 : 1
T6	12,6 ± 0,62 bc	4,4 : 1
T7	9,8 ± 0,64 abc	3,5 : 1
T8	10,0 ± 1,45 abc	4,2 : 1
T9	12,9 ± 0,12 c	4,8 : 1
T10	13,0 ± 0,30 c	5,1 : 1

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

Todas las galletas fueron bien aceptadas por el panel. Los tratamientos de mayor aceptabilidad sensorial fueron T1 (31% de miel, 4% de harina de trigo y 5% de PE), T6 (27% de miel, 4% de harina de trigo y 9% de PE) y T10 (25% de miel, 4% de harina de trigo y 11% de PE).

El contenido de tocoles totales aumentó con el nivel de incorporación de PE (T10), lo cual también se observó en el contenido de tocoferoles totales y de tocotrienoles totales (Tabla 6). Al analizar los compuestos en forma individual, se observó siempre una relación directa entre el contenido de tocoles en las galletas y los niveles de inclusión del PE La concentración el α-tocoferol, especialmente en el T10 es importante ya este tocol es un importante inhibidor de la peroxidación de lípidos en las membranas biológicas.

Tabla 6 Tocoferoles y tocotrienoles presentes en el aceite extraído de las galletas con pulido estabilizado de arroz.

Tocoferoles (mg/kg de aceite)			
Tratamientos	**T1**	**T6**	**T10**
α- Tocoferol	66 ± 0,7 a	130 ± 1,2 b	141 ± 0,4 b
β- Tocoferol	6 ± 0,5 a	6 ± 2,3 a	13 ± 0,2 b
γ- Tocoferol	8 ± 0,2 a	13 ± 0,5 a	18 ± 8,6 a
δ- Tocoferol	123 ± 1,3 a	114 ± 0,9 a	154 ± 4,6 b
Tocoferoles Totales	210	263	319
Tocotrienoles (mg/kg de aceite)			
Tratamientos	**T1**	**T6**	**T10**
α- Tocotrienol	14 ± 0,4 a	26 ± 3,0 b	39 ± 2,7 c
β- Tocotrienol	16 ± 0,9 a	18 ±3,61 a	17 ± 1,8 a
γ- Tocotrienol	236 ± 3,2 a	252 ± 8,4 ab	265 ±1,1 b
δ- Tocotrienol	ND	ND	6 ± 1,5 b
Tocotrienoles Totales	266	296	321
Tocoles Totales	476	559	640

El análisis de la superficie respuesta indicó que el punto máximo corresponde a la mezcla del T1 (Figura 1); sin embargo, el análisis estadístico del modelo mostró que no hubo diferencias significativas entre T1 y el T10 (mayor contenido de PE), el cual por tener mayor contenido de compuestos bioactivos sería más recomendable.

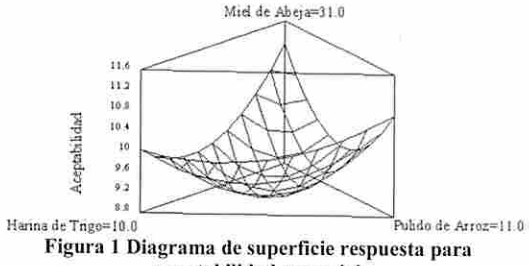


Figura 1 Diagrama de superficie respuesta para aceptabilidad sensorial

CONCLUSIONES

La estabilización por microondas del pulido de arroz permite controlar el deterioro enzimático y no afecta su composición proximal, lo que permitiría utilizarlo en el desarrollo de productos de consumo humano. El pulido de arroz presenta altas concentraciones de fibra dietética y tocotrienoles, los cuales lo convierten en una materia prima importante para su utilización en la nutrición humana. El reemplazo de hasta un 25% de pulido estabilizado de arroz reemplazando la harina de trigo en la elaboración de galletas, permite aumentar significativamente el contenido de fibra dietética y tocotrienoles.

REFERENCIAS

[AACC] American Association of Cereal Chemist. 1989 Approved Methods, s/n. Minneapolis, USA

[AOAC] Association of Official Analytical Chemist .1995. Official methods of analysis. 19° ed. Washington D.C. USA. 1141 p.

[AOCS] American Oil Chemists' Society. 1993 Official Methods, s/n. Champaign, IL USA.

Barnes P, Galliard T. 1991. Rancidity in cereal products. Lipid Technology 3: 23-28.

Champagne ET, Horn RJ. 1992. Stabilizing brown rice to lipolytic hydrolysis by ethanol vapors. Cereal Chemistry 69: 152-156.

Cheftel JC, Cheftel H. 1980. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Editorial. Acribia. Zaragoza. España. 321 p. vol 2.

Hurrell R, Lerman P, Carpenter K. 1979. Reactive lysine in Foodstuffs as Measured by Rapid Dye-bynding procedure. J. Food Sci. 44: 1221-1227, 1231.

Juliano B. 1994. El arroz en la nutrición humana. p:149-176 Roma: FAO.

Kahlon T, Smith G. 2004. Rice Bran: A Health- Promoting Ingredient. Cereal Foods World 49 (4): 188-194.

Lee S, Prosky L, Devries J. 1992. Determination of Total, Soluble and Insoluble Fiber Foods. Enzimatic Gravimetric Method. Mes-Tris Buffer: Collaborative Study. J. AOAC. 75 (3): 395 – 416.

Ramezanzadeh FM, Rao RM, Windhauser M, Prinyawiswatkul W, Marshall WE. 1999a. Prevention of Hydrolytic Rancidity in Rice Bran during Storage. J. Agric. Food Chem. 47: 3050-3052.

Ramezanzadeh FM, Rao RM, Windhauser M, Prinyawiswatkul W, Marshall WE. 1999b. Prevention of Oxidative Rancidity in Rice Bran during Storage. J. Agric. Food Chem. 47: 2997-3000

Ramezanzadeh FM, Rao RM, Prinyawiswatkul W, Marshall WE, Windhauser M 2000. Effects of Microwave Heat, Packaging, and Storage Temperature on Fatty Acid and Proximate Compositions in Rice Bran. J. Agric. Food Chem. 48:464-467.

Recio I. 2004. Alimentos Funcionales, Instituto de Fermentaciones Industriales. Disponible en: http://www.ig.csic.es/pro96.htm consultado el 18 de noviembre del 2004.

Xu Z, Hua N, Godber JS. 2001. Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienols, and Oryzanol Components From Rice Bran Against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2 Azobis (2-Methylpropionamidine) Dihydrochloride. J. Agric. Food Chem. 49: 2077-2081.

APLICACIÓN DEL ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO ACOPLADO A ESPECTROSCOPIA INFRARROJA FTIR-HATR PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADULTERACIÓN DE MIEL DE ABEJA

Zúñiga De Loa Marlene, Gallardo Velázquez Tzayhrí, Osorio Revilla Guillermo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Prol. de Carpio esq. Plan de Ayala S/N. Colonia Sto. Tomás. México D.F.
tgallard@encb.ipn.mx

Palabras clave: miel, espectroscopia infrarroja, quimiometría, adulteración, clasificación.

RESUMEN

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar un método quimiométrico basado en la señal medio-Infrarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada Horizontal de la miel de abeja con la finalidad de detectar adulteraciones de este producto. Se utilizó miel pura de abeja proveniente de los estados de Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México. La caracterización de las muestras de miel pura se llevó de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba) y el AOAC. Las determinaciones que se realizaron fueron: humedad, ceniza, actividad diastásica, azúcares reductores, glucosa, fructosa, hidroximetilfurfural y actividad acuosa. Se realizó la adulteración de las mieles con: glucosa de maíz comercial en el intervalo de 2 a 100%; mezclas de glucosa, fructosa y sacarosa en el intervalo de 5 a 25%; jarabe de alta fructosa (HFCS 55) en el intervalo de 2 a 60% y con azúcar invertido en el intervalo de 2 a 50%. Se obtuvieron los espectros infrarrojos de las mieles puras y adulteradas, los cuales se alimentaron al programa de calibración multivariable QUANT+ v. 4.51 (Perkin Elmer) para construir los métodos quimiométricos con los algoritmos: PLS1, PLS2 y PCR. La selección del mejor algoritmo para las diferentes adulteraciones, se realizó con base en los valores de R^2 (de calibración y validación), así como los mínimos valores de los errores de calibración y predicción (SEC y SEP). También, se aplicó el programa ASSUREID con el modelo SIMCA (Soft Independent Modeling Class Analogy) a las cuatro mieles (Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México), el cual permitió identificar a las mieles por su origen geográfico, así como detectar si la muestra de miel estaba o no adulterada. El modelo SIMCA, presentó un óptimo porcentaje de reconocimiento y rechazo (100%) de las mieles por su origen geográfico.

INTRODUCCIÓN

La determinación de la autenticidad de los alimentos y la detección de adulterantes en la industria alimentaria han incrementado su importancia especialmente en productos de alto valor comercial, ya que la substitución parcial de tales productos por ingredientes de menor costo significa grandes beneficios económicos para quien comercializa estos productos (Marcos y col., 2002). Uno de estos productos de alto valor comercial que se produce en México es la miel de abeja, la cual tiene un amplio espectro de aplicaciones en la industria alimentaria (Sivakesava y Irudayaraj, 2001a,b). Debido al alto precio de la miel, a su gran valor nutricio y su sabor único, la adulteración de miel de abeja con materiales edulcorantes de menor costo ha aumentado en los últimos años, lo cual ha sido reportado en varias ocasiones en la literatura especializada del ramo (Sivakesava y Irudayaraj, 2001a,b). Por lo que la detección de la adulteración de la miel de abeja ha cobrado mucha importancia Actualmente, los adulterantes más comunes utilizados en la adulteración de la miel de abeja son el jarabe de alta fructosa (HFCS) y el azúcar invertido (Cordella, y col., 2002).

La detección de la adulteración de la miel de abeja es difícil por su gran variabilidad natural, lo que incluye a las diferentes floras apícolas, madurez, medio ambiente, técnicas de procesamiento y almacenaje. Sin embargo, para probar la autenticidad de la miel se han utilizando diferentes técnicas analíticas, entre las que se encuentran la espectroscopia, el análisis de radio isótopos, la cromatografía (gases y líquidos) y el análisis de elementos traza. La técnica con el radio isótopo del carbono es la más utilizada para detectar la presencia de azúcares de caña o maíz. Este método además de consumir mucho tiempo y de ser costoso, puede detectar únicamente niveles superiores o iguales al 10% de azúcares provenientes de caña o maíz (Sivakesava y Irudayaraj, 2001a).

En años recientes, la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) ha demostrado ser una opción atractiva para el análisis cualitativo y cuantitativo de los alimentos. En particular, la región media del infrarrojo (MID) provee información de la estructura química de los constituyentes de la muestra a través de las bandas de absorción del espectro. Con la combinación de la espectroscopia media infrarroja de transformada de Fourier (MID-FTIR) y de programas computacionales estadísticos de multivariables, se pueden desarrollar modelos de predicción, los cuales permiten conocer cuantitativamente la composición de una mezcla con base en su señal espectral, lo que se conoce con el nombre de análisis quimiométrico. Además, el uso del accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) permite manejar muestras acuosas, lo cual antes no era posible en la espectroscopia infrarroja tradicional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Se utilizó miel pura de abeja proveniente de los estados de Chiapas, Estado de México, Oaxaca y Morelos, así como D-glucosa, D-fructosa, glucosa de maíz jarabe, de alta fructosa, azúcar invertido y kits analíticos para la determinación de glucosa y fructosa en alimentos.

Métodos. El análisis de las muestras de miel puras se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX, Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba y el AOAC. Las mieles puras se caracterizaron con la determinación de algunas propiedades físicas y químicas: humedad, ceniza, actividad diastásica, azúcares reductores, fructosa, glucosa, sacarosa e hidroximetilfurfural. Los espectros correspondientes de cada una de las mieles puras se obtuvieron con un Espectrofotómetro Perkin Elemer 1600 y el Accesorio de Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR) con cristal de seleniuro de zinc, cuya geometría es de un paralelogramo con dos caras de 45° con una profundidad de penetración de 1.46µm. Los espectros se obtuvieron una resolución de 4 cm^{-1}, con 64 barridos, operando en el infrarrojo medio (4000 – 650 cm^{-1}). Antes de cada lectura se obtuvo el espectro de fondo al aire (background) el cual se leyó bajo las mismas condiciones que las muestras. Después de cada lectura, el cristal de seleniuro de zinc fue completamente limpiado con agua desionizada y secado con un papel absorbente suave.

Desarrollo de los métodos quimiométricos (Beebe y col., 1998). Los métodos quimiométricos se desarrollaron para cuatro adulterantes de la miel: a) glucosa de maíz comercial; b) mezcla de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), c) jarabe de alta fructosa (HFCS 55) y d) azúcar invertido (AI). Se prepararon soluciones de cada adulterante aproximadamente a la misma concentración de la miel de abeja (80 °Brix) y se mezclaron con la miel en las proporciones deseadas. Se obtuvo un modelo de calibración y validación para cada tipo de adulteración con el programa multivariable QUANT+ con los algoritmos: mínimos cuadrados parciales sin y con interacción de variables (PLS1 y PLS2) y regresión de componentes principales (PCR).

Sistema de calibración y validación para la miel adulterada con glucosa de maíz. Para la construcción del sistema de calibración, se prepararon series de 49 muestras adulteradas con glucosa de maíz comercial (84 °Brix) para cada miel en el intervalo de 2-100% p/p con un intervalo de concentración de 2% p/p. También se prepararon 25 muestras de miel adulterada con glucosa de maíz dentro del mismo de concentración (2-

100% p/p), pero que no fueron utilizados en la serie de calibración, para formar la serie de la validación del método.

Sistema de calibración y validación para la miel adulterada con mezclas de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). Se prepararon 45 mezclas de azucares (glucosa, fructosa y sacarosa) de diferentes composiciones mediante diseños de mezclas con el programa estadístico MINITAB 14. Con estas mezclas se prepararon soluciones a 80 °Brix (esta concentración es igual que la de la miel de abeja), las cuales se mezclaron con la miel para obtener adulteraciones comprendiendo concentraciones de 5, 8, 10, 12, 15, 20 y 25% p/p de azúcar total. La bibliografía reporta que en este intervalo de concentraciones es donde se han detectado adulteraciones en la miel de abeja (Sivakesava y Irudayaraj, 2001a). Se prepararon también 15 muestras de miel adulterada con las soluciones de mezclas de azúcares dentro del mismo intervalo, sin que pertenecieran a la serie de calibración para formar la serie de validación del método.

Sistema de calibración y validación para la miel adulterada con jarabe de alta fructosa (HFCS 55). Para la construcción del sistema de calibración para la miel adulterada con HFCS 55 (77.5 °Brix), se prepararon series de 30 muestras adulteradas para cada miel en el intervalo de 2-60% p/p con intervalos de concentración de 2% p/p. También se prepararon 15 muestras de miel adulterada con jarabe de alta fructosa que pertenecieran al mismo intervalo de concentración (2-60% p/p), pero que no fueron utilizadas en la calibración, para formar la serie de validación del método.

Sistema de calibración y validación para la miel adulterada con azúcar invertido (tipo AI). Para la construcción del sistema de calibración para la miel adulterada con azúcar invertido (tipo AI) (76.5 °Brix), se prepararon series de 25 muestras adulteradas para cada miel en el intervalo de 2-50% p/p con intervalos de concentración de 2% p/p. También fue necesario preparar 13 muestras de miel adulterada con azúcar invertido que pertenecieran al mismo intervalo de concentración pero que no fueron utilizadas en la calibración, para formar la serie de validación del método.

Clasificación de las mieles puras (Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México) por el método SIMCA. Para realizar la clasificación de las mieles puras por el método SIMCA del programa ASSUREID de Perkin Elmer y poder discriminar entre mieles puras y adulteradas además de identificar su origen, se colectaron 25 espectros de cada una de las mieles puras (100 espectros en total) bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Veinte espectros de cada miel se utilizaron para formar el modelo SIMCA y cinco para validarlo.

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos del % de humedad, del % de ceniza e hidroximetilfurfural se muestran en el Cuadro 1, en donde se observa que los parámetros, cumplen con los límites de calidad para mieles puras de acuerdo a la norma NMX-F-036-1997-NORMEX (máximo de 20% de humedad, 0.6% de cenizas y 40 para hidroximetilfurfural).

En el Cuadro 2, se muestran los resultados del % de azúcar invertido, glucosa y fructosa para todas las mieles puras analizadas. El límite mínimo de % de azúcar invertido y el intervalo de % de glucosa marcados en la norma son de 53% y de 22.03 - 40.75%, respectivamente para mieles de buena calidad. Con respecto a fructosa, no existe un valor límite en la norma, pero algunos autores consideran un intervalo de 27.25 – 44.26% (Sivakesava e Irudayaraj, 2001a). Como se puede apreciar en el Cuadro 2, todas las mieles analizadas cumplen con los valores de la norma.

Cuadro 1. Contenido de humedad y ceniza en base húmeda e hidroximetilfurfural (HMF) de las diferentes mieles analizadas.

Miel	Humedad (%)	Ceniza (%)	HMF (mg/kg)
Morelos	18.6 ± 0.00	0.092 ± 0.011	24.3 ± 0.36
Chiapas	18.2 ± 0.11	0.143 ± 0.005	28.54 ± 0.08
Estado de México	18.6 ± 0.18	0.143 ± 0.012	14.72 ± 0.08
Oaxaca	17.4 ± 0.00	0.149 ± 0.012	9.56 ± 0.08

Cuadro 2. Porciento de azúcar invertido, glucosa y fructosa en base húmeda de las diferentes mieles analizadas.

Miel	Azúcar invertido (%)	Glucosa (%)	Fructosa (%)
Morelos	67.44 ± 3.33	29.45 ± 0.40	46.01 ± 1.0
Chiapas	56.59 ± 3.91	29.34 ± 1.01	47.32 ± 0.9
Estado de México	70.14 ± 6.40	26.04 ± 0.08	50.13 ± 0.4
Oaxaca	57.02 ± 2.11	33.64 ± 1.59	43.39 ± 1.1

Con respecto al índice de diastasa, los resultados del Cuadro 3 muestran que todas las mieles presentaron un valor superior al mínimo indicado por la norma que es de 8.0. Este resultado indica que las mieles no fueron sometidas a procesos de calentamiento ya que aún conservan actividad enzimática. Los resultados de actividad acuosa (a_w) se encuentran entre los límites (0.5-0.6) para mieles puras.

Cuadro 3. Índice de diastasa de las diferentes mieles analizadas.

Miel	Índice de diastasa	a_w
Morelos	25.02 ± 0.81	0.5790 ± 0.001
Chiapas	18.71 ± 0.69	0.5815 ± 0.000
Estado de México	14.36 ± 0.57	0.6085 ± 0.002
Oaxaca	10.81 ± 0.15	0.5860 ± 0.009

Los resultados mostrados anteriormente indican que las mieles analizadas son mieles puras y por lo tanto pueden ser utilizadas como referencia para desarrollar tanto los métodos quimiométricos basado en FTIR como el método de discriminación SIMCA. En la Figura 1 se presentan los espectros FTIR de las mieles puras de Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México.

Figura 1. Espectros FTIR-HATR de las mieles de puras abeja provenientes de los estados de Chiapas, México, Morelos y Oaxaca.

Los espectros de las mieles de abeja puras muestran bandas de absorbancia en aproximadamente 772, 915, 1021, 1250, 1342, 1412, 2885 y 2934 cm^{-1}. La región de 1500-800 cm^{-1} corresponde a las zonas de absorción de los principales azúcares constituyentes de la miel: fructosa, glucosa y sacarosa. De 900 a 750 cm^{-1} son regiones características de configuraciones de sacáridos (Sivakesava e Irudayaraj, 2001a). En la Figura 2 se muestra un ejemplo de 25 espectros FTIR de los 49 obtenidos para el sistema de calibración la miel de Chiapas adulterada con glucosa de maíz. En esta Figura se observa que existe diferencia de absorción en algunas regiones del espectro proporcional a la concentración de adulteración, lo cual es necesario para la construcción del método quimiométrico.

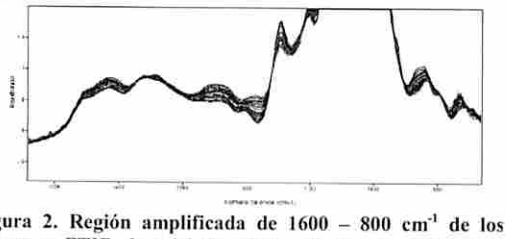


Figura 2. Región amplificada de 1600 – 800 cm^{-1} de los espectros FTIR de miel de abeja del Estado de Chiapas adulterada con glucosa de maíz

Figuras similares se obtuvieron con las otras adulteraciones (mezcla de azúcares, jarabe de alta fructosa y azúcar invertido) para cada una de las mieles (Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México). Los modelos de calibración multivariable para cada miel de abeja fueron desarrollados utilizando los algorítmos PLS1, PLS2 y PCR. Estos modelos establecieron una correlación entre los datos espectrales y las concentraciones de adulterante(s) y presentaron valores altos de correlación (R^2) para la validación y bajos errores de predicción. Los resultados se muestran en los Cuadros 4, 5, 6 y 7.

Cuadro 4. Parámetros estadísticos con el algoritmo PLS2 que presentó la mejor respuesta de las diferentes mieles de abeja adulteradas con glucosa de maíz comercial.

Miel	Factores[a]	R^2_b	SEC[c]	R^2_b Validación	SEP[d]
Chiapas	7	0.992	0.9365	0.9988	1.905
Oaxaca	7	0.9995	0.6853	0.9994	1.500
Estado de México	6	0.9987	1.209	0.9966	1.567
Morelos	8	0.9996	0.6362	0.9984	1.171

a Optimo número de factores; b Coeficiente de correlación; c Error estándar de calibración; d Error estándar de predicción

Cuadro 5. Parámetros estadísticos que presentaron la mejor respuesta de las diferentes mieles de abeja adulteradas con mezclas de glucosa, fructosa y sacarosa.

Miel	Algoritmo	Factores[a]	R^2_b	SEC[c]	R^2_b Validación	SEP[d]
Chiapas	**PLS1**					
	Glucosa	4	0.9412	0.7727	0.9369	1.212
	Sacarosa	4	0.9828	0.2695	0.9553	0.5021
	PLS2					
	Fructosa	8	0.9787	0.5544	0.9316	1.193
Oaxaca	**PLS1**					
	Glucosa	3	0.7791	1.407	0.8534	1.876
	Fructosa	3	0.8880	1.332	0.901	1.629
	Sacarosa	5	0.9901	0.2420	0.9173	0.3740
Estado de México	**PLS2**					
	Sacarosa	8	0.9468	0.6662	0.9542	0.8802
	PCR					
	Glucosa	6	0.8983	1.010	0.8459	1.231
	Fructosa	4	0.8790	1.555	0.916	1.555
Morelos	**PLS1**					
	Glucosa	4	0.8363	1.240	0.8808	1.835
	Fructosa	3	0.9050	1.186	0.9053	1.528
	Sacarosa	5	0.9177	0.9376	0.9584	1.132

a Optimo número de factores; b Coeficiente de correlación; c Error estándar de calibración d Error estándar de predicción

Cuadro 6. Parámetros estadísticos con el algoritmo PLS1 que presentó la mejor respuesta de las diferentes mieles de abeja adulteradas con jarabe de alta fructosa (HFCS 55).

Miel	Factores[a]	R^2_b	SEC[c]	R^2_b Validación	SEP[d]
Chiapas	3	0.9899	1.877	0.9908	3.306
Oaxaca	5	0.9945	1.383	0.995	2.813
Estado de México	8	0.9956	1.413	0.9745	3.646
Morelos	5	0.9962	1.214	0.9817	2.198

a Optimo número de factores; b Coeficiente de correlación; c Error estándar de calibración d Error estándar de predicción

Cuadro 7. Parámetros estadísticos con el algoritmo PLS1 que presentó la mejor respuesta de las diferentes mieles de abeja adulteradas con azúcar invertido.

Miel	Factores[a]	R^2_b	SEC[c]	R^2_b Validación	SEP[d]
Chiapas	8	0.9997	0.3320	0.9912	0.3806
Oaxaca	3	0.9961	0.9574	0.9766	1.808
Estado de México	6	0.9980	0.7585	0.9760	2.793
Morelos	4	0.9976	0.8113	0.9935	1.711

a Optimo número de factores; b Coeficiente de correlación; c Error estándar de calibración d Error estándar de predicción

En el Cuadro 8, se presentan los índices de reconocimiento y rechazo en porciento de interclase (diferencia entre las señales espectrales de las diferentes mieles) obtenidos con el modelo SIMCA optimizado. Se puede observar que para los cuatro tipos de miel se logró obtener una buena separación entre las mieles y por lo tanto su identificación. Esto se puede apreciar mejor en la Figura 3, la cual muestra la distribución espacial de las cuatro mieles en estudio (Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México) y se aprecia claramente que sí se logró su separación con el modelo optimizado.

Cuadro 8. Distancias interclase de los cuatro tipos de miel de abeja.

	Miel Chiapas	Miel Oaxaca	Miel Morelos	Miel Estado de México
Miel Chiapas	1	10.1	8.32	8.77
Miel Oaxaca		1	6.98	12
Miel Morelos			1	11.1

Nota: Entre mayor sea la distancia interclase es mejor el modelo.

El modelo SIMCA obtenido, detecta pequeñas variaciones en las señales espectrales y es capaz de identificar a los cuatro grupos de mieles grupos como diferentes, esto se comprueba más adelante con la validación del modelo.

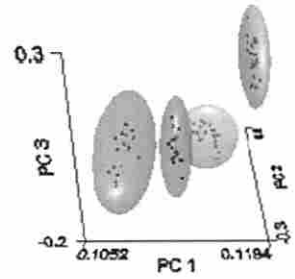


Figura 3. Distribución espacial de las poblaciones de miel de Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México obtenidas con SIMCA con tres componentes principales.

En el Cuadro 9 se muestran dos ejemplos de la aplicación del modelo SIMCA. En este se presenta como problema la identificación de dos muestras de miel, una adulterada (miel de Chiapas adulterada con glucosa de maíz) y la otra miel pura proveniente del estado de Chiapas, la cual es comparada con los cuatro grupos de mieles que forman el modelo SIMCA. Como se puede apreciar, la miel adulterada fue rechazada, ya que no pertenece al grupo de mieles del modelo, mientras que la miel pura, fue identificada como miel pura de Chiapas, dando así un 100% de rechazo y reconocimiento por el modelo.

Cuadro 9. Resultados obtenidos de un ejemplo de identificación de mieles con el modelo SIMCA optimizado.

Problema	Material Especificado	Material identificado	Resultado	Distancia total	Distancia del modelo
Miel de Chiapas adulterada con glucosa de maíz	Chiapas	Otro	Rechazada	13.8151	7.0691
	Morelos	Otro	Rechazada	17.3872	16.3841
	Oaxaca	Otro	Rechazada	22.3845	25.0937
	Estado México	Otro	Rechazada	16.6316	19.1856
Miel pura de Chiapas	Chiapas	Chiapas	Identificada	0.6889	0
	Morelos	Otro	Rechazada	17.2812	14.2131
	Oaxaca	Otro	Rechazada	18.9124	20.7200
	Estado México	Otro	Rechazada	14.5107	18.3164

Nota: Los valores de distancia total deben ser menores o iguales a 1.

CONCLUSIONES.

Se construyeron cuatro métodos quimiométricos basados en Espectroscopia FTIR-HATR capaces de detectar adulteraciones en la miel pura de abeja de diferentes estados de la República (Chiapas, Oaxaca, Morelos y Estado de México) con altos niveles de correlación (R^2) y bajos errores de predicción (SEP). Los métodos obtenidos detectaron niveles de adulteración más bajos (desde 2%) que los que se detectan con Cromatografía de gases (13 %) y la técnica de radio isótopos (10%). Los métodos desarrollados en el presente trabajo constituyen una técnica rápida, económica en comparación con los métodos tradicionales, tiene un alto nivel de precisión, no requiere de un tratamiento previo de la muestra, no es destructiva con la misma y se requiere poca cantidad de muestra para su análisis.

El modelo cualitativo SIMCA desarrollado para mieles puras, fue capaz de realizar una clasificación de las mieles de acuerdo a su origen geográfico, y de discriminar entre mieles puras y adulteradas.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (1980). Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (13th ed.). Washington, DC., USA. AOAC.

Sivakesava, S. & Irudayaraj, J. (2001a). A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup. *Food Chem and Toxicology*. **66**(6). pp. 787-792.

Sivakesava, S. & Irudayaraj, J. (2001b). Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by fourier transform infrared spectroscopy. *Food Eng and Phy Properties*. 66(7). pp. 972-978.

Norma Mexicana NMX-F-036-1997 NORMEX, Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba.

Marcos, I., Pérez, J., Fernández, E., García, C. and Moreno, B. (2002). Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry. *J. of Chromatography A*. **945**. pp. 221-223

Cordella, C., Antinelli, J., Aurieres, C., Faucon, J., Cabrol-Bass, D., and Sbirrazzuoli, N. (2002). Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. *J. Agric. Food Chem*. **50**. pp. 203-208

Beebe, K.R., Pell, J.L. and Seasholtz, M.B. (1998). Chemometrics. A practical guide. Wiley Interscience Publication. New York, USA

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE UNA PASTA TIPO NOODLE ADICIONADA CON ALMIDÓN DE PLÁTANO (*Musa paradisiaca* L)

González-Soto Rosalía América [1,*], Espinosa-Solís Vicente [1], Berrios José De Jesús [2], y Bello-Pérez Luis Arturo [1]

[1]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Km. 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla Col. San Isidro, C.P. 62731, Yautepec, Morelos, México. Fax. 52 735 3942020. rsoto@ipn.mx

[2]U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Western Regional Research Center. 800 Buchanan Street Albany, CA 94710-1105.

*** Autor para correspondencia.**

Palabras clave: Ciencia, Noodle, Musa paradisiaca L, Plátano, Almidón resistente.

RESUMEN

El mercado de sopas instantáneas tipo noodle en México ha aumentado; sin embargo, estas sopas no tienen un valor nutritivo elevado. Para mejorar la calidad nutricional de estas pastas se elaboraron noodles usando diferentes mezclas de harina de trigo y almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L). Una importante cantidad de éste almidón resiste la hidrólisis enzimática y al ser consumido tiene efectos benéficos en la salud. La adición de cualquier componente ajeno a la formulación original de un alimento puede causar cambios en su calidad. Por ello se evaluó la composición química proximal, el color, las pérdidas por cocción y la textura de los noodles. La adición de almidón de plátano disminuyó el contenido de proteínas de 13.6 a 10.2%, aumentó el de cenizas de 2.1 a 3.1%, y redujo la luminosidad (L*). La adición de almidón de plátano no afectó la calidad de cocción de los noodles, pero la textura se modificó aumentando la dureza y disminuyendo la cohesividad de las muestras adicionadas con el almidón de plátano.

INTRODUCCIÓN

Los noodles son un tipo de pasta preparada a partir de una masa que contiene harina de trigo, agua y sal. La calidad de los noodles secos es juzgada por su color, simetría, calidad de cocción y textura (Oh *et al.*, 1983). Las pruebas instrumentales de textura para noodles cocidos son herramientas de investigación y de control de calidad para monitorear algún cambio en la formulación, la materia prima o en el proceso de fabricación (Ross, 2006). El componente mayoritario en este tipo de pasta es el almidón, la principal fuente de energía para el ser humano, pero este polisacárido le confiere propiedades de textura a los noodles; se sabe que cierta porción del almidón en la dieta resiste el ataque enzimático de las secreciones intestinales. A este almidón se le conoce como almidón resistente (AR) y se ha introducido como un ingrediente funcional (Aparicio-Saguilan *et al.*, 2007). Tiene un efecto terapéutico para personas con diabetes, hipercolesterolemia, y problemas digestivos, además de su efecto en la prevención del cáncer de colon (Brouns *et al.*, 2002). Algunas frutas como el plátano, en estado verde o inmaduro tienen hasta 70% de almidón en base seca (Bello-Pérez y Paredes-López, 1999) pero además este almidón, obtenido de una fuente natural, presenta la mayor resistencia al ataque por las enzimas digestivas del humano (Faisant *et al.*, 1995).

El mercado de sopas instantáneas en México ha aumentado desde hace 14 años, hoy muchas personas consumen este tipo de alimento y cada vez hay más compañías dedicadas a fabricarlos (Flores, 2005). Sin embargo, estas sopas no tienen un valor nutritivo elevado y por ello que se busca darle un valor agregado adicionando almidón de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.) para desarrollar un alimento funcional con mayor contenido de AR. Sin embargo, la adición de cualquier componente ajeno a la formulación original de un alimento puede causar cambios en la calidad del producto.

Por tanto el objetivo del presente estudio fue evaluar algunas propiedades físicas y químicas como la textura, color y composición química de una pasta tipo noodle adicionada con diferentes concentraciones de almidón de plátano macho (*Musa paradisiaca* L).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de almidón de plátano

El asilamiento del almidón de plátano se hizo según el método propuesto por Flores-Gorosquera *et al.* (2004).

Elaboración de los noodles

Se usaron mezclas sustituyendo la harina de trigo con 5, 15 y 30% de almidón de plátano y se elaboró una muestra de noodle utilizando 100% harina de trigo (testigo). Cada muestra, incluyendo el testigo, fue elaborada por duplicado. La harina de trigo se mezcló con el almidón de plátano en una mezcladora (Hobart Mixer, Model A-200, OH, USA) por 30 s, se agregó una solución de NaCl (1 – 5 %) sin dejar regiones secas y se mezcló por 4.5 min. La mezcla se introdujo a una procesadora para noodles (Noodle Press, R.S. Venezia Machine G. Inc., CA, USA), donde fue laminada a través de rodillos de 30 mm de espacio entre rodillos; las láminas se doblaron y se volvieron a pasar por la máquina para cortar la pasta y formar los noodles. Los noodles se colgaron y distribuyeron uniformemente sobre una varilla (soporte) para realizar el secado en un secador escala planta piloto (Standard Industries, Fargo, ND, USA). En el ciclo de secado se elevó la temperatura de 35 a 55 °C durante la primera hora, se mantuvo a 55 °C por 10 h, se disminuyó a 45 °C. El tiempo total de secado fue de 19 h, con una humedad relativa de 95% al inicio, disminuyendo gradualmente hasta 45% al final del secado.

Composición químico proximal de los noodles

Se determinó en las muestras de noodles el contenido de humedad por el método 926.07, proteína por el método 960.25, cenizas por el método 925.11A y lípidos por el método 920.39A (AOAC, 1990); y fibra dietética total (FDT) por el método 32-05 (AACC, 2000).

Color

Se molieron las muestras en un mortero con pistilo y se tamizaron a través de una malla No. 100 (0.15 mm de apertura), para obtener un tamaño de partícula homogénea. Se determinó el color en un colorímetro Milton Roy mod. Color mate (Rochester, New York), usando como blanco el estándar de calibración color blanco (X = 82.58, Y = 86.92, Z = 89.30). Las mediciones se realizaron con el iluminante D65 y con 10° de inclinación, excluyendo la reflexión especular; los resultados se reportan de acuerdo al sistema CIELab.

Perdidas por cocción

Se determinaron de acuerdo al método 66-50 de la AACC (2000).

Análisis de textura

Perfil de textura instrumental (TPA)

El TPA se determinó usando el analizador de textura (TA modelo: XT2i, Godalming, England) y la sonda (pasta firmness / stickiness, HDP/PFS) con una celda de carga de 25 kg y una velocidad de prueba de 0.5 mm s^{-1}. Se utilizaron 10 g de noodles cocinados durante 9 min en 300 mL de agua hirviendo. Se colocaron en la sonda 5 tiras de noodle (5 cm largo) juntas y se efectuó el ensayo. La prueba se realizó 10 veces para cada muestra.

Análisis estadístico

A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía, las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los análisis se hicieron con el programa SigmaStat versión 3.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico proximal

El contenido de humedad de los noodles adicionados con 5, 15 y 30% de almidón de plátano no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) y fue mayor que el testigo (Cuadro 1). Este comportamiento se debe a que los gránulos de almidón en las pastas se hinchan durante el procesamiento de mezclado y tienen la capacidad de retener agua. Valores de humedad extremadamente altos pueden contribuir al deterioro químico o microbiológico de las pastas durante el almacenamiento.

Cuadro 1. Análisis químico proximal de noodles adicionados con almidón de plátano en diferentes proporciones (%).

Muestra	Humedad[1]	Lipidos[1,2]	Proteínas[1,2]	Cenizas[1,2]	Fibra dietética total[1,2]
Testigo	6.4±0.12^a	0.41±0.03^a	13.6±0.09^a	2.1±0.11^a	3.0±0.31^a
Almidón 5%	7.2±0.20^b	0.43±0.04^a	13.2±0.11^a	2.3±0.03^a	3.1±0.23^a
Almidón 15%	7.2±0.15^b	0.29±0.03^b	11.4±0.15^b	2.3±0.03^a	2.8±0.51^a
Almidón 30%	7.6±0.11^b	0.33±0.03^b	10.2±0.04^c	2.1±0.02^b	3.1±0.35^a

[1] Media aritmética de 6 repeticiones ± error estándar,[2]Base seca. Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Se observó una disminución en el contenido de lípidos después de la adición del almidón al 15%. Los principales constituyentes de los noodles (almidón de plátano y harina de trigo comercial) tienen contenidos de lípidos bajos. Bello-Pérez *et al.* (2000) reportó un contenido de lípidos en el almidón nativo de plátano de 0.42% y la harina de trigo contiene aproximadamente 1.2% de lípidos (Sangronis *et al.*, 2006).

El contenido de proteínas de los noodles disminuyó al aumentar la sustitución con almidón de plátano, no se encontró diferencia ($p \leq 0.05$) entre el testigo y el noddle con 5% de almidón de plátano. Esto se debió a un efecto de dilución ya que la harina de trigo tiene mayor contenido de proteína (aproximadamente entre 11 y 13%) que el almidón de plátano (1.69%, Aparicio-Saguilan *et al.*, 2005). Esto puede ser aplicado en personas con enfermedad celiáca, la cual se relaciona con la nula digestión de las proteínas del trigo y la producción de diarrea crónica después de su consumo (Ruiz-Díaz y Polanco, 2002).

No se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$) en el contenido de cenizas del testigo y los noodles adicionados con 5 y 15% de almidón de plátano. Este efecto se debió al bajo contenido de ceniza de la harina de trigo (aproximadamente 2.0%) y al reportado en el almidón de plátano (0.45%, Aparicio-Saguilan *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando se adicionó mayor cantidad de almidón de plátano (30%) el contenido de cenizas disminuyó, lo cual se debió a un efecto de dilución por la baja concentración de cenizas en el almidón utilizado.

La cantidad de fibra dietética en los noodles no cambió con la adición del almidón de plátano. La harina de trigo presenta un contenido de fibra dietética entre 2 y 3% y el almidón de plátano se caracteriza por presentar bajo contenido de fibra, ya que durante el proceso de aislamiento ésta queda retenida en los tamices de mayor abertura (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004).

Color

Uno de los valores más descriptivos del cambio de coloración de los noodles fue la luminosidad (L*), la cual describe la claridad de la muestra. El valor de L* disminuyó cuando se adicionó el almidón de plátano (Cuadro 2). Esto indica que las muestras con almidón fueron más oscuras que el testigo, las muestras con 15 y 30% no fueron diferentes ($p \leq 0.05$), lo cual sugiere un efecto de saturación. Este comportamiento se debe a que el almidón de plátano presenta una coloración ligeramente café, producida por pigmentos como clorofilas y carotenoides que son arrastrados durante el aislamiemto, así como productos del oscurecimiento enzimático debido a la presencia de la polifenol oxidasa en el fruto (Agustiniano-Osornio *et al.*, 2005). A pesar de esta coloración, la apariencia de los noodles adicionados con almidón de plátano no es desagradable; en el mercado se pueden encontrar pastas adicionadas con alfalfa u otros compuestos que presentan coloraciones oscuras.

Cuadro 2. Influencia del incremento de almidón de plátano sobre el color de noodles secos.

Muestra	a* [1]	b* [1]	L* [1]
Testigo	0.25 ± 0.09^a	7.27 ± 0.54^a	90.23 ± 0.18^a
Almidón 5%	0.78 ± 0.04^b	7.42 ± 0.38^a	86.78 ± 0.40^b
Almidón 15%	1.68 ± 0.17^c	8.18 ± 0.22^b	83.40 ± 0.42^c
Almidón 30%	1.68 ± 0.14^c	5.82 ± 0.50^c	84.40 ±0.29^c

[1] Media aritmética de 2 repeticiones ± error estándar. Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La adición de almidón de plátano aumentó los valores de a*, mientras que no hubo efecto en la variable b*. Para los noodles blancos salados se prefieren valores altos de L* y un color ligeramente crema que requiere de valores moderados de b*; valores extremos en la escala de a* se consideran como un defecto en el producto (Kruger *et al.*, 1998). Wang *et al.* (2004) encontraron que el color de los noodles es afectado por otros factores como el contenido de proteína, el tamaño de la partícula y la humedad de la harina de trigo.

Pérdidas por cocción

Las pérdidas por cocción de la muestra testigo fueron 7.52% y los valores para los noodles adicionados con almidón de plátano fluctuaron entre 6.92 y 7.95%. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$), esto indica que la adición de almidón no tiene efecto adverso sobre la calidad de cocción de los noodles. Kim *et al.* (1996) encontraron que noodles elaborados con almidón de papa tuvieron un porcentaje mayor de pérdidas por cocción que noodles comerciales y muestras elaboradas con almidón de frijol mostraron menores perdidas por cocción que la muestra comercial; encontrando una correlación negativa entre las pérdidas por cocción y el contenido de amilosa de los almidones (papa: 20 a 26.5% y frijol: 37.3 a 37.8% de amilosa). El contenido de amilosa del almidón de frijol reportado por estos autores es similar al que se reporta para el almidón de plátano (37.4%, Bello-Pérez *et al.*, 2006b).

Textura

Perfil de textura instrumental (TPA)

No se encontraron diferencias entre la dureza de la muestra testigo y los noodles con 5% de almidón de plátano ($p \leq 0.05$), sin embargo a mayores concentraciones los noodles fueron más rígidos (Cuadro 3). Park y Baik (2004) compararon la textura de noodles instantáneos con cantidades diferentes de proteína y amilosa; estos autores encontraron que al aumentar la cantidad de amilosa, la dureza aumentaba significativamente. Los resultados de dureza obtenidos en este estudio están relacionados con el alto contenido de amilosa (37.4 %) presente en el almidón de plátano, en almidón de maíz se reportan valores menores de amilosa (30 %) (Bello-Pérez *et al.*, 2006a).

La cohesividad de la muestra testigo y la muestra con 5% de almidón de plátano no fueron diferentes ($p \leq 0.05$) y al aumentar la concentración del almidón de plátano, la cohesividad disminuyó. La cohesividad se relaciona con la fuerza que los enlaces internos de la muestra ejercen sobre el alimento, por lo que la disminución en el contenido de proteína de los noodles (al aumentar el almidón de plátano) produjo una malla tridimensional no rígida donde quedaron englobados los gránulos de almidón hinchados. En este mismo sentido Park y Baik (2004), encontraron que noodles preparados con harina de trigo waxy (1-2% de amilosa) tenían valores de cohesividad mayores que aquellos con mayor contenido de amilosa; la disminución en la cohesividad de los noodles con mayor contenido de almidón de plátano también puede ser explicada por el mayor contenido de amilosa.

La adhesividad de la muestra testigo y la adicionada con 5% de almidón de plátano no fueron diferentes ($p \leq 0.05$), pero al aumentar la concentración de almidón la adhesividad aumentó. Esto se debió a que el almidón en las pastas se hincha durante el procesamiento de mezclado, provocando la salida de amilosa

del gránulo y la formación de un gel con caracteristicas adhesivas. Baik *et al.* (2003) encontraron una correlación positiva entre el contenido de amilosa y la dureza y adhesividad de noodles blancos salados y una correlación negativa con la cohesividad.

La masticabilidad representa la energía necesaria para masticar un alimento hasta que esté listo para ser deglutido. La adición de almidón de plátano no cambio apreciablemente la masticabilidad de los noodles.

Cuadro 3. Resultados del Perfil de textura instrumental de noodles adicionados con almidón de plátano.

Muestra	Dureza (kg)[¶]	Cohesividad[¶]	Adhesividad[¶]	Masticabilidad[¶]
Testigo	9.78±0.20[a]	0.60±0.01[a]	0.26±0.01[a]	1.95±0.03[a]
Almidón 5%	8.89±0.11[a]	0.58±0.01[a]	0.22±0.01[a]	1.86±0.03[a,c]
Almidón 15%	12.57±0.17[b]	0.52±0.01[b]	0.34±0.01[b]	1.81±0.05[a,c]
Almidón 30%	11.61±0.15[b]	0.44±0.01[c]	0.45±0.01[c]	1.75±0.04[c]

[¶] Media aritmética de 10 repeticiones ± error estándar.
Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Los noodles adicionados con almidón de plátano mostraron una disminución en el contenido de proteína, pero la concentración de cenizas y fibra dietética no cambio respecto al testigo. Los noodles adicionados con almidón de plátano tuvieron un color más oscuro que la muestra testigo, esto debido a que el almidón de plátano presenta una ligera coloración café. Los noodles con almidón de plátano mostraron mayor dureza, fueron menos cohesivos pero con mayor adhesividad. La adición de almidón de plátano a los noodles puede ser una alternativa para personas con la enfermedad celiaca por la disminución en el contenido de proteína y eventualmente un producto nutraceútico por el incremento en el almidón resistente proveniente del almidón de plátano.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico a SIP-IPN, COFAA-IPN y EDI-IPN.

REFERENCIAS

AACC. 2000. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th Edition. Vol. I y II. Minnesota, USA.

Agustiniano-Osornio, J. C., R. A. González-Soto, E. Flores-Huicochea, N. Manrique-Quevedo, L. Sánchez-Hernández, and L. A. Bello-Pérez. 2005. Resistant starch production from mango starch using a single screw extruder. J. Sci. Food Agric. 85(12):2105-2110.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition. Kenneth Helrich (Ed). Virginia, USA.1298p.

Aparicio-Saguilán, A., E. Flores-Huicochea, J. Tovar, F. García-Suárez, F. Gutiérrez-Meraz, and L. A. Bello-Pérez. 2005. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native lintnerized banana starch: partial characterization. Starch/Stärke. 57:1-7.

Aparicio-Saguilán, A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Vargas-Torres, A., Tovar, J., Ascencio-Otero, T. E. and Bello-Pérez, L. A. 2007. Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich litnerized banana starch. J. Food Comp. Analysis. 20:175-181.

Baik, B. K., C. S. Park, B. Paszczynska, and C. F. Konzak. 2003. Characteristics of Noodles and Bread Prepared from double-null partial waxy wheat. Cereal Chem. 80(5):627–633.

Bello-Pérez, L. A. y O. Paredes-López. 1999. El almidón: lo comemos pero no lo conocemos. Ciencia. 50 (3): 29-33.

Bello-Pérez, L. A., F. J. García-Suárez, G. Mendez-Montealvo, J. R. Oliveira Do Nascimento, F. M. Lajolo, and B. R. Cordenunsi. 2006a. Isolation and characterization of starch from seeds of araucaria brasiliensis: a novel starch for application in food industry. Starch/Stärke. 58:283-291.

Bello-Pérez, L. A., R. A. González-Soto, M. M. Sánchez-Rivero, F. Gutiérrez-Meraz, y A. Vargas-Torres. 2006b. Extrusión de almidones de fuentes no convencionales para la producción de almidón resistente. Agrociencia. 40: 441-448.

Bello-Pérez, L. A., R. Romero-Manilla, y O. Paredes-López. 2000. Preparation and properties of physically modified banana starch prepared by alcoholic-alkaline treatment. Starch/Stärke. 52:154-159.

Brouns, F., B. Kettlitz, and E. Arrigoni. 2002. Resistant starch and the butyrate revolution. Trends Food Sci. Tech. 13:251-261.

Faisant, N., D. J. Gallant, B. Bouchet, and M. Champ. 1995. Banana starch breakdown in the human small intestine studied by electron microscopy. Eur. J. Clinical Nutr. 49: 98–104.

Flores, R. E. 2005. Nación Maruchan. Día Siete, El Universal. Agosto 2005 pp:16-25.

Flores-Gorosquera, E., F. J. García-Suárez, E. Flores-Huicochea, M. C. Núñez-Santiago, R. A. González-Soto, y L. A. Bello-Pérez. 2004. Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. Acta Cient. Ven. 55: 86-90.

Kim, Y. S., D. P. Wiesenborn, J. H. Lorenzen, and P. Berglund. 1996. Suitability of edible bean and potato starches for starch noodles. Cereal Chem. 73(3):302-308.

Kruger, J. E., D.W. Hatcher, and M. J. Anderson. 1998. The effect of incorporation of rye flour on the quality of oriental noodles. Food Res. Int. 31 (1): 27-35.

Oh, N. H., P. A. Seib, C. W. Deyoe, and A. B. Ward. 1983. Noodles I. Measuring the textural caracteristics of cooked noodles. Cereal Chem. 60: 433-438.

Park, C. S., and B. K. Baik. 2004. Significance of amylose content of wheat starch on processing and textural properties of instant noodles. Cereal Chem. 81(4):521-526.

Ross, A. S. 2006. Review: Instrumental measurement of physical properties of cooked Asian wheat flour noodles. Cereal Chem. 83(1): 42-51.

Ruiz-Díaz, A., y I. Polanco. 2002. Exposición al gluten y aparición de enfermedades autoinmunes en la enfermedad celiaca. Ciencia Pediátrika. 22(9):311-319.

Sangronis, E., P. Teixeira, M. Otero, M. Guerra, and G. Hidalgo. 2006. Manaca, Batata y Ñame: Posibles Sustitutos del Trigo en Alimentos para dos Etnias del Amazonas Venezolano. Arch. Latin. Nutr. 56(1):77-82.

Wang, C., I. P. Kovacs, D. B. Fowler, and R. Holley. 2004. Effects of protein content and composition on white noodle making quality: Color. Cereal Chem. 81(6):777–784.

BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO HEMO EN CERDOS EN CRECIMIENTO

González Guillermina [1], Sánchez Jonathán[1], Puga Rubén[2], Reyes Gybrán[2] y Quintero Adrián[1].
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL - CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS. Km. 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, C.P. 62731, México.
e mail grosendo@ipn.mx

Palabras clave: Nutrición, biodisponibilidad de hierro, cerdos.

RESUMEN

La deficiencia nutricia más frecuente en el mundo es la del hierro, que afecta a grupos de la población en etapas de crecimiento y desarrollo como preescolares y mujeres en edad fértil (especialmente embarazadas), de paises en desarrollo (WHO, 2000). Este problema sigue sin resolverse a pesar de que se han emprendido acciones a nivel mundial. Una de las estrategias empleadas ha sido la fortificación de alimentos y dentro de esta temática el uso de hemoderivados ha sido importante. La finalidad de este trabajo fue evaluar la biodisponibilidad de un concentrado de hierro hemo (AproFer 1000®) en cerdos en crecimiento como un modelo para su posterior evaluación en humanos. Se utilizaron 24 cerdos hembras de la raza York, que se distribuyeron en dos grupos que consumieron un relleno (pasta) sabor a chocolate: uno adicionado con sulfato ferroso y el otro con hierro hemo durante 16 semanas. Todos los cerdos recibieron los mismos cuidados establecidos desde su nacimiento y la única diferencia al iniciar el estudio entre los cerdos fue el tipo de hierro con el que se fortificó su relleno. Al inicio del estudio se midió el peso de todos los cerdos y se les extrajo una muestra de sangre de la vena cava, posteriormente cada quince días se repitieron estas mediciones. Las determinaciones a las muestras de sangre fueron: biometría hemática completa, hierro y ferritina séricos. Al cabo del periodo de suplementación, los animales fueron sacrificados para realizar las mediciones de hierro en músculo e hígado. Los resultados obtenidos permiten recomendar el uso de hierro hemo para su evaluación y posterior uso en humanos, para atender los problemas de deficiencia de hierro y anemia por deficiencia del mismo.

INTRODUCCIÓN

A pesar de la amplia difusión de hierro en el planeta, su carencia nutricia es la más manifiesta. La ferropenia ocurre cuando existe ingreso insuficiente de hierro en el organismo, aumento de las necesidades y/o eliminación excesiva del mismo, produciéndose un balance negativo. (Wolf, 1998). Se han emprendido múltiples acciones para su control: sanitización del ambiente, educación nutricional, mejoramiento de la dieta, esquemas alternativos de suplementación con sales ferrosas; fortificación de alimentos; sin embargo, el problema persiste por varios motivos, entre los que podemos mencionar: el poco apego a la suplementación, la combinación inadecuada de alimentos en la dieta y la baja biodisponibilidad de los productos con hierro consumidos (Loocker, 2002; Schultink, 1993).

El hierro se presenta en dos formas: 1) hierro no hemo, derivado de productos vegetales principalmente, aunque aproximadamente el 50% del contenido del metal en los productos de origen animal, es también de este tipo y 2) hierro hemo, que se encuentra sólo en productos animales (Fairweather, 2001). El hierro hemo es más fácilmente absorbido que el hierro inorgánico de la dieta; la absorción sucede de manera diferente en ambos (Uzel, 1998); la digestión proteolítica de la hemoglobina y mioglobina resulta en la liberación del grupo hemo, que es mantenido en su forma soluble por los productos de la degradación de la globina, que lo hace disponible para su absorción.

Existen múltiples técnicas para el estudio de la biodisponibilidad del hierro, que dependiendo del modelo utilizado se pueden clasificar en: estudios in vitro e in vivo, estos últimos en animales o en humanos (Fairweather, 2001). Los estudios in vitro, son rápidos, de menor costo y permiten mayor control sobre las variables experimentales. La limitación más importante de estos métodos es que no pueden simular estados fisiológicos o algunas propiedades físico-químicas y respuestas adaptativas que influyen en la biodisponibilidad del hierro (Cook, 1990); aunque cabe mencionar que últimamente se han desarrollado métodos que tratan de corregir estas limitaciones y se acercan más a las condiciones de absorción del intestino delgado.

Los estudios de absorción en humanos continúan siendo el estándar de oro para estimar la biodisponibilidad del hierro; sin embargo, los ensayos con animales son, en muchas ocasiones, más prácticos para predecir la biodisponibilidad de nutrimentos (Fairweather, 2001; Wood, 2001).

Para valorar la biodisponibilidad del hierro en este estudio, se eligió como modelo al cerdo porque su fisiología en general y a excepción de los primates no humanos, es la que más se parece a la del hombre, especialmente la digestiva. Su patrón de crecimiento y maduración es similar al de los niños y los procesos bioquímicos del hierro, son similares a los del humano (Pérez, 1999; Swindle, 1994; Calabrese, 1991; Gad, 1992; Pond, 1981).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la biodisponibilidad de hierro hemo en cerdos en crecimiento alimentados con sulfato ferroso (referencia) y con hierro hemo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Se emplearon 24 cerdos en crecimiento de la raza York, para lo cual fueron inseminadas 9 cerdas, al parir éstas, se eligieron sólo hembras para ser incorporadas al estudio, con todas se siguió el protocolo establecido al nacimiento, a excepción de la aplicación de hierro dextrán, con la finalidad de provocar un descenso en los parámetros hematológicos y observar mejor los incrementos en cada uno de los grupos. Una semana después del destete se asignaron aleatoriamente a cada uno de los dos grupos: sulfato ferroso o hierro hemo.

Métodos.

Identificación de animales

Al inicio del estudio, los animales fueron marcados a través de un arete que les fue colocado en la oreja derecha, posteriormente fueron ubicados en jaulas individuales para controlar su consumo de alimento; cada jaula contaba con bebederos de agua.

Controles periódicos

Diariamente se realizó observación a los cerdos y se registró en un formato de supervisión, el peso se determinó cada quince días con báscula electrónica 0 - 150 kg, precisión de 100g, marca Torrey, hecha en México.

Alimentación

Se prepararon 2 tipos de alimento con sabor a chocolate; uno a base de sulfato ferroso considerado el estándar de oro (4) y el otro con hierro hemo y se dieron a comer junto con una dieta baja en hierro a 2 grupos de cerdas en crecimiento.

Toma de muestras.

Cada quince días se tomaron muestras de sangre de la vena cava (Morton, 1993) (figura 1); previamente los cerdos fueron tranquilizados con azaperona (Sural®) por vía intramuscular, a razón de 0.5 ml por cada 20 kg de peso. Posteriormente, se captaron 7 ml de sangre en tubos con heparina como anticoagulante. Las muestras fueron transportadas de la granja porcina al laboratorio, en un recipiente cerrado y térmico, con hielo en su interior.

Una vez en el laboratorio, las muestras se dividieron en dos tubos para su posterior utillización: un tubo se empleó para realizar la determinación de biometría hemática completa (Celly 70) y el otro para hacer las mediciones de hierro sérico y ferritina (Spin lab). Para éstas últimas determinaciones se dejaron reposar 40 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 4000 RPM durante 6

minutos, en el suero así obtenido se hicieron las mediciones de hierro sérico y ferritina. Para las determinaciones hematológicas, se homogeneizaron las muestras y se procedió a medir en el equipo correspondiente.
Al cabo de las 16 semanas los cerdos fueron sacrificados para realizar la determinación de hierro en hígado y músculo.

Figura 1. Extracción de muestras de sangre de la vena cava.

Análisis estadístico.
Se realizó análisis descriptivo e inferencial, mediante análisis pareado en los valores iniciales contra los finales y análisis de variancia entre los resultados de los dos grupos. Los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS® versión 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, es posible observar las características de cada uno de los grupos al inicio del estudio, las diferencias que se observan entre los grupos en ningún caso son estadísticamente significativas, lo que puede indicar que la única diferencia que hubo entre ambos grupos fue el tipo de suplemento que recibieron; es decir, en el momento que se inició el estudio, los grupos eran similares.

Tabla 1. Peso y características hematológicas de las lechonas, según grupo de estudio (promedio y DT)

Caracteristica	Grupos de estudio[1]	
	Hierro hemo	Sulfato
Peso, kg	16.6 (2.4)	14.6 (3.1)
R. Eritrocitos, M/µl	8.0 (0.9)	7.6 (1.1)
Hemoglobina, g/dl	13.2 ((1.0)	12.3 (1.2)
Hematocrito, %	35.7 (3.6)	33.3 (3.8)
VCM, fl	45.0 (4.6)	44.0 (4.6)
CMH, pgl	16.6 (1.3)	16.5 (3.6)
CCMH, g/dl	36.9 (1.6)	37.3 (4.4)
Fe Sérico, µ/dl	108.8 (44.2)	92.2 (35.7)
Ferritina sérica µg/L	243.9 (104.3)	177.7 (81.2)
R. Leucocitos, k /µl	17.9 (3.9)	15.7 (4.4)
R. Plaquetas, k /µl	442.5 (173.7)	412.4 (136.0)
Linfocitos %	74.6 (5.0)	71.1 (11.1)

Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún caso. $p>0.05$.
El valor de hemoglobina fue mayor en el grupo que consumió hierro hemo que en el que recibió sulfato ferroso y las diferencias son estadísticamente significativas (tabla 2).

Tabla 2. Concentración de hemoglobina (g/dl) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT)

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia[1]
Hierro hemo	13.2 (1.0)	14.6 (0.9)	1.4
Sulfato	12.3 (1.2)	13.5 (0.9)	1.2

[1] Diferencia estadísticamente significativa $p<0,05$.

La concentración de hierro sérico también fue predominantemente mayor en el grupo que consumió hierro hemo y esta diferencia fue estadísticamente significativa. (tabla 3). Este dato es diferente al reportado por Quintero en 2003, en que los valores de hierro sérico presentaron un decremento, esto se había explicado como un proceso natural al aumentar la edad (Thorn, 2000), pero en este estudio encontramos que sí hubo aumento en ambos grupos, siendo aún mayor en el grupo de interés, esto nos indica que hay mayor cantidad de hierro circulando en el cuerpo, aunque en realidad los almacenes de hierro (ferritina) no aumentaron.

Tabla 3. Concentración de hierro sérico (µ/dl) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT)

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia[1]
H. hemo	108.8 (44.2)	150.6 (30.2)	41.8
Sulfato	92.2 (35.7)	121.2 (13.0)	29.0

[1] Diferencia estadísticamente significativa $p<0,05$.

Los hallazgos encontrados en la exploración de las concentraciones de hierro, una vez sacrificados los animales, mostraron ventaja para el grupo de animales que consumió hierro hemo, en comparación con los que ingirieron sulfato ferroso; tanto por el hierro encontrado en los compartimentos, como en el porcentaje de absorción del mismo, todo esto en relación al promedio de hierro consumido por cada uno de los grupos. A pesar de que el grupo de sulfato ferroso consumió un 2.1% más de hierro, los hallazgos no fueron en su favor. El porcentaje de absorción en el grupo que consumió hierro hemo fue de 13.3 % y en el grupo que ingirió sulfato ferroso de 10.1%.

CONCLUSIONES

Con los parámetros estudiados, es posible observar que las cerdas que consumieron hierro hemo presentaron valores sanguíneos de hierro superiores a los de las cerdas del grupo de sulfato ferroso.
Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la utilización de hierro hemo puede ser mayor al uso de sulfato ferroso, en la suplementación de este mineral a poblaciones en riesgo de padecer anemia ya que los valores en sangre así lo demuestran y esto queda de manifiesto al observar el porcentaje de absorción del AproFer 1000, respecto al de sulfato ferroso.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo brindado para la realización de este trabajo a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP–IPN), a la Universidad Autónoma de Barcelona, a APC-Europe, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Empresa Bimbo y a los Porcicultores de la Granja Los Pioneros en Acatlipa, Morelos.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

1. **World Health Organization.** A global agenda for combating malnutrition. Nutrition for health and development: progress report. WHO. Paris, France 86p. 2000
2. **Calabrese JE.** Principles of animal extrapolation. Michigan: Lewis Publishers; 1991. 341p.
3. **Cook JD.** Adaptation in iron metabolism. Am J Clin Nutr 1990;(51):301-8. Dallal GE. PC-SIZE Consultant. A program for sample size determinations. Andover MA: 1990.
4. **Fairweather-Tait SJ.** Biovailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron. J Nutr 2001;(131 Suppl):1383S-6S.
5. **Gad CS; Chengelis CP.** Animals models in toxicology. New York: Marcel Decker Inc; 1992. 764p.
6. **Loecker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Jonson CL.** Prevalence of iron deficiency in the United States. JAMA 2002;(12):973-6.
7. **zMorton DB.** Extracción de sangre en los mamíferos y aves de laboratorio Primer informe del grupo conjunto de trabajo BVA/FRAME/RSPCA/UFAW sobre refinamiento. Laboratory animals 1993;(27):1-22.
8. **Pérez GC; Diez PM; García PP.** Introducción a la experimentación y protección animal. Ponferrada, León: Universidad de León; 1999. 47p.
9. **Pond WG.** Biología del cerdo. Zaragoza: Acribia; 1981. 327p.
10. **Quintero AG.** Desarrollo de un alimento functional a partir de hierro hético y evaluación de su biodisponibilidad, para la prevención y corrección de la deficiencia de hierro (tesis doctoral)Barcelona:Universidad de Barcelona;2003
11. **Schultink W, Van DR, Matulessi P, Gross R.** Low compliance with an iron-supplementation program: a study among pregnant women in Jakarta. Am J Clin Nutr 1993;(57):135-9.
12. **Swindle M, Smith AC, Laberlaid K, Duncan ML.** Farm animals in biomedical research part one swine in biomedical research: management and models. ILAR news 1994;(1):1-8.
13. **Thorn CE.** Normal haematology of the pig. In Schalm's Veterinary Hematology. Baltimore, Lippincott, Williams & Wilkins 2000:1089-1095.
14. **Uzel C, Conrad M.** Absorption of heme iron. Seminars in haematology 1998;(1):27-34.
15. **Wood JR.** Methodological issues in assessing bioavailability of nutrients and other bioactive substances in dietary supplements: summary of workshop discussion. J Nutr 2001;(131):1396S-8S.
16. **Woolf N.** Pathology. Basic and Systemic. London: Saunders Company; 1998.

[1] Profesores CeProBi – IPN
[2] Tesistas de licenciatura

PERFIL NUTRICIONAL DE SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L. PROVENIENTES DE MICHOACÁN

Jorge Martínez Herrera, Silvia Evangelista Lozano y Alma L. Martínez Ayala
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIOTICOS – IPN
Carretera Yautepec-Jojutla Km 8.5. Col San Isidro, C.P. 62731, A.P. 24
Yautepec, Morelos, México
email jmartin@ipn.mx

Palabras clave: piñón, piñoncillo, *Jatropha curcas*, proteína

RESUMEN

La planta de *Jatropha curcas* L. pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, nativa de México y Centroamérica. Crece en climas tropicales y semitropicales en suelos pobres y arenosos. Las semillas de piñón tienen un alto contenido de proteína 25-30% y 55-60% de aceite, además de presentar un perfil de aminoácidos azufrados superiores al patrón FAO/OMS y tener una digestibilidad "*in vitro*" mayor al 80%, por lo que su empleo en la alimentación humana y/o animal es posible. Se caracterizó nutricionalmente las semillas de *J. curcas* provenientes de Michoacán y se les determinó su toxicidad. La semilla no tóxica con mayor contenido de grasa fue la de Peribán 56% y un 25-26% de proteína, hubo semillas tóxicas con un mayor contenido de grasa 57-60% como la de Cacangio, Mpio. de Nuevo Hurecho, La Romera, mpio. de Tepalcatepec, Los Habillos mpio. de Tepalcatepec, Puerta de Alambre mpio. de Apatzingán, Rancho Nuevo, Apatzingán y Coalcomán. Las semillas no tóxicas fueron las provenientes de Tejabán, municipio de Nuevo Urecho con 0.13 mg/g de ésteres de forbol, al igual que las de La Ordeñita, mpio. de Tepalcatepec (0.10 mg/g); Corona, mpio. de Peribán (0.092 mg/g); San Isidro, mpio. Tepalcatepec (0.014 mg/g); La Cortina, Gabriel Zamora (0.048 mg/g). Este es el primer reporte de plantas de *J. curcas* identificadas como no tóxicas para Michoacán.

INTRODUCCION

La planta de *Jatropha curcas* L. pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, como la chaya y la noche buena, originaria de México y Centroamérica. Actualmente es cultivada en varios países de Centro América, Sudamérica, África, Asia incluyendo México. La planta de *J. curcas* sobrevive a la sequía creciendo en suelos pobres y arenosos, en climas tropicales y semitropicales, a altitudes de 0 a 1600 msnm. El látex de sus hojas, se ha utilizado en medicina tradicional como cicatrizante y anti-inflamatorio y también como cerca viva, pues los animales no la comen y para proteger de la erosión (Makkar y col., 1998; Martínez y col., 2006). El arbusto de *J. curcas* tiene un periodo productivo de más de 40 años y que desde el primer año se obtiene cosecha. Presenta tres meses de floración y fructificación, siendo, en el primer mes donde hay mayor rendimiento de fruto. Los meses en que se puede cosechar en México son julio, agosto, y septiembre, dependiendo de las lluvias pues en algunas regiones de Michoacán se ha encontrado fruto en noviembre, diciembre y enero.

En México, la planta se encuentra en forma silvestre en diversos estados de la república mexicana, como Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Sinaloa, Sonora, Puebla, Hidalgo y Morelos, pero sólo es utilizada de manera tradicional por los pobladores de la región de Papantla, Veracruz y Puebla en la preparación de diferentes platillos como tamales, pollo en pipián (mezclado con semillas de calabaza y ajonjolí), o simplemente tostada en comal. Se conoce como piñón, piñoncillo, pistache mexicano y habillo en la región de Michoacán.

Sólo en México, existen plantas de *J. curcas* denominadas como "no tóxicas" pues no presentan los ésteres de forbol, responsables de la toxicidad, es importante mencionar que también existen tóxicas, que con la ingesta de dos a cuatro semillas son suficientes para provocar una intensa diarrea, vómito y mareo. No hay manera de diferenciar las plantas tóxicas de las no tóxicas, y solo ha sido reconocidas por los pobladores mas antiguos a prueba y error y pasando este conocimiento a la otra generación.

Las semillas de piñón tienen un alto contenido de proteína 25-30% y 55-60% de aceite, además de presentar un perfil de aminoácidos azufrados superiores al patrón FAO/OMS y tener una digestibilidad "*in vitro*" mayor al 80%, por lo que su empleo en la alimentación humana y/o animal es posible. (Martínez y col., 2004; Martínez y col., 2006).

Por su contenido de aceite puede considerarse como una oleaginosa y éste, ha sido utilizado a nivel internacional para ser convertido a biodiesel mediante una reacción química conocida como transesterificación. La conveniencia de conversión del aceite de *J. curcas* a biodiesel ha sido demostrada por muchos investigadores. Con rendimientos superiores al 98% (Foidl y col., 1996; Francis y col., 2005).

La pasta residual de *J. curcas*, obtenida después de la extracción de aceite, contiene un 50-60% de proteína cruda superior al encontrado en cereales y en algunas leguminosas. Con la posibilidad de emplearse en la elaboración de alimentos balanceados e incluso su incorporación y/o combinación en diferentes productos alimenticios.

No obstante, de la amplia distribución en la República Mexicana de la planta de *J. curcas* hay pocos estudios realizados en la caracterización nutricional y su toxicidad, es por ello que el presente trabajo fue identificar y caracterizar nutricionalmente semillas de *J. curcas* provenientes del Estado de Michoacán y seleccionar los ejemplares no tóxicos con el propósito de establecer plantaciones y extraer el aceite para su conversión a biodiesel y utilización de la pasta residual en la industria alimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación del material vegetativo

La búsqueda de plantas de *J. curcas* se realizó en los meses de octubre y noviembre del 2006 en los siguientes municipios de Michoacán: Apatzingán, La Huacana, Nuevo Urecho, Peribán, Parácuaro, Tepalcatepec, Churumuco, Turicato, Tiquicheo, Tancítaro, Coalcomán, Nueva Italia, Coahuayana, Ario de Rosales, Gabriel Zamora, Villa Madero, Buena Vista y Múgica.

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario del Centro Regional del Bajío, con la ayuda del Dr. Víctor Steinmann, experto en la identificación del género Euphorbiaceae.

Caracterización nutricional

Se realizó el análisis del contenido de proteína y grasa mediante el método de la AOAC (1990).

Cuantificación de ésteres de forbol.

Se realizó mediante el método descrito por Makkar y col. (1998).

RESULTADOS

Todos los ejemplares de las plantas de piñón colectados fueron identificados como *Jatropha curcas* L. Se encontraron plantas desde los 10 msnm hasta los 1600 msnm en distintos estados vegetativos, de floración, y fructificación incluso arbustos defoliados cuando otros en el mismo mes se encontraban en estado vegetativo, este comportamiento obedece claramente a las diferentes condiciones agroclimáticas en las cuales se encuentran, si bien crecen en climas secos y suelos pobres-arenosos, le favorecen climas con precipitaciones promedio superiores a los 900 mm de agua.

En la tabla 1, se muestran los resultados del análisis químico de las muestras de piñón

Tabla 1. Análisis Químico de las semillas de *J. curcas* provenientes de Michoacán

Procedencia	Prot. (%)	Lip. (%)
Tejabán, Nvo. Urecho	25.34	56.71
Cacangio, Nvo. Urecho	20.41	59.78
Naranjito, Huacana	26.40	56.45
Manga Cuimbo, Huacana	24.56	54.47
Villa Eréndira, Nvo. Urecho	29.78	51.79
Miguel Silva, Ario de Rosales	28.34	55.54
El Carro, La Huacana	25.38	53.12
Puerta de Alambre, Apatzingán	25.63	52.32
Úspero, Parácuaro	27.14	54.34
La Ordeñita, Tepalcatepec	30.34	52.11
Poturo, Churumuco	24.55	55.21
Corona, Peribán	30.57	52.45
La Ordeñita, Tepalcatepec	30.56	51.48
La Romera, Tepalcatepec	22.91	59.88
Los Habillos, Tepalcatepec	23.09	60.17
Canoitas, Tepalcatepec	26.33	56.89
San Isidro, Tepalcatepec	29.29	51.34
Peribán, Peribán	24.51	55.37
La Sidra, Tancítaro	24.83	55.44
Puerta de Alambre, Apatzingan	22.58	58.62
La Cortina, Gabriel Zamora	24.36	54.76
Bapacuaro, Turicato	26.96	57.11
Limón de Bapatzindán	25.56	56.78
Rancho Nuevo, Apatzingan	23.25	57.97
Cd. Morelos, Parácuaro	25.45	56.23
Antúnez, Parácuaro	26.23	55.23
Las Crusitas, Parácuaro	23.79	57.35
Piedra Parada, Parácuaro	28.47	54.67
Buenos Aires, Parácuaro	21.96	58.73
Antunez, Paracuaro	26.64	57.24
Hacienda la Huerta, Apatzingán	27.93	53.79
Ejido Morelos, Apatzingan	26.75	54.82
El Camalote, Coahuayana	28.78	55.22
El Cirián, Nueva Italia	27.12	53.49
Coalcomán, Coalcomán	20.78	58.81

Prot. = Proteína, Lip. = lípidos, % en base seca

La semilla no tóxica con mayor contenido de grasa fue la de Peribán 56% y un 25-26% de proteína, hubo semillas tóxicas con un mayor contenido de grasa 57-60% como la de Cacangio, Mpio. de Nuevo Hurecho, La Romera, mpio. de Tepalcatepec, Los Habillos mpio. de Tepalcatepec, Puerta de Alambre mpio. de Apatzingán, Rancho Nuevo, Apatzingán y Coalcomán. Las semillas de Michoacán tienen también la característica de tener mayor contenido de grasa que las de la India y África, y similar a los reportados para semillas de México (Makkar y col., 1997; Martínez y col., 2006)

Las semillas no tóxicas fueron las provenientes de Tejabán, municipio de Nuevo Urecho con 0.13 mg/g de ésteres de forbol, al igual que las de La Ordeñita, mpio. de Tepalcatepec (0.10 mg/g); Corona, mpio. de Peribán (0.092 mg/g); San Isidro, mpio. Tepalcatepec (0.014 mg/g); La Cortina, Gabriel Zamora (0.048 mg/g). Estos municipios se encuentran en altitudes de 400 a 500 msnm y precipitaciones promedio de 600 a 800 mm de agua anuales, sin embargo, las condiciones agroclimáticas en este caso no influyen en la presencia o ausencia de los ésteres de forbol, pues se realizó una prueba sembrando semillas no tóxicas en una región en donde hay semillas tóxicas y al año siguiente se analizaron de nuevo las semillas obtenidas y no se detectaron los ésteres de forbol, comprobando que por lo menos en plantas de *J. curcas* las condiciones ambientales adversas o similares no influyen en la biosíntesis de los ésteres de forbol por tal motivo, hace suponer que en México se pueden encontrar dos variedades diferentes (datos sin publicar).

La identificación de semillas de *J. curcas* no tóxicas es muy valiosa, pues no solo se puede utilizar el aceite para su transformación a biodiesel, sino que también se puede utilizar la pasta residual para la elaboración de alimentos balanceados. Este es el primer reporte de semillas no tóxicas provenientes del estado de Michoacán, anteriormente solo se tenía la evidencia de las semillas de Veracruz, Morelos, y Puebla (Martínez y col., 2006; Martínez y col., 2006b). No obstante, en un mismo estado pueden coexistir variedades tóxicas y no tóxicas, por lo cual se debe tener especial cuidado en identificar idóneamente el arbusto en el cual se realizó la colecta para evitar colectar semillas tóxicas.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de plantas de *J. curcas* identificadas como no tóxicas para Michoacán, además, que servirán para establecer semilleros en el Estado de Michoacán con el propósito de extraer el aceite de las semillas para convertirlo a biodiesel y utilizar la pasta residual para la elaboración de algún alimento balanceado.

AGRADECIMIENTO

Convenio de colaboración del CEPROBI-IPN con la Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Estado de Michoacán dentro del Proyecto Vinculado "Establecimiento del cultivo de *Jatropha curcas* en el estado de Michoacán para su aprovechamiento"

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

-Francis, G. Edinger R., Becker K. 2005. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of Jatropha plantations. Nat. Res. Forum 29, 12-24.

-Foidl, N., Foidl, G., Sanchez, M., Mittelbach, M., & Hackel, S. 1996. Jatropha curcas L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. Bioresource Technology, 58, 77–82.

-Makkar H.P.S.; Becker K., Schmook B. 1998. Edible provenances of *J. curcas* from Quintana Roo state of México and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. Plant Food for Human Nutr. 52, 31-36.

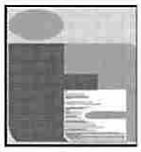
-Makkar H.P.S.; Becker K., Sporer F. y Wink M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of Jatropha curcas. J. Agric. Food Chem. 45, 3152-3127.

-Martínez-Herrera, J., Evangelista-Lozano, S., Martínez-Ayala, A.L. 2004. El piñón. Hypatia, No.12. Revista de Divulgación Científico-Tecnológica del Gobierno del Estado de Morelos.

-Martínez H.J. Siddhuraju P., Francis G., Dávila O.G., Becker K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chem. 96, 80-89.

Martínez-Herrera, J., Martínez-Ayala, A.L., Dávila-Ortíz, G. 2006b. El piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) Fuente de energía renovable. XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales y V Congreso Internacional de Ciencias Ambientales. Academia Nacional de Ciencias Ambientales y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

VALOR NUTRICIONAL DE UN PAN DULCE ELABORADO CON HARINAS COMPUESTAS, ENRIQUECIDO Y FORTIFICADO SEGÚN REQUERIMIENTOS DE INGESTA DIARIA VENEZOLANA, PARA GRUPO ETARIO ESCOLAR.



Ortiz, Maribel; Baragaño–Mosqueda, Mercedes y Pérez Elevina.
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA (UCV),
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (ICTA), FACULTAD DE CIENCIAS. CARACAS -VENEZUELA.
E. mail: zelmar@cantv.net

Palabras claves: Nutrición, pan, harinas compuestas, enriquecimiento, fortificación, hierro vitaminas.

RESUMEN

El objetivo principal del siguiente trabajo fue, fortificar y enriquecer un pan dulce de molde elaborado con harinas compuestas trigo/arroz (70/30% respectivamente), según fórmula panadera de Ortiz y Baragaño-Mosqueda (2006). A su vez, los panes fueron analizados, empleando metodologías oficiales en sus características físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales.

El pan se fortificó y enriqueció empleo una premezcla ferrovitamínica comercial, compuesta por tiamina (vitamina B_1), riboflavina (vitamina B_2), Niacinamida (vitamina B_3), acetato retinol (vitamina A) e hierro (en presentación electrolítica y fumarato ferroso). El porcentaje fijado, para el enriquecimiento y la fortificación fue del 20%, basado en los requerimientos de ingesta diaria (RID), para niños escolares venezolanos con grupo etario entre 7 y 9 años (INN, 2001).

Nutricionalmente, el pan dulce de molde de 52g. (ración permitida en niños, según la tabla de raciones de alimentos del INN, 2002), aporta 183,17 kilocalorías (Kcal), proteínas 25,63%, grasa 41,48% y carbohidratos 116,06%. En cuanto a vitamina A, se enriqueció un 13,48% y se fortifico en: hierro 24,89%, vitamina B_1 29,71%, vitamina B_2 22,29% y vitamina B_3 26,0%.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los estilos de vida, el alto costo de los alimentos, la falta de conocimientos de cómo obtener una alimentación balanceada a menor costo se ha convertido en uno de los grandes retos del consumidor. Cada día las personas están más concientes de que una buena alimentación contribuye a disminuir enfermedades; pero, en muchos casos, aunque se tenga conocimiento de cuales alimentos favorecen la salud, el presupuesto no permite acceder a ellos (INN, 2002). Es necesario que los principios nutritivos indispensables a la vida existan en las raciones y en proporciones convenientes, es decir, que haya cierto equilibrio entre los constituyentes de la ración.

Las necesidades energéticas y protídicas de los niños y de los adolescentes varían según la edad, y son muy superiores a las requeridas por un adulto. En el niño, a las necesidades habituales del desarrollo hay que añadir las necesidades suplementarias del crecimiento, según requerimientos establecidos; la formación de los tejidos nuevos exige, sobre todo, los suplementos de prótidos y los suplementos minerales. La vida celular, particularmente activa, exige igualmente importantes aportes de vitaminas y minerales.

En la actualidad, se ha vuelto común la práctica de enriquecer y fortificar el pan con ciertas vitaminas y minerales, como la tiamina y niacina, entre otras; considerándose un éxito para corregir, fortalecer, erradicar y prevenir enfermedades en la población, en especial la escolar (Reyes, 1995).

El enriquecimiento y la fortificación son dos términos que se usan, generalmente, para describir la adición de vitaminas, proteínas, minerales y otros nutrientes en los alimentos. El término enriquecimiento se usa para referirse a productos en los que se agregan nutrientes para de esta manera, acercarlos a la calidad nutricional de los alimentos tradicionales de los cuales son sustitutos o competencia. Por Ejemplo, la adición de vitaminas del complejo B en la harina blanca/refinada a tales niveles que equivalgan al contenido de estas vitaminas en la harina integral. En algunos casos, a esto también se le conoce como restauración. El término fortificación, que a veces se usa de manera intercambiable con el término enriquecimiento, se refiere a la adición de uno o más nutrientes esenciales sin importar si el alimento lo contenía originalmente o no. El propósito de ambos conceptos, consiste en prevenir o corregir una deficiencia nutricional en un sector de la población (López, 2000).

Una de las áreas más importantes a considerar, en el empleo de la tecnología de la fortificación y el enriquecimiento son los productos elaborados a partir de cereales. Esta categoría de alimentos constituye la mayor parte de la dieta de muchos países alrededor del mundo, lo que es mucho más evidente en países en desarrollo, ejemplo Venezuela. En Latino América, representan entre un 50% a un 70% del aporte calorífico de la dieta; es decir el enriquecimiento y la fortificación llega de esta manera a una buena parte de la población (FAO/WHO, 1994; citado por López, 2000).

La justificación de enriquecer y fortificar el pan con ciertas vitaminas y minerales, es debido a que durante la etapa de molienda de los cereales, un gran porcentaje vitaminas y minerales se pierden, ya que estas se encuentran principalmente en el pericarpio o salvado. Y como la población infantil es consumidora de pan dulce, la fortificación y el enriquecimiento de éste rubro garantiza el éxito de la población infantil al consumo del mismo, suministrando un 20%, aproximadamente, de los RID necesarios de hierro y vitaminas, a la población escolar. A su vez, estas suplementaciones, están orientadas a obtener productos de bajo costo para las poblaciones de escasos recursos y mayor valor nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El arroz, variedad Venezuela 21, se obtuvo a través del INIA-Portuguesa (variedad favorecida en anteriores estudios, realizados por Ortiz y Baragaño-Mosqueda, 2006) y fue convertido en harina según metodología de Pérez (1984) y La harina de trigo panadera, la premezcla ferrovitaminica y el resto de los ingredientes necesarios para elaborar en pan dulce, se obtuvieron del mercado local.

Métodos

Se elaboraron los panes dulces de molde de harinas compuestas trigo:arroz (70:30%), según metodología descrita por Ortiz y Baragaño-Mosqueda, (2006).y fueron evaluados en sus características físicas y químicas (COVENIN, 226-1988; AOAC ,1993 y AACC 1995), microbiológicas y sensoriales. Para los análisis microbiológicos se siguió la metodología señalada por la ICMSF (1981) y la norma COVENIN 1337 (1990). Se empleó agares PDA (agar potato dextrosa) y EMA (agar extracto de malta) con 0,5 ml cloranfenicol. La evaluación sensorial se llevo a cabo mediante escala hedónica facial de tres puntos, para evaluar el grado de aceptabilidad, previa planilla de consentimiento informado, según las normativas del Código de Bioética y Bioseguridad (2002) y Ortiz, M. (2006), las diferencias estadísticas se determinaron a un nivel de confianza de 95%.

Los mismos fueron enriquecidos y fortificados, aportando un 20% de los RID a una población entre 7 y 9 años, según la tabla de valores de energía y nutrientes de la población venezolana, definida por grupo de edad y sexo del INN 2001; considerando que el 80% restante de nutrientes son aportados por otros alimentos de la dieta diaria de los niños. Se tomó como base el valor del hierro, para el cálculo de los RID, por encontrarse el mineral y las vitaminas en presentación de premezcla ferrovitaminica y no por separado cada elemento. De la

premezcla ferrovitaminica, se agregó 174,78 mg/kg a la masa elaborada, para obtener un enriquecimiento aproximado del 20% de hierro por cada unidad de pan dulce de molde de 52g. El % de enriquecimiento de las vitaminas, dependerá de la cantidad expresada en la formulación de la premezcla, así como de la estabilidad durante el procesamiento. Se calcularon los % de enriquecimiento y los porcentajes de perdidas durante el proceso. Por cada 100g. de premezcla, contiene: 1.63g. de tiamina (vitamina B_1), 1.13g. de riboflavina (vitamina B_2), 26.12g. de Niacinamida (vitamina B_3), 4.655.567 U.I. de acetato retinol (vitamina A) y 26,70g. de hierro en mezcla electrolítica y fumarato ferroso. El hierro se determinó por absorción atómica (AACC, 1995) y las vitaminas por HPLC (AOAC,1995)

Diseño experimental: todos los análisis se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los panes obtenidos fueron evaluados en sus características físicas y físico-químicos (tabla 1). Por ser un producto de nueva tecnología, no pudo ser comparado con las normativas venezolanas para pan; sin embargo, los resultados obtenidos en los análisis evidenciaron que ni en los parámetros de la norma COVENIN 226 (1988), ni en los de la tabla de composición de alimentos del INN (2001) exceden los valores establecidos para ninguna de las presentaciones de pan que muestran; excepto en el valor proteico que se encuentra muy por encima del mínimo reportado (debido a los ingredientes en su formula panadera) y el índice de sólidos solubles (ISS), por ser un pan dulce.

Tabla 1.Análisis físicos y químicos del pan dulce de molde de harinas compuestas trigo/arroz Venezuela 21 (70:30), recién elaborado.

PARÁMETROS*	Pan Trigo:arroz (70/30%)
Humedad (%)	21,58 ± 0,08
Proteína cruda (%)	12,32 ± 0,38
Grasa cruda (%)	8,85 ± 0,13
Cenizas (%)	1,44 ± 0,03
Carbohidratos (%)	55,80 ± 0,31
Fibra cruda (%)	1,49 ± 0,09
pH	6,05 ± 0,01
Acidez titulable (mequiv/100g)	2,03 ± 0,13
IAA (g gel/g mtra.)**	2,24 ± 0,11
ISS (%)	22,32 ± 0,15

***: Los valores están expresados en base seca y son promedios de tres determinaciones.**

En cuanto al contaje de mohos y levaduras, de los panes dulces de molde de harinas compuestas trigo:arroz (70/30%), presentaron condiciones de estabilidad a lo largo del almacenamiento tanto en bolsas de plásticas (figura 1-A), tipo paquitas de 8 días y por más de 12 días en bolsas de papel (figura 1-B); debido a que los valores obtenidos se encontraron por debajo de lo establecido por la norma COVENIN 226 (1988). Este resultado, fue muy satisfactorio al considerar que el pan es un producto de poca vida útil y en especial porque el pan dulce de molde elaborado no posee ningún tipo de preservativo en su formulación, por ser un producto destinado a consumo de la población infantil, principalmente.

Figura 1. Panes almacenados en bolsa plástica (A) y bolsa de papel (B).

La evaluación sensorial aplicada al panel de 83 niños con grupo etario entre 7 y 9 años (no entrenados), empleando escala hedónica facial de 3 puntos fue estadísticamente del 100% de aceptación.

Si se observa la tabla 2, los valores teóricos calculados y los valores obtenidos por los análisis, se evidencia una diferencia, que indica que hubo pérdida durante el proceso en la elaboración del pan, dichas pérdidas se le podría atribuir que ocurrieron durante el proceso de fermentación o por la alta exposición de calor durante el horneado. Estos porcentajes de pérdidas, pueden ser mejorados, es decir, pueden ser minimizados, si el hierro y las vitaminas se añadieran por separado (individualmente), y no en por mezcla ferrovitamínica; ya que se podría lograr establecer los cálculos por separado de cada nutriente y no fijando un nutriente, como ocurrió en este ensayo que se fijo el hierro (Ortiz, 2006), es por ello que se evidencia que las pérdidas en el caso del hierro fueron menores.

Tabla 2. Vitaminas y minerales, que aportan 100g de pan dulce de molde de harinas compuestas trigo:arroz Venezuela 21 (70:30%), sin enriquecer y ni fortificar. Aporte teórico y aporte real de análisis en fortificación y enriquecimiento y porcentaje de pérdidas al final del proceso de cocción.

Vitaminas y minerales	Contenido en 100g de pan sin enriquecer, ni fortificar	Contenido en 100g de pan enriquecido y fortificado que debería presentar en teoría	Contenido en 100g de pan enriquecido y fortificado cuyos valores son los obtenidos por los análisis	% de pérdida durante la fermentación y/o cocción del pan
Hierro	5,50 mg	7,15 mg	6,70 mg	6,29
Vitamina A	0 ER***	345,03 ER	181,5 ER.	47,4
Vitamina B_1	0,12 mg	0,49 mg	0,0,40 mg.	18,37
Vitamina B_2	0,16 mg	0,44 mg	0,30 mg.	30,83
Niacinamida (B_3)	1,7 equivmg	7,55 equivmg	4,50	40,44

*** : RID: Requerimiento de Ingesta Diaria, para niños entre 7 y 9 años.**

**** : INN: Instituto Nacional de Nutrición, 2000.**

***** : ER: equivalentes de retinol.**

******: Se fijo el hierro, por encontrarse las vitaminas y el mineral en una premezcla ferrovitaminica.**

Ahora bien, la tabla 3, muestra los valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana según el INN (2001), en los que se observan los valores de ingesta diaria recomendados para niños en edad escolar entre 7 y 9 años de edad, en los parámetros evaluados y muestra que el valor teórico fijado del hierro fue del 20%, para 1 unidad de pan dulce de molde de harinas compuestas trigo:arroz (52g.), observando que se obtuvieron excelentes porcentajes en la práctica. Notese, que el enriquecimiento de la vitamina A fue de 13,48% (menor a lo teórico establecido), sin embargo se logro el enriquecimiento en parte, gracias a la microencapsulación de la vitamina A, para resistir a las altas temperaturas de cocción del pan.

Tabla 3. Enriquecimiento y fortificación por unidad de pan (52g.) dulce de molde de harinas compuestas trigo:arroz Venezuela 21 (70:30%), según el RID* para niños entre 7 y 9 años.

Vitaminas y minerales	RID/día Según INN**	Aporte fijado en % en 52g. de pan (en teoría)	Aporte en 52g. de pan enriquecido y fortificado)	Aporte en %, en 52g. de pan en relación al RID (en la práctica)
Hierro	14 mg	20 %****	3,38 mg	24,89
Vitamina A	700 ER***	-	94,38 ER.	13,48
Vitamina B_1	0,7 mg	-	0,21 mg.	29,71
Vitamina B_2	0,7 mg	-	0,16 mg.	22,29
Niacinamida (B_3)	9,0 equivmg	-	2,34 mg.	26,00

*** : RID: Requerimiento de Ingesta Diaria, para niños entre 7 y 9 años.**

**** : INN: Instituto Nacional de Nutrición, 2000.**

***** : ER: equivalentes de retinol.**

******: Se fijo el hierro, por encontrarse las vitaminas y el mineral en una premezcla ferrovitaminica.**

En la tabla 4, se muestran los valores calóricos del pan dulce de molde de harinas compuestas trigo:arroz Venezuela 21 (70:30%). Se reportan los valores en 52g de pan (1 unidad completa o entera del pan dulce de molde trigo:arroz Venezuela 21), presentando 183,17 Kcal/unidad de pan; valores éstos superiores a los establecidos por INN, 2001. Aunado a ello, según reportes del CANIA (Centro de Atención Nutricional Infantil de Antímano) 2002, en la tabla de raciones para una

población infantil, la unidad de pan dulce (52g.) es ubicado como un alimento de mediana ración.

Tabla 4. Aporte Calórico del pan dulce de molde de harinas compuestas trigo:arroz (70:30%).

PARÁMETROS	Valores en 100g pan	*Kcal. en 100g de pan	Kcal. en 52g. de pan (1 unidad)
Proteína cruda (%)	12,32	49,28	25,63
Grasa cruda (%)	8,85	79,65	41,48
Carbohidratos totales (%)	55,80	223,20	116,06
Kcal. Totales		352,13	183,17

***Kcal = Cal: Kilo calorías (para obtener las Kcal: las proteínas X 4, las grasas X 9 y los carbohidratos X 4).**

CONCLUSIONES

Los resultados tanto fisicoquímicos como microbiológicos evidencian la estabilidad del pan en el tiempo estudiado.
Se logro enriquecer el pan dulce, con vitamina A en un 13,48%, gracias a la microencapsulación de la vitamina. El porcentaje de pérdida al enriquecer con hierro y vitaminas, fue dependiente de cada nutriente; el hierro fue el que arrojó menor pérdida (6,29%) en comparación con las vitaminas; por ser el nutriente que se fijó para procesar los cálculos en la premezcla ferrovitamínica. El pan dulce de molde enriquecido y fortificado fue aceptado por los niños en un 100%. El aporte calórico por unidad pan (52g.) o ración es de 183.17 Kcal., superando los requerimientos calóricos establecidos en las tablas del INN.

RECOMENDACIONES

La tecnología para elaborar el pan dulce de molde de harinas compuestas trigo/arroz (70:30%) con enriquecimiento y fortificación, se recomienda a panificadoras industriales o a pequeño nivel, por los resultados obtenidos, en cuanto a su buena calidad nutricional, sabor, esponjosidad y buenas condiciones de almacenamiento. También es recomendado para fortificar o enriquecer con otros minerales y vitaminas como ácido fólico, por ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

- Ing. Bruzual, Zeldivar. Facultad de Ingeniería -UCV.
- Dra. Baragaño-Mosqueda, Mercedes (Tutora). Facultad de Ciencias -UCV - ICTA.
- Universidad Central de Venezuela (UCV). Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA).

BIBLIOGRAFÍA

AACC. 1993 y 1995. American Association of cereal Chemists. Approved methods of the AACC (formerly Cereal laboratory methods, 7ma ed.). The Association St.

AOAC. 1995. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis of the Official Analytical Chemists International. Ed. 17ª. Editor Horwitz, W. Vol. I y II. Washington DC. EUA.

CÓDIGO DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD. 2002. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2da. Ed. Coordinadora, Soc. Eva Briceño.

COVENIN 226. 1988. Pan. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Producción y Comercio. Caracas. Venezuela. FONDONORMA.

COVENIN 1337. 1990. Hongos y Levaduras. Comisión Venezolana de Normas industriales. Ministerio de Producción y Comercio. Caracas. Venezuela. FONDONORMA.

ICMSF. 1981. Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos. Principios y aplicaciones específicas. Vol. 2. Edit. Acribia. Zaragoza

INN. 2001. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población Venezolana. Serie cuadernos azules. Revisión 2000. Publicación Nº 53. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Instituto Nacional de Nutrición. Caracas Venezuela. 76 p.

INN. 2002. Nutrición comunitaria. Serie: Capacitación a nivel comunitario. Revisión 2001. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Instituto Nacional de Nutrición. Caracas Venezuela. 31 p.

MOSQUEDA-BARAGAÑO, M.; GUERRA, M. y RIVERO de, M. 1986. Los cereales en el patrón alimentario del venezolano. Taller de trabajo. Comisión Coordinadora de Investigaciones en Alimentos y Nutrición. Colonia Tovar. Venezuela.

ORTIZ, M. 2006. Influencia de las diferencias varietales de arroz (*Oryza sativa* L.) en la calidad del pan dulce trigo-arroz. Enriquecimiento con hierro y vitamina a para niños en edad escolar. Trabajo especial de grado de Maestría. MOSQUEDA-BARAGAÑO, M. (tutora). Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas.

PEREZ, E. 1984. Evaluación del comportamiento reológico de las harinas de arroz, maíz y yuca sometidas a diferentes tratamientos. Tesis. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas.

REYES, A. 1995. Alimentos extruidos a base de las mezclas de maíz, amaranto y arroz. Su enriquecimiento con vitaminas y minerales. Acción de la extrusión sobre el valor nutritivo de los productos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas.

REYES, C.; MILÁN, J.; ROUZAUD, O.; GARZÓN, J., MORA, R. 2002. Descascarillado/ suavización/ extrusión (DSE): alternativa tecnológica para mejorar la calidad nutricional del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Agrociencia 36: 181-189.

AVALIAÇÃO DE AGENTES DESINFETANTES FRENTE A *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498

[1]Cristiana de Paula Pacheco Sanchez, Wilson Pedro Tamega Júnior, José Orlando Ferreira, Marcos de Freitas Barbosa e Pilar Rodríguez de Massaguer. [1]Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua monteiro Lobato, 80- CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil. [1]pacheco@fea.unicamp.br.

Palavras-chave: Ciência de Alimentos, laranja, desinfecção, Alicyclobacillus acidoterrrestris

RESUMO

A avaliação da ação desinfetante de diversos produtos foi realizada a fim de estabelecer o mais eficiente frente a *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Para tanto foram procedidos os testes de halo e de Time-kill frente a células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498. Os sanitizantes comerciais avaliados foram: BP610, Kilol-L, Vortexx ES, Tsunami 100, Tecsa-clor e Dióxido de cloro (gás). Foi considerado que a eficiência dos produtos é comprovada quando o sanitizante for capaz de promover quatro reduções decimais na população de esporos de *A. acidoterrestris*. A partir dos resultados destes testes foram selecionados os desinfetantes Dióxido de cloro e Vortexx ES, mais eficientes, para realizar o ensaio de determinação de Mínima Concentração Inibitória (MIC). A mínima concentração inibitória do Vortexx ES foi de 1,25% e de 10ppm para o Dióxido de Cloro frente aos esporos *A. acidoterrestris*. Como esporos de bactérias podem permanecer aderidos na superfície de equipamentos, estas concentrações foram utilizadas no ensaio de ação esporicida da AOAC realizada em carregadores de aço inox. Finalmente, considerando os resultados dos testes de MIC, Time Kill e atividade esporicida, o sanitizante mais adequado para desinfecção de *A. acidoterrestris* foi o Vortexx ES 1,25% (57/60). Apesar da fraca atividade esporicida com possibilidade de corrosão das tubulações, 10ppm (1/60) de dióxido de Cloro após 1 minuto de contato, a 50°C, foi sugerido como segunda opção.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, muitas bactérias termoacidofílicas e esporuladas foram isoladas de sucos de frutas (McIntyre *et al*, 1995) implicando em acidificação e deterioração do produto. Dentre elas foi isolada e identificada a espécie *Alicyclobacillus acidoterrestris.*. Esta bactéria possui ácidos graxos ω-alicíclicos em sua membrana, é capaz de crescer em pH variando de 2,5-6,0 e temperatura de 25-60°C (Yamasaki *et al*, 1996). Apesar de não apresentarem patogenicidade, sua presença no produto final é indesejada, pois alteram as propriedades sensoriais do suco (odor e sabor) pela produção de compostos fenólicos (2-6-dibromofenol e guaiacol), sem produção de gás, resultando em rejeição do consumidor (Baumgart *et al*, 1997). Esporos podem se originar do solo e, por isso, sua ocorrência no produto final pode ser resultante do uso de frutas coletadas do solo e inadequadamente lavadas durante o pré-processamento. Além disso, esporos de *Alicyclobacillus* são resistentes ao calor, em condições ácidas, sobrevivendo aos tratamentos convencionais de pasteurização e enchimento a quente, aplicados a produtos de frutas (Previdi *et al*, 1997). No entanto, ainda existem poucas pesquisas na literatura sobre o tema de controle de contaminação e desinfecção de *Alicyclobacillus*. Fica evidente que a qualidade da matéria prima e as condições higiênicas do processo e, em especial, da lavagem da fruta, são de primordial importância para reduzir o risco de presença de esporos no produto final, e da sua provável germinação. Assim, este estudo propõe avaliar, *in vitro* a ação desinfetante de diversos produtos a fim de eliminar o potencial deteriorante, de cítricos, *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura. Foi utilizada a cultura padrão *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498, do Laboratório de Termobacteriologia da UNICAMP, para produção das suspensões de células vegetativas e esporos utilizados neste estudo.

Teste de halo (WHO, 1999). Seis sanitizantes foram selecionados para avaliação da sua eficiência *in vitro*, frente a esporos e células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em condições sugeridas pelos fabricantes, (Tabelas 1 e 2). No teste de halo, discos de papel filtro de diâmetro 0,6cm foram impregnados com os sanitizantes a serem testados. Um volume de 0,2mL da suspensão de células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ajustada a 10^6 UFC/mL, foi inoculado em superfície, mediante espátula de Drigalski, no meio BAT (Meio *Alicyclobacillus acidoterrestris* - Merck) solidificado em placas de Petri. Após a secagem do inóculo, 3 discos impregnados com o sanitizante de interesse, foram posicionados em cada placa. Em seguida, as placas foram incubadas a 50ºC por 24 a 48 horas. A extensão da difusão do antimicrobiano foi estabelecida entre a borda externa do disco e a borda do crescimento do microrganismo na placa. Quando o sanitizante demonstrava ação bacteriostática, havia formação de um halo ao redor do disco caracterizando a zona de inibição. O diâmetro da cada zona foi medido em três direções.

Tabela 1: Dados dos sanitizantes testados

Sanitizante concentração recomendada (fabricante)	Princípio ativo	Utilização a 50°C	Obs.:	Neutralizante, concentração
BP 610 0.5 % p/v (Ipel)	Quaternário de Amônia + glutaraldeído + guanidina	Sim	Perde eficiência após 2 a 3 h a 50°C, pois o gluteraldeído começa a se degradar.	Tween 80 a 3% + lecitina 0.3%, proporção de uso 1: 9 de neutralizante
Tecsa-clor 5 ppm, 25ppm, 50ppm (Setquimico Ltda.)	Dióxido de cloro estabilizado	Sim		Não há, pois não deixa residual
Vortexx ES 0.5 % v/v (ECOLAB)	Ácido peracético (12 a 16%), ácido peroctanóico, peróxido de hidrogênio (3 a 5%), ácido acético, tensoativo aniônico	Sim	Temperatura limite, acima disso a degradação se torna muito forte	Tiosulfato de sódio a 0.1 N. 0.1 ml neutralizam 1ml de sol a 1000 ppm de ac. peracético
Tsunami 100 + P3 Oxonia Ativo 0.2 % p/v (ECOLAB)	Peróxido de hidrogênio (15.7% min), ácido peracético (13.5% min) e ácido acético	Sim	Temperatura limite, acima disso a degradação se torna muito forte	Tiosulfato de sódio a 0.1 N. 0.1 ml neutralizam 1ml de sol a 1000 ppm de ac. peracético
Dióxido de cloro (gás) 5 ppm, 40ppm, 120ppm (Prominent)	Dióxido de cloro	Sim		Metabisulfito de sódio, proporção estequiométrica 2.8 partes de Metabisulfito para cada parte de ClO_2
Kilol 5 ppm (Quinabra)	Ácidos ascórbico, cítrico e lático	Sim	Estável até 80°C	Tween 80 a 0.5% v/v + lecitina 0.01%, dissolvido em salina peptonada (0.85% NaCl +0.1% de peptona) proporção de uso 1 : 1 de neutralizante,

Tabela 2. Padronização das concentrações dos desinfetantes

Sanitizante e concentração recomendada	Princípio ativo	Concentração do princípio ativo no produto	Diluição	CONCENTRAÇÃO (PPM) DE PRINCÍPIO ATIVO
BP 610	Quaternário de Amônia + glutaraldeído + guanidina (ação sinérgica)	17 ± 1%	0.5% p/v	900
Kilol (Quinabra)	Ácidos ascórbico, cítrico e lático (ação sinérgica)	1.975 %	5 ppm	0.09875
Tecsa-clor	Dióxido de cloro estabilizado	5%	5 ppm	0.25
Tecsa-clor	Dióxido de cloro estabilizado	5%	25 ppm	1.25
Tecsa-clor	Dióxido de cloro estabilizado	5%	50 ppm	2.5
Vortexx ES	Ácido peracético	12.0 a 16.0%	0.5 % v/v	800
Tsunami 100	Ácido peracético	13.5 a 15.0%	0.2 % p/v	300
Dióxido de cloro (gás)	Dióxido de cloro	N/A	5 ppm	5
Dióxido de cloro (gás)	Dióxido de cloro	N/A	40 ppm	40
Dióxido de cloro (gás)	Dióxido de cloro	N/A	120 ppm	120

Ensaio de Time Kill (Eguchi *et al.*1999). Dois tubos 16x150mm contendo 9 ml de água destilada estéril (controle) e 9 ml da solução sanitizante a ser testada, respectivamente, foram submetidos a aquecimento em banho termostático de água regulado a 50°C, simulando a temperatura de aplicação em planta industrial. Após atingirem a temperatura desejada cada um dos tubos foi inoculado com $1,86x10^6$ esporos de *A. acidoterrestris*. O tempo de contato, a 50°C, foi de 5 minutos. Após o tempo de contato uma alíquota foi neutralizada conforme estabelecido pelos fabricantes de cada sanitizante (Tabela 1); contudo, o tempo de neutralização foi padronizado em 2 minutos. Após a neutralização, o tubo sem o sanitizante e os tubos de neutralização foram colocados em banho termostático de óleo, ajustado a 80°C, para choque térmico de ativação dos esporos remanescentes, por 10 min (IFU, 2004). Em seguida, os tubos foram retirados do banho de óleo e imediatamente resfriados em banho de gelo por 2 minutos, para reduzir a sua temperatura até 25°C. Foram realizadas diluições decimais sucessivas até 10^{-6}, seguidas de plaqueamento em profundidade em meio BAT (duplicata). As placas foram então incubadas a 50°C/10 dias, e as contagens realizadas no quinto e décimo dias de incubação (Nf). O resultado deste teste é expresso em número de reduções decimais ocasionadas pelo agente sanitizante em função da concentração do microrganismo no tubo controle (No). O número de reduções decimais foi calculado como Log No/Nf.

Determinação da Mínima Concentração Inibitória – MIC (Massaguer, 2006). Foram testadas três concentrações (1,25%; 2,5% e 5%) de Vortexx ES sob o seguinte procedimento: em cada tubo vazio, foram adicionados 4,5ml do sanitizante, na concentração de teste, e num último tubo 4,5ml de água estéril (controle). Todos os tubos foram aquecidos em banho de água à 50°C por 2 minutos e 20 segundos (tempo de atraso térmico). Após este período, quando os tubos atingiram 50°C, foi adicionado 0,5ml de uma suspensão 10^7esporos/ml de *A. acidoterrestris* em cada um dos tubos. Após 1 minuto de contato, foi retirado 2,5 ml de cada tudo, exceto da solução controle, e transferido para tubos com 2,5 ml da solução neutralizante (Tabela 1). Após 2 minutos de neutralização, todos os tubos receberam choque de ativação em banho de óleo à 80°C por 10 minutos (IFU, 2004). Na seqüência, os tubos foram retirados do banho de óleo, e colocados em banho de óleo, durante 1 minuto. À temperatura ambiente, foi retirado 1ml de cada tudo, e passado para tubos contendo 9 ml de caldo BAT em duplicata. Os tubos foram incubados à 50°C durante 5 e 10 dias. Após o período de incubação foi observada a presença de turbidez que indicou o crescimento. A menor concentração do sanitizante onde não houve crescimento foi considerada a MIC. Para o dióxido de cloro (5ppm e 10ppm) o ensaio seguiu o mesmo protocolo com exceção do neutralizante (Tabela 1).

Determinação da atividade esporicida de desinfetante (AOAC, 1995). Este teste utiliza carregadores de aço inox (l10xOD8xID6mm) para simular a superfície de equipamentos onde esporos podem ser aderidos. Os sanitizantes avaliados foram Vortexx ES a 1,25% e Dióxido de cloro a 10 ppm. Os carregadores foram esterilizados em estufa a 180°C/2h. Depois de frios, foram lavados com uma solução de Triton X e enxaguados até remoção completa da solução. Os carregadores secos foram colocados em Placa de Petri forrada com camada dupla de papel filtro e esterilizados à 121°C/30 min. Para contaminação dos crregadores, foi preparada 70ml de uma suspensão de *Alicyclobacillus acidoterrestris* 10^6 esporos/ml. Em tubos 25x200mm esterilizados foram adicionados 10ml desta suspensão (num total de 7 tubos). Em 6 tubos, foram adicionados, com o auxílio de uma pinça estéril, 10 carregadores previamente esterilizados, e no sétimo apenas 5 carregadores, sendo estes utilizados para o teste de viabilidade da cultura. Após 15 minutos de contato, os carregadores foram retirados com o auxílio de uma pinça estéril, e colocados em placas estéreis contendo camada dupla de papel filtro, e levados à estufa à vácuo (62mm de Hg) por 30°C/24hs. Para desinfecção, 12 tubos 16x150mm esterilizados, foram adicionados de 10 ml de uma solução do sanitizante de interesse. Em cada tubo, foram adicionados 5 carregadores previamente contaminados e secos. Estes tubos foram aquecidos em banho de água à 50°C, e após todos os tubos atingirem esta temperatura, foi procedido 1 minuto de contato. Após a ação do sanitizante, cada carregador foi passado para 1 tubo 16x150mm contendo 9 ml de neutralizante (Tabela 1), com o auxílio de uma pinça estéril. Depois de 2 minutos de contato cada carregador foi transferido para um tubo 16x150mm contendo 9 ml de Caldo BAT. Os tubos foram incubados a 50°C por 10 dias. Após o período de incubação, foi observado o crescimento do microrganismo por turbidez do tubo. Os 5 carregadores utilizados para o teste de viabilidade não sofreram sanitização, sendo transferidos para Caldo BAT e incubados a 50°C por 10 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de halo mostram que apenas um composto, o BP 610, tem ação bacteriostática frente a células vegetativas de *A. acidoterrestris* (Tabela 3), apresentando uma zona de inibição de tamanho intermediário. É conhecido que os quaternários de amônia podem exibir ação bioestática de inibição. Temos ainda que este é o único composto que não se volatilizou a 50°C. No ensaio de Time Kill, a ação biocida de BP 610, frente a esporos, foi limitada a apenas 2 ciclos logarítmicos (Tabela 4). Já os compostos Tecsa Clor 5ppm e Kilol foram os menos eficientes causando apenas 1 redução decimal de destruição dos esporos. O Tecsa Clor 25ppm também não atingiu o limite de eficiência, pois causou apenas 3,5 reduções decimais (Tabela 4).

Tabela 3: Medida da zona de inibição efetiva para *A. acidoterrestris* DSM2498 frente aos sanitizantes

DESINFETANTE	Média da placa (cm)	Média da placa (cm)	Média Final - zona de inibição efetiva (cm)
BP 610 0.5% p/v	1.40	1.09	**1.25**
Kilol-I 5ppm	0	0	**0**
Tsunami100 0.2% p/v	0	0.02	**0.01**
Vortexx ES 0.5% v/v	0.08	0.02	**0.05**
Tecsa-clor 5ppm	0	0	**0**
Tecsa-clor 25ppm	0	0	**0**
Tecsa-clor 50ppm	0	0	**0**
Dióxido de cloro 40ppp	0	0	**0**
Dióxido de cloro 120ppm	0	0	**0**

Tabela 4: Resultados do ensaio de time kill para esporos de *A. acidoterrestris* DSM2498 com inoculo de $1,86x10^6$ esporos/mL; tempo de contato:5 minutos; Temperatura: 50°C; Meio de subcultura: BAT

Tempo de incubação (dias)	Nº de tubos inoculados	Nº de tubos negativos	Nº de tubos positivos*
2	60	5	55
4	60	5	55
6	60	1	59
10	60	1	59
Obs. todos os 5 tubos de viabilidade foram positivos			

Comparando os nossos resultados com o estudo de Gray *et al*, 2002 onde uma linhagem de *Alicyclobacillus*, não especificada, sofreu 4,4 reduções decimais da população em 5 minutos de contato com 40 ppm de dióxido de cloro livre; em nossos testes, obtivemos resultados maiores que 6,87 reduções. Para tratamentos com 120 ppm de dióxido de cloro, os autores obtiveram mais de 5,4 reduções decimais, ainda menores que os nossos resultados. Estes pesquisadores confirmam a alta eficiência de dióxido de cloro no controle de esporos de *A. acidoterrestris*. Previdi *et al*, 1999 observaram menos de uma redução decimal na população de *A. acidoterrestris* 278/B quando aplicaram P3 Oxônia ativo a 0,5 e 1%, com o mesmo princípio ativo (ácido peracético) que o Vortex ES e o Tsunami. O tempo de contato utilizado pelos respectivos pesquisadores foi de 5 minutos, com concentração de 0,5% e temperatura de 40°C. Utilizando o Vortexx ES e o Tsunami neste estudo, foi obtido resultado satisfatório para a destruição de esporos (mais de 5,6 e 4,85 reduções decimais, respectivamente) na mesma concentração de sanitizante utilizada por Previdi *et al*, 1999, porém a 50°C. A importância da temperatura de aplicação na

potencialização da atividade esporicida do ácido peracético e do peróxido de hidrogênio deve ser destacada. No entanto, o uso de temperaturas acima de 50°C para desinfetantes que usam ácido peracético como principio ativo não são recomendadas, pois levam a uma acelerada descomposição do ácido (ECOLAB, 2001). Orr *et al,* 2000 estudaram o efeito do tratamento com Tsunami a 23°C por 10 minutos de contato, na desinfecção de *Alicyclobacillus* e encontraram menos de uma redução decimal ao usar 160ppm do sanitizante (0,1 % p/v), indicando que este composto não foi eficiente como esporicida. Além disso, a atividade do acido peracético é maior a pH ácido, pois potencializa a formação de peracetato (). Os resultados com Tsunami foram satisfatórios, causando 4,85 reduções decimais e confirmando alta eficiência, com 0,2% p/v do composto, conforme recomendação do fabricante.

Tabela 5 Resultado do teste de carregadores com Vortexx ES a 1,25 % v/v (ação esporicida) frente a esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 por 1 minuto a 50°C

Sanitizante	Concentração	Contagem população inicial Controle – No (esp/mL)	Contagem de sobreviventes após ensaio – Nf (esp.mL)	N° de reduções decimais
BP 610	0.5% p/v	1.80E+06	1.18E+04	2.18
Tsumani	**0.2 % p/v**	**1.06E+06**	**1.50E+01**	**4.85**
Kilol	5 ppm	2.46E+06	4.30E+04	1.76
Vortex ES	**0.5 % v/v**	**4.00E+05**	**<1**	**>5.60**
Tecsa Clor	5 ppm	1.23E+06	9.70E+04	1.10
Tecsa Clor	25 ppm	1.23E+06	3.90E+02	3.50
Tecsa Clor	**50 ppm**	**1.23E+06**	**<1**	**>6.09**
Dióxido de Cloro	**5 ppm**	**7.35E+06**	**7.20E+02**	**4.01**
Dióxido de Cloro	**40 ppm**	**7.35E+06**	**<1**	**>6.87**
Dióxido de Cloro	**120 ppm**	**7.35E+06**	**<1**	**>6.87**

Segundo a AOAC, 1996 um agente esporicida será considerado eficaz se não apresentar mais do que 1 tubo com turvamento (crescimento positivo) em 60 tubos contendo carregadores (AOAC,1996). Pode-se então afirmar que este sanitizante tem ação esporicida eficaz, com 95% de certeza, na tarefa de eliminar totalmente a carga de esporos aderida nos carregadores. De acordo com isto, a partir de uma contaminação de $1{,}0x10^4$ esp/carregador, o Vortexx ES 1.25% v/v apresentou melhor ação esporicida que o Dióxido de Cloro a 10ppm, quando o microrganismo está aderido a superfícies sólidas (Tabela 5). Observa-se que no caso do Dióxido de Cloro (Tabela 6), o produto não é efetivo para remover contaminação aderida em superfícies apesar de sua eficiência ter sido verificada para A*licyclobacillus acidoterrestris* em meio fluído.

Tabela 6: Resultado do teste de carregadores com Dióxido de cloro 10 ppm (ação esporicida) frente a esporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 por 1 minuto a 50°C

Tempo de incubação (dias)	N° de tubos inoculados	N° de tubos negativos	N° de tubos positivos*
3	60	60	0
5	60	60	0
7	60	59	1
10	60	57	3
Obs. todos os 5 tubos de viabilidade foram positivos			

CONCLUSÕES

Considerando os resultados de todos os ensaios, o sanitizante mais adequado para desinfecção de *A. acidoterrestris* foi o Vortexx ES 1,25%,. Apesar da fraca atividade esporicida em meio sólido e da possibilidade de maior corrosão das tubulações, 10ppm de dióxido de Cloro após 1 minuto de contato a 50°C foi sugerido como opção para desinfecção em meio líquido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. 1996. Método Oficial 966.04 – Esporocidal Activity of Desinfectants 6: 12-13.

Baumgart, J.; Husemann, M.; Schmidt,C.1997. *Alicyclobacillus acidoterrestris:* occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. Fluss. Obst. 64: 178-180.

ECOLAB. 2001. Vortexx ES. Apresentação e divulgação do produto.

Eguchi, S. Y., Manfio, G. P., Pinhatti, M. E., Azuma, E., Variane, S. F. 1999. *Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices: Detection Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices.* Report of the Research Project, Campinas.

Gray, P.M.; Kang, D.H.; Dougherty, R.H. 2002. Controle em *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores with chlorine dioxide on laboratory medium and apples. Apresentado no Annual Meeting and Food Expo – Anaheim, California.

IFU - International Federation of Fruit Juice Producers. 2004. First Standard IFU-Method on the detection of *Alicyclobacillus* in Fruit Juices. Method 12:1 – 6.

Massaguer,P.R.2006. Microbiologia dos processos alimentares. 258p.

McIntyre, D.; Ikawa, J.Y.; Oarkinson, N.; Haglund, J.; Lee, J. 1995. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strains isolated from shelf-stable juices. J. Food Prot. 58: 319-321.

Previdi, M.P.; Quintavalla, S.; Lusardi, C.; Vicini, E. 1997. Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices Ind. Conserve, 72(4): 353-358.

Previdi, M.O.P.; Lusardi, C.; Vicini, E. 1999. Resistance of *Alicyclobacillus* spp. Spores to a disinfectant. Industria Conserve, 74(3): 231-236.

Orr, R.V.; Beuchat, L.R. 2000. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. Journal of Food Protect. 63(8): 1117-1122

WHO. 1990. Guidelines for surveillance and control of antimicrobial resistance. Ed. por W. J. Brinley Morgan. Yamasaki, K., Teduka, H.; Shimano, H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 543-545.

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y DETERMINACIÓN DE 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURALDEHÍDO (HMF) EN LECHES COMERCIALES COLOMBIANAS

Rada-Mendoza, Maite del Pilar y Rojas Fernández, Sandra Patricia
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA. Grupo de investigación: BICAMSA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS y DE LA EDUCACIÓN
Calle 5 No. 4-70. Sector Tulcán. E-mail: mrada@unicauca.edu.co
POPAYÁN (CAUCA)-COLOMBIA

Palabras clave: nutrición y control de calidad, hidroximetilfurfural, leches UHT comerciales, parámetros microbiológicos.

RESUMEN

El 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído, es un aldehído y derivado furánico que se forma durante los procesos que involucran altas temperaturas, tales como son la deshidratación y la degradación térmica de las hexosas; además, actúa como intermediario en la formación de pigmentos en las etapas más avanzadas de la reacción de Maillard, y por ello, se puede utilizar como un indicador del deterioro térmico. Ha sido identificado en una amplia variedad de alimentos procesados térmicamente, entre los cuales se encuentra la leche.

En este estudio se implementó la técnica de espectrofotometría UV-Vis y se determinó la concentración de HMF en diferentes tipos de leche UHT colombianas enteras, semi-descremadas, descremadas, deslactosadas, enriquecidas con vitaminas, minerales y fibra, disponibles comercialmente; se encontraron niveles de HMF comprendidos entre 4,3 y 27,8 mg/mL. Estas leches también fueron caracterizadas microbiológicamente y se estableció su calidad higiénica, teniendo en cuenta la reglamentación colombiana (ICONTEC).

Como criterio de confianza del método, se determinó la exactitud, la precisión, la linealidad y los límites de detección y cuantificación.

INTRODUCCIÓN

La leche es el líquido segregado por la glándula mamaria, producto del ordeño (manual ó mecánico), ininterrumpido de animales sanos (Gaviria y Bernal, 1993); contiene la mayoría de los elementos necesarios para el organismo y componentes únicos que la hacen imprescindible para una correcta nutrición, entre los cuales se encuentran agua, proteínas, carbohidratos, una compleja mezcla de lípidos, vitaminas y minerales, en una proporción que varía de acuerdo a factores tales como raza, alimentación, época de lactancia ó del año, etc. El constituyente característico que la distingue de cualquier otro alimento es la lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranosa) (Badui, 1989). Por su composición la leche, además de ser un excelente alimento para el hombre, es un caldo de cultivo ideal para diversos microorganismos; por ello, se hace necesario asegurar que la leche vendida para el consumo humano, sea un producto sano que conserve bien su calidad. Para lograr esto, se deben desarrollar sistemas de manejo y procesado que destruyan todos los microorganismos patógenos y prolonguen la vida útil del producto, siendo el método más eficaz el tratamiento térmico, ya sea mediante procedimientos de pasteurización, ultra-pasteurización (UHT) ó esterilización (Garza, 1998). A pesar de que los tratamientos térmicos son necesarios para garantizar una leche de óptima calidad, tienen la desventaja de que ocasionan modificaciones en los componentes de la misma; así, por ejemplo la lactosa, es propensa a sufrir alteraciones como consecuencia del calentamiento, tales como: reacción con grupos aldehídicos ó aminados (reacción de Maillard) (Morales et al., 1997) y descomposición con formación de ácidos orgánicos (fórmico, láctico, acético, pirúvico y propiónico) (Badui, 1989), que disminuyen el valor nutritivo de la leche.

Uno de los productos intermediarios más estudiados de la reacción de Maillard es el HMF, producto de la degradación de las hexosas y un reconocido indicador de calentamiento, que conduce a la formación de pigmentos oscuros denominados melanoidinas (Boekel, 1998). El HMF ha sido determinado en una gran variedad de alimentos sometidos a procesos de calentamiento ó de almacenamiento inapropiado y prolongado, tales como leche y productos lácteos (Morales et al., 1997; Boekel, 1998), miel (Sanz et al., 2003; Viñas et al., 1992), jugos de frutas (Blanco et al., 1991), fórmulas infantiles (Guerra-Hernández et al., 2002; Chávez-Servín et al., 2005, 2006; Ferrer et al., 2002; Rada et al., 2004), cerveza (Bravo et al., 2002), entre otros; dentro de estos, los productos lácteos son susceptibles al pardeamiento no enzimático durante los tratamientos térmicos a los que se someten, lo cual se debe básicamente a su elevado contenido de lactosa y de lisina; a pesar de que la lactosa es un reductor débil, puede interaccionar con la lisina presente en las proteínas de la leche durante el almacenamiento por varios días (Valero et al., 2001). Los métodos empleados para la determinación del HMF, han incluido desde técnicas colorimétricas y espectrofotométricas hasta polarográficas y cromatográficas (Bonvehi, 2000). Para establecer que una leche es apta para el consumo humano, es necesario verificar la calidad de la misma, llevando a cabo una caracterización microbiológica, cuyos valores deben estar de acuerdo con lo reportado en las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos (Decreto 476 de 1998) (ICONTEC, 1998). Las determinaciones microbiológicas detectan las bacterias patógenas y la presencia de antibióticos (Rivera, 1995); dentro de éstas se encuentran: la prueba de reductasa, que evalúa la cantidad de bacterias en la leche y por tanto la calidad de su conservación, basándose en la capacidad reductora de las bacterias en presencia de sustancias reductoras como el azul de metileno, y la prueba de fosfatasa, que permite verificar rápidamente si la leche ha sido efectivamente privada de todos los gérmenes patógenos que pudiera contener antes de ser pasteurizada (Veisseyre, 1980).

El objetivo de este trabajo es presentar los valores obtenidos de las concentraciones de HMF y de la caracterización microbiológica de las leches comerciales analizadas, para establecer su calidad y valor nutritivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras.

Las muestras de leches se adquirieron de forma aleatoria en los supermercados de la ciudad de Popayán, cubriendo la amplia variedad disponible en el comercio y con fechas de caducidad entre 5 y 6 meses. Se seleccionaron 21 tipos de leches UHT en envases Tetrapak: *Enteras:* enriquecidas con vitaminas y minerales; *semi-descremadas:* deslactosadas, enriquecidas con vitaminas, minerales y fibra; *descremadas:* enriquecidas con vitaminas y minerales, deslactosadas, con fibra y deslactosadas enriquecidas con vitaminas y minerales.

Preparación de las muestras.

Ya adquiridas, las leches se envasaron en frascos de vidrio y se refrigeraron a 5ºC; estas muestras se utilizaron para las pruebas de caracterización. Adicionalmente, se envasó y congeló en un frasco ámbar, 30 mL de cada leche, para cuantificar el HMF.

Caracterización microbiológica de las leches comerciales.

Se siguió la metodología descrita en los Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional (AOAC, 2003). Estos métodos se implementaron y estandarizaron en la Unidad de Análisis Industriales del departamento de Química de la

Universidad del Cauca. Cada ensayo se realizó 10 veces. A continuación, se describen cada uno de ellos.

Reductasa: En un tubo de ensayo se adicionaron 10 mL de leche y 1 mL de la solución de azul de metileno; se agitó hasta homogeneidad completa, se tapó con un algodón y se colocó en baño maría a 37°C; como criterio de comparación, se utilizó un tubo control que contenía 40 mL de la muestra y 1 mL de agua destilada, el cual se sumergió en agua hirviente durante 5 minutos. El tubo control y el que contenía la muestra, se dejaron sumergidos durante 7 horas mínimo.

Fosfatasa: A cada uno de dos tubos de ensayo, se les adicionó 5 mL de solución de *p*-nitrofenilortofosfato disódico al 0,15%, se taparon con algodón y se colocaron en un baño maría a 37°C durante 5 minutos; después de este tiempo, se agregó al primer tubo 1 mL de muestra y al segundo 1 mL de leche cruda para utilizarla como testigo. Para incubar, los tubos se sumergieron nuevamente en el baño maría a 37°C durante 2 horas.

Condiciones experimentales de la estandarización del método espectrofotométrico UV-Vis para determinar HMF. Calibración del espectrofotómetro.

El espectrofotómetro UV-Vis THERMO GENESYS 6, se calibró preparando una solución madre de $K_2Cr_2O_7$ de 50 ppm y a partir de ella, soluciones de 4, 8, 16, 24 y 32 ppm; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 373 nm, empleando como blanco KOH 0,06M. La calibración del espectrofotómetro se realizó cada vez que se realizaron lecturas de muestras ó de patrones.

Elección de la longitud de onda.

Para ello, se prepararon soluciones patrón de HMF de 0,3, 0,9, 1,2 y 1,5 mg/mL, las cuales fueron extraídas con soluciones de Carrez I y II y seguidamente se les realizó el correspondiente barrido desde una longitud de onda de 190 a 900 nm.

Método de cuantificación.

Se realizó por el método de curva de calibración, preparando patrones de concentración entre 0,039 y 0,232 mg/mL. Se graficó la absorbancia versus la concentración de las soluciones patrón. La concentración del analito se determinó a partir de la absorbancia y de la curva de calibración, empleando el análisis por mínimos cuadrados.

Estandarización del método analítico.

Se determinaron los parámetros que servirán como criterio de confianza del método analítico tales como: linealidad, precisión, sensibilidad (límite de detección y cuantificación) y exactitud (porcentaje de recuperación).

Extracción y análisis espectrofotométrico de HMF.

Para la extracción de HMF, 2 mL de leche fueron aforados a 25 mL con agua destilada. En un tubo para centrifugar CORNING, se adicionaron 5 mL de la solución anterior y 0,5 mL de la solución de Carrez I (ferrocianuro de potasio trihidratado al 15%) y 0,5 mL de la solución de Carrez II (sulfato de zinc heptahidratado al 14,4%). La mezcla se agitó en un vortex durante 5 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se tomó 1 mL del sobrenadante y se aforó a 10 mL con agua destilada; finalmente, se midió la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro UV-Vis a la longitud de onda correspondiente. Cada determinación se llevó a cabo por triplicado y utilizando un blanco de reactivos.

Prueba de estabilidad.

Para definir la estabilidad del HMF con el método empleado, se prepararon tres soluciones patrón de concentración 0,039, 0,051, 0,065 mg/mL y una muestra de leche (PEFeV). Se guardaron en la nevera durante 10 días y cada día se les realizó la lectura de la absorbancia.

RESULTADOS

Caracterización microbiológica. El análisis microbiológico de la leche, constituye un método directo para determinar sus características higiénicas y tiene gran valor en la investigación de las condiciones industriales del producto.

Dentro de las pruebas desarrolladas para verificar la calidad microbiana de la leche, se encuentran las determinaciones enzimáticas de reductasa y fosfatasa (Veisseyre, 1980).

La prueba de reductasa mostró que todas las leches analizadas están exentas de microorganismos contaminantes, lo que hace que su actividad reductora sea nula y por tanto, no haya cambio visual en el color del indicador azul de metileno, cuya coloración persistió durante por lo menos 7 horas. Como es sabido, la prueba de reductasa se realiza sobre leche no tratada y leche pasteurizada; al trabajar con leches ultra-pasteurizadas, se asume que éstas están exentas de microorganismos contaminantes, lo cual pudo comprobarse con los resultados obtenidos para dicha prueba. Por otra parte, todas las leches analizadas resultaron negativas ante la prueba de fosfatasa y por ello no ocurrió la reacción colorimétrica específica, evidenciada por la formación de productos de hidrólisis como el *p*-nitrofenol, que proveen un color amarillo a la solución; sin embargo, en la leche cruda, se observó una coloración amarilla intensa; lo anterior, indica que las leches evaluadas fueron calentadas en condiciones que garantizaron la destrucción de todos los gérmenes patógenos que pudieran estar presentes en la leche cruda, mediante la aplicación de adecuados procesos de ultra-pasteurización y por tanto, se pueden clasificar como leches de primera calidad; adicionalmente, cumplen con la normativa del Ministerio de Salud (ICONTEC, 1998), que dice que la leche que se produzca, transporte, envase, comercialice ó consuma en el territorio nacional, deberá cumplir con las características microbiológicas que se señalan a continuación: Para las leches higienizadas enteras, semi-descremadas y descremadas, la prueba de la reductasa debe tener una duración mínima de 7 horas y la prueba de la fosfatasa debe ser negativa.

Condiciones experimentales del método espectrofotométrico UV-Vis.

Ya calibrado el equipo, se realizaron los barridos correspondientes a cada patrón y se obtuvo un máximo pico de absorción a 285 nm para el HMF.

Para llevar a cabo la cuantificación del HMF en las muestras de leche, con los patrones respectivos preparados, se construyó una curva de calibración y se obtuvo la ecuación $y = 3{,}916x - 0{,}0105$, con un r de 0,9965, demostrando así, la linealidad del método.

La repetitividad del método y del sistema completo, mostró valores inferiores a 5,10 y 0,38% para el análisis de patrones; para la muestra PEFeV, los valores fueron inferiores a 4,17 y 0,08%, respectivamente.

El límite de detección del método fue de 0,011 mg/mL, mientras que el de cuantificación fue 0,036 mg/mL. En el cálculo de la exactitud, los porcentajes de recuperación estuvieron alrededor del 91%.

Cuantificación de HMF en las muestras de leche.

Un aspecto importante que se deriva de las dos vías de formación del HMF, es que se ha designado como «HMF libre» al formado directamente durante el tratamiento térmico de la leche, durante su procesado y su posterior almacenamiento, y como «HMF total» el que se forma por calentamiento con el ácido. En éste estudio se determinó el «HMF libre» producido vía isomerización y degradación de la lactosa, para establecer las condiciones de calidad en que se encuentra el producto antes de llegar a la mesa del consumidor. En la tabla 1, se muestran los valores correspondientes a la determinación de HMF en las muestras analizadas. Como se observa, el contenido de HMF calculado para las muestras de leches comerciales, se encuentra en el rango de 4,3 a 27,8 mg/mL; esta variación puede deberse a las diferentes condiciones de los procedimientos de higienización a los cuales han sido sometidas las leches en las diferentes industrias lácteas colombianas. Las leches deslactosadas, las cuales son sometidas a procesos especiales, donde alrededor del 80% de la lactosa se transforma en sus unidades monoméricas de glucosa y galactosa por adición de la enzima lactasa, mostraron los más bajos niveles de HMF, entre 4,3 y 4,5 mg/mL, posiblemente debido a que su contenido de lactosa hidrolizada y en mínima cantidad, limita la reacción de degradación para producir el HMF; por esto, hay una menor cantidad de HMF formado para este tipo de leches, comparada con las leches cuyo contenido de lactosa está dentro de lo normal.

Tabla 1. Concentración de HMF (mg/mL) en leches UHT comerciales colombianas.

Muestra	HMF (mg/mL)
Leches enteras	
ALE	13,6
CEV	13,6
PEFeV	27,8
Leches semi-descremadas	
PSOV	10,4
PS	10,3
CSV	13,5
APSV	20,1
APSMV	25,0
APSCaV	21,0
SFS	13,7
Leches descremadas	
CDV	13,6
ALDF	13,6
APD	20,1
APDF	10,4
Leches deslactosadas	
SFSD	4,4
PSD	4,5
ALSDF	4,3
APSD	4,4
CSDV	4,3
PDD	4,5
APDD	4,4

Las leches UHT enriquecidas PEFeV y APSMV, presentaron la mayor cantidad de HMF; en estos casos, se considera que hay cierta influencia por la adición de minerales (como por ejemplo el Fe), en la producción de HMF, debido a que este tipo de fortificación se realiza, por lo general, con sales férricas que requieren de un aumento alrededor de 10ºC más en la temperatura de pasteurización ó ultra-pasteurización, lo cual también se utiliza para inactivar la enzima lipasa que se encuentra protegida de la desnaturalización térmica en presencia de dichas sales (Badui, 1989). La leche enriquecida con calcio APSCaV, también presentó un alto contenido de HMF (21,0 mg/mL). Por antecedentes, se conoce que la fortificación de los alimentos con calcio, se efectúa con sales de fosfato de calcio di y tribásico, al igual que con carbonatos, lo cual favorece la inestabilidad de las proteínas, principalmente las caseínas y por lo tanto, los residuos de aminoácidos libres como la lisina, podrían fácilmente reaccionar con la lactosa para formar el HMF en mayor proporción (Badui, 1989). Los valores de HMF libre encontrados en las leches UHT colombianas, con respecto a lo reportado por otros autores en España (Ferrer et al., 2002) y Holanda (Berg, 1993), es mucho mayor.

Estabilidad

Las pruebas de estabilidad demostraron que la muestra preparada para la determinación de HMF, es estable durante tres días.

CONCLUSIONES

Las leches analizadas, son de calidad y aptas para el consumo humano. El contenido de HMF en las leches UHT, no está influenciado por la composición en grasa. La adición de vitaminas no tuvo ninguna influencia sobre la formación de HMF. Las leches adicionadas de minerales, muestran un contenido mayor de HMF, debido posiblemente a un calentamiento más elevado que se realiza para poder incorporar los minerales.

En general, la formación de HMF es debida a: el tratamiento térmico al que se sometió la leche, es decir, la ultra-pasteurización a 132ºC durante 5s y a su posterior período y condiciones de almacenamiento.

Al analizar este tipo de leches, es importante tener en cuenta que durante la fortificación de los alimentos, se requiere conocer muy bien los efectos físicos y químicos que el nutrimento puede tener sobre aquellos.

BIBLIOGRAFÍA

-AOAC. 2003. "Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC Internacional". 17th. edition, Maryland, USA

-Berg, H. 1993. "Reactions of lactose during heat treatment of milk: A quantitative study". Ph.D. Thesis. Agricultural University. Wageningen. pp. 105-106, 112.

-Badui, S. 1989. "Química de los alimentos". 1 ed. México. Editorial Alhambra. pp. 41-64, 376, 380-386, 392-396.

-Blanco, D. et al. 1991. High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates. Chromatographia, 32:45-48.

-Boekel, M. 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. Food Chemistry, 62:403-414.

-Bonvehi, J. 2000. Determination of the hydroxymethylfurfural content of honey by HPLC and UV spectrometry. Sciences des Aliments, 11:547-557.

-Bravo, A. et al. 2002. α- Dicarbonylic compounds as indicators and precursors of flavor deterioration during beer aging. Master Brewers Association of the Americas, 39:13-23.

-Chávez-Servín, J. et al. 2005. Analysis of potential and free compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography evolution during storage. Journal of Chromatography A., 1076:133-140.

-Chávez-Servín, J. et al. 2006. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. Food Research International, 39:536-543.

-Ferrer, E. et al. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas changes during heat treatment and storage. Journal of Chromatography A., 947:85-95.

-Garza, S. 1998. El pardeamiento no enzimático en zumos y purés de fruta. Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos, 293:87-91.

-Gaviria, L. y Bernal, I. 1993. "Análisis y control de calidad". 1 ed. Bogotá. Unisur. Vol. II. pp. 215-217, 234-237.

-Guerra-Hernández, E. et al. 2002. Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82:587-592.

-ICONTEC. 1998. Ministerio de salud. República de Colombia. Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos. Decreto 2437 de 1983. Decreto 476 de 1998.

-Morales, F.J. et al. 1997. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45:1570-1573.

-Rada, M. et al. 2004. Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. Food Chemistry, 85:605-609.

-Rivera, J. 1995. "Tecnología de leche y derivados". 1 ed. Colombia. pp. 25, 32, 65-68, 79, 87, 97-99, 104.

-Sanz, M.L. et al. 2003. 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:4278-4283.

-Valero, E. et al. 2001. Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. Food Chemistry, 72:51-58.

-Veisseyre, R. 1980. "Lactología técnica". 2 ed. España. Acribia. pp. 2, 11, 13, 17, 30-40, 47, 51, 97, 102-105, 116, 156, 161, 206-209, 233-235, 257, 297.

-Viñas, P. et al. 1992. Simultaneous liquid chromatographic analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde and methyl anthranilate in honey. Food Chemistry, 44:67-72.

INFLUÊNCIA DE TANINOS, FITATOS E FIBRAS NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E ZINCO E NO VALOR FUNCIONAL DE FEIJÕES (*Phaseolus vulgaris*, L.)

Ramírez-Cárdenas, L.[1], Leonel, A.J.[2], Costa, N.M.B.[2], Reis, F.P.[3]
Universidade Federal de Viçosa, UFV. [1]Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, [2]Departamento de Nutrição e Saúde, [3]Departamento de Informática.
Campus Universitário s/n. Viçosa, MG-BRASIL. CEP: 36570-000. email: lramirez@vicosa.ufv.br
[1]Endereço atual: Universidad San Francisco de Quito. Campus Universitário. Cumbayá. Quito-Equador. Telefone: 00-593-2-2971700, Ext. 1283. email: luciar@usfq.edu.ec

Keywords: feijões, biodisponibilidade, taninos, fitatos, fibras

RESUMO

Foram avaliados 5 cultivares de feijão: branco (Ouro Branco), preto (Diamante Negro) e marrom-rajado (BRS Radiante, Pérola e Talismã). Foram utilizadas farinhas de feijões cozidos com água de maceração para quantificação dos teores de umidade, proteína, lipídios, ferro, zinco, cálcio, taninos, fitatos e fibra alimentar total, solúvel e insolúvel. No ensaio da biodisponibilidade de zinco, ratos recém desmamados receberam dietas experimentais com mesmo nível de zinco (15mg/kg). Foram medidos zinco plasmático, eritrocitário e a retenção de zinco, apresentando o Ouro Branco a melhor biodisponibilidade e o Talismã a mais baixa. Já para o ferro, os ratos foram submetidos a um período de depleção (dieta sem ferro), seguido de repleção (dietas experimentais contendo 6, 12, 24 mgFe/kg). Após avaliar o ganho de hemoglobina observou-se que o Ouro Branco teve a melhor biodisponibilidade e o BRS Radiante a menor. Para o valor funcional, animais adultos foram distribuídos em 7 grupos, um com dieta controle (Normal), um com dieta rica em gordura e açúcar (HFS) e outros 5 com dietas HFS adicionadas de 30% das farinhas de feijões. A avaliação das fezes, sangue e fígado, permitiu observar que o Diamante Negro teve a melhor ação hipocolesterolemiante, o BRS Radiante a maior ação hipoglicemiante e o Ouro Branco a menor ação hipocolesterolemiante, além de ter sido o único cultivar que não promoveu a redução da glicose sanguínea. A biodisponibilidade de zinco não foi associada ao conteúdo de taninos, fibras e fitatos dos feijões, mas sim à relação milimolar fitatoxcálcio:zinco. A biodisponibilidade de ferro foi associada ao teor de taninos dos feijões, porém não foi influenciada pelo teor de fibras, fitatos ou da relação milimolar fitato:ferro. O valor funcional dos feijões não foi associado ao teor de fitatos, mas sim dos taninos e das fibras solúveis e insolúveis.

INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) é uma importante fonte de proteínas, amido, vitaminas, minerais e fibras (Martinez *et al.*, 1998). Entretanto, a presença de fatores antinutricionais, como os polifenóis e fitatos podem reduzir a biodisponibilidade de minerais essenciais, em particular do ferro não-heme e zinco (Sandberg, 2002). As fibras dos feijões também podem interferir negativamente na absorção mineral (Geil e Anderson, 1994). Por outro lado, a inclusão de feijões na dieta diária traz efeitos fisiológicos benéficos (Tharanathan e Mahadevamma, 2003). Taninos e outros polifenóis são considerados possíveis fatores protetores contra câncer e arteriosclerose (Carbonaro *et al.*, 1996). Os fitatos são importantes na redução de glicose, dos níveis de lipídios sanguíneos e diminuição do risco de câncer de mama e cólon (Yonekura e Suzuki, 2003), A fibra tem sido recomendada como um importante componente alimentar na prevenção da obesidade (Birketvedt *et al.*, 2002), desordens metabólicas como diabetes tipo 2 e hiperlipidemia (Liu *et al.*, 1999). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar em cinco cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), a influência de taninos, fitatos e fibras na biodisponibilidade de zinco e de ferro e nos efeitos na glicemia e no colesterol sanguíneo, em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os cultivares de feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) estudados foram: Ouro Branco (OB), Diamante Negro (DN), BRS Radiante (BRS), Pérola (PER) e Talismã (TL). Os grãos de cada cultivar foram selecionados, submetidos à maceração em uma proporção feijão: água de 1:2 (p/v) por 15 h à temperatura ambiente, cozidos com a água de maceração em panela de pressão doméstica, durante 40 minutos. Posteriormente foram secos, juntamente com o caldo de cocção, em estufa de ar circulante por 17 h a 60°C, moídos em microprocessador e peneirados (20 mesh) o número suficiente de vezes até a obtenção de um pó homogêneo (farinhas). Nas farinhas foram determinados os teores de: umidade (Instituto Adolfo Lutz 2006), proteínas e lipídios (AOAC, 1990), zinco, cálcio, e ferro por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (Gomes 1996), taninos (Price *et al.*,1978). Fitatos segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990) e o método cromatográfico (Par iônico, Ultrasep ES 100 RP18, 2x250mm) proposto por Sandgerg e Ahderinne (1986). Fibra alimentar total (FAT) e fibra alimentar insolúvel (FAI) de acordo com o método enzimático gravimétrico (Prosky *et al.*, 1988; AOAC, 1990). A fibra solúvel (FAS) foi obtida por diferença entre FAT e FAI.

Para a biodisponibilidad de zinco e de ferro foram utilizados Ratos machos Wistar recém desmamados. No caso do zinco a composição das dietas experimentais foi baseada na dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993), com mistura mineral sem zinco. As dietas foram devidamente ajustadas para fornecerem 15 mg Zn/kg de dieta, procedente do $ZnCO_3$ (dieta padrão) ou dos cultivares de feijão (dietas testes). Os ratos foram divididos em 11 grupos (n=10/grupo), alimentados por 42 dias com as dietas experimentais. Foi utilizado um modelo fatorial (5x2+1), sendo os tratamentos dispostos no delineamento em blocos casualizados. Após o sacrifício dos animais, foram coletadas amostras de sangue e o fêmur, para análise de zinco plasmático (EAA, Gomes, 1996) e eritrocitário (Whitehouse *et al.*, 1982) e retenção de zinco (mg Zn (fêmur) x100/ mg Zn ingerido total respectivamente. Para o estudo do ferro os ratos foram submetidos a um período de depleção, de 21 dias com dieta AIN-93G, isenta de ferro. Posteriormente, os ratos anêmicos foram divididos em 18 grupos (n=8/grupo) e alimentados por 14 dias com as dietas testes (Dieta AIN-93 G sem ferro +cultivares de feijão) para prover 3 diferentes níveis de ferro (6,12, 24 mg/kg de dieta). Uma dieta padrão forneceu as mesmas concentrações de ferro a partir do $FeSO_4$. Foi utilizado um modelo fatorial (6x3), sendo todas as dietas dispostas no delineamento em blocos casualizados. Avaliou-se o ganho de hemoglobina em função do teor de ferro fornecido pelas dietas

Para o valor funcional ratos machos Wistar, adultos, divididos em 7 grupos (n=8/grupo), foram alimentados por 28 dias com as dietas experimentais, utilizando-se um delineamento em blocos casualizados. A primeira dieta controle (Normal) foi baseada na dieta AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993). As outras dietas experimentais também foram baseadas nesta dieta, porém para elevar o teor de gordura e açúcar foi acrescentado, tanto na segunda dieta controle, *High fat & sucrose* (HFS), quanto nas dietas testes (cultivares de feijão), 11% de banha de porco, 1% de colesterol cristalino e cerca de 40% de sacarose. Nas dietas testes foi ainda adicionado 30% de cada cultivar de feijão na forma de farinha. Do 21° ao 24° dias foram coletadas todas as fezes dos animais e após o sacrifício, foram retiradas amostras de sangue e o fígado. Utilizando o Autoanalizador Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé, Mod Lisabio No B.652) foram determinados no soro o colesterol total (Allain *et al.*, 1974), HDL colesterol (Warnik *et al.*, 1982), triglicerídios

(Fossati e Prencipe, 1982) e glicose (Lot e Turner, 1975). A determinação de lipídios hepáticos e das fezes foi baseada na metodologia de Folch *et al.* (1957).

Em todos os casos os dados foram interpretados por meio de análise de variância, e as médias testadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Para essas análises, foi utilizado o programa estatístico SAEG (1998).

RESULTADOS E DISCUSÃO

Biodisponibilidad de Zinco.- A dieta de feijão OB apresentou as maiores médias nos parâmetros avaliados e foi a que menos diferiu da dieta padrão, entanto que a dieta de feijão TL teve as menores médias (P<0,05) e foi a que mais diferiu da dieta padrão (Tabela 1). Estes resultados não mostraram relação com o consumo de taninos, fitatos e FAT que afetam a biodisponibilidade de zinco, já que segundo o consumo total de dieta os ratos alimentados com a dieta BRS tiveram o maior consumo destes antinutrientes. Por outro lado a menor ingestão de razões milimolares fitatoxcálcio/zinco, pelos animais que receberam a dieta de feijão OB pode ser a causa destes animais apresentarem os melhores níveis nos parâmetros avaliados entanto que o consumo mais alto destas razões milimolares pelos animais que receberam a dieta de feijão TL pode ser a causa dos níveis mais baixos (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração de zinco no plasma (Zn-P), zinco nos eritrócitos (Zn-erit) e retenção de zinco no fêmur (Zn-fêmur) nos ratos segundo as dietas experimentais recebidas.

Dieta	Zn-P (µgZn/dL)	Zn-erit (µgZn/gHb)	Zn-fêmur (mg/100mg)
DP	73,66±4,80	47,05±1,34	2,30 ± 0,08
OB	82,09 ± 4,70a	42,27 ± 1,29a	1,29 ± 0,04a*
DN	72,56 ± 4,55a	38,98 ± 1,77a*	1,18 ± 0,03ab*
BRS	75,66 ± 6,00a	37,85 ± 1,29ab*	1,10 ± 0,04b*
PER	70,80 ± 5,13a	35,65 ± 1,52bc*	1,06 ± 0,03b*
TL	51,43 ± 4,46b*	31,81 ± 0,80c*	0,90 ± 0,04c*

Média ± desvio padrão. Para cada característica avaliada as médias com asteriscos diferem da dieta padrão a 5% de probabilidade pelo teste Dunnett. Para cada característica avaliada, as médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Razões milimolares fitatoxcálcio:zinco ingeridas pelos ratos em 42 dias.

Dieta	Razões milimolares fitatoxcálcio:zinco (mM/42 dias)
OB	325,05 ± 4,94 e
DN	526,89 ± 0,84 b
BRS	497,88 ± 1,45 c
PER	414,82 ± 3,79 d
TL	720,08 ± 7,31 a

Média ± desvio padrão. Para cada característica avaliada, as médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Biodisponibilidade de Ferro.- Foi verificado que para ganho de hemoglobina a dieta de feijão OB não diferiu da dieta padrão (P>0,05) em nenhum dos níveis assim como apresentou as medias mais altas em todos os níveis enquanto a dieta de feijão BRS diferiu em todos os níveis com a dieta padrão e teve as menores medias nos níveis 6 e 12 (Tabela 3). Observou-se também o incremento no ganho de hemoglobina à medida que aumentava a concentração de ferro em todas as dietas experimentais utilizadas. Embora indicado na literatura que fitatos, razões milimolares (fitatos:Fe) e fibra alimentar estariam influenciando na biodisponibilidade de ferro, no presente estudo isto não foi observado. Observou-se, porém, a influência dos taninos na biodisponibilidade de ferro, sendo o maior ganho de hemoglobina nos animais que consumiram o menor teor de taninos, alimentados com a dieta de feijão OB e a menor biodisponibilidade nos animais que consumiram a maior concentração de taninos, alimentados com a dieta de feijão BRS (Tabela 4).

Tabela 3. Ganho de hemoglobina (GHb) nos ratos em função de diferentes dietas nos diferentes níveis de ferro.

	GHb (g/dL)		
Dietas	6 ppm Fe	12 ppm Fe	24 ppm Fe
Padrão	2,55±0,12a	4,23±0,07ab	6,28±0,68a
OB	2,51±0,10a	4,27±0,25a	5,76±0,26ab
DN	1,88±0,08ab	3,84±0,08abc	5,20±0,04b
BRS	1,30±0,13b	2,61±0,19d	4,14±0,06c
PER	1,79±0,05ab	3,04±0,31cd	4,13±0,51c
TL	1,57±0,06ab	3,29±0,13bcd	4,09±0,21c

média ± desvio padrão; Dentro de cada nivel de ferro, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste TUKEY.

Tabela 4. Consumo de taninos nos ratos segundo as dietas testes recebidas durante a fase de repleção.

	Consumo de taninos (mg catequina/14dias)		
	6 ppm Fe	12 ppm Fe	24 ppm Fe
OB	2,45±0,08c	4,64±0,29c	10,21±0,07d
DN	4,57± 0,06bc	9,02± 0,18b	18,01±0,22c
BRS	10,53 ±0,26a	20,86±0,48a	37,90±2,18a
PER	5,24 ±0,05b	9,71±0,43b	20,75±0,28b
TL	2,89±0,05 bc	5,94±0,03c	10,81± ,52d

Média ± desvio padrão; Dentro de cada nivel de ferro, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste TUKEY.

Valor funcional.- O feijão Diamante Negro promoveu menor nível de colesterol sérico e de triglicerídios, bem como maior fator de proteção (maior relação HDL/CT), menor deposição de lipídios nos fígados e a maior excreção fecal de lipídios. O feijão BRS Radiante promoveu a maior redução nos níveis de glicose sanguínea. O feijão Ouro Branco foi o que apresentou a menor ação hipocolesterolemiante, maior índice de lipídios no fígado e a menor excreção de lipídios nas fezes. Além de que foi o único cultivar que não reduziu os níveis de glicose sanguínea (Tabelas 5). As propriedades funcionais do feijão avaliadas estiveram influenciadas significativamente pela ação da fibra alimentar solúvel, fibra alimentar insolúvel e taninos (Tabela 6). Porém, os fitatos não mostraram ter influenciado significativamente.

Tabela 5 – Níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol (HDL), triglicerídios, relação HDL-colesterol total (HDL/CT), glicose, peso do fígado, lipídios hepáticos e lipídios nas fezes dos ratos segundo as dietas experimentais.

Dieta	Colesterol total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglicerídios (mg/dL)
Normal	95,20± 2,25 ab	38,75± 1,04a	103,52± 8,16 a
HFS	98,58± 2,98 a	33,96± 1,11 abc	76,25± 3,86 b
OB	94,82± 2,16 abc	32,26± 1,56 bc	82,12± 6,31 ab
DN	82,70± 3,38 c	34,84± 1,39 abc	76,51± 3,38 b
BRS	84,99± 1,53 bc	31,19± 0,64 c	80,57± 7,89 ab
PER	87,44± 4,15 abc	33,01± 0,63 abc	81,33± 7,60 ab
TL	87,69± 2,45 abc	37,69± 1,98 ab	87,40± 2,66 ab

Dieta	Relação HDL/CT	Glicose (mg/dL)
Normal	0,41± 0,01 ab	267,86± 9,63 a
HFS	0,35± 0,01 b	237,07± 16,20 ab
OB	0,34± 0,01 b	234,41± 11,88 ab
DN	0,43± 0,02 a	187,74± 28,36 b
BRS	0,37± 0,01 ab	181,73± 14,75 b
PER	0,38± 0,01 ab	184,28± 11,60 b
TL	0,43± 0,02 a	185,18± 19,61 b

Dieta	Peso do fígado (g)	Lipídios hepáticos (mg/100g)	Lipídios nas fezes (mg/100g)
Normal	11,08 ± 0,30c	6,37 ±0,27c	5,10 ± 0,25c
HFS	15,31 ±0,34a	17,22 ±1,86a	11,76 ±0,39b
OB	12,81 ± 0,41b	15,49 ±0,63ab	16,90 ±1,26a
DN	13,91 ± 0,27ab	13,43 ±0,19b	19,95 ±1,04a
BRS	13,00 ± 0,48b	13,94 ±0,31ab	19,91 ± 0,75a
PER	13,80 ± 0,27b	14,08 ±0,30ab	19,05 ±1,09a
TL	13,82 ± 0,42b	14,47 ±0,59ab	19,01 ±0,89a

Média ± desvio padrão; Para cada característica avaliada, as médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Consumo de fibra alimentar solúvel (FAS), fibra alimentar insolúvel (FAI) e taninos nos ratos segundo as dietas testes recebidas durante todo o experimento.

Dieta	Consumo de FAS (g/28 dias)	Consumo de FAI (g/28 dias)	Consumo de taninos (mg cateq/28dias)
OB	2,95 ± 0,09d	30,35 ± 0,89bc	10,69 ± 0,31c
DN	6,13 ± 0,19a	35,35 ± 1,11a	25,00 ± 0,78b
BRS	6,34 ± 0,16a	28,84 ± 0,75c	41,20 ± 1,07a
PER	4,34 ± 0,12c	33,43 ± 0,93ab	24,32 ± 1,91b
TL	5,46 ± 0,10 b	34,77 ± 0,64a	22,47 ± 0,41b

Média ± desvio padrão. Para cada característica avaliada, as médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Embora neste estudo tenha sido observada a influência dos fitatos, dos taninos e das fibras de forma diferenciada na biodisponibilidade e no efeito funcional dos feijões, o efeito não parece ser devido a um único fator, mas sim a um conjunto de características que estão co-atuando. Os estudos de biodisponibilidade e do valor funcional se tornam importantes, para planejamentos dietéticos que buscam solucionar problemas nutricionais e de saúde que beneficiariam mais diretamente a grupos populacionais mais suscetíveis e com menores recursos que baseiam sua dieta diária neste alimento. Assim, para deficiências de zinco e ferro, o feijão Ouro Branco deveria ser o cultivar escolhido. Na procura das melhores propriedades funcionais, os cultivares indicados são Diamante Negro e BRS Radiante. Em todo caso, os feijões contribuem a uma dieta de alta qualidade devendo ser estimulado o aumento do seu consumo na dieta.

AGRADECIMENTO

Pelo apoio financeiro para a execução desta pesquisa ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) e à EMBRAPA - Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás (Brasil) em especial à Dra. Priscila Zaczuck Bassinello. Ao Centro de Biologia Molecular no Federal Research Centre for Nutrition and Food (Alemanha), em especial ao Dr. Ralf Greiner, pela determinação de fitatos

REFERENCIAS

ALLAIN, C. C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, 20: 470-475.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. 1990. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15. ed. Washington, D.C; p. 800-801; 1105-1106.

BIRKETVEDT, G.S.; TRAVIS, A.; LANGBAKK, B.; FLORHOLMEN, J.R. 2002. Dietary supplementation With Bean extract improves lipid profile in overweight and obese subjects. **Nutr.**, 18: 729 –733.

CARBONARO, M.; VIRGILI, F.; CARNOVALE, E. 1996. Evidence for protein–tannin interaction in legumes: implications in the antioxidant properties of faba-bean tannins. **Lebens-Wiss. U.- Technol.**, 29: 743-750.

FOSSATI, P.; PRINCIPE, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme and produces hydrogen peroxide; **Clin. Chem.**, 28: 2077-2080.

GEIL, P.B., ANDERSON, J.W. 1994. Nutrition and health implications of dry beans: A review. **J. Am. College Nutr.**, 13(6): 549-558.

GOMES, J. C. **Análise de Alimentos.** Universidade Federal de Viçosa. 1996.126 p.

Instituto Aldolfo Lutz. (2006). Normas Analíticas do Institute Adolfo Lutz: métodos químicos e físico para análise de alimentos, 2° edição, volume 1. São Paulo, SP: Editora do IAL.

LIU, S.; STAMPFER, M.J.; HU, F.B.; GIOVANNUCCI, E.; RIMM, E., MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.H.; WILLETT, W.C. 1999. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study1–3. **Am. J. Clin. Nutr.**, 70: 412-419.

LOTT, J.A.; TURNER, K. 1975. Evaluation of Trinders glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin. Chem.**, 21 (12): 1754-1760.

MARTINÉZ, C.; ROS, G.; PERIAGO, M. J.; ORTUÑO, J.; LÓPEZ, G.; RINCÓN, F. 1998. *In vitro* protein digestibility and mineral availability of greenbeans (*Phaseolus vulgaris* L) as influenced by variety and size. **J. Sci. Food Agric.**, 77: 414-420.

PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.**, 26(5): 1214-1218.

PROSKY, L.; ASP, N.-G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. 1988. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products. Interlaboratory study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 71 (5): 1017-1023.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93. 1993. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN - 76 A Rodent Diet. **J. Nutr.**, 123:1939–1951.

SAEG – 1998. Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa (Software).

SANDBERG, A.; AHDERINNE, R. 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates in foods and intestinal contents. **J. Food Sci.**, 51: 547-550.

SANDBERG, A-S. 2002. Bioavailability of minerals in legumes. **Brit. J. Nutr.**, 88 (3): S281-S285.

THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. 2003. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends Food Sci. Technol.**, 14: 507–518.

WARNICK, G. R.; BENDERSON, J.; ALBERS, J. J. 1982. Dextran sulfate-Mg^{2+} precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. **Clin. Chem.**, 28: 1379-1388.

WHITEHOUSE, R. 1982. Zinc in plasman neutrophilis, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clin. Chem.**, 28 (3): 475-80.

YONEKURA,L.; SUZUKI, H. Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed a phytic acid-containing diet. **Nutr. Res.**, v.23, p. 343–355, 2003.

INCIDENCIA DE SALMONELLA SPP. Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN CHULETAS CRUDAS DE CERDO VENDIDAS AL DETAL EN VENEZUELA

Ramos Ana; Hernández Andreína y Hurtado Ernesto
UNIVERSIDAD DE ORIENTE-NÚCLEO DE MONAGAS. AV. UNIVERSIDAD CAMPUS LOS GUARITOS, METURÍN ESTADO MONAGAS, VENEZUELA
Tlf: 0291-3004058. E. mail: ay2170@hotmail.com

Palabras claves: Calidad, Incidencia, Cerdo, Microbiología, Chuletas.

RESUMEN

Los alimentos comúnmente asociados con intoxicaciones son: carne (vacuno, cerdo, pollo), productos cárnicos, ensaladas, productos de pastelería, productos lácteos, etc. El cerdo (*Sus scrofa domesticus*), es un animal ampliamente utilizado por el hombre por su gran capacidad para transformar el alimento que consume en carne y grasa por lo cual se puede aprovechar su cuerpo casi en su totalidad. Estas cualidades han impulsado la comercialización y consumo de este tipo de carne posicionándolo como un perfecto sustituto de la carne bovina, a pesar de la mala fama que lleva a cuestas, que se ha visto disminuida gracias a los beneficios nutricionales que posee. Siendo ésta una carne de amplio consumo, es importante conocer su calidad desde el punto de vista microbiológico. El objetivo de este trabajo fue determinar la incidencia de ***Salmonella spp.*** y ***Staphylococcus aureus*** en muestras de chuletas de cerdo crudas vendidas al detal en supermercados de la ciudad de Maturín, Estado Monagas. Las muestras fueron obtenidas de cuatro supermercados, se identificaron y ubicaron individualmente dentro de bolsas plásticas estériles y se trasladaron bajo refrigeración hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Oriente. El muestreo se realizó por espacio de ocho (8) semanas. Se obtuvieron 32 muestras en total. Se utilizó el método del enjuague o lavado de la pieza y los análisis de ***Salmonella*** se realizaron según la metodología descrita por COVENIN, mientras que ***Staphylococcus aureus*** se determinó por el Manual de MERCK. Los resultados revelaron que el 3,12% (1) de las muestras evaluadas resultaron positivas para la presencia de ***Salmonella spp*** y el 68,75%(22) para ***Staphylococcus aureus.*** Concluyéndose que los riesgos de producirse accidentes alimentarios a causa del consumo de carne de cerdo son elevados si no se respetan los principios sanitarios fundamentales, los cuales no son vigilados con suficiente diligencia por los entes responsables de garantizar la salud pública.

INTRODUCCIÓN

Uno de los animales domésticos que mayor utilidad tiene para el hombre es, sin duda, el cerdo, tanto por la variedad de productos que de él se obtienen, ya que casi todo su cuerpo es aprovechable de una forma u otra, como por el elevado rendimiento que presenta, dada su notable capacidad de transformar el alimento que ingiere en carne y grasa, razón por la cual se ha extendido su cría por todo el mundo y ha dado lugar a una gran diversificación de razas.

En Venezuela, se consumen mensualmente ocho mil novecientas toneladas de carne de cerdo, consumo que ha ascendido a niveles históricos en los últimos 5 años (7,5 kilos/hab/año). Es importante también tomar en cuenta el potencial incremento del consumo de carne fresca, el cual esta en pleno desarrollo, debido a que el aumento en el precio del vacuno por efectos de la exportación de este rubro por parte de otros países, permiten aumentar la competitividad de la carne de cerdo como sustituto. (Enciclopedia Hispánica, 2000).

en nuestro país, no se observan los niveles de calidad deseados que satisfagan al consumidor, en lo que respecta a seguridad alimentaria y manipulación de alimentos, lo cual se refleja claramente debido a las condiciones de los sitios de expendio de alimentos existentes, y el estado Monagas específicamente en Maturín no escapa de esta realidad.

Debido a esta lamentable situación surge la inquietud por conocer de manera mas profunda, la calidad de los alimentos que consume el ciudadano maturinés tomando como estandarte la chuleta de cerdo por ser un producto cárnico de amplio consumo, accesible y apetecido por la población; esto, aunado al hecho de que FONDONORMA no ha establecido criterios microbiológicos para la carne de cerdo cruda, lo cual permite la ocurrencia de ciertas irregularidades en este ámbito dada la falta de regulaciones en este aspecto, justifica en cierta medida la realización de esta investigación.

Por tanto, se planteó la determinación de la incidencia de ***Salmonella spp.*** y ***Staphylococcus aureus*** en chuletas crudas de cerdo vendidas al detal en cuatro supermercados localizados en la ciudad de Maturín, estado Monagas, por ser estos patógenos de interés a nivel de salud pública además de formar parte de la flora contaminante de los productos cárnicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

Chuletas de cerdo: las muestras de cerdo se obtuvieron de cuatro supermercados codificados como A, B, C y D localizados en la ciudad de Maturín, Estado Monagas. En cada bandeja de los establecimientos seleccionados se encuentran de 10 a 15 chuletas de cerdo, de cada una de ellas se tomó una muestra y el muestreo se repitió en ocho ocasiones, las chuletas tenían un peso comprendido entre 175 y 185g. A dichas muestras se les tomó la temperatura por medio de un termómetro para carnes al momento de adquirirlas, así como también se realizó una inspección visual de las condiciones higiénicas del sitio de expendio. Las chuletas fueron introducidas e identificadas individualmente en bolsas plásticas de cierre hermético estériles de marca comercial "Ziploc" (Figura 2) y se trasladaron hasta el Laboratorio de Microbiología de Universidad de Oriente Núcleo Monagas. campus Los Guaritos mediante el empleo de una cava con hielo para mantener las condiciones de refrigeración. Una vez ubicadas las muestras dentro del laboratorio se procedió a procesarla en un lapso de cuatro horas aproximadamente.

Métodos:

Preparación de la muestra: se realizó por el método de lavado o enjuague de las chuletas de cerdo (Fernández, 2000). Esta técnica se ejecutó abriendo la bolsa que contenía la muestra asépticamente y se le adicionó 99 ml de agua peptonada al 0,1% estéril, se cerró la bolsa y se procedió a frotarla por un espacio de tiempo de 3 a 5 min aproximadamente. El líquido proveniente del lavado se consideró como la dilución 10^{-1} (dilución 1:10): seguidamente se prepararon cinco diluciones seriadas a partir de la obtenida por el lavado, desde 10^{-2} hasta 10^{-6} transfiriendo 11 ml de cada dilución a los frascos con 99 ml de agua peptonada estéril al 0,1%.

Análisis microbiológicos:

Determinación de *Salmonella spp.* (COVENIN, 1988)

Pre-enriquecimiento selectivo: a partir de la dilución 10^{-1} se transfirieron 10 ml a un matraz con 100 ml de caldo lactosado y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Enriquecimiento: del cultivo anterior se transfirieron 10 ml a un matraz que contenía 100 ml de caldo tetrationato mas 1 ml de yodo, se agitó y se incubó a 43°C durante 24 horas.

Aislamiento: se sembró una asada por estrías en superficie en agar sulfito de bismuto un pequeño inóculo del cultivo anterior, se incubó a 37°C durante 24 horas. Se identificaron como ***Salmonella*** aquellas colonias negras con brillo metálico.

Confirmación: se seleccionaron 3 colonias típicas por cada placa y se purificó el cultivo obtenido repicando en tubo con agar nutritivo, se le realizó tinción de Gram para comprobar la pureza del mismo; luego se repicó en tubos con agar kliger inclinado por cada cultivo puro perteneciente a los supermercados estudiados, se sembró una asada por estrías en superficie y se incubó a 37°C durante 24 horas, observándose un ennegrecimiento del agar por producción de H_2S típico de este microorganismo.

Prueba del caldo urea: se sembró por agitación a través de un asa de platino dos ó tres colonias típicas del cultivo anterior en un tubo con 3 ml de caldo urea y se dejará un tubo como control, se incubó a 37°C , se observó la reacción positiva por cambio de color de naranja a rojo y negativo si permanece igual.

Prueba del indol: se le realizó tinción diferencial como la de Gram para comprobar la pureza del cultivo. A partir del cultivo puro se inocularon mediante el uso de un asa de platino los tubos con caldo triptosa y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se le añadieron a cada cultivo de 0,2 a 0,3 ml de reactivo de Kovacs, se agitó y se observó la reacción; la cual resultó positiva si se produjo la aparición de una coloración rojo oscuro en la superficie del medio, y negativa si la coloración del medio se torna amarilla. Las muestras positivas se reportaron en porcentaje (%).

Determinación de *Staphylococcus aureus* (MERCK, 1982)

Enriquecimiento: se transfirió 1 ml de la dilución 10^{-1} a un tubo con 9 ml de caldo tripticasa de soya con 10 % de NaCl y se incubó a 37°C durante 24 horas. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Aislamiento: se sembró una asada por estrías en superficie en agar Vogel-Johnson (VJ), se incubó durante 24 horas a 37°C. Se identificaron como ***Staphylococcus*** aquellas colonias negras brillantes y por el viraje a amarillo del agar. Este procedimiento se realizó por duplicado.
Confirmación: ante la presencia de colonias típicas de ***Staphylococcus aureus*** se realizó tinción de Gram y se repicó en placas de petri con agar nutritivo para la obtención de un cultivo puro y se realizó tinción de Gram para comprobar la pureza del mismo, para posteriormente realizar la prueba de la coagulasa.

Prueba de la coagulasa: Se seleccionaron de 3 a 5 colonias típicas y se transfirieron a un tubo con 0,3 ml de caldo infusión cerebro corazón e incubó a 37°C, durante 24 horas. Seguidamente se le adicionó 0,5 ml de plasma sanguíneo al cultivo anterior, se mezcló y se incubó durante 4 a 6 horas. Para observar la reacción se inclinaron los tubos para observar la formación de un coagulo firme, lo cual pudo determinar la positividad de la prueba. Las muestras positivas se reportaron en porcentaje (%).
Diseño del experimento: se utilizó un diseño en bloques al azar considerando como fuente de variación conocida el efecto de las semanas (bloques). El factor considerado como variable independiente fueron los establecimientos comerciales (A, B, C y D). La variable dependiente a medir fue la presencia de microorganismos (*Salmonella spp., y Staphylococcus aureus*). Se evaluó como covariable las temperaturas de las muestras. Quedando establecido el diseño con cuatro tratamientos representados por los establecimientos y ocho repeticiones que representan las semanas que duró el experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los alimentos que han sido sometidos a un tratamiento de higienización eficaz que asegure su inocuidad para el consumidor está indicada la posible presencia en los alimentos de microorganismos patógenos de procedencia entérica, ya que es un indicativo de deficiencias o fallas en el tratamiento industrial de los alimentos, y en última instancia, de su calidad higiénica o microbiológica (Mossel y Moreno, 1994).

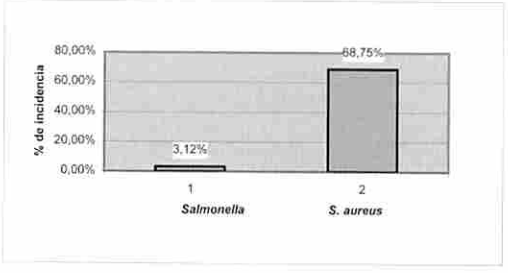


GRÁFICO 1. Porcentaje (%) de incidencia de *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* en cuatro supermercados localizados en la ciudad de Maturín.

En el Gráfico se observa un porcentaje de incidencia para ***Salmonella*** de 3,12, debido a que solo en una muestra se detectó la presencia de este patógeno, aunque se trata de un porcentaje bastante bajo con respecto al obtenido para el otro microorganismo analizado, dicha cifra representa un importante riesgo sanitario por las razones siguientes, puesto que si bien no forman parte de las bacterias toxigénicas (que no producen enterotoxinas) la contaminación por este patógeno puede crear serias dificultades terapéuticas debido a su resistencia a los antibióticos, razón por la cual el criterio microbiológico establecido para dicho microorganismo es la ausencia total.

Es importante destacar que la muestra en la que se detectó ***Salmonella*** perteneció al Supermercado C el cual representó 12,5% (Gráfico 2) de incidencia, ya que se manifestó la presencia de este microorganismo en una sola muestra de las ocho analizadas, durante las semanas de experimentación, por establecimiento comercial; el resto de los expendios no evidenció presencia del patógeno.

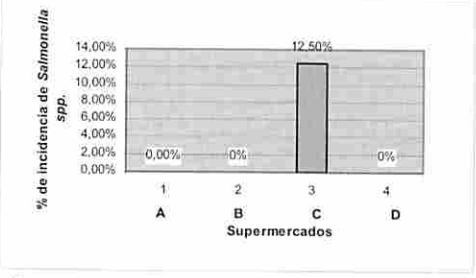


GRÁFICO 2. Porcentaje (%) de incidencia de *Salmonella spp.*, en chuletas crudas de cerdo comercializadas en cuatro supermercados de la ciudad de Maturín.

A nivel mundial se han realizado diversos estudios similares a este, como es el caso de Carrera *et al.*, (1998) quienes reportaron en establecimientos de producción, expendio o consumo, contaminaciones por ***Salmonella spp.***, en alimentos semielaborados cárnicos (11 %) y de pescado (10 %). La incidencia de contaminación por ***Salmonella spp.*** (5 %) indicó la necesidad de mejorar las acciones de la inspección sanitaria.

Las cifras reportadas por estas investigaciones demuestran la preocupación existente en este ámbito de la industria alimentaria a nivel mundial debido a los crecientes niveles de contaminación con este microorganismo y nuestro país no escapa de esta lamentable realidad, lo que permite deducir la falta de medidas

higiénicas y de seguridad por parte de los mataderos y supermercados; no obstante, las granjas de cría de estos animales también juegan un rol fundamental debido a que se deben aplicar severas medidas de bioseguridad que contribuyan a disminuir los índices de prevalencia de este microorganismo.

A pesar de que es cierto que ***Salmonella*** puede ser introducida en la cadena alimentaria a cualquier nivel, incluyendo la distribución el cocinado y consumo, es importante partir de una materia prima con el menor nivel posible de estas bacterias para mejorar la eficacia de cualquier procedimiento de seguridad alimentaria en los siguientes niveles de producción (Mora, 2003).

En general se puede expresar que aunque los niveles de incidencia de ***Salmonella*** reportados en esta investigación fueron en su mayoría inferiores a los mencionados por otros estudios realizados a nivel mundial, la sola presencia de este patógeno implica un riesgo a nivel de salud pública que debe tratar de eliminarse en la medida de lo posible a fin de evitar mayores complicaciones a nivel de seguridad alimentaria.

En los análisis realizados para la detección de ***Staphylococcus aureus*** en muestras de chuletas crudas de cerdo se obtuvo un porcentaje de incidencia bastante significativo a nivel de todos los supermercados analizados, resultando 22 muestras positivas de las 32 muestreadas, lo cual representó un 68,75% (Gráfico 1). Al examinar cada supermercado de manera particular se conoció la incidencia individual de cada uno de ellos, discriminándose de la siguiente manera: un 50% para el establecimiento A, 63% para el B, un 75% en el supermercado C y 87,5% de incidencia en el supermercado D (Gráfico 3).

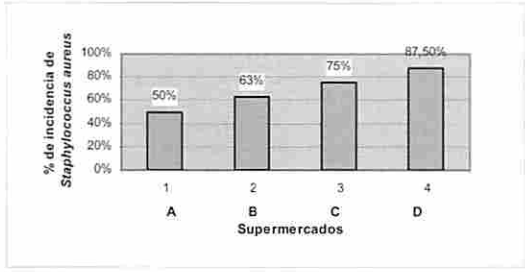


GRÁFICO 3. Porcentaje (%) de incidencia de *Staphylococcus aureus* en chuletas crudas de cerdo comercializadas en cuatro supermercados de la ciudad de Maturín.

En el caso de ***Staphylococcus aureus*** se encuentra tanto en el hombre como en los animales, las fosas nasales constituyen el principal reservorio del germen. En el hombre la localización nasal afecta al 20-50% de los individuos, el microorganismo se disemina a partir de la nariz a la piel, manos y cara en particular y al ambiente, aire, suelo, agua, ropa, etc. Este microorganismo provoca infecciones diversas, localizadas o generalizadas. El crecimiento de ***Staphylococcus aureus*** en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias (ISPCH, 2006).

En el estado americano de Nebraska un criterio microbiológico es usado como referencia para carnes, el cual establece ***S. aureus*** coagulasa positivo debe estar ausente en una muestra de 1 gramo de carne (Wehr, 1982). Tomando en cuenta estos datos se puede afirmar que los recuentos de ***S. aureus*** obtenidos en este estudio se encuentran por encima del criterio máximo establecido para países como España y Estados Unidos.

A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones que incluyen a ***Staphylococcus aureus*** como objeto de estudio, entre ellas se destacan Carrera *et al.*, (1998) los cuales llevaron a cabo un estudio de la vigilancia de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* en alimentos desde enero de 1995 hasta junio de 1997, en establecimientos de producción, expendio o consumo. Se encontró que la presencia de *Staphylococcus aureus* se presentó con mayor frecuencia en productos semielaborados cárnicos (7 %); indicando así la necesidad de mejorar las acciones de la inspección sanitaria.

Por su parte, Normanno *et al.*, (2005) estudiaron la presencia de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva en productos comercializados en Italia, de un total de 11384 muestras examinadas, en 1971 se encontró ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva, lo cual representó un 17,3%. Siendo esta tasa inferior a la obtenida en esta investigación.
Todas las investigaciones antes descritas tuvieron una tasa de incidencia inferior a la arrojada en esta investigación.

CONCLUSIONES

En general los niveles de contaminación de las muestras de chuletas de cerdo vendidas en los distintos supermercados fue alta, el establecimiento comercial C resultó ser el comercio con los mayores porcentajes de incidencia para los microorganismos estudiados. Por lo que su calidad microbiológica fue deficiente. A nivel de salud pública este producto representa un riesgo para la población, sino se toman las medidas higiénicas y de cocción respectivas.

REFERENCIAS

Carrera J, Caballero A, Lengomin M. 1998. Vigilancia de *Staphylococcus* y *Salmonella* en alimentos. Rev Cubana Aliment Nutr. 12(1):16-9.
Comisión Venezolana de Normas Industriales. (Covenin). 1988. Alimentos . Aislamiento e identificación de ***Salmonella***. 1era Revisión. Norma venezolana nº 1291-88. FONDONORMA. Caracas – Venezuela.
Encyclopedia Britannica Publishers. 2000. Hispánica. Vol 4. Encyclopedia Britannica Publishers, INC. Kentucky- E.U.A. 407 p.
Fernández E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad autónoma de Querétaro. Querétaro- México. 1325 p.
ISPCH (Instituto De Salud Pública De Chile). 2006. recuento de microorganismos aerobios mesófilos. [Documento en Línea] Disponible: http://www.ispch.cl/lab-amb/serv-lab/aerobios-staphylococcus.html. [Consulta: 28/04/2006].
Merck E. 1982. Manual de Medios de Cultivos. Darmstadf-Frankfurter Strasse 250. 32p.
Mora, J. 2003. ***Salmonella*** en porcino: Un patógeno alimentario de creciente importancia. [Documento en línea]. Disponible:http://www.hypor.com/spain/dbdocs//3fe1a24a1d81c.pdf [Consulta:06/04/2006].
Mossel D y Moreno B. 1994. Microbiología de los Alimentos. Acribia S. A. Zaragoza – España. 375p.
Normanno G., Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti A, La Salandra G, Bartoli M, y Celano GV. 2005. Coagulase-positive Staphylococci and ***Staphyloccocus aureus*** in foods products marketed in Italy. Journal of Food Microbiology. 98 (15): 73-79.
Wehr HM. 1982. Attitudes and policies of governmental agencies on microbial critera for foods. Food Technol 36: 45-54.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN NÉCTAR MIXTO DE FRUTAS TROPICALES

Sousa, Paulo Henrique Machado de[1]; Ramos, Afonso Mota[1]; Brito, Edy Sousa de[2]; Maia, Geraldo Arraes[3]; Pinheiro, Anália Maria[3]; Abreu, Cyntia Rafaelle Amaral de[3]

1 – UFV, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campus Universitário, CEP: 36570-000. Viçosa-MG, Brasil. e-mail: amramos@ufv.br
2 – EMBRAPA Agroindústria Tropical, Rua Dra Sara Mesquita, 2270 - Planalto do Pici, CEP: 60511-110. Fortaleza-CE, Brasil. e-mail: edy@cnpat.embrapa.br
3 – UFC, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campus do Pici, CEP: 60356-000. Fortaleza-CE, Brasil. e-mail: gmaia@secrel.com.br

Palabras clave: nutrición y control de calidad, frutas tropicales, formulación de mezclas, actividad antioxidante

RESUMEN

El trabajo tuvo por objeto determinar la actividad antioxidante y correlacionarla con el índice de fenoles totales, carotenoides totales (CT) y vitamina C de néctares desarrollados de anacardo, mango y acerola a través de planeamiento de mezclas, variando los contenidos de pulpas: anacardo, 12,25-21 %; mango, 12,25-21 % y acerola, 1,75-10,50 %, siendo fijado 35 % de pulpa en las formulaciones y corrección de los sólidos solubles hasta 11 °Brix. Las pulpas de frutas fueron pesadas y homogeneizadas juntamente con el agua y el azúcar, pasando en seguida por un tratamiento térmico a 90°C por 60 segundos, envasado a caliente y enfriado.

Fueron determinadas las actividades antioxidantes y los contenidos de vitamina C, carotenóides totales y fenoles totales, y luego se comparó la correlación entre los componentes.

La actividad antioxidante fue mayor en mezclas con mayores proporciones de pulpa de acerola, seguida por la de anacardo y por último por la pulpa de manga, que contribuyó para menores contenidos de actividad antioxidante. Se ha obtenido una gran correlación entre el contenido de antioxidante y la proporción de pulpa de acerola. Se verificó aún una alta correlación entre el contenido de actividad antioxidante y de vitamina C y fenoles totales.

Por consiguiente, una mayor participación de acerola en el néctar mixto de frutas contribuye para el aumento de la actividad antioxidante, probablemente a causa de los elevados contenidos de vitamina C y fenoles totales en estas formulaciones.

INTRODUCCIÓN

El Brazil es considerado un de los principales países productores de zumos de frutos, ocupando en concreto la tercera posición respecto a esto. La diversidad de frutos en el mercado es cada vez mayor, introduciéndose diariamente nuevos frutos tropicales cuyas propiedades y actividades no están aún totalmente determinadas (Kuskoski et al., 2005).

Actualmente, hay un mercado creciente para bebidas compuestas por mezcla de frutas, principalmente frutas tropicales (Branco y Gasparetto, 2003). Tales productos pueden ser gasificados o no, con contenido variado de zumo de frutas. Las bebidas mixtas de frutas presentan una serie de ventajas, como la posibilidad de combinación de diferentes aromas, sabores y componentes nutricionales (Matsuura et al., 2004), como vitamina C, fenoles y carotenoides, que son componentes que poseen actividad antioxidante.

El énfasis en destacar la capacidad antioxidante de los alimentos se sustenta en que el estrés oxidativo es un proceso biológico propuesto como un factor etiológico de las enfermedades crónicas no transmisibles y ocurre cuando la velocidad de formación de los radicales libres es superior a la actividad de los sistemas protectores. En condiciones fisiológicas, los compuestos agresores son controlados por la acción integrada y armónica de enzimas generadas por la evolución de miles de años y que depende de nutrientes antioxidantes de los alimentos de origen vegetal, como las vitaminas E y C y compuestos bioactivos antioxidantes llamados fitoquímicos, siendo el grupo más importante el de los polifenoles, que actúan de forma directa y independiente del sistema enzimático (Araya et al., 2006). La ingestión de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de estas enfermedades (Le Core et al., 2004; Park et al., 2003; Jampol y Ferris, 2001). Se cree que la dieta aumenta la defensa antioxidante del organismo evitando el daño oxidativo.

Se publican cada vez en mayor número nuevas investigaciones que asocian el consumo de frutas con los efectos beneficiosos para la salud humana. El trabajo tuvo por objeto determinar la actividad antioxidante y correlacionarla con índices de fenoles totales, carotenoides totales (CT) y vitamina C de néctares desarrollados de anacardo, mango y acerola a través de planeamiento de mezclas.

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

La formulación de la pulpa varió según un delineamento de mezclas (Barros Neto et al., 1995), variando los contenidos de pulpas: anacardo, 12,25-21 %; mango, 12,25-21 % y acerola, 1,75-10,50 % (Tabla 1), siendo fijado 35 % de pulpa en las formulaciones y corrección de los sólidos solubles hasta 11 °Brix. Las pulpas de frutas fueron pesadas y homogeneizadas juntamente con el agua y el azúcar, pasando en seguida por un tratamiento térmico a 90°C por 60 segundos, envasado a caliente y enfriado.

MÉTODOS

El experimento se desarrolló por duplicata y triplicado para los diferentes análisis.

La determinación de la actividad antioxidante fue realizada por métodos descritos por Re et al. (1999); vitamina C y fenoles totales fueron realizadas por metodología descrita en el Instituto Adolfo Lutz (2005) y AOAC (2005), respectivamente.

Para determinación de la actividad antioxidante, el néctar de cada tratamiento fue centrifugado a 15000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue recogido, filtrado y analizado suya actividad antioxidante según la metodología ABTS (Re et at., 1999). El radical $ABTS^{\bullet+}$ fue generado tras la reacción de 5 mL de solución acuosa de ABTS (7mM) con 88 µL de solución de persulfato potásico a 140 mM (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (25 °C) y en la oscuridad durante 14 h. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ± 0,02 a 734 nm usando espectrofotómetro UV-vis (Micronal, modelo B582. Las muestras filtradas y diluidas (30µL) y el antioxidante tomado como referencia, Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidrixi-2,5,7,8-tetrametilcromano) reaccionaron con 3 mL de dilución del radical $ABTS^{\bullet+}$ sin la presencia de luz. La disminución de la absorbancia a 734 nm fue medido pasado 6 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 µM (concentración final) en etanol. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

Fenoles totales fueron determinados según el método colorimétrico con el reactivo Folin-Denis (AOAC, 1995), usando el reagente ácido fosfotungstico-fosfomolibídico. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 765 nm. El contenido de fenoles totales fue determinado usando una curva de calibración con soluciones de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/mL de ácido gálico. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico en mg/100 mL de néctar.

La determinación de vitamina C fue determinada mediante el método de titulación con 2,6 dicloro indofenol (Instituto Adolfo Lutz, 2005).

Los resultados fueron expresos como mg de ácido ascórbico/ 100 mL de néctar.

El modelo para actividad antioxidante fue evaluado según los valores de F ($p \leq 0,05$) y del coeficiente de determinación (R^2).

Para el estudio de las relaciones existentes entre la actividad antioxidante y los contenidos de vitamina C, fenoles y carotenoides se aplicó un análisis de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa el gráfico de contorno referente a la actividad antioxidante en néctares mixtos de frutas tropicales.

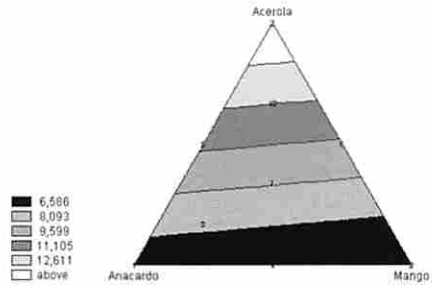


Fig. 1. Gráfico de contorno referente a la actividad antioxidante en néctares mixtos de frutas tropicales.

El modelo linear para actividad antioxidante fue significativo (Ecuación 1).

$$Activ\ antioxidan\ te = 5.62x_1 + 4.73x_2 + 14.12x \qquad (1)$$

Donde: x_1= contenido de anacardo, x_2= contenido de mango y x_3= contenido de acerola $R^2 = 0,973$

La actividad antioxidante fue mayor en mezclas con mayores proporciones de pulpa de acerola, seguida por la de anacardo y por último por la pulpa de manga, que contribuyó para menores contenidos de la actividad antioxidante. Se ha observado en la ecuación 1 una gran correlación entre el contenido de actividad antioxidante y la proporción de pulpa de acerola.

Los resultados de la actividad antioxidante y de las determinaciones de carotenoides, fenoles totales y vitamina C se encuentran en el Tabla 1.

Tabla 1. Curvas de nivel del modelo linear de 10 tratamientos y medias de los resultados para mezcla de pulpas.

Trat	Proporciones de pulpas			Resultados			
	Anacardo	Mango	Acerola	*AA*	*CT*	*FT*	*VC*
1	*21,00*	*12,25*	*1,75*	*5,7*	*0,4*	*66,5*	*82,2*
2	*12,25*	*21,00*	*1,75*	*5,1*	*0,5*	*53,2*	*66,4*
3	*12,25*	*12,25*	*10,50*	*14,7*	*0,5*	*111,2*	*202,5*
4	*16,80*	*16,80*	*1,75*	*5,4*	*0,4*	*58,6*	*75,9*
5	*16,80*	*12,25*	*6,30*	*10,5*	*0,8*	*91,4*	*139,2*
6	*12,25*	*16,80*	*6,30*	*9,3*	*0,5*	*83,6*	*136,0*
7	*15,05*	*15,05*	*4,55*	*7,8*	*0,5*	*73,6*	*117,0*
8	*18,20*	*13,65*	*3,15*	*6,6*	*0,4*	*75,7*	*110,7*
9	*13,65*	*18,20*	*3,15*	*6,3*	*0,5*	*69,1*	*91,7*
10	*13,65*	*13,65*	*7,70*	*10,1*	*0,4*	*93,5*	*174,0*

Trat = tratamiento; AA = actividad antioxidante (µM trolox/mL); CT = carotenoides totales (mg/100mL); fenoles totales (mg ácido gálico /100 mL); VC = vitamina C (mg acido ascórbico /100mL)

La pulpa de acerola elevó los contenidos de vitamina C y fenoles totales, a pesar de la poca cantidad de pulpa de acerola utilizada en las formulaciones.

El contenido de fenoles totales varió de 53,25 a 111,20 mg de EAG/100 mL de néctar, siendo el mayor contenido encontrado en el jugo con mayor proporción de acerola.

El contenido de vitamina C osciló de 66,46 a 202,53 mg de ácido ascórbico/100 mL de néctar, también estando el mayor contenido en el néctar con mayor proporción de acerola, siendo todas las formulaciones consideradas fuentes ricas en vitamina C, considerándose que la Ingestión Diaria Recomendada (IDR) para un adulto es de 45 mg (Brasil, 2005).

Nogueira (1991) mencionó la posibilidad de utilizar jugo de acerola como agente enriquecedor de numerosos jugos y néctares pobres en vitamina C, como de manzana, pera, cereza, lima, ananás, molecotón.

Matsuura y Rolim (2002) enriquecieron jugos de ananás con vitamina C a través de la mezcla con jugo de acerola, con pequeño o ningún impacto en las características sensoriales de los productos, cuando se incrementaron pequeñas proporciones de jugo de acerola (2.5-5%). Otros autores utilizaron anacardo para enriquecimiento de vitamina C en bebidas mixtas de frutas (Akinwale, 2000; Inyang y Abah, 1997).

La utilización de vitamina C obtenida de mezclas producidas por pulpas de acerola y anacardo puede ser utilizada para fortificar la cualidad nutricional de mezclas con pulpa de manga, que poseen bajo contenido de vitamina C.

En relación al contenido de antioxidantes expresos en TEAC, este varió de 5,08 a 14,73 µM/mL, siendo los néctares con mayores contenidos de vitamina C los responsables por el aumento de la actividad antioxidante.

El Tabla 2 muestra la correlación de Pearson entre la actividad antioxidante y las otras variables estudiadas.

Tabla 2. Correlación de Pearson (R) entre la actividad antioxidante (expreso como TEAC usando ABTS) y vitamina C, carotenoides totales y fenoles totales (n = 20)

Parámetros	*Coeficiente de correlación (R)*
Carotenoides totales	$0,127^{NS}$
Fenoles totales	0,934*
Vitamina C	0,938*

*NS No significativo al nivel de P ≤ 0.05; **Significativo al nivel de P ≤ 0.05*

La capacidad antioxidante (TEAC) demostró una tendencia a la correlación directa significativa con el contenido de fenoles totales y vitamina C al nivel de 5% de probabilidad, presentando correlación altamente positiva (r = 0,7126), aunque no se haya verificado correlación con el contenido de carotenoides totales en los néctares mixtos de frutas (p > 0,05).

Resultados semejantes fueron observados por Kuskoski et al. (2005), que verificaron correlación positiva entre los componentes fenólicos y la actividad antioxidante en pulpas de frutos; y Gardner et al. (2000), que observó correlación positiva entre actividad antioxidante y contenido de fenoles totales y vitamina C y no encontró correlación con carotenoides, en varios jugos de frutas. Por otro lado, Hassimoto et al. (2005) no encontraron correlación entre el contenido de vitamina C y la actividad antioxidante en frutas.

CONCLUSIONES

Una mayor participación de acerola en el néctar mixto de frutas contribuye para el aumento de la actividad antioxidante, probablemente debido a los elevados contenidos de vitamina C y fenoles totales en estas formulaciones.

La formulación con 12,25% de anacardo, 12,25 de mango y 10,50% de acerola fue la que presentó mayor cantidad de actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTO

A la agencia CNPq por financiar el trabajo a través del Edital Universal n° 019/2004 y por la beca de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Akinwale, T. O. 2000. Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. European Food Research and Technology, 211: 205-207.

AOAC. 1995. *Official methods of analysis of the AOAC*, 16th ed., USA: AOAC. 1141p.

Araya, H.L., Clavijo, C.R., Herrera, H. 2006. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. Archivos Latinoamericanos de nutrición, 56:.

Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Brums, R.E. 1995. *Planejamento e Otimización de Experimentos*. Editora da UNICAMP, Brasil, 299p.

Branco, I.G., Gasparetto, C. 2003. Aplicación da metodologia de superficie de resposta para el estudo do efeito da temperatura sobre el comportamento reológico de misturas ternárias de manga, laranja e cenoura. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23: 166-171.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, 23 de setembro de 2005. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial da União, Poder Executivo.

Gardner, P.T., White, T.A.C., McPhail, D.B., Duthie, G.G. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. Food Chemistry, 68: 471-474.

Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I.S., Lajolo, F.M. 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53: 2928-2935.

Instituto Adolfo Lutz. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Instituto Adolfo Lutz – Brasília: Ministério da Saúde, 1018p.

Inyang, U.E.; Abah, U.J. 1997. Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice. Plant Foods for Human Nutrition, 50: 295-300.

Jampol L.M., Ferris F.L. 2001. Antioxidants and zinc to prevent progression of age-related macular degeneration. J. Am. Med. Assoc., 286: 2466-2468.

Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc. Tecnol. Aliment., 25: 726-732.

Le Core, L., Fustier, P., Chalabi, N., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D. 2004. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. Clin Chim Acta, 344: 115-121.

Matsuura, F.C.A.U., Folegatti, M.I.S., Cardoso, R.L. et al. 2004. Sensory acceptance of mixed nectar of papaya, passion fruit and acerola. *Sci. Agric.* 61: 604-608.

Matsuura, F.C.A.U.; Rolim, R.B. 2002. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um "blend" com alto teor de vitamina C. Revista Brasileira de Fruticultura, v: 138-141.

Nogueira, C. M. C. da C. D. Estudo químico e tecnológico da acerola (*Malpighia glabra* L.). 1991. 117 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1991.

Park, Y.K., Park, E., Kim, J.S., Kang, M.H. 2003. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. Mutat Res. 529: 77-86.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med., 26: 1231-1237.

ESTADO FISICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICOS DEL PESCADO SECO DISTRIBUIDO EN PERIODOS DE TEMPORADA

SALAMANCA GROSSO GUILLERMO[1]; OSORIO TANGARIFE. MÓNICA PATRÍCIA; MACHADO ARGUELLES INDIRA NATALLI
[1] GRUPO DE INVESTIGACIONES MELLITOPALINOLÓGICAS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ALIMENTOS.
Facultad de Ciencias Departamento de Química. Universidad del Tolima.
***Barrio Santa Helena Parte Alta. Telefax: +57-8-2669162. Ibagué Colombia. gsalaman@ut.edu.co**

Palabras clave: Tecnología de Alimentos. Control de Calidad. Pescado seco.

RESUMEN

El pescado contiene proteínas de importante valor biológico, vitaminas, minerales y lípidos, fracción constituida por triglicéridos y fosfolípidos; el contenido de carbohidratos es bajo; en muchos países es la principal fuente de alimentación. Investigaciones recientes han demostrado que durante el proceso de degradación se generan bases nitrogenadas volátiles (BNV): Amoniaco, Monometilamina, Dimetilamina y Trimetilamina (TMA). En este trabajo, se abordan las condiciones fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas relativas al mercado del pescado seco en temporada. Se encuentra una correlación significativa entre el contenido de TMA y otras BNV. Los valores de TMA, que hacen indeseable al pescado seco son de 10 mg de N-TMA/100 g, que para el caso de las muestras comercializadas en Ibagué (Colombia) oscilaron entre 27.8 a 148.7 mg de N-TMA/100 g. El pH del pescado fresco oscila entre 6.0 a 6.5, la proximidad al límite para consumo es de 6.8, valores superiores a 7.0 son indicativos de pérdida de calidad. Se identifica la presencia de bacterias entéricas, que determina estar en contacto con heces fecales durante alguna de las etapas del procesado. El 15% de las muestras analizadas colectadas de manera aleatoria, demuestra la existencia de *E. coli*, que se desarrolla con protocolos microbiológicos.

INTRODUCCIÓN

El incremento constante de la población mundial, ha requerido que exista gran cantidad y variedad de alimentos disponibles en las centrales de abastecimiento, motivo por el cual la industria alimentaria en respuesta a las exigencias del mercado, ha implementado técnicas de procesamiento para fabricar de manera eficaz productos alimenticios de calidad [1]. El Consejo de Alimentación y Agricultura de la Organización Mundial de la Salud considera que las actuales y nacientes capacidades relativas a la producción y conservación de alimentos garantizarían el suministro suficiente de alimentos inocuos y nutritivos hasta el año 210, cuando esta previsto que la población mundial alcance una cifra de más de 7 mil millones. Es por esto que la carne de pescado que contiene proteínas de importante valor biológico, además de vitaminas, minerales, lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos de la serie ω) y carbohidratos, ha incrementado su consumo en los últimos años, desplazando otros tipos convencionales de carne. Es importante señalar que durante el año 2000, se movilizaron hacia el interior de Colombia por vía aérea 8.446 toneladas de pescado, correspondiendo a pescado fresco el 90.7% y el 9.3% a pescado seco, perteneciente a la variedad Bagre [3,9,15].

En estudios de trazabilidad alimentaria, se hace indispensable considerar el termino "intoxicación alimentaría" se utiliza para designar las enfermedades producidas por la ingestión de toxinas elaboradas por los microorganismos en un alimento o bebida contaminada. Las autoridades responsables de la Salud Pública de los Estados Unidos [17], han identificado los microorganismos causantes de la mayoría de enfermedades trasmitidas por alimentos, de acuerdo a la severidad de la enfermedad o por el número de casos que produce. Dentro de estos microorganismos se encuentran *Campylobacter jejuni sp., Escherichia coli* 0157:H7; *Staphylococcus aureus sp.*, la bacteria *Vibrio vulnificus sp., Listeria monocytogenes spp, Shigella sp., Clostridium botulinum sp.* y *Salmonella sp.*, responsable de millones de casos al año de enfermedades que se originan por manipulaciones deficientes y malos sistemas de procesado [5,7]. La carne de pescado bajo condiciones higiénico sanitarias de manipulación deficiente, ha generado severos problemas de contaminación. El pescado durante su vida, posee barreras que impiden el desarrollo de microorganismos y agentes patógenos capaces de vulnerar su estructura física [18]. Sin embargo durante y después de la recolección y sacrificio se genera el inicio de la descomposición albergando una flora comensal patógena que se localizará en las estructuras internas del músculo, generando enzimas que destruyen el tejido y que conllevan al incremento bacteriano [12].

La contaminación posterior a la captura y procesamiento del pescado para la obtención de un producto seco y salazonado, demanda una serie de etapas entre las cuales se destaca el almacenamiento, transporte, manipulación y venta a granel. Como consecuencia de su composición y la reacción poco ácida de su carne, el pescado se constituye en un alimento altamente perecedero, donde se generan procesos degradativos y actividad enzimática del tipo autolítico endógenas y crecimiento de flora microbiana diversa, que se asienta básicamente sobre la piel y el intestino, se extiende y multiplica en otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas, de bajo peso molecular entre ellos aminoácidos y aminas, acompañados de un pH relativamente alto que favorece su desarrollo. Según el tipo de germen implicado en los procesos, las consecuencias clínicas para la salud del consumidor pueden ser leves hasta altamente toxiinfecciosas por lo que se hace necesario realizar un estricto control de las características organolépticas y microbiológicas garantizando la salubridad e inocuidad de la materia prima. Los factores que influyen en el desarrollo y sucesiones microbianas están clasificados en cuatro grupos: Factores intrínsecos (limitación del sustrato) como: disponibilidad de nutrientes, incidencia del pH, potencial redox, actividad de agua y componentes antimicrobianos; Factores extrínsecos (limitaciones ambientales) como: humedad relativa, temperatura y presión atmosférica, entre otros; Factores implícitos como la velocidad de crecimiento, sinergismo, antagonismo y comensalismo. Los factores de elaboración como: división, lavado, envasado, tratamiento térmico y radiaciones. Dependiendo de las condiciones predominantes para un grupo de agentes microbianos capaces de deteriorar la calidad de los alimentos se tienen: Aerobios estrictos (*Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus*) y facultativos (*Staphylococcus* y *Enterobacterias*), anarobios estrictos (*Clostridium, Bacteriodes, Pectococcus y Pripionibacterium*) y microaerófilos o aerotolerantes (*Lactobacillus, Streptococcus o Pediococcus*) [4]. Entre las intoxicaciones que suelen producirse por consumir pescado seco se encuentra la causada por histamina debida a la ingestión de escómbridos en mal estado como resultado de una inadecuada manipulación y preservación, generalmente almacenados en lugares poco higiénicos y temperaturas por encima de las de refrigeración. La histamina se produce por descarboxilación del aminoácido histidina, debido a la acción proteolítica de las catepsinas. Dentro de la flora existente se encuentra *Proteus, Klebsiella o Morganella*, que de acuerdo a las condiciones produce la enzima histidina-descarboxilasa. Los aminoácidos son importantes iniciadores de la degradación, se encuentra el ácido glutámico, arginina, lisina, tirosina e histidina.

Las bacterias encargadas de la formación de histamina están comprendidas para un amplio rango de temperaturas. *Photobacterium phosphoreum* se desarrolla significativamente

a menos de 10°C; *Pseudomonas* I, II y III proliferan en pescados frescos inadecuadamente almacenados cerca de 5°C. Mientras que próximo a 30°C son dominantes especies de *Vibrio* y *Photobacterium*. Los posibles potenciadores de la toxicidad son trimetilamina (TMA), el óxido de trimetilamina y aminas biogénicas como putrescina, cadaverina, anserina, espermita, entre otras. La existencia de inhibidores de la diaminooxidasa y de la histamina metiltransferasa incrementaría también la toxicidad. La concentración de histamina en pescados determina que menor a 50 ppm es un pescado seguro para su consumo, de 50 a 200 ppm es un pescado maltratado y posiblemente tóxico y de 200 a 1000 ppm es un pescado no apto y altamente riesgoso [14]. Los países que comprenden la Comunidad Europea establecen un valor máximo promedio de histamina de 100 ppm; mientras que de acuerdo a la guía de la FDA (Food Drugs Administration) establece que los niveles para éste componente deben ser a lo más de 50 ppm para pescado fresco y de 200 ppm para pescado procesado. En el Perú, establecen niveles promedios máximos de histamina según el tipo de pescado: super prime (250 ppm), prime (600 ppm) y estándar (por encima de 600 ppm). Existe la posibilidad de producción de histamina en medio salado, almacenado a 5°C, una vez presente la enzima histidina descarboxilasa, que continua con la formación de histamina en el pescado, aún cuando la bacteria deje de ser activa (muerta o con metabolismo mínimo) [16]. Algunos de los métodos mas utilizados en distintos tratamientos para cuantificar la alteración de los productos de la pesca debido a la variedad de rutas químicas a través de las cuales se puede causar deterioro de los peces son los físicos comprendidos por la medición en cambios de textura, resistencia eléctrica especifica y fluorescencia del músculo, índice de refracción del humor vítreo y químicos donde se determina la medida de nitrógeno básico volátil total o TMA, la determinación de histamina y el valor K (índice de descomposición enzimática de los nucleótidos) [6,8]. Los criterios de clasificación para pescados en general, incluyen características morfológicas entre las que se destacan la forma del cuerpo, aletas, escamas y número de las mismas; zona de captura según: aguas saladas o dulces y composición que se clasifica en tres grupos: Pescados magros o blancos, grasos o azules y semigrasos.

En el proceso de degradación del pescado, se generan bases nitrogenadas volátiles, que pueden ser expresados como nitrógeno volátil total (NVT) o como bases nitrogenadas y que representan al Amoniaco, Monometil amina (MMA), Dimetilamina (DMA) y Trimetilamina (TMA) [10,11]. La correlación efectiva entre NVT y TMA. Cuando el pescado supera valores de 25 mg N/100 g el pescado comienza su deterioro, a 30 mg N/ 100 g, puede ser considerado como indeseable y a 40 mg N/ 100 g como indeseable para el consumo humano. En el proceso de degradación del pescado se generan bases nitrogenadas volátiles (BNV) en particular: Amoniaco, Monometil amina (MMA), Dimetilamina (DMA) y trimetilamina (TMA). El oxido de trimetilamina se suele reducir durante la descomposición a TMA y el amoniaco es el producto de la descomposición de la proteína [13]. La cantidad de TMA y las (BNV), son dos indicativos de la calidad y estabilidad fisicoquímica del pescado. Se ha encontrado una correlación significativa entre el contenido de (TMA) y otras bases nitrogenadas volátiles. En otros productos de la pesca, se demostró que el almacenamiento a (-10°C) se producía (DMA) con deterioro de la textura y la calidad organoléptica del producto particularmente en merluzas, con deterioro de lípidos por efectos de oxidación.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se adelantó un estudio, de las condiciones higiénico-sanitarias de calidad fisicoquímica, microbiológica y atributos sensoriales relacionados con la textura, aroma, aspecto global y color en muestras de pescado seco distribuido en la ciudad de Ibagué. Se realizaron pruebas para detección de *Salmonella sp, Shiguella sp, Clostridium sp,* sulfito reductores, hongos y levaduras, siguiendo procedimientos descritos [9]. Los parámetros de estabilidad comprendieron las bases nitrogenadas básicas totales (BNVT) y trimetilamina (TMA), además se determinó el contenido de humedad, fracción grasa, pH, actividad de agua (a_w) y nivel de cloruros. Se realizó un muestreo aleatorio simple, para un total de 11 (once) muestras. En todos los casos se siguieron los métodos descritos por [2]. El producto de la referencia, se comercializa en Colombia durante las épocas de temporada de Cuaresma y en los meses de Febrero a Mayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En sistemas productivos el concepto de trazabilidad juega un papel significativo, siguiendo normativas ambientales sociales relativas a la inocuidad, calidad autenticidad y la confirmación de procedencia de los alimentos [11]. Las muestras de pescado colectadas y analizadas demostraron proceder del Magdalena, frontera con Brasil y los Llanos Orientales en cerca del 18%, Amazonas 9% y proveedores de supermercados de cadena debidamente registrados 19 %. Las determinaciones de actividad de agua (a_w), presentaron niveles superiores a 0.70 (18% de humedad), condición necesaria para albergar el desarrollo microorganismos. El contenido de cloruros en las muestras fue variable presentándose un mínimo de 5.30 y un máximo de 14.9 % en un rango de 9.6 unidades, lo que indica falta de control en la cantidad adicionada durante el sistema de salazonado y secado en el lugar de origen, (Figura 1), la desviación estándar (DS) para las once muestras es de ± 2.81 y su coeficiente de variación (CV) de 26.5%, parámetro estadístico que confirma la variabilidad y la falta de control de proceso para los distintos lotes estudiados. De esta información se infiere que la (a_w) no se ve controlada por la adición de cloruro de sodio y por tanto permite el desarrollo de microorganismos.

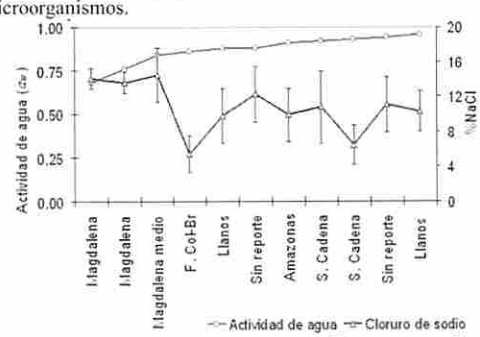


Figura 1. Perfil para el contenido de Cloruro de sodio y actividad de agua en muestras de pescado seco.

Los valores de pH para el pescado fresco esta entre 6.0 a 6.5, el límite para consumo es de 6.8, valores superiores a 7.0 son indicativos de alteración. En las muestras analizadas, el contenido de humedad y (a_w), no se han controlado suficientemente y han facilitado el inicio del proceso de hidrólisis de proteínas, con incremento del pH y evolución de las bases nitrogenadas volátiles totales, debido a la actividad enzimática. Las muestras analizadas exhibieron pH en un rango comprendido entre 6.25 y 7.74. Los perfiles para Nitrógeno en mg N/100 g, así como el %N-TMA se muestran en la (Figura 2). El 55.4% de las muestras presentaron niveles superiores a 40 mg N/100g. En el pescado fresco, se debe esperar remociones graduales de la humedad para evitar la evolución de bases nitrogenadas por acción de los microorganismos. Los valores de TMA, que hacen indeseable al pescado son del orden de 10 mg de N-TMA/100 g, que para el caso de las muestras estudiadas oscilaron entre 27.80 a 184.0 mg N-TMA/100 g, superiores a los valores guía. El 27.7% de las muestras presentaron niveles superiores a 40 mg de N/100g, un 27.7% adicional presentó valores de 30 mg N/100 g, es decir, cerca del 60% de las muestras resultaron no seguras desde el punto de vista del proceso.

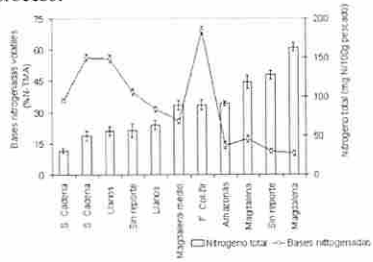


Figura 2. Perfiles para el contenido de nitrógeno total y las bases nitrogenadas totales en muestras de pescado seco

La fracción lipídica encontrada en las muestras oscilaron entre 1.40 y 34.6% (p/p). Los perfiles de pH y grasa total se muestran en la Figura 3.

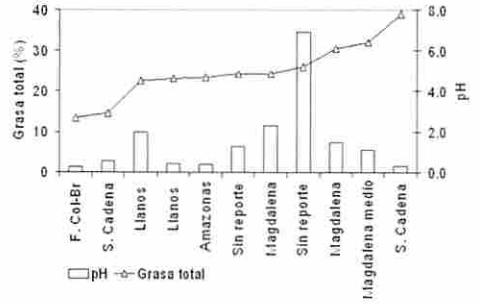


Figura 3. Perfil para la fracción grasa y el pH en muestras de pescado seco

En las caracterizaciones microbiológicas se identificó la presencia de bacterias entéricas. El 15% de las muestras analizadas demostró la presencia de *E. coli*, indicativo de contacto con heces fecales en algunas de las etapas en las que estuvo expuesta el producto, el 38% *Kleibsiella sp* y el 47% correspondió a *Enterobacter sp.* Las enterobacterias del genero *Proteus sp* y *Klebsiella sp.,* se caracterizan por la formación de histamina como producto secundario de su metabolismo, debido a la acción de su enzima histidina descarboxilasa. Ciertas bacterias no intestinales del pescado son también capaces de producir histamina en condiciones de anaerobiosis (*Clostridium perfringens*). Se ha demostrado que *Klebsiella pneumoniae* es capaz de producir histamina a menos de 7°C después de prolongados períodos de almacenamiento, este compuesto podria ser contributivo a la formación de BNVT. En todas las muestras analizadas se identificó la presencia de *Clostridium perfringens,* determinada por el medio selectivo utilizado que contiene sulfadiaxina y polimixina que inhibe el crecimiento de otros tipos de *Clostridium.* El 79% de las muestras de pescado seco presentó desarrollo de levaduras lo que describe la iniciación del proceso de fermentación lo que permite de igual forma corroborar el alto grado de humedad.

CONCLUSIONES

Del estudio se deduce que las condiciones higiénico-sanitarias del producto exhibieron actividad microbiológica en virtud a diversos factores que podrían ser clasificados en tres grupos: contaminación en la fuente debido a manipulación defectuosa, a procesos de salazanado y secados incompletos; a las condiciones de transporte necesarias para el manejo de materia prima a los expendios usualmente en camión con exposición de factores medioambientales y la voluntad de los transportadores y a contaminación en salas o unidades de almacenamientos durante la temporada. Por lo anterior, se puede afirmar que los agentes que influyen en el desarrollo y sucesiones microbianas relacionadas con la calidad y estabilidad del pescado seco, depende fundamentalmente de factores intrínsecos del producto que involucran el pH, el potencial redox y la (a_w), así como de las limitaciones ambientales establecidas para las muestras, las condiciones de manejo y envasado. La humedad relativa y su temperatura, son aspectos que definen la velocidad de crecimiento, sinergismo, antagonismo y comensalismo de agentes microbianos. Sin controles en los procesos de elaboración (BPM), división, lavado, envasado y tratamiento térmico, es imposible considerar al pescado seco como material seguro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar toda su gratitud al Instituto Colombiano Agropecuario -ICA- Seccional Tolima, al Comité Central de Investigaciones y al Departamento de Química de la Universidad del Tolima, por facilitar las condiciones necesarias en la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

[1] ABGRALL, B. Pescados y otros productos marinos. Bourgeois, C. M.; Mescle, J. F.; Zucca, J. Microbiol. Alim. 1994.

[2] AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington,D.C. 2000.

[3] Indicadores de coyuntura Nacional. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. 2000.

[4] ANDRE´S, A.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; BARAT, J. M.; FITO, P. Mass transfer kinetics during cod salting operation. Food Science and Technology International, 8, 309-314. 2002.

[5] BARAT, J. M.; GALLART-JORNET, L.; ANDRE´S, A.; AKSE, L.; CARLEHO¨ G, M.; SKJERDAL, O. T. Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. Journal of Food Engineering, 73, 9–19. 2006.

[6] BEUCHAT, L. Microbial stability as affected by water stability. Cereal foods World 26:345-349. 1981.

[7] CARDINAL, M., GUNNLAUGSDOTTIR, H., BJOERNEVIK, M., OUISSE, A., VALLET, J. L., LEROI, F. Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. Food Research International, 37, 181–193. 2004.

[8] FAID, M.; KARANI, H.; ELMARRAKCHI, A.; ACHKARI-BEGDOURI, A. A Biotechnological process for the valorization of fish waste. Bioresourse technology 49 Pp. 237-241. 1994.

[9] FORSYTHE, S. J. Alimentos seguros. In: Microbiología. (Ed) Acribia S.A. Zaragoza España. 2003.

[10] HUSS, H. Cambios Post-mortem en pescado. In: El pescado fresco, su calidad y cambios de calidad. FAO. Documento Técnico de Pesca N° 348. 202 pp. 1998.

[11] KINSELLA, J. E. Fish and Seafoods: Nutritional implications and quality issues. Food Tech., 42, 5. Pp 146-150. 1988.

[12] LARRAÑAGA, I. J.; CARABALLO, J. M.; et al. In: Control e higiene de los alimentos. (Ed) Interamericana S.A. Madrid España. 1999.

[13] LINDEN, G.; LORIENT, D. In: Bioquímica Agroindustrial. (Ed) Acribia S.A. Zaragoza España. 1994.

[14] LISBETB TRUELSTRUP HANSEN,"" TOM GILL,B SUSANNE DREWES RSNTVED' & HANS HENRIK HUSS. Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International,* Vol. *29, No. 2,* pp. *181-188, 1996.*

[15] LOVE,R. M. Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. G. M. Hall. Fish Proc. Tech., 2ª edition. (Ed) Blackie Academic and Professional, Londres. 1997.

[16] KIRK, R.; SAWYER, R.; EGAN, H. In: Composición y análisis de los alimentos de Pearson. (Ed) Continental S.A. 2da Ed. México. 1996.

[17] Servicio de salud pública de Estados Unidos. (on-line) http://www.foodsafety.gov/~fsg/bac/s10least.html. 05-02-05. Nota html.

[18] VALLS, J.; PAREDES, A.; GONZÁLEZ, D. Estabilidad de filetes de sardina (*Sardinella aurita*) en almacenamiento congelado a –18°C. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVI, N° 2, 176 - 185, 2006.

VALORACIÓN BROMATOLÓGICA, ORGANOLÉPTICA, TECNOLÓGICA Y NUTRICIONAL DEL GEL DE *Opuntia subulata* PARA INCORPORAR EN ALIMENTOS HUMANOS

López Jesús, Zambrano John, Játiva Cumandá, Monserrath Mejia, Sofía Carrillo
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería en Industrias Pecuarias
Panamericana Sur Km. 1,5. Telefax 032605911-Ext. 153
jelopez@espoch.edu.ec-jrlopez@yahoo.com.mx

Palabras clave: nutrición y control de calidad, yogurt dietetogeriátrico, gel de *Opuntia subulata.*

RESUMEN

En el presente trabajo se investigo la tecnología para extraer el gel de la *Opuntia subulata* mediante pruebas de laboratorio con la finalidad de determinar las características bromatológicas del gel y sus componentes naturales (propiedades fitoquímicas de los metabolitos secundarios), que permitió establecer la cantidad de gel que se pueda incorporar al yogurt para proveer las características organolépticas y el tiempo de vida de anaquel del producto para la aplicación del protocolo de investigación medica, mediante pruebas de aceptación, tolerancia y cito protección a mucosa gástrica y entérica en una muestra no representativa de 60 personas de la tercera edad del yogurt elaborado con dos niveles de inclusión del gel de *Opuntia subulata.*

El diseño de la intervención médica se constituyo en la administración de una dosis diaria de yogurt (250 ml) por 60 dias consecutivos a cada uno de los sujetos del estudio, en cada uno de los grupos de casos y controles a doble ciego. Al iniciar el estudio, se realizaron pruebas de laboratorio a cada individuo que incluyen: examen coprológico y coproparasitario –para diferenciar parasitosis como causas de posibles síntomas de intolerancia- y pH fecal, así como Colesterol total, HDL-colesterol y LDL-colesterol.

La aceptación del gel por el panel de cata fue esencial para incorporar el gel al yogurt, determinándose que cuando se licua los cladodios de *Opuntia subulata* con una mínima cantidad de agua, el sabor del gel extraído es amargo, color verde intenso y fuerte olor herbáceo. Las características organolépticas del gel se mejoran cuando los cladodios son lavados, descortezados, laminados y secados en estufa con circulación forzada de aire a 65°C por 8 horas, la extracción y purificación del gel es mas rápida cuando se añade al extracto seco obtenido alcohol potable, para luego purificarlo en rotavapor, esterilizar el gel y mantenerlo en refrigeración.

INTRODUCCION

En la ultima década se han desarrollado nuevos conceptos de nutrición como una respuesta a incrementar el nivel de vida de las personas es por ello que: "Alimento sano", definido como aquel alimento libre de riesgo para la salud y que conserva su capacidad nutricional, su atractivo a los sentidos, su pureza y su frescura y "Alimento funcional", descrito como alimento modificado o ingrediente alimentario, que pueda proveer beneficios a la salud, superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales. Condory et, al (1988) En personas de edad adulta es necesario incrementar una dieta para mejorar la calidad de vida por los problemas gastrointestinales que se presentan por la rutina de vida que llevaron es por ello que se recomienda una dieta con vegetales, cereales, frutas que vengan acompañados de un derivado lácteo como es el yogur dietetogeriátrico, elaborado con gel extraído y purificado de los cladodios de la *Opuntia subulata*, que contienen un gel compuesto por metabolitos secundarios, por lo tanto, el gel humecta el tracto faríngeo, ayuda a que los alimentos puedan ser deglutidos, neutraliza la acidez estomacal y tienen acción cicatrizante.

La *Opuntia subulata* es una cactácea que crece abundantemente en forma silvestre desde los 2400 a los 3200 m.s.n.m. Cáceres, (2003), también es cultivada como ornamental en algunas viviendas y se usa como cercas vivas. En medicina tradicional los cladodios son utilizados en jarabes para curarse los riñones, el jugo y fruto de esta planta se le atribuye la propiedad para disolver cálculos biliares. Con la incorporación del gel de *Opuntia subulata*, el grado de viscosidad y gelificación del yogurt fue favorecido, evitando la sinéresis. Además el propósito de añadir el gel de *Opuntia subulata* al yogurt contribuye a mejorar la firmeza del producto y darle al gel (yogurt) una mayor resistencia a los daños mecánicos, como lo menciona Robinson (1986) , evitando así el desuerado durante el manejo normal del yogurt.Los estudios de cito protección determinaron la tolerancia en pacientes de la tercera edad, esta cito protección es relevante a nivel de mucosa gástrica y entérica. . Buchanan (1974), Sneath, (1986), Radke. (1986)

Por cuanto el yogurt al ser un alimento fermentado, que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobaillus delbrueeckii ss. bulgaricus y Streptococcus salivarius ss. thermophilus,* es un alimento suave y viscoso o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con sabor característico, que son convenientes para las personas que sufren de intolerancia a la lactosa, ya que estos problemas no se presentan cuando se consume estos alimentos. Debido a que el *Lactobaillus delbrueeckii ss. Bulgaricus* es un bacilo homofermentativo grampositivo , el cual produce ácido D-(-) láctico y es capaz de fermentar la lactosa, glucosa, galactosa y fructosa, pero no así la maltosa y sacarosa. Tiene habilidad para crecer a pH inferiores a 5.0 y presenta metabolismo fermentativo aun en presencia de aire.. En tanto que el *Streptococcus salivarius ss. Thermophilus*, es una bacteria grampositiva, es homofermentativa y produce ácido L -(+) láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa. Ambas especies tienen una temperatura óptima de crecimiento de 40 a 45°C. Buchanan (1974), Sneath, (1986), Radke. (1986)

MATERIALES Y METODOS

Materiales.

Se recopilaron 150Kg. de cladodios de *Opuntia subulata*, para lavar, descortezar, laminar, deshidratar y realizar la extracción y purificación del gel, elaboración del yogur dietetogeriatrico, valoración físico-química, microbiológica y organoléptica del producto obtenido, evaluación de la vida de anaquel, aplicación del protocolo de investigación medica, mediante pruebas de aceptación, tolerancia y cito protección a mucosa gástrica y entérica en una muestra de 60 personas de la tercera edad. En la elaboración del yogur dietetogeriatrico, el tamaño de la unidad experimental fue 15 litros de yogurt para cada individuo, separados en dos grupos de 30, se empleo un total de 900 litros de leche, a las cuales se les añadió los diferentes niveles de gel de *Opuntia subulata,* por lo que se utilizaron 60 sujetos de estudio, que recibieron una dosis diaria de yogurt (250ml.) por un lapso de 60 dias.

Métodos.

En el desarrollo de esta investigación para las pruebas paramétricas como: composición bromatológica tanto del gel de *Opuntia subulata como del yogurt con* inclusión del gel se aplico un Diseño Completamente al Azar (DCA) , en las pruebas no paramétricas u organolépticas del yogurt geriátrico se aplico la Prueba de Ratting Test, Witting (1981) y en las pruebas de tolerancia y cito protección, se aplico un estudio analítico de Casos y Controles a Doble Ciego, mediante la selección de pacientes con diagnostico clínico de intolerancia a la lactosa. Además fue necesario realizar un reporte preliminar de resultados sobre los beneficios del uso de *Opuntia subulata*

en preparados lácteos (yogurt), principalmente en individuos con diagnostico clínico de intolerancia a la lactosa Kretchmer. (1972). El propósito de añadir el gel de *Opuntia subulata* al yogurt contribuyo a mejorar la firmeza del producto Mostacero, (2002), y darle al gel (yogurt) una mayor resistencia a los daños mecánicos, como lo menciona Robinson (1986), evitando así el desuerado durante el manejo normal del yogurt.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se definió la técnica de extracción, purificación y recuperación del gel de *Opuntia subulata*, mediante el secado en estufa con circulación forzada de aire a 60°C de las laminas obtenidas de los cladodios lavados y descortezados *de Opuntia subulata*, cuyo extracto es macerado por 24 horas en alcohol potable, para luego recuperar el alcohol en el rota vapor, al mismo tiempo que se purifica y se obtiene el gel para incorporar en el yogurt que se administr0 a 60 pacientes de la tercera edad, de acuerdo con el Diseño de Investigación Médica, con una dosis diaria de 250 cc de yogurt con gel de *Opuntia subulata* por dos meses, lo cual permitió elaborar el Diseño de Aplicación de exámenes de laboratorio.

En las pruebas de actividad colerética del gel, a cada tipo de cálculos biliares se les colocó en envases plásticos estériles, se les añadió 30ml. de gel esterilizado, observándose que a partir de las 36 horas los cálculos comienzan a disolverse, a los 15 días los cálculos de pigmentación negra presentan una mínima cantidad de partículas disgregadas, los cálculos biliares de color crema lobulado presenta un mayor grado de blandura, disolviéndose completamente a los 30 días, los cálculos de color blanco no presenta hasta los 30 días signos de dilución o disgregación de partículas con lo cual se podrá realizar las pruebas cualitativas requeridas con el fin de complementar el estudio posteriormente.

Al considerar la valoración del carácter apetecible de los yogures dietetogeriátricos elaborados con diferentes niveles de gel de *Opuntia subulata*, las puntuaciones medias asignadas no fueron diferentes estadísticamente ($P>0.05$), por cuanto se registró puntuaciones entre 16.30 y 17.11 puntos sobre 20 de referencia, que corresponden a los yogures del grupo control y de aquellos en los que se empleó el 6.0 % de gel, respuestas que permiten considerar que al emplearse el gel de *Opuntia subulata* se mejora ligeramente la aceptación del yogur, por cuanto la calificación que recibió el producto del grupo control, fue menor que los otros grupos en estudio, es necesario señalar que el yogur es un producto lácteo altamente apetecible, no solo por sus características organolépticas, sino también por sus propiedades nutritivas, así como señala Kroger (1976), quien indica que la ingestión de este producto es recomendable en todas las edades, siendo apropiado para los pacientes con deficiencia de lactasa, por sus propiedades bacteriostáticas contribuyen a la resistencia a las infecciones, intensifica la retención de fósforos, calcio y hierro, por lo que se considera que la ingesta diaria de yogur puede mejorar la calidad de vida.

Valoración físico – química del yogurt dietetogeriatrico

En la evaluación de los parámetros nutritivos de los yogures dietetogeriátricos, se determinaron diferencias estadísticas por efecto de los niveles de gel de *Opuntia subulata* empleados, por lo que se considera que los niveles de gel de *Opuntia subulata* afectaron la calidad nutritiva del yogur dietetogeriatrico, como se puede observar en la tabla 5.

Tabla 1. **VALORACIÓN FÍSICO –QUÍMICA DEL YOGURT DIETETOGERIATRICO ELABORADO CON DISTINTOS NIVELES DE GEL DE *Opuntia subulata***

Parámetro (%)	Niveles de inclusión de gel de *Opuntia subulata*				
	0.0%	1.5%	3.0%	4.5%	6.0%
Humed.	81.6a	76.2b	75.7b	75.9b	75.7b
M. Seca	18.4d	23.8c	24.06b	24.2b	24.4a
Proteína	3.8b	5.8a	5.81[a]	5.83[a]	5.87a
Grasa	2.4a	2,3ab	2.1abc	2.0bc	1.8c
Cenizas	0.64e	0.8d	1.13c	1.45b	1.79a
Fibra	0.0e	0.47d	0.76c	0.97b	1.26a
Acidez *	2.27a	2.15a	1.73ab	1.64ab	1.20b

*Unidades de acido láctico.

Promedios con letras diferentes en una misma fila difieren estadísticamente de acuerdo a la Prueba de Tukey.

Acidez del yogurt dietetogeriatrico

La acidez de los yogures dietetogeriátrico obtenidos al emplearse diferentes niveles de gel de *Opuntia subulata*, presentaron diferencias significativas ($P<0.01$) entre las medias obtenidas, observándose los mayores valores de acidez en los yogures del grupo control (2.27 unidades en ácido láctico) y en los que se empleó el nivel 1.5 % (2.15 unidades en ácido láctico), se observo que al utilizar los niveles 4.5 y 6.0 %, la acidez de los yogures se redujeron a 1.64 y 1.20 unidades en ácido láctico, notándose por tanto que el empleo de estos niveles permiten el descenso de la acidez del producto, manteniéndoles dentro de la calidad exigida por el INEN (1996), que señala que la acidez del yogur debe estar entre 0.6 a 1.5 medias en unidades de ácido láctico, por consiguiente se considera que los yogures elaborados con 4.5 y 6.0 % de gel de *Opuntia subulata*, favorecerá, la alimentación de las personas de la tercera edad, ya que al ser un producto lácteo fermentado con una baja acidez, aliviará las dolencias estomacales es el estilo de vida que actual que siguen muchas personas a nivel mundial, considerando que el 25% de la población del mundo es intolerante a la lactosa. Tramer. (1991).

Análisis microbiológico del yogurt dietetogeriatrico

Mediante los análisis microbiológicos realizados en los yogures dietetogeriátricos obtenidos por efecto de la utilización de diferentes niveles de gel de *Opuntia subulata*, se determinó en todas las muestras analizadas la ausencia de E. Coli, coliformes totales, estafilococos, mohos y levaduras, y aerobios mesófilos debido posiblemente a que el yogur se obtiene a partir de leche pasteurizada que permite una mezcla libre de microorganismos patógenos, por cuanto la temperatura aplicada es de 85°C durante 30 minutos, a lo que se suma el proceso de fermentación, en el cual la mezcla de yogur con el gel de *Opuntia subulata* se coagula produciendo un descenso del pH. por lo tanto el desarrollo de microorganismos patógenos es negativo, cumpliéndose por consiguiente con los requerimientos que indican tanto el INEN (1996), donde se menciona el yogur debe estar libre de hongos y mohos, debiendo presentar únicamente gérmenes vivos de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

En lo referente a la presencia de *Estreptococos sp.* y Lactobacillus sp en los yogures dietetogeriátricos, las medias determinadas registraron diferencias altamente significativas ($P<0.01$), por efecto de los diferentes niveles de gel de *Opuntia subulata* empleados; al ser estas dos bacterias importantes en la elaboración del yogur, es importante que se analicen concomitantes, aunque pueden crecer independientemente, Montaño (1991)encontrándose en el caso de los *Estreptococos sp*, las mayores cantidades en los yogures elaborados con 4.5 y 6.0 % del gel (55.71 ± 5.77 y 59.38 ± 6.43 UFC/g), y la menor cantidad observada fue cuando se utilizó el nivel 1.5 % (40.0 UFC/g), en cambio de los Lactobacillus sp, se mantiene la mayor carga en el yogur elaborado con el 6.0 % del gel (45.08 ± 4.36 UFC/g) y las menores presencias en los yogures del grupo control y con el nivel 4.5 % (32.73 ± 2.89 UFC/g, en ambos casos), considerando-se en base a las respuestas anotadas que el nivel 6.0 % del gel de *Opuntia subulata*, favorece las características dietetogeriátricas del yogur.

Actividad prebiótica, prebiótica y nutria cética del yogurt dietetogeriatrico.

En la elaboración del yogurt dietetogeriatrico se utilizo cultivo para yogurt (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.), como prebióticos se empleo *Lactobacillus acidophilus* y *Byfidobacterium bifidum*, para proveerle las características prebióticas. Huis (1990) , y nutria céticas se incluyo el gel de opuntia subulata que aporta con la fibra dietética.

Secuestro y eliminación de sales biliares

La importancia del aporte de fibra del gel de *Opuntia subulata* en el yogurt, radica en que esta tiene resistencia a la digestión, debido a que el sistema enzimático humano es incapaz de atacar y digerir los distintos componentes de la fibra. Contribuye al secuestro y posterior eliminación de las sales biliares. La importancia nutria cética de la fibra se ha observado en el aumento de la excreción de ácidos biliares. Bruneton (1991).

Incremento en la excreción de ácidos biliares

El efecto probiotico del yogurt con inclusión de gel de *Opuntia subulata*, es capaz de eliminar por vía fecal determinadas cepas bacterianas, como el Clostridium putrificans, con capacidad

cancerígena, utilizan como sustrato a los ácidos biliares y al colesterol, que son desconjugados por las mismas. Se activa la proteinquinasa C que es capaz de estimular el crecimiento celular. Otras bacterias dan lugar al ácido litolítico y otros mutágenos que son inhibidos por algunos tipos de fibra. Gilliland (1985). Coadyuva en la disminución de la absorción de las grasas. Este efecto se debe a que las grasas no se pueden emulsionar ni transportar hasta la mucosa intestinal. Sharapin (2000)

Interrupción de la circulación enterohepática de las sales biliares.

El efecto prebiotico de la fibra que aporta el gel de Opuntia subulata, la interrupción provoca que el hígado tenga que formar nuevas sales biliares y, por tanto, recurrir a las reservas orgánicas de colesterol.

La fibra rica en ácido urónico tiene facultad para fijar calcio, fósforo, cinc, hierro y magnesio, por lo que puede alterar la absorción de las mismas. Si el aporte de fibra se corresponde con las recomendaciones habituales no existirá ningún problema carencial causado por el balance negativo de los minerales mencionados. Se considera que si el aporte de fibra es inferior a 50 gr / día, no hay exposición para desencadenar un equilibrio nutricional. En cualquier caso, la ingesta de pan blanco puede prevenir estas alteraciones. El retardo de la absorción intestinal de los hidratos de carbono, de las proteínas y de las grasas, esta propiedad origina un aumento ligero de la excreción en heces de estos principios inmediatos, por lo que la fibra puede ser útil en la diabetes y en las dislipemias. Shaparin (2000)

CONCLUSIONES.

El desarrollo y validación de la tecnología para extraer gel de *Opuntia subulata*, permitirá conocer los beneficios de esta especie que en nuestro medio crece en su mayoría en forma silvestre. Es un recurso fitogenético con el cual se pueden elaborar alimentos geriátricos, ya que los mismos no se encuentran disponibles en el mercado local y posiblemente internacional. La composición química de la *Opuntia subulata* es en gran porcentaje gel conteniendo los triterpenos con características antinflamatorias, que poseen la capacidad de disolver determinados cálculos biliares (cálculos de carbonatos).

Al ser la *Opuntia subulata* una planta fibrosa que contiene pectina, gel, mucílagos y gomas, contribuye a la salud del aparato digestivo, y en combinación con una dieta adecuada pueden prevenir trastornos alimenticios derivados del abuso de grasas y azucares y las propiedades antiglucemiantes en el tratamiento de personas diabéticas.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS.

-Buchanan, R. 1974 " Bergy's Manual of Determinative Bacteriology". 14-16. Baltimore . USA

-Bruneton, J. 1995. "Fitoquímica y farmacognosia de las Plantas Medicinales" 92-106. Edit. Springer, New York- USA

- Cácerez, F. et, al. 2003 " Cactáceas Medicinales de Importancia de la Provincia de Arequipa" (Dto. Arequipa). Revista Fito . 108-116. Lima Perú.

-CONDONY R, MARINÉ A, RAFECAS M. 1998. Yogurt: elaboración y valor nutritivo. Madrid. Fundación española de la nutrición. se

- Gilliland. , S. 1985. "Infuence of Bacterial Starter Cultures on Nutritional Value of Foods". , 28 – 33, USA

-Huis, J. 1990 " Probiotics Innovations in Food Fermentation" 117-123, Reino Unido

-INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN) 1996. Elaboración y requisitos exigidos en la elaboración de yogur. Norma INEN 710. Quito, Ecuador

-Kretchmer., N. 1972. "Lactose and lactase", Food Readings from Scietific American. , 35 – 43, USA.

-Kroger, M. " 1976. "Quality of Yogurt" J Dairy Sci. 344-347

-Montaño. M et, al. 1991 " Análisis Microbiológico , de Composición y características Físico Químicas de Yogures Comerciales y su Repercusión en la Vida de anaquel" . IV Congreso Panamericano de la Leche, México.

-Radke, L.1986." Lactase and Their Applications"., Enzymes and Food processing. G.G., 255-256, Londres

-R. Robinson, 1986.A. Tamine, Vol 2 Recent Developments in Yogurt Manufacture, Modern daity Tecnology . Londres

-Sharapin. N. ,et, al. 2000. "Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapeúticos"

-Sneath, P. 1986. "Bergy's Manual of Systematic Bacteriology." Vol 2. 14-16. Baltimore . USA

-Tramer, J. 1991. "Yogurt Cutures" J. Soc. Dayry technol. 16-21

- WITTING, E. 1981. Evaluación sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. 1a ed. Santiago, Chile. Edit. Talleres gráficos USACH. pp 8 – 14

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ARSÉNICO Y CADMIO EN LEGUMINOSAS, CEREALES Y DERIVADOS UTILIZADO EN ALIMENTACIÓN ESCOLAR REGIÓN DEL MAULE, CHILE

Bastías, José Miguel[1]; Carrasco, Teresa[1]; Rice, Maria[1]; Muñoz, Ociel[2].
[1]Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias de la Salud y Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Av. Andrés Bello s/n, Chillán Chile, jobastias@ubiobio.cl. [2]Instituto de Ciencia y Tecnología en Alimento, Faculta de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Av. J. Sarrazín s/n, Valdivia, Chile.

Palabras claves: Control de Calidad, minerales tóxicos, arsénico, cadmio, cereales y leguminosas.

RESUMEN

Arsénico y cadmio son metales tóxicos que pueden encontrase en los alimentos, para los cuales pueden ser especialmente vulnerables los niños en edad escolar. El objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de arsénico y cadmio en leguminosas, cereales y derivados utilizado en la alimentación escolar de la región del Maule, Chile. Se recolectaron un total de 74 muestras de leguminosa (lentejas, garbanzos y porotos), cereal (arroz) y derivados (cereal laminado, galletas, pastas, pan rallado) de las bodegas de las empresas concesionarias que atienden el programa de alimentación escolar en la región del Maule. Las muestras se mineralizaron por vía húmeda, y se cuantificaron por Espectrofotometría de Absorción Atómica acoplado a generación de Hidruros para As y por llama para el Cd. Los parámetros de validación de la metodología como limite de detección, exactitud y precisión son adecuadas para este estudio. En el caso del Arsénico, del total de muestras analizadas el 17, 5% sobrepaso el límite establecido por la legislación chilena, presentando las muestras de arroz la concertación más alta (1,87 µg/g). Para el Cd el 66% de la muestras de pastas se excedieron del límite establecido por el Codex Alimentario. Se determino que la ingesta de As proveniente del grupo con mayor concentración solo alcanza al 47% del Ingesta Semanal Tolerable Provisional propuesto por FAO/OMS y para el caso del Cd solo un 10%.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados están presentes naturalmente en los suelos, pero en los últimos años las actividades industriales y la disposición de residuos de todo tipo han contribuido a una acumulación de estos elementos en suelos (Giuffré, et al, 2005). Generalmente los alimentos se contaminan con Arsénico y Cadmio mediante el aire o las aguas de regadío por lo que luego con la ingesta de los alimentos puede llegar a nuestro organismo y causar trastornos a distintos niveles de intoxicación (*ATSDR, 1999*).

El arsénico presenta efectos por la exposición aguda como son alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares, nerviosas, renales, hepáticas y en caso extremos producir la muerte, en forma crónica reproducen lesiones cutánea, alteraciones al sistema cardiovascular, alteraciones al metabolismo de la purina y el grupo hem, efectos neurológicos, sobe el sistema inmune, sistema endocrino, genotoxicidad y cáncer (Del Razo, et al. 2004). La ingesta semana tolerable provisional (ISTP) de As inorgánico propuesta por la FAO/OMS es de 15 µg/kg de peso corporal (FAO/OMS, 1989).

La ingestión de cadmio causa nausea, vómitos, diarrea, dolor abdominal y tenesmo, la inhalación e ingestión de dosis relativamente pequeñas producen síntomas complicados. La inhalación de polvos y gases pueden causar toxicidad respiratoria después de un período de latencia de varias horas, incluyendo una enfermedad leve, únicamente limitada a la fiebre, tos, malestar, dolor de cabeza y estomacal. La absorción prolongada de cadmio ha causado daño renal, anemia, daño hepático, y defectos a la estructura ósea. La inhalación prolongada de polvos de cadmio ha contribuido a enfermedades de obstrucción crónica del pulmón (Ando et al, 1996; Barnhart et al, 1984 ; Hendrick, 1996). La ingesta semana tolerable provisional (ISTP) de Cd propuesta por la FAO/OMS es de 7 µg/kg de peso corporal (FAO/OMS, 2003).

El Programa de Alimentación Escolar (PAE) en Chile es administrado por la Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas (JUNAEB) dependiente del Ministerio de Educación, y cuya finalidad es entregar diariamente alimentación complementaria y diferenciada, a los alumnos de establecimientos educacionales que se encuentren en condiciones de vulnerabilidad social y económica, y evitar la deserción escolar. En particular la región del Maule atiende aproximadamente a 110.000 estudiantes, y dentro de las minutas de desayunos y almuerzos que se entregan están las leguminosas, cereales y derivados (JUNAEB, 2007). De acuerdo a lo anterior, se planeo como objetivo evaluar el contenido de arsénico y cadmio en leguminosas, cereales y derivados utilizado en la alimentación escolar de la región del Maule, Chile.

MATERIALES Y METODOS

Las 74 muestras de leguminosa, cereal y derivados se colectaron de las bodegas de empresas concesionarias que atienden el PAE en la región del Maule, de acuerdo a lo es las Bases Técnicas establecidas para este efecto, (JUNAEB, 2004). Del total de las muestras de leguminosas 3 correspondieron a lentejas (*Lens culinaris*), 10 a garbanzos (*Cicer arietinum*), y 12 a porotos (*Phaseolus vulgaris*), de las muestras de cereales 12 muestras fueron de arroz (*Oryza sativa*), y 9 muestras de pastas, 4 de pan rallado, 12 de galletas y 12 de cereal laminado.

Para la determinación de As y Cd se pesaron 2,0 $\pm$ 0,1 g de muestra en vaso precipitado formato alto de 100 mL para su mineralización por vía seca, adicionando 5 ml de agua grado reactivo 18 MΩ cm^{-1} y 20 mL de HNO_3 concentrado, en presencia de un agente de mineralización (20% p/v $Mg(NO_3).6HO_2$ + 2% p/v MgO, 1 mL). Las muestras así tratadas se llevaron a placa calefactora (Gerhardf mod. EV 16). Al quedar aproximadamente 10 mL de la mezcla se adiciono 5 mL de H_2O_2, 30 Vol., posteriormente las muestras se llevaron a sequedad. Luego se mineralizaron en horno mufla (Termolyne mod. FB 1410 M – 26) a 425 °C por 12 horas, hasta cenizas blancas. La medición de As se realizó en espectrofotómetro de absorción atómica AAS Varian, modelo Spectra A-55 acoplado a generador hidruro -HG- efectuando 3 mediciones de absorbancia para cada una de las muestras en duplicado. Para Cd la determinación se realizó mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica por llama (AAS), realizando 3 mediciones de absorbancia para cada una de las muestras en duplicado. La validación de los métodos analíticos, se realizo a través de los parámetros exactitud, precisión y límite de detección, que se consideran límites primarios para una validación de metodología (Compañó y Ríos, 2002). El análisis estadístico de los resultados se efectuó, mediante ANOVA simple entre los grupos analizados y Tets de Tukey con un nivel de confianza del 95% para.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestras los distintos parámetros de validación utilizados, es así como los límites de detección obtenidos se encuentran bajo los límites recomendados por el compendio de los Métodos Oficiales de Análisis de los Alimentos, el cual indica que una metodología es aceptable cuando el límite de detección es inferior a 0,2 µg/g (AMV, 1994).

Los resultados que se obtuvieron para la exactitud y precisión se encuentran dentro de los rangos establecidos (entre 80-120% y hasta 10% y respectivamente), lo que permite asegurar que la metodología implementada para el análisis de estos analitos es adecuado (Directiva CEE, 2001).

La muestra que presenta la concentración más alta de As corresponde a una muestra de arroz con 1,87 µg/g y la muestra que presenta la menor concentración corresponde a una muestra de garbanzo con 0,003 µg/g.

Tabla 1 Resultados de los distintos parámetros para la validación de la metodología.

Parámetro	As Total	Cadmio
LOD[a]	0.001 (µg/g)	0.009 (µg/g)
Exactitud[b]	109,93%	84,12%
Precisión[c]	7,33%	1,66%

a: Límite detección; b: Porcentaje de Recuperación; c: Coeficiente de Variación.

Del total de muestras analizadas para As, el 17,5% sobrepaso el límite establecido por el Reglamento Sanitarios de los Alimento de Chile (0,5 µg/g), de los cuales 11 correspondieron a muestras de arroz y 2 a muestras de porotos, (González, 2006). El mayor porcentaje de arroz que se consume en Chile es importado donde los consumidores locales y la normativa no discriminan, (Revista Agro Económico, 2003). Al analizar si existe diferencia significativa en la concentración de As entre los diferentes productos estudiados, se puede observar en la Figura 1 que el arroz es el que presenta mayor diferencias, esto seguramente se deba al gran contenido de agua que es utilizada en su cultivo. Suárez et al. (2004) señala que muchos compuestos arsenicales son solubles en agua y las concentraciones más elevadas se presentan en aguas de manantial en forma natural, y por arrastre de compuestos derivados de la actividad industrial.

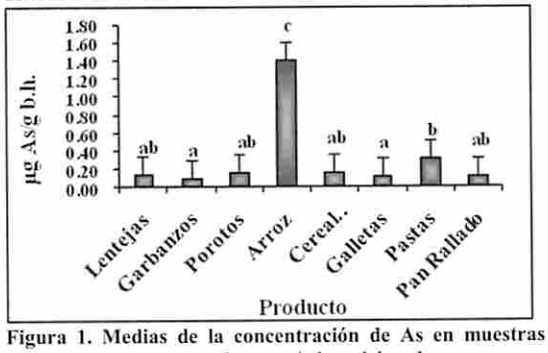


Figura 1. Medias de la concentración de As en muestras según producto expresado en µg/g base húmeda.

El contenido de Cd en la mayoría de las muestras analizadas estuvieron bajo el limite de 0,1 µg/g, establecido por el Codex Alimentario (2001), sin embargo el 66 % de la muestras de pastas sobrepasaron este límite, siendo la concentración máxima de 0,18 µg/g. Al analizar la concentración de Cd presente en los diferente productos estudiados las pastas fue el único grupo que presento diferencia significativa como se observa en la Figura 2. Lo anterior podría estar relacionado con el uso de fertilizantes fosfatado ya que en Chile estos contiene una elevada concentración de Cd y este puede pasar a los cultivos (Villanueva, 2001). Utilizando los resultados del estudio de dieta total de Muñoz et al. (2005) se calculó la ingesta para arsénico y cadmio ocupando las concentraciones más altas, determinando que la ingesta de As solo alcanza el 12% y para el caso del Cd un 2,5% de los respectivos ISTP propuesto por FAO/OMS .

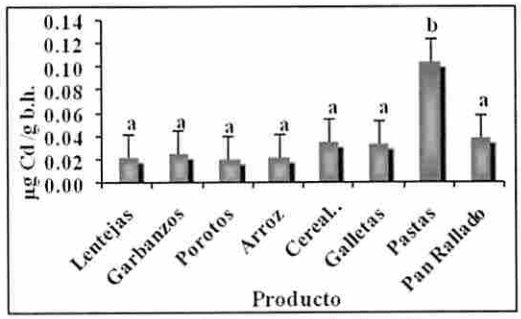


Figura 2. Medias de la concentración de Cd en muestras según producto expresado en µg/g base húmeda.

AGRADECIMIENTOS

Dirección Investigación Universidad del Bío-Bío Proyecto 075121 3/R, y al Proyecto CYTED 105PI0272

BIBLIOGRAFÍA

Giuffré L.; Ratto S.; Marbán L; Schonwald J.y Romaniuk R. (2005). Riesgo por metales pesados en horticultura urbana. Ciencia del Suelo v.23 n.1 Buenos Aires jan./jul.

ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). (1999). Reseña Toxicológica del Cadmio (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.

Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Albores A. (2004). Arsénico En: Toxicologia Ambiental, Ed. Lilia A. Albert. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Capítulo 16.

FAO/WHO (1989). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third Report of de Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Report Series N°. 776, Geneva, Switzerland.

FAO/WHO (2003). Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Sixty-first Meeting, Rome, June 10-19, 2003. Available from: ftp://.fao.org/es/esn/jesfa/jecfa61sc.pdf

González, C. (2006). Nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos. Ediciones Publiley, Santiago, Chile.

Barnhart S and Rosenstock L. (1984) .Cadmium chemical pneumonitis. Chest; cap. 86: 789-91.

Hendrick DJ. (1996). Occupational and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Thorax*; cap: 51:947-55.

JUNAEB (2007). Balance de Gestión Integral 2006. Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas. Santiago Chile. En: www.junaeb.cl

Junaeb (2004). Bases Administrativas y Técnicas, Propuesta Pública N° 18/2004. Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas, Chile.

Compañó B. R., y Ríos C. A. (2002). Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos. Editorial SINTESIS, Madrid, España.

AMV ediciones (1994). Métodos Oficiales de Análisis de los Alimentos. Mundiprensa. pp 403-404.

Directiva CEE (2001). Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 2001/22/CEE. de la Comisión, 8 marzo.

Revista Agro Económico, (2003). Revista n° 72 Industria del Arroz: Desafío del Cambio.

uárez M., González-Delgado F., González D., Rubio C. y Hardisson A. (2004). Análisis, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones arsenicales. Cuaderno medico forense no.35 Sevilla Jan. 2004.

Codex Alimentarius (2001). Nivel máximo para el cadmio en cereales, legumbres y leguminosas CAC/GL 39 -2 001.

Muñoz O., Bastías J.M., Araya M., Morales A., Orellana C., Rebolledo R., Velez D. (2005). Estimation of the dietary intake of the population of Santiago (Chile) using a Total Diet Study. Food and Chimical Toxicology 43 (2005) pp. 1647 – 1655.

Villanueva L. (2001). Evaluación del Impacto de los Fertilizantes Fosfatados en la Acumulación de Cadmio en Suelos Cultivados con Maiz (*Zea mays*). Tesis para optar al Grado de Magister en Gestión y Planificación Ambiental. Universidad de Chile.

MICROBIAL AIR-PROCESSING IN A BRAZILIAN PRODUCE PLANT

Cruz, A.G.da[1]; Cenci, S.A.[2] and Maia, M.C.A.[3]
[1]Pos-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, UFRJ.
[2]Embrapa Agroindústria de Alimentos, CTAA/RJ
[3]Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, UFRJ.
Centro de Tecnologia, bloco A - 5° andar – Ilha do Fundão - Cep: 1949-900
Rio de Janeiro – Brasil. Email: food@globo.com

Keywords: air-processing, produce, contamination.

ABSTRACT

The microbial air-processing in a Brazilian Produce Plant was investigated. Ranges from 4.35 to 5.27 log CFU/cm^2/week for mesophilic bacteria count to 5.16 to 5.33 log CFU/cm^2/week for yeasts and moulds were reported along the processing steps. 100% of the values were above the APHA standards ones. The results reinforce the importance of air as a vehicle for microbial contamination in the food industry.

INTRODUCTION

Minimally processed vegetables are products requiring no additional preparation before consumption and do not suffer heat treatment during processing (Wattada and Qi 1999). Researches involving environmental contamination in produce plants are rare, and in the majority of cases, are limited to a sanitary evaluation of the utensils/equipment and handlers, not mentioning the microbiological status of the air in the industrial plant (Kaneko et al. 1999; Cruz et al. 2005). The importance of air as a source of contamination in a food industry can be resumed by four factors: the time of exposure of the food to the air, the level of contamination of the former, the aerodynamic behaviour of the particles and the area of the food product exposed (Salustriano et al. 2003). In this context, the objective of this study was to evaluate the microbial air-processing in a Brazilian Produce Unit identifying factors that could compromise final product quality and proposing corrective actions aimed at protecting the health of the final consumer.

MATERIAL AND METHODS

Microbiological analyses were carried out for mesophilic bacteria and yeasts and moulds in the environmental processing areas inside a Produce plant located in the State of São Paulo, Brazil: raw reception, 1st washing, 2nd washing, sanitation and packaged product. The technique of simple sedimentation was adopted, using, respectively, Plate Count Agar (PCA-Merck, Brazil) for aerobic mesophilic bacteria and potato dextrose agar (PDA-Merck, Brazil) acidified with tartaric acid, for yeasts and moulds. Duplicate plates, each containing approximately 20 mL of the respective culture media, were left open and placed in each of the above-mentioned areas cited for approximately 15 minutes. They were then closed and incubated according to the following criteria: 37°C/48 h for the mesophilic bacterial count and 25°C/3-5 days for yeasts and moulds. The results were expressed as CFU/cm^2/week, and analysed according to the standard values recommended by the American Public Health Association for aerobic mesophiles, 30 CFU/cm^2/week (1.5 log CFU/cm^2/week). In the absence of a standard value for yeasts and moulds, the same one cited for aerobic mesophilic bacteria was used. The experiment was repeated 3 times, with an interval of 10 days between each trial. The results of the microbiological analyses were transformed into logarithms (log CFU/cm^2/week) and submitted to a statistical analysis. The differences between the means were calculated using the Analysis of Variance followed by the Tukey Test. Probabilities ≥ 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the results of the microbiological analyses for aerobic mesophilic bacteria carried out in the air processing of the Produce Plant. A range of from 4.35 to 5.32 log CFU/cm^2/week was reported being the extreme values being observed for the 2nd washing step and final product, respectively. During the experiment, the 2nd washing and the raw reception area presented statistical significant difference ($p<0.05$). This could have been due to a variable raw material microbial load and the proximity of these two areas in the industrial unit without physical separation, allowing for the transference of microorganisms to the already sanitised product in water droplets suspended in the air, or transported by workers, who had free access to the various sectors of the factory and moved about numerous times, especially on maximum production days. In addition it could be related to the hygienic-sanitary quality of the water used in this stage, since this was only submitted to a single filtration stage before coming into contact wit the vegetables, with no sanitation stage.

Table 1. Microbiological Analysis for Mesophilic Bacteria Count

Processing Steps	Trial 1	Trial 2	Trial 3
Raw reception	5.06^{abA}	5.01^{aAB}	5.15^{bA}
Washing 1	4.97^{aA}	4.89^{aAB}	4.88^{aA}
Washing 2	4.94^{acA}	4.35^{bA}	4.90^{cA}
Sanitation	5.10^{aA}	4.47^{aAB}	4.90^{aA}
Packing room	5.32^{aA}	5.07^{aB}	5.27^{aA}

*Different lowercase superscripts denote significant differences between the trials ($p<0.05$). Different superscripts capital letters denote significant differences between the processing phases ($p<0.05$)

Between the processing phases, a significant difference was observed between the packaging room and the 2nd washing ($p<0.05$), which could also be attributed to transit of the workers in the production unit, since they had free access throughout the plant. According to Heldman (1967), a single handler is responsible for the dissemination of 20-70 microorganisms per minute. No significant reduction in the microbial counts was observed between the sanitation step and the packaged product ($p>0.05$), which could indicate the need to improve the Good Manufacturing Practices, with training programmes for the handlers involving standardisation of the activities related to this stage, such as contact time, temperature and concentration of the disinfectant used, or even deficiencies in the hygiene of the centrifuge, equipment located between the sanitisation tank and the packaging section, which could lead to the occurrence of a biofilm. A more detailed study is required to know the true causes of this problem.

Table 2 shows the results of the microbiological analyses for yeasts and moulds carried out in the air-processing of the Produce Plant. These results were higher than those obtained for the aerobic mesophilic bacteria, being registered a range from 5.16 to 5.33 log CFU/cm^2/week, the extreme values obtained referring to the stages of raw reception and sanitation step, respectively. Throughout the experiment, the 2nd washing stage presented a significant statistical difference ($p<0.05$), probably due to direct contact of the water with the air in the processing line, since this one had no protection from the outside and the treatment of the water before contact with the food was deficient. The persistence of high counts for this microbial group in the final product packaging area – 5.18 to 5.28 log CFU/cm^2/week – indicates a potential danger for mycotoxin production, which could be present in the final product, apart from decreasing the time the product would be

apt for consumption. The intrinsic characteristics of minimally processed vegetables, which require no further preparation before ingestion by the final consumer, make this situation even more worrying, representing an imminent risk to consumers. The wide range of results found reflects the total inadequacy of the environmental sanitation protocol employed inside the plant, made worse by some of the structural conditions observed, such as deficient ventilation and a total lack of unidirectional layout, becaming air circulation in the processing environment difficult. The immediate adoption of standardised sanitation procedures for the different areas of the processing unit is suggested, plus a programme to monitor the microbiological quality to check the efficiency of these operations, allied to structural modifications in the industrial unit allowing for a positive air pressure in the processing environment. In addition, the installation of physical separations between the processing areas, as well as the use of air filters and the adoption of a adequate sanitation at the water used to wash the vegetables.

Table 2. Microbiological Analysis for Mould & Yeast Count

Processing Steps	Trial 1	Trial 2	Trial 3
Raw reception	5.16^{aA}	5.16^{aA}	5.18^{aA}
Washing 1	5.27^{aA}	5.27^{aA}	5.29^{aA}
Washing 2	5.31^{aA}	5.17^{bA}	5.27^{abA}
Sanitation	5.27^{aA}	5.33^{aA}	5.22^{aA}
Packing room	5.24^{aA}	5.18^{aA}	5.28^{aA}

*Different lowercase superscripts denote significant differences between the trials ($p<0.05$). Different superscripts letters capital denote significant differences between the processing phases ($p<0.05$).

It is important to remember that throughout this experiment, 100% of the results found in all the areas of the processing plant were above the recommended standard value of 1.48 log CFU/cm^2/week for both aerobic mesophiles and yeasts & moulds. This highlights the importance of a unidirectional layout in food industries, minimising cross-contamination, and also the need for the involvement of professionals with knowledge of food safety right from the beginning, when the industrial unit is in the project stage.

Fain (1996) reports centralisation of efforts by the processors to avoid product contamination, establishing a routine of cleaning and sanitisation of the along the processing plant, being the efficiency of the system tested by periodic microbiological analyses of the environment processing.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study indicated the existence of a high level of microbial load in the air processing of the produce plant. This suggests it should be considered as a potential source of contamination for the safety of the final product, and should compulsory be taken into consideration when establishing a formal protocol sanitation for it. Despite the limitations of the methodology used, it also served as a first report, exhibiting data that can be used in future studies on the microbiology of the air processing in Produce Plants.

REFERENCES

Cruz, A.G. da, Cenci, S.A. and Maia, M.C.A. 2005. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma unidade produtora de vegetais minimamente processados. *Anais do Terceiro Simpósio de Ciência de Alimentos. Florianópolis*, Brasil: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (cd-room)

Heldman, D.R. 1974. Factors influencing the air-borne contamination of foods. J. *Food Sci.*, 39, 962-969.

Fain, R. F. 1996. A Review of the Microbiological Safety of Fresh Salads. Dairy Food Environ. Sanit., 16, 146-149.

Kaneko, K., Hayashidani, H., Takahashi, K., Shiraki, Y., Limawongpranee, S. and Ogawa, M. 1999. Bacterial contamination in the Environment of Food Factories Processing Ready-to-eat Fresh Vegetables. *J. Food Prot.*, 62, 800-804.

Salustriano, V.C.S., Andrade, N.J., Brandão, S.C.C., Azeredo, R.M.C. and Lima, S.A.K. 2003. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. 2003. *Braz. J. Microbiol.* , 34, 255-259.

Watada, A.E. and QI, L. 1999. Quality of fresh-cut produce. *Post. Harv.. Biol. Technol.*, 15, 201-205.

ANÁLISIS DE "SISTEMA-ALIMENTO": UNA VISIÓN SISTÉMICA EN EL DISEÑO DE PROCESOS INNOVADORES.

Sotelo, I.;[1] León, M.;[2] González-Mariño, G.[3]
[1] Profesora y Coordinadora de énfasis Alimentos Maestría en Diseño y Gestión de Procesos indira.sotelo@unisabana.edu.co.; [3] Directora de Investigación y Desarrollo. Facultad Ingeniería Universidad de la Sabana; [2] Profesora Creatividad y Diseño Maestría en Diseño y Gestión de Procesos, Facultad Ingeniería Universidad de La Sabana y Art Insitute of Tampa.
Km 21 Autopista Norte de Bogotá Colombia.

RESUMEN

Para dar cumplimiento al reto propuesto por la Maestría en Diseño y Gestión de Procesos de articular de manera integral la racionalidad del enfoque sistémico, no lineal y orientado a metas, con el diseño inspirado en las maneras de proceder propias de la Naturaleza, en la búsqueda de soluciones a problemas dentro de sus contextos reales, y con un profundo sentido de responsabilidad social, para el énfasis en Alimentos, se diseñaron los cursos "Sistema – Alimento" y ""Diseño de Procesos".
El curso "Sistema – Alimento" tiene como objetivo desarrollar en el estudiante la capacidad de integración sistémica entre las ciencias Químicas, Biológicas, Físicas y Matemáticas, para la profundización del conocimiento en fenómenos de transferencia y en las relaciones entre la estabilidad y estructura de los materiales biológicos alimentarios, bajo una metodología propia.
Consecuentemente la innovación propuesta bajo este enfoque conlleva diseños de procesos y productos novedosos con el compromiso social de su implementación.

INTRODUCCIÓN

Soportada en el desarrollo del Grupo de Investigación (Procesos Agroindustriales), clasificado A por Colciencias[1] la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana ubicada a 21 km del norte de Bogotá, tiene un programa de Maestría en Diseño y Gestión de Procesos desde Agosto de 2006. La construcción de las asignaturas del énfasis "Alimentos" en este programa, Sistema-Alimento y Diseño de Procesos, ha tomado elementos del pensamiento sistémico y de creatividad, entendiendo que sólo desde una perspectiva integradora y de consideración de las partes con el todo se puede tener un dominio que lleva a optimizar diseños a través de soluciones creativas. El diseño de procesos desde esta perspectiva permite el desarrollo de productos innovadores, que responden a las necesidades del ambiente y que no necesariamente están inspiradas en réplicas de productos y procesos existentes.
En el mundo actual, los países han comprendido que en cuanto a competitividad el desafío consiste en lograr procesos idóneos de producción que respondan a las necesidades del medio logrando mayor agregación de valor y conocimiento, para ello la ciencia, la tecnología y la innovación son indispensables. Este programa de Maestría encuentra eco en el proyecto gubernamental Visión Colombia 2019, en el que referente a la educación ligada a la competitividad manifiesta "Colombia tendrá una economía cimentada en la producción, difusión y uso del conocimiento, el cual será un elemento fundamental para la productividad y la competitividad internacional…. Para obtener crecimientos en productividad es indispensable una mayor acumulación de conocimiento en términos de educación, entrenamiento y pensamiento innovador. Establecer sólidamente un programa que desarrolle las capacidades en prospectiva tecnológica, mediante la realización sistemática de estudios que permitan al país reaccionar con mayor oportunidad ante las nuevas condiciones y escenarios previsibles".

La conceptulización del pensamiento sistémico en la Maestría en Diseño y Gestión de Procesos.

La Maestría en Diseño y Gestión de Procesos, de la Universidad de La Sabana, responde a las demandas del país por soluciones innovadoras a problemas de desarrollo económico y social. La Maestría ofrece la formación requerida para intervenir en los sistemas implicados en los procesos productivos, inicialmente de Alimentos, Bioprocesos, Biosistemas y Sistemas Logísticos, a partir de diseños creativos que permitan apreciar y aprovechar el valor de los recursos disponibles. Dado que en la realidad los problemas del desarrollo no se presentan de manera aislada, ya no basta la sola mirada del especialista en cada campo, la búsqueda de soluciones necesita de un enfoque que igualmente establezca conexiones entre distintos aspectos de la realidad e integre las ciencias de manera coherente. Además, el consenso internacional sobre la necesidad de promover un desarrollo sostenible demanda estrategias educativas para lograr nuestras metas en medio de prácticas ambientales que valoren y sustenten la biodiversidad. En respuesta a estas exigencias de nuestra época, la Maestría en Diseño y Gestión de Procesos por su enfoque sistémico permite establecer relaciones de interdependencia entre los problemas para buscar soluciones desde una visión integradora de las ciencias. Soluciones que promuevan el desarrollo en co-evolución con la naturaleza, con un profundo compromiso social y entendimiento del valor humano en los proyectos a través del fomento de la creatividad.
En el caso de situaciones altamente complejas, como los procesos productivos, ya no es suficiente recurrir a conceptos aislados de las ciencias involucradas en cada etapa del proceso, sino que se requiere de la capacidad para proponer alternativas innovadoras que permitan interrelacionar y armonizar los saberes para superar las soluciones fragmentarias y cerradas. Los referentes internacionales para este tipo de programas[2] muestran una clara tendencia hacia los enfoques unificadores y convergentes que van más allá de una propuesta interdisciplinaria. que articula el diseño y la gestión de procesos, inmersos en sistemas productivos, de una manera novedosa al combinar la racionalidad del enfoque sistémico, no lineal y orientado a metas, con el diseño inspirado en las maneras de proceder propias de la Naturaleza, en la búsqueda de soluciones a problemas dentro de sus contextos reales, y con un profundo sentido de responsabilidad social.

Elementos conceptuales de creatividad para el diseño de Sistema-Alimento

En la conceptualización de "Sistema –Alimento" como asignatura prerrequisito para el Diseño de Procesos de alimentos, la aplicación del pensamiento sistémico provee un acercamiento a una serie de herramientas tradicionalmente ajenas a la ingeniería, las cuales fomentan la innovación a través de un análisis global del alimento como sistema complejo y del planteamiento de procesos innovadores basado en analogías con productos o procesos similares en otras industrias o momentos históricos, que además involucran a la naturaleza como fuente de inspiración.
El estudio de la creatividad, como base de la innovación, incluye un análisis con elementos creativos para la construcción del "Sistema-Alimento", establecido con dos elementos: El Análisis y la Síntesis. El **análisis** en el Sistema-Alimento inicia con el estudio de la complejidad de este, en el cual la integración de todas sus partes estudiadas desde los cuatro elementos de la ciencia de los materiales, descritas por M. C. Flemings y R. W. Cahn, 2000: Síntesis y Procesamiento, Aptitud de Uso, Propiedades, Estructura y Composición. Con el

[1] Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas"

[2] Por ejemplo, MIT-Cambridge (The Cambridge-MIT Institute Master Degrees), ECIU (European Consortium of Innovative Universities), EUA (European University Association)

análisis de estos elementos se lleva a la **síntesis** de diseño de procesos en alimentos creativos e innovadores, que involucran los efectos del entorno hacia la estabilidad del sistema expresada como vida útil. Así el carácter innovador en este énfasis de la Maestría va más allá de la búsqueda de diseños creativos e insiste en la manera misma como estos diseños sean implementados. Es decir, no basta la creatividad si no hace parte de un plan realista de gestión y ejecución de los diseños propuestos. De esta manera se podrá intervenir en la búsqueda e implementación de soluciones que respondan a las sociedades y tengan presente las realidades concretas en las que se encuentren inmersas.

Diferentes experiencias en la enseñanza de la ingeniería y disciplinas afines con el procesamiento de alimentos han mostrado que el desarrollo de la ciencia, tecnología e ingeniería relacionada con los procesos de alimentos, ha evolucionado y se ha entendido que la enseñanza para el avance en diseño y en desarrollo de procesos debe integrar tanto a tecnólogos como a científicos, cada uno con sus cualificaciones y destrezas para el desarrollo de procesos productivos sostenibles (A C Cleland1, et al., 1997; C. Niklasson et al., 2001)

El "Sistema-Alimento" como proyección al Diseño de Procesos.

Para la ingeniería del procesamiento de alimentos, investigadores como José Miguel Aguilera, Jorge Welti-Chanes, Gustavo V Barbosa Cánovas[1], y Pedro Fito[2] entre otros, desde comienzos de este siglo han abordado el tema del diseño de procesos de alimentos conociendo las características del producto y sus relaciones con el entorno.

El diseño de procesos se había centrado en la disponibilidad de materia prima, con un desarrollo centrado en la tecnología existente en donde se evidenciaba una desarticulación entre las propiedades de las materias primas y las condiciones del proceso productivo. Dentro de los procesos industriales, es evidente que los realizados con materias primas alimentarias han constituido y se han proyectado como una de las principales áreas de investigación en nuestro entorno. El avance científico técnico en este sector se debe centrar en la búsqueda de productos alimentarios con valor agregado que integren las nuevas tendencias de los consumidores en diferentes aspectos, como seguridad, salud, calidad, economía, medio ambiente, nutrición, y procesado mínimo de los alimentos. En el marco de este programa con la aplicación de los sistemas al diseño y gestión de procesos, específicamente a los procesos que se desarrollan con alimentos, se pretende suministrar instrumentos que integren los conocimientos y que permitan generar procesos con un alto grado de relación sistema-entorno para la profundización del conocimiento en fenómenos de transferencia y en las relaciones entre la estabilidad y estructura de los materiales biológicos alimentarios que como Sistema-Alimento definen los elementos del diseño de procesos.

Así, la asignatura Sistema Alimento inicia con el análisis de la complejidad del material alimentario y la termodinámica del sistema, que en conjunto con los fenómenos de transporte: masa, calor y momento llevan a entender la estabilidad del sistema y su efecto en la calidad. Estos elementos del Sistema-Alimento se integran como se ha descrito anteriormente de forma creativa y sistémica para lograr que el estudiante diseñe procesos idóneos, con uso eficiente de recursos y de impacto social.

CONCLUSIONES

Considerar el "Sistema – Alimento" con una visión sistémica permite una nueva manera de enseñar interrelaciones antes no tenidas en cuenta para el diseño de procesos innovadores.

El considerar el alimento como un sistema complejo requiere que los fenómenos que ocurren durante el procesamiento se analicen desde las diferentes ciencias. Este ejercicio lleva no solo a optimizar el producto final sino a hacer el proceso en si amigable al ambiente y más rentable.

La creatividad que se desarrolla basada en la observación de la Naturaleza permite el desarrollo de productos y procesos innovadores que son mucho más que las mejoras a procesos existentes y ofrece las herramientas necesarias para su implementación.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores expresan su especial agradecimiento a los profesores Mauricio Pardo Benito. Ph.D. y Gerardo González Martínez Ph.D quienes han participado en el diseño y seguimiento de estas asignaturas.

BIBLIOGRAFÍA

Welti-Chanes, J; Barbosa-Cánovas, G; Aguliera., J.M. 2002. Engineering and food for the 21 st. Century. CRC Press

Betoret, N., Andrés, A., Segui, L., Betoret, E., Fito, P., 2005, Proyecto SAFES: Systematic Approach to Food Engineering Systems).*V Congreso Iberoamericabno de Ingenieria de alimentos*, IPN, UDLAP, CYTED, Vallarta, Jal., México, sep. 2005, V-08

A C Cleland,Mipenz. 1997. "Seeking analogies between course design and engineering design processes - A case study in food engineering. En: *IPENZ Transactions, Vol. 24, No. 1*

Aspelund, K. 2006. *Design Process*. Fair Child Books.

Cherry, E. 1998. *Programming for Design: From Theory to Practice.* Willey Publishers.

Claes Niklasson y Said Irandoust. 2001. "How Can Mathematics Support a Deeper Learning Approach in Applied Engineering Subjects?". *Global J. of Engng. Educ., Vol.5, No.1.* Documentos Registro Calificado Maestría en Diseño y Gestión de Procesos, presentado a CONACES. Facultad Ingeniería. Universidad de la Sabana. Ministerio de Educacional Nacional. Colombia. 2005.

Flemings M.C y R. W. Cahan. 2000. "Organization and trends in materials science and engineering education in the us and Europe. En Acta mater. 48 p.371±383.

ANÁLISIS DE COMPETITIVIDAD DE BANANO, MANGO Y PIÑA ECUATORIANOS

Vanegas, David; Schwartz, Marco; Kern, Werther; Núñez, Hugo.
UNIVERSIDAD DE CHILE
MAGISTER CIENCIAS AGROPECUARIAS, MENCIÓN PRODUCCIÓN AGROINDUSTRIAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
Casilla 1004. E. mail: csaenz@uchile.cl
SANTIAGO -CHILE

Palabras clave: Competitividad, Matriz BCG, Indicadores de Competitividad, Mercado de fruta.

RESUMEN

Ecuador exportó US$ 12.728,24 millones al mundo en el año 2006, de los cuales 1.292,30 corresponde a frutas (BCE, 2007). El banano, la piña y el mango son los frutos "estrellas" del sector frutícola exportador ecuatoriano, sin embargo estos se encuentran amenazados a convertirse en productos "vacas de dinero" debido al retroceso que han experimentado en los últimos periodos (2004-2005). Dicho problema se ve incrementado por las debilidades y amenazas que enfrenta el sector al no poseer políticas de desarrollo e investigación sostenidos.

INTRODUCCIÓN

El mercado internacional de frutas en los últimos años ha experimentado un elevado incremento del comercio en cuanto a las exportaciones e importaciones por parte de los países, actualmente comercio mundial de frutas y vegetales ya sea frescos o con algún grado de procesamiento es de 61.068 millones de dólares, de los cuales 29.401 corresponden a fruta fresca además se transan 48.017.379 toneladas de fruta primaria entre los países. América tiene una participación del 56% del monto monetario que se comercializa y con un 64% en cuanto al volumen.[1]

Frente a esto Ecuador es un país que posee ventajas significativas. Posee una gran diversidad climática pasando del páramo andino al clima tropical conforme se aproxima al nivel del mar, lo cual le permite producir una gran variedad de frutos tradicionales así también como exóticos, teniendo mayor relevancia los tropicales como banano, piña, papaya, mango y cítricos de clima cálido y, además, otros de clima frío templado como la aguacate (palta) y tomate de árbol, los cuales tienen producción todo o la mayor parte del año, debido a que no existen estaciones marcadas.

Ecuador posee ventajas geográficas ya que se encuentran bañado por el océano Pacífico y situado en el centro del mundo, punto estratégico para transporte marítimo y aéreo, además se encuentra situado frente al continente asiático el cual es el de mayor población mundial, por ende, un mercado potencialmente atractivo para los principales productos tanto tradicionales como no tradicionales del Ecuador. Las exportaciones ecuatorianas de alimentos alcanzan los 1.746 millones de dólares de los cuales aproximadamente 1.100 corresponden a fruta fresca (SICA 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES`

Este estudio se realizó en las ciudades de Cuenca Ecuador y Santiago de Chile entre los meses de diciembre 2006 a julio 2007, y se utilizó para el mismo: fuentes secundarias de información oficial de Ecuador, así como bases de datos y bibliografía escrita.

Las frutas a analizar fueron 3, las cuales se seleccionaron de acuerdo a la mayor relevancia de éstas para el rubro exportador, volumen exportado e ingresos hayan generado para Ecuador en los últimos años.

Fuentes secundarias de información:

Publicaciones oficiales y boletines del Banco Central del Ecuador.

- Páginas Web de los Ministerios del Ecuador, así como organismos gubernamentales encargados de exportación y promoción de fruta.
- Bibliografía acerca de comercio exterior, mercados internacionales y competitividad.
- Páginas Web de asociaciones de exportadores de fruta y diferentes proyectos del país, que prevean información útil acerca de producción, exportación e importación de fruta.

MÉTODOS

La metodología que se utilizó para este estudio fue: recopilar, seleccionar, procesar y analizar la información obtenida de las fuentes y bases de datos señaladas anteriormente, con lo cual se cuantificó el comercio exterior de fruta de Ecuador, estableciendo el valor, volumen y destino de las exportaciones, así como también el valor, volumen y origen de las importaciones de fruta del Ecuador.

Con dicha información se determinó los indicadores de competitividad atendiendo el objetivo de este estudio, éstos son:

- Indicador de balanza comercial relativa
- Transabilidad
- Grado de apertura exportadora
- Grado de penetración de importaciones
- Modo de inserción al mercado
- Indicador de especialización

Dichos indicadores permitieron determinar la posición que tiene la fruticultura de exportación ecuatoriana frente a sus competidores y observar su evolución, para los diferentes frutos específicos analizados en este estudio.

Formulas:

$$\textbf{Balanza Comercial Relativa} = \frac{(Xij - Mij)}{(Xij + Mij)}$$

$$\textbf{Transabilidad} = \frac{(Xij - Mij)}{(Yij + Mij - Xij)}$$

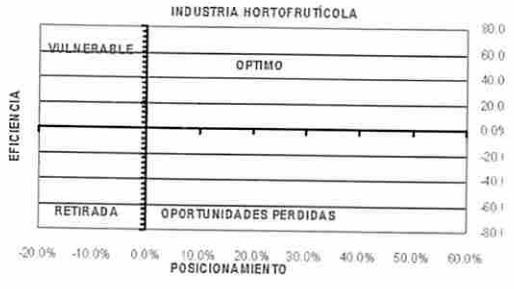
$$\textbf{Grado de apertura exportadora} = \frac{(Xij)}{(Yij + Mij - Xij)}$$

$$\textbf{Grado penetración de importaciones} = \frac{(Mij)}{(Yij + Mij - Xij)}$$

Modo de inserción al mercado

Posicionamiento: Expresado por la Tasa anual de crecimiento de las exportaciones del producto **i** por el país **j** en el mercado **m = TCMXij.**

Eficiencia: Expresado por la Tasa anual de crecimiento de la participación de las exportaciones del producto **i** por el país **j** en el mercado **m = TCMPXij.**



$$\textbf{Indicador de especialización} = \frac{(Xij - Mij)}{(Xim)}$$

[1]Fuente: OMC (Organización Mundial del Comercio, 2005).

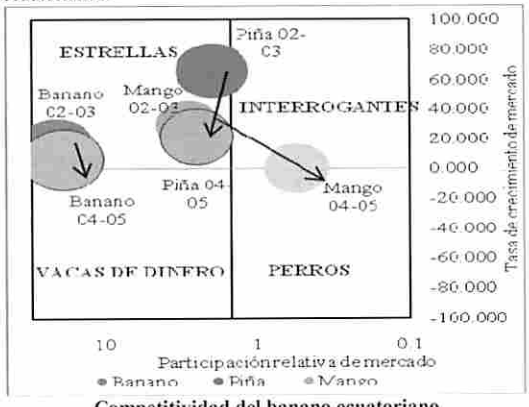
Xij = Exportaciones del producto **i**, por un país **j**, en un período dado.
Mij = Importaciones del producto **i**, por un país **j**, en un período dado.
Yij = Producción interna del bien **i** en el país **j**, en un período dado.
(Xij-Mij) = Balanza o saldo comercial.
(Xij+Mij) = Flujo comercial del producto.
(Yij+Mij-Xij) = Consumo aparente (demanda efectiva) interna del bien **i** en el país **j** en un período dado.
Xim = Exportaciones del bien i realizadas por el mundo ó un mercado específico.
i = Producto en estudio.
j = Se refiere a cada uno de los distintos países analizados en relación con el producto

Exportaciones ecuatorianas de frutas 2005.

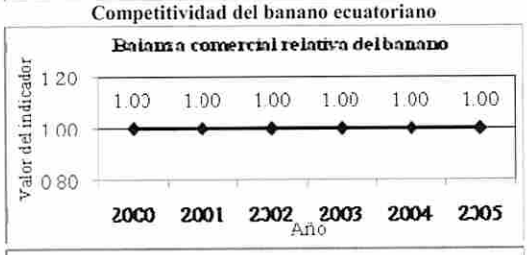
	VOLUMEN (tm.)	VALOR FOB (Millones US$)
Banano	4´847.167	1.083,61
Piña	79.737	29,913
Mango	42.128	18,173

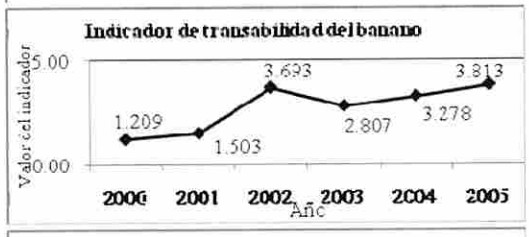
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

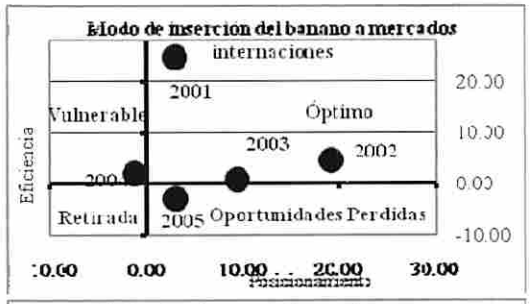
Matriz BCG para participación relativa del mercado y tasa de crecimiento de mercado para banano, piña y mango ecuatorianos.



Competitividad del banano ecuatoriano

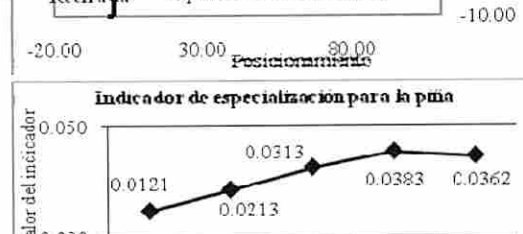




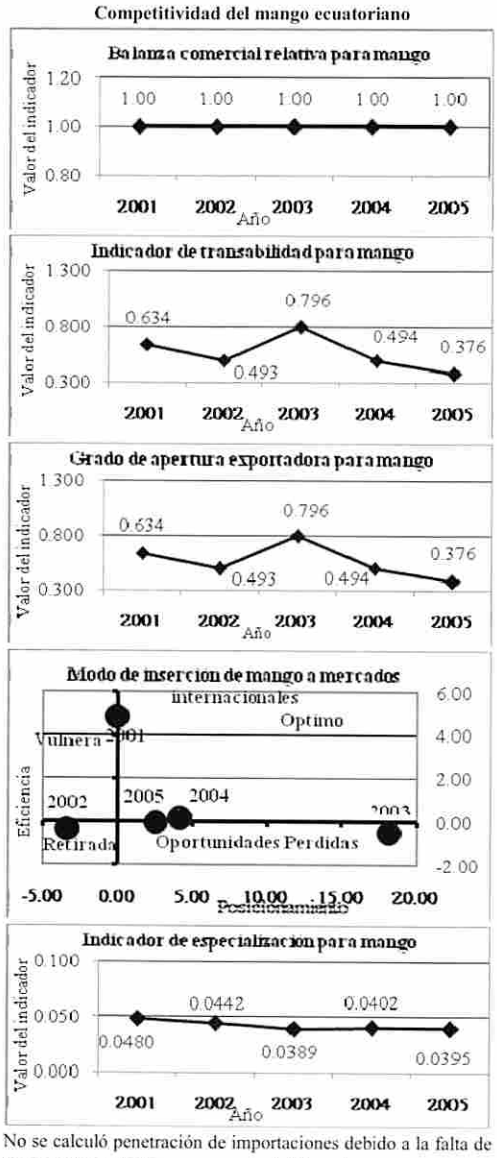


No se calculó penetración de importaciones debido a la falta de importaciones de banano por parte del Ecuador.

Competitividad de la piña ecuatoriana



No se calculó penetración de importaciones debido a la falta de importaciones de banano por parte del Ecuador.



No se calculó penetración de importaciones debido a la falta de importaciones de banano por parte del Ecuador.

CONCLUSIONES

-El sector frutícola de exportación tiene un alto potencial competitivo, por haber ganado participación en el mercado regional y mundial, en especial en los mercados norteamericanos y europeos. Sin embargo es necesario incentivar la comercialización de productos con mayor valor agregado para fortalecer la agroindustria ecuatoriana.

-El banano ecuatoriano puede perder su condición de fruta estrella del Ecuador para pasar a convertirse en una vaca de dinero. La piña mantiene su condición de producto estrella. El mango ecuatoriano pasó de ser una fruta estrella a una interrogante.

-El banano ecuatoriano ha retrocedido en su protagonismo mundial ya el crecimiento en las exportaciones mundiales de banano se han incrementado en un promedio del 2,68% anuales (ton FOB), sin embargo las exportaciones ecuatorianas de banano no han logrado crecer con igual índice, las exportaciones ecuatorianas crecen a un 2,28% anuales promedio entre el año 2000 al 2005. Lo cual hace notar la pérdida de capacidad de crecimiento a comparación del promedio mundial.

-La piña ecuatoriana ha sufrido un retroceso en cuanto a su competitividad, su imagen pasó de ser producto estrella en el periodo 2002-2003 a casi considerarse un producto vaca de dinero en el periodo 2004-2005, debido a que no ha podido sostener un índice de crecimiento continuo.

-El mango aumentó el volumen de sus exportaciones en un promedio del 4,41% (ton FOB) anual, si embargo el índice de crecimiento de las exportaciones mundiales fue de un 9,6% (ton FOB) promedio lo que denota que el mango ecuatoriano no es capaz de incrementar sus exportaciones en relación a la misma tasa de crecimiento mundial.

BIBLIOGRAFIA

-AGROCADENAS COLOMBIA 2006. *Indicadores de Competitividad.* (en línea). http://www.agrocadenas.gov.co/home.htm Consulta: 10 Octubre 2006

-BANCO CENTRAL DEL ECUADOR (Estadísticas) 2007 (en línea) Ecuador: Estadísticas de comercio exterior del Banco Central del Ecuador Disponible en: http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/ComercioExterior.jsp Consulta: 20 de Junio 2007.

-CORPORACIÓN PARA LA PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES (CORPEI). 2007 (en línea) Comercio exterior de la República del Ecuador. Disponible en: http://www.corpei.com.ec Consulta: 20 junio 2007.

-DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS, Banco Central del Ecuador, "Indicadores de competitividad, apertura comercial y capital humano", *Apunte de Economía No. 30*, junio 2003.

-FAO, FAOSTAT. 2006 (en línea) Datos agrícolas de producción: Comercio de fruta fresca. Disponible en: http://faostat.fao.org/faostat/collections/ Consulta: 10 de Junio 2007.

-F□RSTER, K; SCHWARTZ M. 2005 *Estrategia de Marketing Para Consolidar las Exportaciones de Miel de Abeja a Alemania* 2005. Memoria Ingeniero Agrónomo, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 109p.

-HAX, A; MAJLUF, N. *Estrategias para el Liderazgo Competitivo*. Ed. Dolmen, Economía y Gestión 1999 536p.

-ORGANIZACIÓN MUNDIAL DEL COMERCI (OMC). 2007 (en línea) Datos: participación de los Miembros en el comercio mundial de productos agropecuarios. Disponible en: http://www.wto.org/spanish/tratop_s/agric_s/agric_s.htm Consulta: 20 junio 2007.

-PORTER, M. *"Estrategia y Ventaja Competitiva"*, Barcelona, ES Barcelona Cía. Editorial Deusto, 2006 222p.

-SEPULVEDA N, *Factores que inciden en la competitividad de la fruta fresca de exportación en Chile.* Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Economía Agraria 2005 6p.

-SICA, BANCO MUNDIAL 2007 (en línea) "Frutas: Datos Estadísticos 2005" Disponible en: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/consejos_consultivos/consejos/frutas/estadistas2005_frutas.htm Consulta: 20 Junio 2007.

-TRADEMAP 2007 (en línea) Estadísticas de comercio para el desarrollo internacional de las empresas Disponible en: http://www.trademap.net/ecuador/conexion.htm Consulta 20 junio 2007.

-SCHWARTZ, M; CABEZAS, M; LUCHSINGER L. 2007 *Análisis de la competitividad en el comercio internacional de la cereza* V Congreso Iberoamericano de tecnología Post-cosecha y Agroexportaciones. p 1608-1618.

PROPUESTA DE UNA PRACTICA INTEGRADA DE REOLOGIA DE ALIMENTOS

Tripaldi, Piercosimo*; Velín, Tanya; Chialvo, Luís y Rojas, Cristian
Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador.
*** Autor correspondiente: tripaldi@uazuay.edu.ec**

Palabras clave: Reología, Regresión, Componentes Principales, Cluster Análisis.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el de explorar la factibilidad de realizar una práctica integrada de reología combinada con análisis multivariante como ejemplo de didáctica experimental, estrategia en la que el alumno ensambla el instrumento, realiza los experimentos y recolecta e interpreta los datos utilizando herramienta estadísticas clásicas y multivariantes de regresión de mínimos cuadrados y regresión robusta.

De esta manera el experimento se vuelve un enlace entre diferentes disciplinas científicas que interesan la ciencia de los alimentos aumentando el conocimiento del estudiante y su capacidad de integrar diferentes campos de la ciencia.

INTRODUCCIÓN

La didáctica de la investigación experimental, a menudo, se limita a la realización práctica, de un experimento determinado en forma aislada. Sin embargo, la investigación científica necesita la integración de diferentes disciplinas en forma creativa y no mnemórica por lo que resulta necesario que el estudiante se apersone del problema en estudio y, si es necesario, ensamble físicamente el aparato experimental, de tal forma, que este cumpla con las necesidades y utilidades deseadas para el experimento.

Esta necesidad es antigua, hasta un físico teórico como Maxwell [1] en su conferencia inaugural de su cátedra en Cambridge en el 1871 dijo "Es muy necesario que aquellos que están intentando aprender de los libros los hechos de la ciencia física, se les capaciten con la ayuda de unos cuantos experimentos ilustrativos, para reconocer tales hechos cuando se los encuentran al aire libre".

Conforme con esta necesidad se ha planificado el estudio teórico-práctico de la reología de los fluidos, mediante la construcción de un simple viscosímetro capilar de presión variable. El fluido es empujado hacia el capilar [2] gracias a una presión mecánica en lugar de la presión hidrostática. Se han estudiado algunas salsas de tomate comerciales. De esta manera se puede estudiar el comportamiento a diferentes esfuerzos de cizalla obteniendo los reogramas respectivos mediante aplicación de regresión OLS y Robusta. Con los resultados de los reogramas conjuntamente con las diferentes propiedades físicas y químicas determinadas, se ha utilizado análisis multivariante exploratorio de componentes principales y cluster para visualizar el comportamiento contemporáneo de las variables descriptoras y las diversas salsas.

Figura No 1: Esquema conceptual del experimento

MATERIALES Y METODOS

Se ha estudiado el comportamiento reológico de 7 salsas comerciales utilizando un viscosímetro capilar de presión variable, obtenido por acople de un capilar de vidrio a una jeringuilla de vidrio de 3 ml de capacidad. Las presiones se obtuvieron aplicando diferentes pesos al pistón. Para que las condiciones de fricción, humedad y tiempo sean constantes en el experimento se tuvo el cuidado de secar el instrumento, lubricándolo con una mínima cantidad de aceite; de esta forma el émbolo cae libremente dentro de la jeringa. Se realizaron 4 replicas, y se tomó como valor central a la mediana, en vez del promedio, ya que, la mediana es menos sensible a los valores extremos [3].

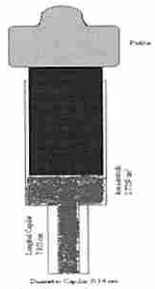


Figura 2. Esquema de viscosímetro a presión variable

Para cada muestra se registró el peso de la salsa escurrida en un intervalo de tiempo, bajo una determinada presión. Previamente se determinó la densidad de cada muestra mediante el picnometría. El pH y la conductividad eléctrica se determinaron mediante pH-metro THERMO-ORION 420 A+ y conductivímetro HANNA-INSTRUMENTS HI 8819N. El contenido de cenizas de las salsas se determinó gravimétricamente por incineración a 500 °C.

Se calcularon los esfuerzos de cizalla y el gradiente de velocidad mediante las ecuaciones de flujo laminar modificadas para tener en cuenta de la energía cinética a bajas presiones [4]. Graficando los valores obtenidos de σ y γ para diferentes valores de presión P aplicados, se obtuvieron los reogramas de las diferentes salsas. Los modelos se obtuvieron por regresión lineal de mínimos cuadrados utilizando el macro XLSTAT. El mismo programa sirvió para estudiar comparativamente las características experimentales de las diferentes salsas.

El Análisis en componentes principales se realizó por diagonalización de la matriz de varianza-covarianza mediante algoritmo de descomposición de valor singular [5]. Mientras que el análisis de cluster se realizó determinando las distancias euclidianas cuadradas entre las salsas y construyendo el dendrograma mediante método de jerárquico de Ward [5].

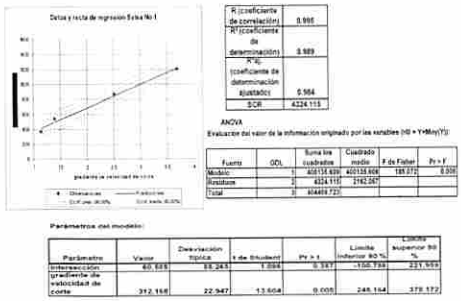
RESULTADOS Y DISCUSION.

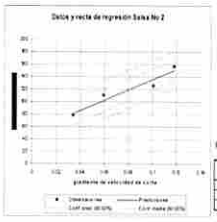
En la siguiente tabla se presentan las características químicas obtenidas para las diferentes salsas:

Tabla 1 Características químicas de las salsas

Salsa No	Humedad %	Cenizas %	Extr. Seco %	pH	Conductividad ms/cm
1	68.324	5.483	31.676	4.7	26.2
2	68.398	4.614	31.602	4.66	17.73
3	74.678	3.063	25.322	4.76	15.57
4	74.172	5.852	25.828	4.55	31
5	72.032	4.433	27.968	4.6	29.6
6	69.975	4.125	30.025	4.64	18.57
7	78.867	3.615	21.133	5.01	23.8

Los reogramas y los parámetros de los modelos de las salsas se presentan a continuación:





R (coeficiente de correlación)	0.944
R² (coeficiente de determinación)	0.929
R²aj. (coeficiente de determinación ajustado)	0.894
SCR	223.288

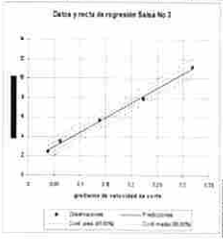
ANOVA

Evaluación del valor de la información originado por las variables (Hl) = Y=Moy(Y));

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	2927.102	2927.102	26.215	0.036
Residuos	2	223.288	111.644		
Total	3	3150.389			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 90 %	Límite superior 90 %
Intersección	53.883	13.521	3.984	0.058	14.112	93.653
gradiente de velocidad de corte	814.820	159.122	5.120	0.036	330.154	1299.486



R (coeficiente de correlación)	0.998
R² (coeficiente de determinación)	0.996
R²aj. (coeficiente de determinación ajustado)	0.995
SCR	0.174

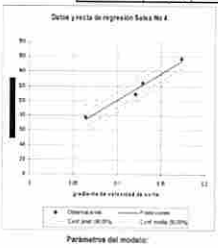
ANOVA

Evaluación del valor de la información originado por las variables (Hl) = Y=Moy(Y));

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	48.537	48.537	836.250	< 0.0001
Residuos	3	0.174	0.058		
Total	4	48.712			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 95 %	Límite superior 95 %
Intersección	1.423	0.196	7.293	0.005	0.802	2.044
gradiente de velocidad de corte	30.187	1.043	28.902	< 0.0001	26.792	33.422



R (coeficiente de correlación)	0.989
R² (coeficiente de determinación)	0.979
R²aj. (coeficiente de determinación ajustado)	0.967
SCR	71.248

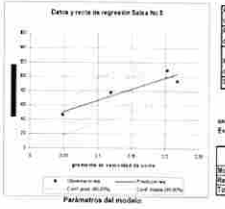
ANOVA

Evaluación del valor de la información originado por las variables (Hl) = Y=Moy(Y));

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	3134.333	3134.333	87.671	0.011
Residuos	2	71.591	35.660		
Total	3	3205.924			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 90 %	Límite superior 90 %
Intersección	25.888	5.836	2.937	0.209	0.166	57.609
gradiente de velocidad de corte	718.420	76.696	9.373	0.011	494.760	942.080



R (coeficiente de correlación)	0.942
R² (coeficiente de determinación)	0.888
R²aj. coeficiente de determinación ajustado)	0.832
SCR	237.268

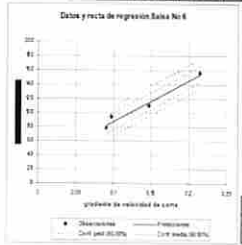
ANOVA

Evaluación del valor de la información originado por las variables (Hl) = Y=Moy(Y));

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	1876.674	1876.674	15.819	0.058
Residuos	2	237.268	118.634		
Total	3	2113.942			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 90 %	Límite superior 90 %
Intersección	34.925	12.938	2.684	0.114	-2.954	72.704
gradiente de velocidad de corte	316.823	79.658	3.977	0.058	84.224	549.422



R (coeficiente de correlación)	0.984
R² (coeficiente de determinación)	0.969
R²aj. (coeficiente de determinación ajustado)	0.953
SCR	105.689

ANOVA

Evaluación del valor de la información originado por las variables (Hl) = Y=Moy(Y));

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	3099.229	3099.229	62.334	0.016
Residuos	2	105.689	52.845		
Total	3	3204.918			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 90 %	Límite superior 90 %
Intersección	29.825	10.741	2.777	0.109	-1.837	61.188
gradiente de velocidad de corte	579.248	73.432	7.888	0.016	364.827	793.668

R (coeficiente de correlación)	0.974
R² (coeficiente de determinación)	0.948
R²aj. (coeficiente de determinación ajustado)	0.931
SCR	291.887

ANOVA

Evaluación del valor de la información originado por las variables (Hl) = Y=Moy(Y));

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	5313.079	5313.079	54.667	0.005
Residuos	3	291.887	97.296		
Total	4	5604.966			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 90 %	Límite superior 90 %
Intersección	29.642	9.917	3.287	0.046	8.421	50.863
gradiente de velocidad de corte	403.822	54.647	7.390	0.005	278.217	532.426

Los datos indican que las salsas estudiadas tienen un comportamiento reológico parecido, presentando un comportamiento lineal bien definido y un esfuerzo límite de cizalla, perteneciendo al grupo de los fluidos plásticos de Bingham [6]. Sin embargo los intervalos de confianza al 90% de la intercepción con el eje del esfuerzo de cizalla, indican que las salsas No.1 5, 6 comprenden el cero, por lo tanto no se puede afirmar que sean realmente fluidos plásticos o newtonianos.

Los reogramas de las salsas 6 y 5 presentan dos datos que influyen muchos sobre la calidad del modelo, se calcularon entonces dos nuevos modelos mediante el método de regresión robusto de la mediana repetida "RM" [5]. Se obtuvieron los siguientes parámetros para estas dos salsas:

Salsa	bo	b1
Salsa No 5	30.7081	374.0693
Salsa No 6	101.7487	627.8429

En la salsa No 6, el límite de cizalla pasa de 29.825 a 101.7487 Pa, lo que sugiere que esta salsa sea plástica, mientras que en el caso de la salsa No 5 los dos valores calculados del esfuerzo límite de cizalla son prácticamente idénticos, indicando que el modelo newtoniano es mejor.

Con el fin de comparar las características químicas y reológicas de las salsas se aplicó el Análisis de las Componentes Principales obteniendo los siguientes resultados [8]:

Tabla 2 PCA: Autovalores y Autovectores

Autovalores:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valor propio	3.300	1.834	1.245	0.375	0.172	0.073
% varianza	47.146	26.195	17.793	5.362	2.461	1.043
% acumulado	47.146	73.341	91.133	96.495	98.957	100.000

Número de valores propios triviales suprimidos: 1

Autovectores

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
HUMEDAD	-0.472	0.201	0.363	-0.238	-0.134	0.175
CENIZAS	0.418	0.420	0.145	0.303	-0.031	0.731
Extracto seco	0.472	-0.201	-0.363	0.238	0.134	-0.175
pH	-0.451	-0.128	0.136	0.845	0.216	-0.036
ductividad mi	0.116	0.682	0.179	-0.017	0.523	-0.465
sigma0	0.168	-0.505	0.519	-0.206	0.602	0.191
visc	0.357	-0.078	0.629	0.196	-0.530	-0.387

Los autovalores significativos bajo el criterio del valor promedio han sido los primeros tres, que explican el 91% de la información. Proyectando conjuntamente las variables originales con los objetos en las primeras dos componentes principales se obtiene el biplot:

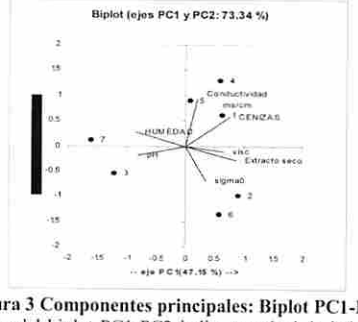


Figura 3 Componentes principales: Biplot PC1-PC2

El estudio del biplot PC1-PC2 indica un nivel de información del 73% del total que a la primera componente principal contribuyen prevalentemente las variables químicas, en cuanto el peso del esfuerzo límite de cizalla es pequeño así como lo son los de la conductividad eléctrica, mientras que el de la viscosidad es intermedio. En la segunda son muy altos los pesos del esfuerzo límite de cizalla de la conductividad eléctrica. Además:

- La humedad se comporta en forma inversa al extracto seco, como la lógica impone. El pH tiene una cierta relación sinérgica con la humedad, es decir que al aumentar la humedad el pH aumenta, es decir que la acidez disminuye.
- La conductividad eléctrica se relaciona positivamente con las cenizas, en cuanto el contenido de sales inorgánicas contribuye enormemente a la conductividad eléctrica.
- La viscosidad aparente se relacionada sinergicamente con el extracto seco y en forma antagónica con la humedad, esto es obvio considerando que la viscosidad depende de la cantidad total de materia presente en el fluido. El esfuerzo límite de cizalla tiene un comportamiento aislado.
- El grupo formado por las salsas 1, 4, 5 presentan alta conductividad eléctrica y, lógicamente, valores altos de ceniza, su extracto seco no es muy alto. El grupo de las salsas 2 y 6 son las menos fluidas y tienen un extracto seco relativamente alto pero con baja conductividad eléctrica (probable adición de un modificante de fluidez no salino). Las salsa 3 y 7 son las que tienen valores mas altos de humedad y pH, probablemente las más "aguadas", su viscosidad y esfuerzo límite de cizalla son relativamente bajos así como su extracto seco.

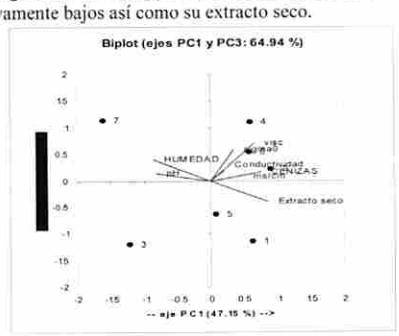


Figura 4 Componentes principales: Biplot PC1-PC3

El biplot de la PC1 y PC3 explica aproximadamente el 60 % de la información. Se advierte que la tercera componente depende principalmente de los parámetros reológicos opuestos al extracto seco. Se confirma que las salsas 7 y 3 son las más aguadas, en particular la 3 tiene parámetros reológicos muy bajos. La salsa 4 es la que más altos valores de parámetros reológicos tiene, seguida por la salsa 6. Mientras que las salsas 5 y 1, presentan valores relativamente altos de extracto seco, pero no con valores altos de esfuerzo límite de cizalla y de viscosidad aparente.

Posteriormente se realizó una clusterizacion de tipo jerárquico, de enlace tipo Ward con una distancia de Minkowski de exponente 2:

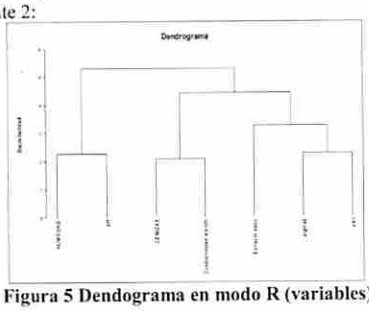


Figura 5 Dendograma en modo R (variables)

Se confirma la relación de similitud entre la humedad y el pH, entre la conductividad eléctrica y las cenizas y entre los dos parámetros reológicos, a un nivel de similitud menor el extracto seco se acerca como similitud a los parámetros reológicos.

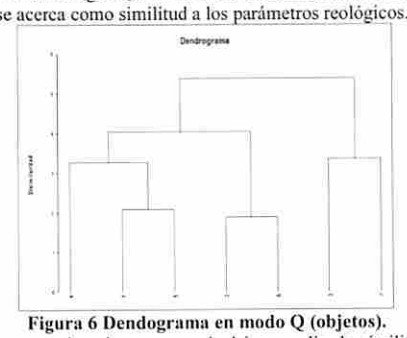


Figura 6 Dendograma en modo Q (objetos).

Se observan dos cluster a un nivel intermedio de similitud, el formado por las salsas 1, 4, 5, 2, 6 y uno formado por la 3 y las 7. Estas últimas son las más aguadas como se dedujo del análisis PC. El primer grupo a un nivel más alto de similitud se descompone en dos: 4, 1, 5 y 2 con 6. Esta separación confirma el grafico PC1 vs. PC2.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que, también un experimento simple como el propuesto, se interpreta utilizando diferentes disciplinas permitiendo así al estudiante una visión holística con creatividad los diferentes instrumentos a disposición.

En efecto, conjugando la matemática, física, la ciencia de los alimentos, la estadística descriptiva, la regresión y la estadística multivariante, el alumno tiene la posibilidad de rever y aplicar los conceptos de las disciplinas generales a casos concretos y acostumbrarse a extraer la más grande cantidad de información de los experimentos utilizando los métodos multivariantes.

Un aspecto importante es la aparente simplicidad del experimento la misma que esconde en realidad muchos problemas manuales (rozamiento entre pistón y paredes, capacidad de tomar correctamente el tiempo, necesidad de muchas réplicas para controlar el error casual etc.) que desarrollan las capacidades empíricas de los estudiantes y lo entrenan para trabajos de mayor alcance.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maxwell, J.C. 2006. Materia y movimiento, Editorial Critica, Barcelona, España, pp. 83.
2. Steffé, J.F. 1996. Rheological methods in food process engineering, II edition, Freeman Press pp. 21, 95.
3. Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M. and Buydens, L.M.C. 1997. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 339, 356-358.
4. Societá Ceramica Italiana. 1990. Reologia ceramica applicata, Faenza Editrice SpA, Bologna, Italia, pp. 126-128.
5. R. Todeschini, R. 1998. Introduzione alla chemiometria, Edises srl, Napoli, Italia. pp. 39, 65-69.
6. Wold, S., Esbensen, K.H. and Geladi, P. 1987. Principal component analysis, *Chemometr. Intel. Lab. Syst.*, 2: 37-52.

CONTRIBUCION DIDACTICA EN EL USO DE HERRAMIENTAS DE DISEÑO EXPERIEMENTAL EN LA OPTIMIZACION DE PROCESOS MEDIANTE SUPERFICIES. DE RESPUESTA

[1]Álvarez Laverde Héctor René; [2]Salamanca Grosso Guillermo

[1]UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CATALUÑA
DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA E INVESTIGACIÓN OPERATIVA. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CATALUNYA. UPC. BARCELONA. (ESPAÑA).
[2]GRUPO DE INVESTIGACIONES MELLITOPALINOLOGICAS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
IBAGUÉ-COLOMBIA

Palabras clave: Diseño experimental. Didáctica. Procesos Agroalimentarios. Estadística aplicada.

RESUMEN

Se aborda la didáctica y uso de herramientas del diseño experimental en la optimización de procesos agroalimentarios. La aplicación se orienta desde la perspectiva de la metodología de superficie de respuesta, sobre una operación de osmodeshidratacion en cubos de papaya (*Carica papaya* L.) para encontrar las condiciones optimas de proceso. Se resalta la evolución del diseño experimental y se justifican sus posibilidades como herramienta de valoración y diagnostico en tecnología de alimentos.

INTRODUCCIÓN

En los estudios relacionados con la optimización de procesos y en el desarrollo de nuevos productos alimentarios a partir de frutas y verduras, para la elaboración de jugos, néctares, conservas, compotas, mistelas, mermeladas y conservas en general, se requiere de la optimización de los sistemas de procesado, en las que intervienen variables como temperatura, presión, concentración de agentes y tiempo de proceso por citar solo algunas de ellas. En estos casos es indispensable establecer el efecto de las variables que influencian de manera significativa el rendimiento del proceso y calidad del producto o productos finales. Con frecuencia la información que se derive de la optimización de un proceso, es el resultado de la investigación sistemática, que demanda la participación de operarios, sistemas de mantenimiento, verificación de la calidad de la materia prima entre otros, donde se requiere de las herramientas del diseño experimental. El diseño estadistico de experimentos contempla una amplia variedad de estrategias, entre ellos los diseño factoriales completo 2^k donde se describen los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen los k factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. Estos experimentos están planeados de forma que se varían simultáneamente varios factores pero se evita que se cambien siempre en la misma dirección. Al no haber factores correlacionados se evitan experimentos redundantes. Además, los experimentos se complementan de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos; esto permite obtener la información con el mínimo número de experimentos y con la menor incertidumbre posible. Uno de los factores más críticos en el diseño y desarrollo de productos, especialmente agroalimentarios, es el establecimiento de las condiciones de operación que generen una respuesta óptima en las caracteristicas criticas de calidad (Mongomery, 1999). En el campo industrial la metodología de la superficie de respuesta ha tomado un papel de singular importancia en la obtención de condiciones óptimas de operación. La Metodología de la Superficie de Respuesta (MSR), surge como una alternativa de solución a la necesidad de superar los inconvenientes que se presentan en los diseños con arreglo factorial de tratamientos, cuando el número de factores y niveles crecen considerablemente. La principal desventaja de los arreglos factoriales completos consiste en que al aumentar el número de factores o niveles de éstos, el número de tratamientos también se incrementa en forma sustancial, llegando incluso a imposibilitar la administración de los ensayos y experimentos en general (Myers, 1995), Box y Wilson (Box y 1951), (Henika. y Palmer, 1976), econcibieron los diseños compuestos para dar solución a problemas de experimentos que involucran un número de factores y niveles relativamente grande, fundamentalmente bajo condiciones que permitieran un control adecuado del error, sin embargo, es bien conocido que en la investigación agrícola, especificamente en la experimentación de campo, la variabilidad del material experimental es alta y no siempre es posible estimar adecuadamente el error experimental como en los procesos industriales. El concepto de (MSR), en principio se utilizó principalmente como técnica de optimización experimental en la industria química; posteriormente fue aplicada en la experimentación agronómica, biologia y ensayos clínicos. En la industria de alimentos se ha venido aplicando desde la década de los 70´s y han sido muchos los investigadores que han usado esta técnica en aplicaciones en procesos agroalimentarios. Henika y Palmer (1976) y Henika (1982), influenciaron la aplicación de (MSR) en la investigación agroalimentaria.

El primer artículo publicado con un enfoque de ingeniería de calidad fue el de Jao, Larkin, Chen y Goldstein (Jao *et al* 1982) y El-Dash, Gonzales y Ciol (El-Dash, *et al* 1983), quienes usaron los métodos (MSR), para encontrar las condiciones de operación ideal en las áreas de tecnología. Las primeras aplicaciones en la industria de los alimentos se remontan a 1980, con los trabajos de Min y Thomas (Min et al, 1980). Las aplicaciones reportadas en la industria de alimentos han crecido de manera exponencial, a tal punto que casi todas las revistas técnicas en alimentos, presenta cientos de publicaciones basadas en metodologías por (MSR). Huor *et al* (1980).

Metodología de la superficie de respuesta

Las técnicas mediante (MAS), involucran a un conjunto de prácticas y artificios matemáticos y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés se ve influenciada por diversos factores o variables, donde el objetivo primordial es el de optimizar ésta respuesta. (Montgomery, 1991). En (MSR), se buscan respuestas a las inquietudes: Cómo es afectada una respuesta particular de un proceso por un conjunto de variables dentro de una región especifica de interés? y qué valores de las variables importantes producirán un máximo (mínimo) en la respuesta especificada? o si la superficie de respuesta se ajusta a un máximo o a un mínimo?. Para la interpretación y descripción de la (MSR), se considerará brevemente un ejemplo simple y practico. Un ingeniero Agroindustrial desea encontrar cual es la temperatura (X_1) y el tiempo de cocción (X_2) que maximiza la textura (Y), de una mezcla de aguacates. La respuesta se puede escribir en función de la temperatura y el tiempo de cocción de la siguiente forma:

$$y = f(x_1, x_2) + e \qquad (1.1)$$

Donde e es la componente aleatoria. Si se nota la respuesta esperada como $E(Y)=\eta$ entonces la superficie representada por $\eta=f(x_1,x_2)$, que es la llamada la superficie de respuesta. Se puede mostrar gráficamente la superficie de respuesta en dos dimensiones a través de un gráfico de contornos, tal como se ilustra en la figura 1.

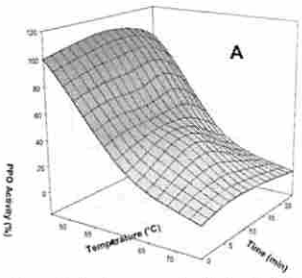


Figura 1. Superficie de respuesta efecto de la adición de vitamina C y extractos fenólicos purificados de romero y tomillo sobre la capacidad antioxidante de jugo de uva procesado por alta presión hidrostática (HHP).

En la mayoría de problemas de (MSR), el tipo de relación entre la respuesta y las variables de proceso es desconocida, por tanto el primer paso a seguir es encontrar una aproximación para la verdadera relación funcional. Usualmente un polinomio de bajo orden en una región del dominio (región experimental) es usada para estimar *el modelo de primer orden*: por lo general, se utiliza un modelo lineal para hacer esta estimación.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots + \beta_k x_k$$

Si existe curvatura en el sistema, entonces un polinomio de más alto orden se puede usar como *modelo de segundo orden*. El más utilizado es:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=}^{k} \beta_{ii} x_i^2 - \sum_{i} \sum_{j} \beta_{ij} x_i x_j$$

Frecuentemente los problemas de (MSR), utilizan uno o ambas aproximaciones. El método de mínimos cuadrados es usado para estimar los parámetros en la aproximación de los modelos. El análisis de la superficie de respuesta es realizado en términos de la superficie ajustada. Los parámetros del modelo pueden ser entonces ajustados más efectivamente, si se realiza un diseño de experimentos apropiado. El diseño de experimentos que permite hacer el ajuste se llama superficie de respuesta: Diseño de Superficie de Respuesta (DSR).

Diseño de superficie de respuesta

En un (DSR), se debe tener la característica de poder estimar curvatura, por esta razón debe tener por lo menos tres niveles en cada factor. Algunas de las propiedades que debe satisfacer éste tipo de diseños son los de poder estimar los coeficientes de un modelo cuadrático, tener un número pequeño de experimentos y factibilidad de construir diseños secuenciales (diseños de primer orden + otros puntos = diseños de segundo orden). Hay un tipo de diseño que cumple la primera condición. El diseño factorial 3^k, este diseño contempla todas las combinaciones de los tres niveles (-1, 0,+1) de cada variable de proceso, el problema es que cuando k crece el número de experimentos crece exponencialmente, y no cumple la segunda condición. Por esta razón, los diseños de superficies de respuesta tienen una estructura muy especial (15). Otra clase de diseños que utiliza menos experimentos, se conocen como Diseños Centrales Compuestos (DCC). Estos, se construyen a partir de diseños factoriales con dos niveles 2^k (lo cual permiten la estimación de efectos principales e interacciones). Además, incluyen un conjunto de puntos en los ejes (llamados puntos estrella) que permiten estimar los términos cuadráticos puros (los términos X^2i). La combinación de los puntos centrales y estrella representan un conjunto de experimentos "uno a la vez", con tres niveles cada variable de proceso considerada y ellos se notan como -1, 0 +1. La figura 2 ilustra el diseño central compuesto para 3 factores.

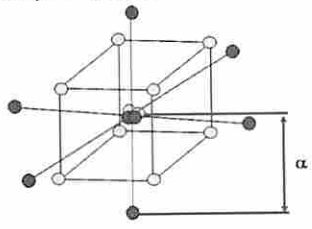


Figura 2. Estructura de un diseño central compuesto con 3 factores

Lo único que se debe decidir es cual es valor de la distancia del origen al punto de la intersección en el eje. Y cuantas repeticiones de los puntos centrales se deben incluir en el diseño. Al seleccionar el $\alpha=(N)^{1/4}$, donde N es en número de puntos usados en la porción factorial del diseño. De esta forma si se en el diseño se involucran dos factores con dos niveles, el número de puntos usados es $2^2=4$, así $\alpha=(4)^{1/4}=1.414$; si se involucran tres factores con dos niveles, el número de puntos usados es $2^3=8$, así $\alpha=(8)^{1/4}=1.682$. (Chapín, 1998; Corso y Centeno, 2003)

Aplicación de (MSR) en procesos agroalimentarios

Para ilustrar como se aplica esta técnica para encontrar las condiciones optimas de proceso, se va utilizar los datos reportados en la literatura en El-Aouar *et al* (El-Aouar, *et al* 2006). Estos investigadores evaluaron la superficie de respuesta siguiendo la evolución de la perdida de agua, ganancia de soluto y pérdida de peso durante un proceso que trascurre por deshidratación osmótica papaya, cortado en trozos cúbicos. Para ello, se utilizó un diseño experimental (DCC), con tres factores. La deshidratación osmótica consiste en la inmersión de un alimento, generalmente una fruta, ya sea entero ó en piezas, en una solución acuosa de alta concentración de soluto en la solución osmótica. El uso del proceso de deshidratación osmótica en industria de alimentos tiene varias ventajas: mejora de calidad en términos de color, sabor y textura, eficiencia de energía, reducción de costos de empaque, no pretratamiento químico, provee estabilidad al producto y retención de nutrientes durante el almacenamiento. La metodología de superficie de respuesta ha sido ampliamente usada en investigación para la mejora nutricional de productos y en procesos de deshidratación osmótica. Planificación del diseño. Fase I. Seleccionar variables y sus intervalos de variación: En este paso se seleccionan las variables que se van a controlar en el experimento. También se debe elegir la escala específica en cada variable que se estudia. Se van a considerar tres variables de proceso: Concentración de Soluto (°Brix), Tiempo de proceso (minutos) y Temperatura de deshidratación (° C). Para elegir los niveles de las tres variables se utiliza la estrategia del "centramiento", que consiste en seleccionar el punto central primero y luego seleccionar los valores extremos. En este caso se selecciono 50% de concentración de soluto y se probaron 6% por encima y por debajo; el tiempo de proceso fue de 165 minutos de deshidratación durante 45 minutos por encima y por debajo, la temperatura fue de 40°C y se probaron 6°C por encima y por debajo. Por lo general estos valores se escogen de acuerdo a las condiciones normales del proceso o de acuerdo a la experiencia del investigador. Fase II. Diseñar el experimento: Se diseño un experimento factorial 2^3 con 8 puntos centrales. La tabla 1 muestra la matriz del diseño compuesto Central, con las tres variables codificadas como se recoge en la tabla 1. Las observaciones de los puntos centrales son usadas para estimar el error experimental y permite chequear el ajuste del modelo de primero y segundo orden. En la fase III. Trabajo de experimental: De acuerdo al plan experimental mostrado en la tabla 1, se realizan pruebas de osmodeshidratacion; con el propósito de reducir el error, se aleatorizan las mediciones, a partir de los resultados de las mediciones se estiman los parámetros y características de los modelos, haciendo uso de paquetes especializados de estadística. En la fase IV. Se ajusta el modelo: Para el análisis se usa el programa informático MINITAB. Para el caso de cambios en la concentración del soluto (S), se obtiene un modelo cuadrático de la forma:

$$S = 11.49 + 1.38X_1 + 1.27X_2 + 1.4X_3 + 1.92X_1^2 + 0.56X_3^2 + 0.96X_1X_3$$

Que explica un 85.1% de la variabilidad global de la ganancia de solutos. La tabla 3 muestra la tabla ANOVA para los dos modelos. La tabla ANOVA, resume el cálculo del estadístico de prueba F, que permite validar el modelo estimado, ya sea de primer orden (Lineal) o de segundo orden (Cuadrático) y si existe interacción entre los factores en forma significativa. En consecuencia para el caso que se ocupa, se observa un modelo cuadrático y no existe interacción entre todos los factores en forma significativa. De acuerdo al modelo estimado se concluye que las dos únicas variables que están interactuando en el proceso osmótico de la fruta es de una parte la concentración del agente osmótico y la temperatura del proceso de deshidratación. Los resultados asociados a la perdida de humedad, ganancia de sólidos solubles usualmente se ilustran en gráficos 3D (figura 3 y 4). Cuando se deja constante el

tiempo, se obtiene la mayor ganancia de sólidos, con una temperatura por encima de 50° C y una concentración mayor de 60%. De la misma forma, cuando se deja la temperatura constante se obtiene la mayor ganancia de sólidos cuando la concentración está por encima de 60% y el tiempo de proceso es 240 minutos. De acuerdo al modelo las dos únicas variables que están interactuando es la concentración de soluto con la temperatura de deshidratación, esto también se observa en la grafica de contornos. Al dejar constante la concentración, se obtiene la mayor ganancia de sólidos y cuando la temperatura es mayor de 50 °C y un tiempo de proceso de 240 minutos. Esto indica que para encontrar el valor optimo (máximo relativo) de ganancia de sólidos, debe usarse el método de la máxima pendiente en ascenso (*steepest ascent)* el cual permite a partir de la selección especifica de condiciones de experimentación la dirección en donde se encuentra la máxima ganancia de sólidos.

Tabla 1. Diseño Central Compuesto con las variables codificadas

Corrida	Brix		Tiempo		Temp	
	Real	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado
1	44.0	-1	120.0	-1	34.0	-1
2	56.0	1	120.0	-1	34.0	-1
3	44.0	-1	210.0	1	34.0	-1
4	56.0	1	210.0	1	34.0	-1
5	44.0	-1	120.0	-1	46.0	1
6	56.0	1	120.0	-1	46.0	1
7	44.0	-1	210.0	1	46.0	1
8	56.0	1	210.0	1	46.0	1
9	39.9	-1.68	165.0	0	40.0	0
10	60.1	1.68	165.0	0	40.0	0
11	50.0	0	89.3	-1.68	40.0	0
12	50.0	0	240.7	1.68	40.0	0
13	50.0	0	165.0	0	29.9	-1.68
14	50.0	0	165.0	0	50.1	1.68
15	50.0	0	165.0	0	40.0	0
16	50.0	0	165.0	0	40.0	0
17	50.0	0	165.0	0	40.0	0
18	50.0	0	165.0	0	40.0	0
19	50.0	0	165.0	0	40.0	0
20	50.0	0	165.0	0	40.0	0

$$X_1 = \frac{\text{Concentración} - 50}{6} \qquad X_2 = \frac{\text{Tiempo} - 90}{30}$$

$$X_3 = \frac{\text{Temperatura} - 45}{5}$$

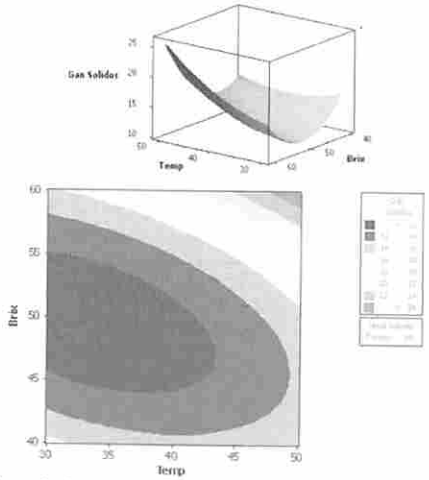


Figura 3: Superficie de Respuesta y Gráfica de Contorno para ganancia de soluto durante la deshidratación osmótica de la papaya, manteniendo el tiempo constante.

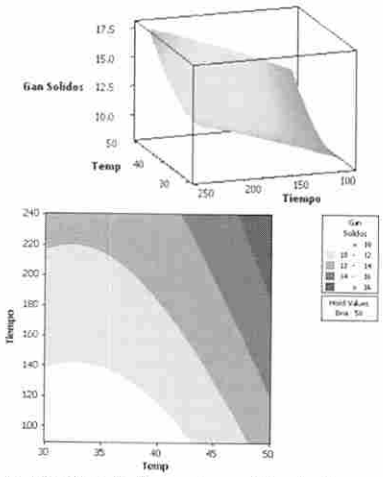


Figura 4: Superficie de Respuesta y gráfica de Contorno para ganancia de soluto durante la deshidratación osmótica de la papaya, manteniendo el concentración °Brix constante.

CONCLUSIONES

La metodología de superficie de respuestas (MSR), es un método usado ampliamente en la investigación y desarrollo de productos en la industria de alimentos y cada vez se van haciendo aplicaciones más complejas y de mayor cobertura. En las últimas investigaciones se está utilizando la MSR donde se mezclan las mezcla de componentes y variables de proceso, y dentro del campo del diseño robusto se está aplicando para encontrar las condiciones de mezcla o de proceso que minimice la varianza de la respuesta. Es importante resaltar que los profesionales involucrados en la investigación y el desarrollo de productos y procesos agroalimentarios, cada vez deben dominar tecnologías que permitan ser más eficientes en los análisis estadísticos, y que permitan sacar la mayor cantidad de información a los datos experimentales y así generar un mayor conocimiento de los ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

MONTGOMERY, D. 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México.

MYERS, R.; **MONTGOMERY, D. C**. 1995. Response Surface Methodology Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley y Sons, Inc. New York 1995..

BOX, G. E.P., **WILSON, K.B**. 1951. *On the Experimental Attainment optimum Conditions*. Journal of the Royal Statistical Society, Series B. Vol 13.

HENIKA, R. G.; **PALMER**, G.M.1976. *Response Surfase Metodology-Revisited*. Cereal Food Science. Vol. 21. pp: 432-445.

HENIKA, R.G. 1982. *Use of Response Surfase Methodology in Sensorian Evaluation*. Food Technology. Vol. 36. pp: 96-101.

JAO, Y. C; LARKIN, J. W.; CHEN, A. H.; GOLDSTEIN, W. E. 1982. *Response Surfase Analysis of Egg White Gelling Properties in a Meat Loaf Analog*. Journal of Food Process Engineering. Vol. 4. pp: 227-239..

EL-DASH, A. A., **GONZALES**, R.; **CIOL**, M. (1983) *Response Surfase Methodology in the Control of Temoplastic Extrusión of Starch*. Journal of Fooc Process Engineering. Vol. 2 pp:129-152.

HUOR S.S.; AHMED, E. M.;. RAO, P.V; CORNELL, J.A. *Formulation ana Sensory Evaluation of a Fruit Punch Containing Watermelon Citrullus Lanatus Juice*. Journal of Food Science. Vol. 45. pp:809-813. 1980.

MIN, D. B.; THOMAS, E. L.; 1980. *Application of Response Surface Analysis in th Formulation of Whipped Toppin*. Journal of Food Science. Vol. 45. pp: 346-348.

HUOR, S.S.; AHMED, E. M. ;. RAO, P. V.; **CORNELL, J. A.** 1980. *Formulation and Sensory Evaluation of a Fruit Punch Containing Watermelon Citrullus Lanatus Juice*. Journal of Food Science. Vol. 45. pp:809-813.

MONTGOMERY, D. C. 1991 *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. Mexico.

DALEY, H.; DENG, J.C.; CORNELL, J.A. 1978. *Development of a Sausage Type Prodcut From Minced Mulled Using Response Surface Methodology*. Journal of Food Science. Vol. 43. pp:1501-1506.

CHAPÍN, L.F. 1998. Comparaciones teóricas y prácticas y análisis en tiempo y espacio de los diseños de superficie de respuesta. Revista Alcance Nº 54. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 189p.

CORSO, O.; **CENTENO, A.C.** 2003. *Superficies de respuesta de la transferencia de masa durante la deshidratación osmótica del melón*. Revista de la Facultad de Farmacia. Vol. 45 (1).

EL-AOUAR, A. A.; AZOUBEL, P. M.; BARBOSA, J. L.; XIDIEH F. E. 2006. Influence of the osmotic agent on the osmotic dehydration of papaya (*Carica papaya* L.). Journal of Food Engineering 75 (2006) pp. 267–274.

DETERMINATION OF B-LACTAM ANTIBIOTICS IN WATER USING DIFFUSE REFLECTANCE SPECTROSCOPY

Rodriguez Maecker Roman Nicolay and Kuss Heinz-Martin
UNIVERSITY DUISBURG-ESSEN
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY
FORSTHAUSWEG 2
47057 DUISBURG - GERMANY

Keywords: β-lactam antibiotics, diffuse reflectance, polyurethane foam, phosphomolybdic acid, sorption, solid phase extraction.

ABSTRACT

A simple, inexpensive, sensitive and no-contaminating method to determine β-lactam antibiotics in aqueous solutions is presented. The method is based on the chemical reaction between β-lactam antibiotics and phosphomolybdic acid, a heteropolyacid able to be reduced by the thiols obtained after the acid hydrolysis of the β-lactam ring. The heteropolyblues obtained, which are proportional to the antibiotic amount, are adsorbed on polyurethane foam, and the intensity of color is directly evaluated on the solid material by means of diffuse reflectance spectroscopy. A 0°/45° illumination geometry, designed in the way to rotate the sample during the measurement of the diffuse reflectance was construted and used. This device allowed obtaining high reproducibility among the different diffuse spectra. The effect of several parameters was also estimated: concentration of phosphomolybdic acid, pH and mineral acid type, time for hydrolysis and time for adsorption, as well as the corresponding adsorption isotherms, range of linearity and possible interferences. For all six evaluated β-lactam antibiotics (amoxicillin, ampicillin, penicillin V, penicillin G, cefotaxime, cefuroxime), the analytical parameters achieved were: LOD (0.03 μg/ml), LOQ (0.1 μg/ml), RSD (4.0 %). The study of possible interferences showed that using commercial solid phase extraction cartridges is possible to eliminate even strong interferences as ascorbic acid, cysteine and reducing salts like stannous chloride.

INTRODUCTION

Development of antimicrobial resistance.- The use of antibiotics generates wastes with considerable amount of unaltered antibiotic, since the biological absorption of these antimicrobial agents under the metabolic pathways in humans and animals is around 30%; or, what is the same, 70% of an administrated doze is excreted unchanged by the living organism and disposed into the waste water system. From the whole antibiotics used in human medicine and animal veterinary, β-lactam antibiotics reach 65% of the total amount of administrated antibiotics [1]. The use of antibiotics led to microbial drug resistance as an adaptive response in which microorganisms begin to tolerate an amount of drug that would ordinary be inhibitory [2]. Antimicrobial resistance is an inevitable natural biological phenomenon that is exacerbated by the abuse, overuse and misuse of antimicrobials in the treatment of human illness and in animal husbandry and agriculture [3].

Analytical methods to analyze antibiotics.- Native β-lactam antibiotics are colorless and do not have chromophores with significant UV adsorption properties. In that way, applications for determining β-lactam antibiotics using spectrophotometry are based in suitable derivatizations to obtain colored compounds for measurements in the visible range. Several applications using spectrophotometry for determination of β-lactam antibiotics have been developed. Nevertheless, all of these spectrophotometric methods have been developed for analysis of β-lactam antibiotics only in pure forms or in pharmaceutical preparations. In 2002, the European Commission presented the decision 2002/657/EEC that states: "Methods based only on chromatographic analysis without the use of molecular spectrometric detection are not suitable for use as confirmatory methods" [4]. On such a way, High Performance Liquid Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (HPLC-MS) is the ideal technique to separate identify and quantify several chemical compounds and it has been used to analyze β-lactam antibiotics in food, biological and some environmental samples. Nevertheless, this statement doen not respond to the world reality, because in many developing countries, the access to laboratories with sophisticated instrumentation like an hplc-ms chromatographic system is difficult or even not possible. Even worse is to think that in those countries, such kind of instrumentation can be used in routinary analysis, where the technological and economical situation creates the barrier. In function of that, and aiming specially to hospitals and husbandry farms where antibiotics are used daily, there is a necessity to perform cheap clean and sensitive analytical methods for direct determination in the field, and to keep the expensive laboratory examinations only for confirmatory analysis.

The present approach.- The present work involves the development and optimization of a simple, cheap, sensitive and no-contaminating analytical method for the determination of β-lactam antibiotics in aqueous solutions. The method does not include the use of contaminating reagents, nor expensive and sophisticated instrumentation, nor microorganisms and enzymes. The method is based on the reduction of phosphomolybdic acid by means of the thiols obtained after the acid hydrolysis of β-lactam antibiotics, being penicillamine the characteristic degradation product of penicillins [5], while for cephalosporins, a thiolactone is produced via a thiol-intermediate product [6]. The reduced form of phosphomolybdic acid - known as heteropoly blues - is formed proportionally to the amount of β-lactam antibiotic present in the sample and then, adsorbed on disks of polyurethane foam. PUF is a polymer material with special characteristics as sorbent material: high efficiency, versatility, chemical and mechanical stability, resistance to organic solvents, relatively low cost and world wide availability. The unique sorption property of this polymer, which is a combination of various hydrophilic and hydrophobic centers and the reactive toliudine terminal groups, has made possible to use PUF for physical and chemical sorption [7-8]. The heteropolyblues adsorben on PUF can be desorbed with an suitable solvent (e.g. acetone) and analized within the resulting colored solution. Nevertheless, this step is not necessary because the sorbed analyte can be evaluated directly on the polymer using diffuse reflectance spectroscopy, technique that allows to measure the intensity of the color on solid materials [9]. The reflectance values obtained are correlated with the concentration using the Kubelka-Munk Function,

$$F(R_\infty) = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{k}{s} = 2.303\frac{\varepsilon c}{s}$$

where R_∞ is the diffuse reflectance of the layer expressed as a decimal fraction, k is the molar absorption coefficient, s is the scattering coefficient caused by the supporting material, ε is the molar extinction coefficient and c is the molar concentration [10].

EXPERIMENTAL PART

Instrumentation and equipemt.- A diode-array X-dap spectrophotometer (IKS optoelektronik GmbH, Germany) was used for all absorbance and reflectance measurements. In order to develop a measurement, the instrument was coupled by optical fiber with one of the following attachments: a reflection head with 0°/45° geometry for measurements of diffuse reflectance on solid material, and a 10 mm path length cell holder for measurements of absorbance on solutions. The spectrophotometer was controlled via PC by means of XLAB software, version 3.11. For diffuse reflectance measurements, a home-made horizontal rotating device (25 rpm as slowest speed) was prepared using a mechanical stirring motor (Type RW 18; IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany) coupled with the sample holder.

Materials and reagents.- Polyurethane foam polyether type, Contipur 3550 (Contitech, Germany), density 33.5 kg/ m^3 was used. Commercial solid phase extraction cartridges of 500 mg of sorbent were used for testing the removal of possible interferences. All solutions were prepared using deionized water, purified by Elix3 - MilliQ System (Millipore, USA). Standards of antibiotics were friendly donated by the Institute for Energy and Environmental Technology, IUTA, Germany. Phosphomolybdic acid (Riedel-de Haen, Puriss. p.a) was used.

Procedures.- Blocks of polyurethane foam were cut in sheets of thickness 5 mm using a proper vertical saw for foam. Then, the sheets were immersed in liquid nitrogen and using a cork borer, disks with diameter of 20 mm were prepared. All PUF disks were firstly washed with 1.0 M HCl, secondly with pure water until the washings are acid free and third with acetone. The disks were air-dried and then stored in brown-stoppered flasks. Analytical solutions were prepared placing 40 ml of water in 10 glass reactor tubes. Aliquots of 0, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 µl of stock antibiotic solution (100 µg ml^{-1}) were added into each reactor and then 0.1 ml of 1.0 M HCl to set the pH to 2.50, followed by 1.0 ml of 0.01 M phosphomolybdic acid. The tubes were heated in a water bath at 90 °C for 60 minutes. After the heating step, the reactors were cooled to room temperature and 0.5 ml of 1.0 M HCl were added to set the pH to 2. A PUF disk previously soaked in 0.01 M HCl was added to each reactor and the air bubbles were removed using a glass rod. The reactors were closed and mechanically shaken for 90 minutes. The disks were removed, squeezed between filter paper and air-dried. Finally, the diffuse reflectance of each disk was measured, using a white PUF disk to setup the reflectance to 100%.

RESULTS AND DISCUSSION

Diffuse reflectance spectra.- The diffuse reflectance spectra, presented as Kubelka-Munk function F(R) in Figure 1, show that the maximum peak occurred at 720 nm.

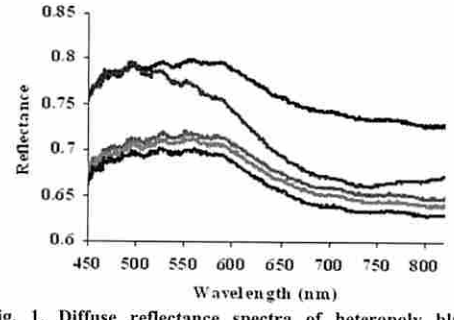


Fig. 1. Diffuse reflectance spectra of heteropoly blues adsorbed on PUF: amoxicillin (1), ampicillin (2), penicillin V (3), penicillin G (4), cefuroxime (5), cefotaxime (6).

The measurement of Diffuse reflectance.- Using a 0°/45° geometry, only the light reflected in one direction (45° in this case) is detected. This reflected light is not always homogenous because the material presents some imperfections like hills, holes, canals, etc., making that the reflectance spectra obtained present strong differences between them, as indicated in Figure 2, where it is possible to see the lack of reproducibility achieved.

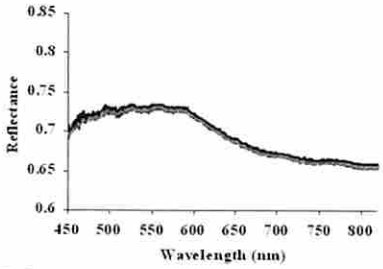


Fig. 2. Reflectance spectra obtained for the same sample without rotating the sample.

An interesting solution was found to solve this problem: the sample under analysis, in this case the PUF disk, was rotated during all the time of reflectance measurement. At Figure 3 is possible to visualize the good reproducibility achieveded.

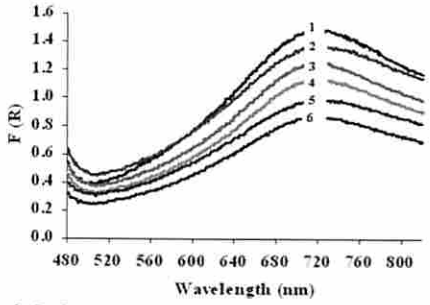


Fig. 3. Reflectance spectra obtained for the same sample rotating the sample.

Development of heteropoly blues in function of pH and mineral acid type.- The reactivity of amoxicillin with phosphomolybdic acid at different pH was evaluated using three different mineral acids as medium: hydrochloric acid, sulfuric acid and phosphoric acid. The results show that the maximum development of heteropoly blues was achieved at pH 2.5 with hydrochloric acid.

Development of heteropoly blues in function of the concentration of phosphomolybdic acid.- Phosphomolybdic acid at different concentrations and also at three different pH was tested to find the maximally coloured PUF disk. Phosphomolybdic acid was prepared at five different concentrations between 0.05 mM and 1.0 mM. Three different pH values: 1.5, 2.5 and the natural value of the phosphomolybdic acid solution were tested. The pH was adjusted with 1.0 M HCl and amoxicillin was the antibiotic used. 0.25 mM phosphomolybdic acid at pH 2.5 gave the best result and was selected for all determinations.

Development of heteropoly blues in function of time.- All antibiotics were tested to find the necessary time for reacting with phosphomolybdic acid. Minimum 60 minutes are needed for all solutions to reach the maximal absorbance value using a temperature of 90 °C..

Sorption of reduced phosphomolybdic acid on PUF.- The time necessary for the sorption process was evaluated using two different concentrations of phosphomolybdic acid: 0.25 mM and 0.1 mM. The minimum sorption time necessary to adsorb the reduced phosphomolybdic acid on PUF is 60 minutes, but an ideal time is 90 minutes, and this was the time used in all sorption steps.

Range of linearity and calibration curves.- The range of linearity for all six antibiotics, evaluated by means of the response factor method [49], was between 0.1 and 2.0 µg/ml. The correlation parameters and analytical limits for all six antibiotics are indicated in table 1. The limits of quantitation

(LOQ) achieved with the present method are at least 10 times lower than other spectrophotometric methods based on the analysis of solutions.

Table 1. Correlation parameters and analytical limits

	Correlation Coefficient	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	RSD (%)
Amoxicillin	0.9954	0.038	0.145	4.32
Ampicillin	0.9959	0.039	0.142	3.20
Penicillin V	0.9928	0.035	0.126	2.96
Penicillin G	0.9955	0.026	0.096	2.45
Cefuroxime	0.9942	0.037	0.133	3.70
Cefotaxime	0.9946	0.039	0.139	2.28

Evaluation of interferences.- Due to phosphomolybdic acid can be reduced by several chemical agents, an evaluation of possible interferences was carried out using fifty chemical substances from the following groups: reducing agents, pharmaceuticals, amino acids, sugars, active metabolites and phenols. The results indicate that the strongest interferences are produced by ascorbic acid, stannous chloride and cysteine. The elimination of interferences was evaluated using solid phase extraction technique (SPE) by means of commercial available SPE cartridges. Based on preliminary experiments obtained with TLC, amoxicillin was selected to evaluate the *breakthrough* volume and cefotaxime was selected to evaluate the *elution* volume. The breakthrough volume for amoxicillin using five different commercial SPE cartridges is shown in Figure 4.

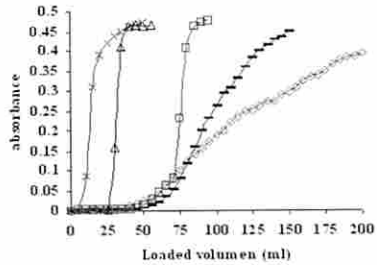


Fig. 4. Breakthrough for amoxicillin. C_{amox} = 25 µg/ml; pH = 1.5 in HCl medium; Flow = 3 ml/min: C18 Polar Plus (Δ), C18 (X), Isolute Env+ (–), Chromabond Easy (◊), Strata X (□).

The highest load capacity was achieved using cartridges packed with polystyrene-divinylbenzene. In a similar way, the breakthrough volume for ascorbic acid and cysteine was evaluated, getting the result that these two interfering compounds are not retained at all on the sorbents. An elution test was performed to evaluate the behavior of the cartridges for removing the interferences. Hydrochloric acid 0.1 M was used as cleaning solvent. Among all SPE cartridges, Strata X must be finally selected for cleaning up the sample, since it presents a sharp curve for the breakthrough of amoxicillin and also a sharp curve for removal of ascorbic acid.

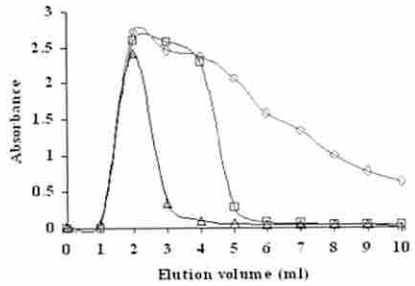


Fig. 5. Elution of cefotaxime from SPE cartridges. Eluent = methanol - 0.1 M HCl in proportion [1:1]: C18 Polar Plus (Δ), Chromabond Easy (◊), Strata X (□).

The elution of retained β-lactam antibiotics on each cartridge was evaluated using cefotaxime and is indicated in Figure 5. Strata X, the sorbent selected for the elimination of interferences needs 7.0 ml of the elution solvent to remove all cefotaxime, but using 10 ml would be better for practical reasons.

Recovery evaluation.- The recovery evaluation for five Strata X cartridges was performed using amoxicillin, and based on the selected SPE parameters, as follows: volume of sample loaded on the cartridge = 50 ml (amoxicillin, 20 µg/ml at pH 1.0); removal of interferences = 10 ml of 0.1 M HCl and elution step = 10 ml of methanol:0.1 M HCl [1:1]. The recovery results gave a mean of 93 %.

CONCLUSIONS

The method presents the advantages to have more sensitivity compared with spectrophotometric methods using analysis of solutions. In general, a LOD of 0.03 µg/ml, a LOQ of 0.1 µg/ml and a good reproducibility with RSD of 4.0% was achieved for all six evaluated β-lactam antibiotics. The method presents the limitation of being not selective, due to phosphomolybdic acid can be reduced by several agents. Nevertheless, strong possible interferences like ascorbic acid, stannous chloride and cysteine were completely eliminated using commercial solid phase extraction sorbent "Strata X". The method makes no difference between the β-lactam antibiotics present in the sample, therefore, the results should be expressed based on the β-lactam antibiotic which is more often administrated and also, more often found in waste water: that is, amoxicillin. In that manner, it is suggested to state the results of analysis as "β-lactam antibiotics expressed as amoxicillin". This particularity must be considered in the way that a possible over-estimation of the real amount of β-lactam antibiotics can result from this suggestion, because the sensitivity for amoxicillin, compared with the rest five β-lactam antibiotics, is the highest one achieved in the present method. Nevertheless, an over-estimation would be preferred instead of under-estimation.

REFERENCES

[1] Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemothe 52: 5*

[2] Talaro K, Talaro A (2002) Foundations in microbiology. *McGraw-Hill, New York, USA.*

[3] World Health Organization (2000) Report on infectious diseases 2000: Overcoming antimicrobial resistance. Accessed on 07.03.2005 from: *http://www.who.int/infectious-disease-report/*

[4] Ghidini S, Zanardi E, Varisco G, Chizzolini R (2002) Prevalence of molecules of β-lactam antibiotics in bovine milk in Lombardia and Emilia Romagna (Italy). *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma 22: 245*

[5] Abraham E P, Chain E, Baker W, Robinson R (1943) Penicillamine, a characteristic degradation product of penicillin. *Nature 151: 107*

[6] Dinner A (1977) Cephalosporin degradations. *J. Med. Chem. 20, 963-965*

[7] Braun T, Navratil J D, Farag AB (1985) Polyurethane foam sorbents in separation science. *CRC Press Inc., Boca Raton, USA.*

[8] Dmitrienko S G, Zolotov Yu A (2002) Polyurethane foams in chemical analysis: sorption of various substances and its analytical applications. *Russian Chemical Reviews 71, 159*

[9] Dmitrienko S G, Sviridova O A, Pyatkova L N, Senyavin V M (2002) Polyurethane foams as solid chromogenic reagents for diffuse reflectance spectroscopy. Anal. Bioanal. Chem. 374, 361-368

[10] Kortüm G, Braun W, Herzog G (1963) Principles and techniques of diffuse refelctance spectroscopy. *Angew Chem Internat Edit 2:333*

UTILIZACION DE APLICACIONES INFORMATICAS EN EL PROCESO DE INTERAPRENDIZAJE DE FUNDAMENTOS DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

Amaluisa, M.; Salazar, J.
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
LABORATORIOS
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Casilla 18-01-0334. E. mail. fcial@uta.edu.ec
AMBATO – ECUADOR

Palabras clave: recurso informático, didáctica, aplicaciones, autoaprendizaje, balance, materia, energía.

RESUMEN

El propósito del trabajo fue desarrollar un recurso informático útil que sea aplicado en el proceso de interaprendizaje de los fundamentos de la ingeniería de alimentos en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. El uso de las NTICs como un recurso didáctico pedagógico, permite dinamizar el proceso de interaprendizaje, y el uso de aplicaciones informáticas aporta en la visualización interactiva de los aspectos matemáticos de resolución de problemas. Se realiza una recopilación preparada para trabajar en el entorno Windows, mediante presentación en Power Point, con aplicaciones de procesador de textos MS Word, hojas de calculo Excel y archivos PDF, en las que se despliega la información del proceso de resolución de problemas de conversión de unidades, balance de materia y balance de energía; esta información ha sido organizada tomando en cuenta temas y subtemas, en los que se presentan ejemplos con problemas resueltos. El presente trabajo genero una nueva visión en el aspecto metodológico de "aprender a aprender", con base en las tendencias educativas actuales, para que el estudiante calcule y verifique los balances en los diferentes procesos relacionados con la ingeniería de alimentos.

INTRODUCCIÓN

"Un sistema operativo constituye el soporte básico de todas las funciones y programas que desarrolla una computadora." Vásquez. M et. al. (2006). En la actualidad, Windows es el sistema operativo mas utilizado y por su facilidad de manejo es un estándar de referencia de los software de sistemas.

"Un programa informático es un evento diseñado para facilitar al usuario la realización de un determinado tipo de trabajo", Sánchez, M. (2006).

El uso de las aplicaciones informáticas del MS Office que permitan visualizar la resolución de problemas relacionados con el balance de materia en el campo de la Ingeniería en Alimentos, así como la preparación de material didáctico basado en archivos de procesador de texto, hojas de calculo, presentaciones, y archivos con formato PDF, viabiliza la posibilidad de que exista una amplia accesibilidad para la comunidad estudiantil. Un módulo completo comprende el número de ítems necesarios para completar una temática específica de formación y desarrollara el número de unidades que permitan al estudiante alcanzar un aprendizaje significativo de destrezas dentro de su formación integral. Al finalizar el módulo, el estudiante debe estar en capacidad de calcular los balances de materia y de energía, de procesos industriales mediante fórmulas para su diseño, control y optimización.

Dentro de las industrias de procesos, los balances de materia y energía son importantes auxiliares en el diseño, control, optimización y evaluación económica de los procesos propuestos y existentes, así como de decisiones sobre las operaciones que se presentan a diario, por lo que tienen repercusión directa en la producción y en la situación financiera de las compañías; en consecuencia que el profesional técnico desarrolle los conocimientos, habilidades y actitudes que le permitan realizar el cálculo de balances de materia y energía con la exactitud requerida.

El manejo adecuado de los sistemas de unidades, su conversión, las bases conceptuales de proceso y sistema, constituyen los fundamentos para la resolución de problemas de balance.

En WIKIPEDIA (2007), se manifiesta que "los balances de materia se basan en la ley de la conservación de la materia, que indica que la masa de un sistema cerrado permanece constante, sin importar los procesos que ocurran dentro del sistema". La cantidad de material que entra en un sistema será la misma que salga y/o se acumule en él.

Entradas = Salidas, o

Entradas = Salidas + Acumulación

Los balances de materia se desarrollan generalmente para la totalidad de masa que atraviesa el sistema, aunque también pueden enfocar a sus elementos o a algún compuesto químico especifico.

Los balances pueden ser integrales o diferenciales. Será integral cuando enfoca el comportamiento global del sistema, en tanto que será diferencial si enfoca los mecanismos dentro del sistema, y que a su vez, afectan el comportamiento global.

En la resolución de problemas de balance, inicialmente se debe establecer los límites del sistema, es decir, se encuentra el contexto que lo rodea, y cómo ese contexto influye sobre aquel. Un grafico permitirá por tanto tener una mejor visión de lo mencionado y de los componentes involucrados.

"Un problema de balance de materiales puede ser resuelto sobre cualquier base asumida. Después que todas las cantidades de las corrientes del proceso son identificadas, la cantidad específica requerida en el planteamiento del problema puede ser contestada usando relaciones y proporciones". Toledo, R. (1980).

Los cálculos dependen también del tipo de balance.

- balance total: que se aplica a en todo el sistema considerando las masa total de cada una de las corrientes.
- balance parcial: que se aplica en los subsistemas en base a un determinado componente en cada una de las corrientes.

El balance de energía, constituye una contabilidad de las diferentes formas de energía involucradas en un sistema o en un proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Computador Personal con entorno Windows

Aplicaciones de procesador de textos MS Word, hojas de cálculo en Excel, presentaciones en Power Point, y archivos PDF

Ejercicios de balance de materia y energía propuestos por varios autores

Software libre

Método

Se preparo un índice de organización de cada una de las dispositivas, analizando los temas y subtemas a abordar, de cada uno de ellos se escogieron problemas particulares, los cuales fueron resueltos siguiendo la metodología pedagógica aplicada en el aula. Cada problema se estructuro con una disposición que evidencie, al ser ejecutado, cada paso a

desarrollar en su resolución. Se buscaron en el Internet, elementos que apoyen a esta propuesta como material didáctico, como el caso de Covert, un software convertidor de unidades de joshmadison.com (http://www.joshmadison.com/software)
Los problemas desarrollados fueron resueltos individualmente, algunos de ellos por varios procedimientos que evidencian las diferentes opciones de resolución. Cada uno de los ejercicios que se presentan, se diseñan de tal manera que consta paso a paso, la forma de resolución especifica planteada en el problema y que tiene relación con la ingeniería de alimentos.
Luego se integro en el programa de presentación, cada uno de los archivos mediante vínculos, para configurar la secuencia, enlace y ejecución ordenada de cada uno de ellos.
Se verifico la adecuada disposición de los elementos para que exista facilidad en el manejo.
Se personalizo las diapositivas adicionando efectos de animación ensayando los intervalos correspondientes para lograr una adecuada ejecución.
Este recurso fue socializado ante el sector estudiantil con la finalidad de evaluar las bondades del mismo e integrar aportes para su mejoramiento.

RESULTADOS

El recurso didáctico desarrollado para su aplicación informática, es amigable y versátil, contiene ordenada la temática como se indica a continuación.

Contenido:

Unidades
Ejercicios de conversión de unidades
Software para conversión de unidades
Noción de proceso
La Materia: Propiedades
Balance de Materia
Balances de materia con soluciones directas
Balances de materia con soluciones algebraicas
Balances de materia con elementos de correlación
Base teórica del balance de materia en procesos de producción
de alimentos
Balance de materia en Productos lácteos
Balance de materia en Productos cárnicos
Balance de Materia en Mermeladas
Balance de materia en Procesos con flujo
Ejercicios propuestos
Balance de energía
Ecuación básica
Interpolación
Ejercicios

Los archivos son accesibles en forma ordenada y sistemática de manera que se logra cubrir una secuencia de menor a mayor complejidad en la resolución de los problemas de balance, tanto en el aspecto de materia como en el de energía.
Se desarrolla como un modulo autodidáctico completo de Fundamentos de Ingeniería.
Todo esto con la finalidad de cumplir con las expectativas que el estudiante desarrolle la capacidad de convertir unidades de diferentes sistemas, realizar balances de materia y aplicar balances de energía con relación a procesos de alimentos.

CONCLUSIONES

Este recurso informático generado para el interaprendizaje de los fundamentos de ingeniería de alimentos, ejecutado en el sistema operativo Windows, mediante el uso de las aplicaciones de procesador de textos Word, hojas de calculo Excel, presentaciones Power Point y archivos PDF, permite generar ordenadamente un despliegue de los procedimientos y técnicas que se aplican para la solución de ejercicios de conversión de unidades, problemas de balance de materia y de balance de energía en procesos relacionados con la ingeniería de alimentos. Usada como una herramienta didáctica permite complementar las bases teóricas de la resolución de problemas, con el desarrollo de destrezas y habilidades en la resolución de problemas relacionados al área de alimentos.
Presenta una variada gama de alternativas respecto a los procesos que se ejemplifican y según el tipo de balance de materia aplicado.
El material presentado es útil para propósitos de ingeniería y tecnología de alimentos, permite en varios casos (ejercicios resueltos en hojas de cálculo), ejecutar simulaciones básicas para la comprensión de la influencia de variables en procesos específicos.
El recurso se encuentra en proceso de evaluación para la posterior difusión a nivel institucional, previo la autorización correspondiente.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- BATTY, C. 1990. Fundamentos de la Ingeniería de Alimentos. Editorial Continental S.A..México.

- CHARM, S. 1971 The fundamentals of food engineering. 2th ed. The AVI Publishing Company Inc. Connecticut, USA. p: 41-42.
- COLEGIO DE EDUCACION PROFESIONAL TECNICA DEL ESTADO DE MEXICO, PLANTEL LERNA. 2001. Proceso de balance. ttp://conaleplerma.galeon.com/PlanProcesoBalance.htm
- CRUZ VIERA, L., PONS FERNANDEZ, A. 1985. Introducción a la ingeniería química. Tomos 1 y 2. Pueblo y Educación. La Habana. CU. fig. SPA.
- FELDER, R. y ROUSSEAU, R. 1978. Principios básicos de los procesos químicos. Traducción del inglés por Alejandro Hill. Ed. El Manual Moderno. México. p: 151.
- FELDER. R.M., ''On creating creative engineers'', Engr. Ed., January, 1987, p. 222-227.Traducción de Ma. del Carmen Doria y Armando Rugarcía, UIA. - HIMMELBLAU, DAVID M. 1989. Basic principles and calculations in chemical engineering. Prentice Hall. Englewood. US. 5a. ed. 735 p. tbls., ilus. ENG.
- JOSHMADISON.COM. 1993. Convert. http://www.joshmadison.com/software
- KENDALL, K.; KENDALL, J. 1991. Análisis y diseño de sistemas. Prentice hall Hispanoamericana, S.A. México
- LA SALLE. 2003. Ejercicios balance de materia y energía. http://vulcano.lasalle.edu.co/~docencia/Alimentos/Mat&Ener_Mat_Ejrccios_pqmico.htm
- LITTLEJOHN, C. 1984. Introducción a la ingeniería química. 1 ed. Editorial Continental. México.
- MICROSOFT OFFICE. Programas de ayuda. Office 2003.
- MERBEL, J. 1983. Basic Engineering Principles. 2 ed. The AVI Publishing Company. U.S.A.
- PERRY, J. 1981. Manual del ingeniero químico. 1 ed. Editorial Hispano Americana. México.
- REKLAITYS, G. 1989. Balances de materia y energía. 1 ed. Mac Graw Hill. México.
- TOLEDO, R.1980. Fundamentals of food process engineering. Avi. Westport, US. 409 p. ilus., tbls. ENG.

- VALIENTE BARDERAS, A.. 1997. Problemas de balance de materia y energía en la industria alimentaria. Limusa. México. MX. 2ed. 307 p. ilus., prob., resuel. SPA.
- WIKIPEDIA. 2005. Balance de materia. http://es.wikipedia.org/wiki/Balance_de_materia