

9 CIBIA

Congreso Iberoamericano
de Ingeniería de Alimentos

Valencia (España)

13 - 16 enero 2014

Libro de Actas

Vol. 4

Editado por Pedro Fito, Ana María Andrés,
Ángel Luis Argüelles y María Dolores Ortolá



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA9

13 - 16 enero 2014 Valencia (España)

Libro de Actas

Vol. 4

Editores:

Pedro Fito
Ana María Andrés
Ángel Luis Argüelles
María Dolores Ortolá

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Colección Congresos

Los contenidos de esta publicación han sido evaluados por los miembros del Comité científico:

Pedro Fito
Ana María Andrés
Ángel Luis Argüelles
Amparo Chiralt
Marco Dalla Rosa
María José Galotto
Albert Ibarz
María Dolores Ortolá
Paola Pittia
Abel Guarda Moraga

Primera edición, 2013 (versión impresa)

© Editores: Pedro Fito
Ana María Andrés
Ángel Luis Argüelles
María Dolores Ortolá

© de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València
distribución: Telf. 963 877 012 / <http://www.lalibreria.upv.es> / Ref. 6125_01_01_01

ISBN: 978-84-9048-168-4 (version impresa)

Queda prohibida la reproducción, la distribución, la comercialización, la transformación y, en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de la totalidad o de cualquier parte de esta obra sin autorización expresa y por escrito de los autores.

Comité Organizador:

Pedro Fito – Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

Ana María Andrés - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

David Arce - Grid y Computación de Altas Prestaciones (GRyCAP)
Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular (I3M)
Universitat Politècnica de València (UPV)

Ángel Luis Argüelles - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Ignacio Blanquer – Grid y Computación de Altas Prestaciones (GRyCAP)
Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular (I3M)
Universitat Politècnica de València (UPV)

Juan Manuel Castagnini- Universidad Nacional de Entre Rios (Argentina)

Carolina Ivonne Contreras - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Virginia Larrea - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

María Dolores Ortolá - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Milagro Reig - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Mario Visquert - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Comité Científico:

Pedro Fito - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Ana María Andrés - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Ángel Luis Argüelles - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Amparo Chiralt - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Marco Dalla Rosa – Interdepartmental Centre for Agri-Food Industrial Research – Alma Mater Studiorum – Università di Bologna (Italia)

María José Galotto – Laben-Chile. Laboratorio de Envases. Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Santiago de Chile.

Abel Guarda - Laben-Chile. Laboratorio de Envases. Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Santiago de Chile.

Albert Ibarz - Departament Tecnologia Aliments, UTPV-XaRTA, Agrotecnio Center, Universitat de Lleida (España)

María Dolores Ortolá - Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Paola Pittia – Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari ed Ambientali – Università di Teramo (Italia)

Presentación

En el año 1995, del 5 al 9 de Noviembre se celebró en Campinas (Brasil) la primera Conferencia Ibero-Americana de Ingeniería de Alimentos. Fue organizada por la Red Iberoamericana de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (RIBIADIR) dentro del Programa CYTED-D, que celebraba el 500 aniversario del descubrimiento de América. Este hecho certificaba, no solo el potencial científico de la Comunidad Iberoamericana, sino la oportunidad de hacerlo contribuyendo al mismo tiempo al reconocimiento y fortalecimiento de una disciplina joven e íntimamente ligada al potencial de desarrollo social y económico de la región. De los más de 300 trabajos presentados, la mayor parte fueron publicados por la Universidad Politécnica de Valencia.

Basándose en la información recibida y con ayuda de muchos de los autores de dichos trabajos se publicó el libro **FOOD ENGINEERING 2000** (1) que cumplía la doble función de recoger los principales conceptos e informaciones incluidos en los trabajos presentados, con la colaboración de sus autores, y en segundo lugar hacer una reflexión sobre el concepto y contenidos de la Ingeniería de Alimentos, desarrollándolos de una forma estructurada.

El resultado fue un volumen histórico por cuanto demostraba el potencial de la Región en una disciplina en desarrollo, con enorme potencial científico y económico, y al mismo tiempo proponía a la comunidad científica la sistematización de su ámbito de influencia. En él se abordaba el estudio de esta disciplina manejando conceptos tan actuales como estructura y propiedades físicas de los alimentos, modelos del proceso y de sus operaciones, envasado y un capítulo dedicado a la Formación en la Ingeniería de Alimentos.

En la Introducción los editores del libro señalábamos:

“Is quite apparent Food engineering is gaining recognition worldwide by developing an identity within food and engineering related programs in academia, institutions and the food industry. We are confident this book will help in the consolidation of a much needed profession and will also provide its readers an incentive for identifying what is awaiting for the profession in the twenty-first century.”

Hoy, 18 años después, podemos asegurar sin ninguna duda que la Ingeniería de Alimentos se ha consolidado como una disciplina académica, científica y profesional fundamental para hacer frente al desafío de alimentar a la población mundial, mejorando la producción y distribución de alimentos más saludables, nutritivos y accesibles, especialmente para los sectores menos desarrollados.

Este CIBIA 9, con los más de 400 trabajos presentados, es un ejemplo de que el impulso de industriales, profesores e investigadores persiste. Otros muchos foros sobre Ingeniería de Alimentos han aparecido en el Mundo, pero CIBIA mantiene una característica peculiar: es el fruto del impulso de una comunidad que se reconoce como tal y que disfruta las posibilidades de demostrarlo.

Pedro Fito

“Food Engineering 2000” Edited by Pedro Fito, Enrique Ortega y Gustavo V. Barbosa
Chapman & Hall 1997

Índice

Presentación 3

Comunicaciones

- 333 INFLUENCIA DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA EN LA TEXTURA DE UN QUESO FRESCO DESLACTOSADO..... 19
Antezana Vásquez Cintya, Ludeña Urquizo Fanny, Linares García Laura
- 334 OPTIMIZACIÓN Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE SECADO CON VACÍO COMO PRETRATAMIENTO AL BAGAZO DE MANZANA..... 27
Almeida-Trasviña, F., Medina-González, S., Ortega-Rivas, E., Salmerón-Ochoa, I., Pérez-Vega, S.
- 336 IMPACTO DE LA TRAYECTORIA TERMOHÍDRICA DE LA OPERACIÓN DE COCCIÓN SOBRE LA GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE PLATANO DE COCCIÓN..... 35
Andrés Giraldo, Olivier Gibert, Dominique Dufour, Julien Ricci, Philippe Bohuon
- 337 IMPACTO DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA Y CARBOXIMETILCELULOSA EN LA CALIDAD DE KIWI EN POLVO OBTENIDO POR LIOFILIZACIÓN Y ATOMIZACIÓN 45
Yishi Wu-Ng, María Benlloch-Tinoco, Eva García-Martínez, Nuria Martínez-Navarrete
- 338 OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE SECADO COMBINADO PARA OBTENER KIWI EN POLVO DE ALTA CALIDAD 52
Juana Teresa Cervera Valero, María Benlloch-Tinoco, Eva García-Martínez, Nuria Martínez-Navarrete
- 343 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA MATURAÇÃO NO CONTEÚDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DE MIRTILO 59
Marta Coelho, Sara Silva, Eduardo M. Costa, M^a Manuela Pintado
- 344 OPTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO FENÓLICA DE EXTRACTOS AQUOSOS DE MIRTILO (FOLHA E FRUTO SECO) 66
S. Silva, Coelho M., Costa E.M., Pereira M.F., Costa M.R., Pintado M.
- 345 IMPACTO DA METODOLOGIA DE CONGELAMENTO NO PERFIL FITOQUÍMICO DE DUAS CULTIVARES DE MIRTILO (*VACCINIUM CORYMBOSUM*)..... 72
Marta Coelho, Sara Silva, Helena Gomes, Pilar Morais e M. Manuela Pintado

- 346 EXTRACCIÓN Y FORMULACIÓN DE ANTIOXIDANTES DE SALVADO DE TRIGO. APLICACIONES EN PANIFICACIÓN 79
Alexander Navarrete, Felicidad Ronda, Luis García, Sofia Fernández, María José Cocero
- 347 APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA PARA EVALUAR LA VIDA ÚTIL DE LECHE FRESCA 86
David Canet, Ana Fuentes, Nicolás Laguarda, Isabel Fernández-Segovia, Rafael Masot, Miguel Alcañiz, José Manuel Barat.
- 348 CINÉTICA DE INACTIVACIÓN DE PECTIN METILESTERASA EN TRITURADO DE NARANJA POR MEDIO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y TEMPERATURA 93
Viridiana Alejandra Tejada-Ortigoza, Zamantha Escobedo-Avellaneda, Aurora Valdez-Fragoso, Hugo Mújica-Paz, Jorge Welti-Chanes.
- 349 INFLUENCIA DEL TIPO DE ROBLE Y GRADO DE TOSTADO DE LA BARRICA EN LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y POLIFENÓLICA DE VINOS TINTOS..... 101
Lizama, V., García M.J., Sevilla, G., Álvarez, I. y Aleixandre, J.L.
- 350 EFECTOS DE LA COFERMENTACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICO SENSORIALES DE LOS VINOS OBTENIDOS CON LAS VARIEDADES SYRAH Y VIOGNIER. 109
J.L. Aleixandre-Tudó, L. Genoves, J.L. Aleixandre, I. Alvarez, M.J. García y V. Lizama
- 351 EVALUACIÓN QUÍMICO SENSORIAL DE VINOS DE FONDILLÓN ELABORADOS CON DIFERENTES TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN 123
I. Alvarez, J.L. Aleixandre, A. Martinez, M.J. García, V. Lizama, J.L. Aleixandre-Tudó
- 352 ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ELABORACIÓN DE BEBIDAS FERMENTADAS A PARTIR DE NARANJA Y MANDARINA .. 132
M.J. García, L. Cano, J.A. Anaya, I. Alvarez, V. Lizama, J.L. Aleixandre
- 356 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SECAGEM DE CORTES DE CARNE BOVINA SALGADOS 142
Bampi, M., Domschke, N.N., Schmidt, F. C., Laurindo, J.B.
- 357 TRATAMIENTO TÉRMICO DE CARNE DE MEXILHÃO EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS TERMOESTERILIZÁVEIS (*RETORT POUCHES*) 149
G. Tribuzi, F. C. Schmidt, J. B. Laurindo
- 358 DIAGRAMA OPERACIONAL DOS PROCESSOS DE SALGA E MARINAÇÃO DE CARNE PRÉ-COZIDA DE MEXILHÃO (*Perna perna*) 156
G. Tribuzi, F. C. Schmidt, J. B. Laurindo

- 359 RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS PELA *SPORODILOBOLUS pararoseus* POR DIFERENTES MÉTODOS ABRASIVOS.. 164
Lopes, Almeida Nathalie , Remedi, Rafael Diaz , Sá, Carolina dos Santos , Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros
- 360 USO DE LIOFILIZAÇÃO NA BIOMASSA MICROBIANA DA *SPORODILOBOLUS pararoseus* PARA A RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES 170
Lopes, Almeida Nathalie , Remedi, Rafael Diaz , Sá, Carolina Dos Santos , Burkert, Janaína Fernandes De Medeiros
- 361 UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS QUÍMICAS NA RUPTURA CELULAR DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR *Rhodotorula mucilaginosa*..... 175
Lopes, Almeida Nathalie , Remedi, Rafael Diaz , Sá, Carolina dos Santos , Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros
- 362 CIRCULACIÓN DE AIRE A TRAVÉS DE LECHOS FORMADOS POR GRANOS DE QUINUA (*CHENOPODIUM QUINOA WILLD*) 180
Melgarejo S, Valdivia R, Chire G, Salas W
- 363 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE SALMÓN AHUMADO OBTENIDO MEDIANTE EL USO DE BOLSAS PERMEABLES AL VAPOR DE AGUA..... 188
Mañes, V., Rizo, A., Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Barat, J.M.
- 365 EFECTO DE LAS VARIABLES DE SECADO EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE MICROCÁPSULAS DE LICOPENO 196
M.C. Soto-Caballero, Y. Mendoza-Martínez, P. Cortés-Sánchez, A. Valdez-Fragoso, J. Welti-Chanes & H. Mújica-Paz
- 367 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MONTMOTILLONITA SOBRE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS, DE BARRERA Y MECÁNICAS DE PELÍCULAS DE ALMIDÓN Y HARINA DE PLÁTANO (*Musa Paradisiaca L.*)..... 203
Martínez-Alarcón, B.A., Núñez-Santiago, M.C., González-Soto, R., Bello-Pérez, L.A.
- 369 SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SOLVENTES EN ETAPAS TEMPRANAS PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES EN CUTÍCULA DE CACAHUATE 208
Medina-González, S., Almeida-Trasviña, F., Ortega-Rivas, E., Salmerón-Ochoa, I., Pérez-Vega, S.
- 370 CAMBIOS QUÍMICOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PLÁTANO MACHO (*Musa AAB*) 216
E. Juárez-García, R. A. González-Soto, E. Agama-Acevedo, L. A. Bello-Pérez

- 371 CARATERIZAÇÃO DO MEL DA REGIÃO DO ALTO MINHO RELATIVAMENTE AO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E À CAPACIDADE ANTIOXIDANTE 223
Vale A. P., Pinheiro J.C.C., Pires J., Oliveira E.C., Candeias, G., Lopes J.C., Afonso I.M., Brito N.V.
- 372 PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE MASAS DE PAN SIN GLUTEN ENRIQUECIDAS CON PROTEINAS DE HUEVO Y LECHE..... 227
 Marina Villanueva, Raúl R. Mauro, Concha Collar, Felicidad Ronda
- 373 ENRIQUECIMIENTO DE PAN CON BETAGLUCANOS DE AVENA Y CEBADA DE DIFERENTE PESO MOLECULAR..... 234
 Camino M. Mancebo, Felicidad Ronda, Pedro A. Caballero.
- 374 MANDIOCA E INHAME: REDUÇÃO DE PERDAS PÓS-COLHEITA, SEGURANÇA ALIMENTAR DOS SEUS DERIVADOS E VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO – O PROJECTO *GRATITUDE* FP7... 241
Vincenza Ferraro, Clara Piccirillo, Keith Tomlins, Paula Teixeira, L. Sanni, A. Obadina, Kim Anh To, Kuakoon Piyachomkwan, Nanam Tay Dziedzoave, Charles Tortoe, Manuela E. Pintado
- 375 EXTRAÇÃO DE COLAGÉNIO, GELATINA E HIDROLISADOS DE COLAGÉNIO A PARTIR DE ESCAMAS DE SARDINHA E CAVALA REJEITADAS AO LONGO DO PROCESSO DE ENLATAMENTO 245
Vincenza Ferraro, Paula M.L. Castro e Manuela E. Pintado
- 376 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-IPERTENSIVA DE MISTURAS DE AMINO ACIDOS EXTRAIDAS DA ÁGUA DE SALGA DE BACALHAU (*GADUS MORHUA* L.) 250
Vincenza Ferraro, Sérgio C. Sousa, Paula M.L. Castro and Manuela E. Pintado
- 377 ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE O POLIFENOL ÁCIDO ROSMARINICO E AS PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO 255
Vincenza Ferraro, Ana Raquel Madureira, Ana Gomes e Manuela E. Pintado
- 379 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS..... 261
 Patrícia Érica Fernandes, Nélio José de Andrade, Maíra Paula da Silveira, Daiene Silva da Costa, Patrícia Campos Bernardes, João Paulo Natalino de Sá,.
- 380 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PELÍCULAS COMESTIBLES OBTENIDAS A PARTIR DE CÁSCARA DE MANGO 266
Argüelles-Piña J.A., Olvera-Maldonado G., Gómez-López E., Martin-Belloso, O., Welti-Chanes J., Valdez-Fragoso A., Mújica-Paz H.

- 381 PELÍCULAS BIODEGRADABLES OBTENIDAS A PARTIR DE PECTINA DE CÁSCARA DE MANGO 271
Argüelles-Piña J.A., Olvera-Maldonado G., Martin-Belloso, O., Welti-Chanes J., Valdez-Fragoso A., Mújica-Paz H.
- 382 ESTUDO DA CINÉTICA DE SECAGEM EM RESÍDUO DE AMORA-PRETA. 275
 Mazalli, A., Madrona, G. S., Branco, I. G.
- 387 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DEL BAGAZO DE UVAS TINTAS PORTUGUESAS EN UN MEDIO DE GRADO ALIMENTICIO 283
Hernan H. Tournour, Marcela A. Segundo, Luís M. Magalhães, Jorge Queiroz, Luís M. Cunha.
- 388 ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y TEMPERATURA MODERADA PARA LA CONSERVACIÓN DE TRITURADO DE NARANJA: EFECTO SOBRE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES 292
Zamantha Escobedo-Avellaneda, Aurora Valdez-Fragoso, Hugo Mujica-Paz, Viridiana Tejada-Ortigoza y Jorge Welti-Chanes
- 389 ADAPTAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM 300
 Tatiane Corrêa de Oliveira, Thiago Ferreira dos Santos e Edna Maria Morais Oliveira
- 390 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CHOURIÇA DE SANGUE TRADICIONAL DO “FUMEIRO DE MELGAÇO” 305
Afonso, I.M., Lopes J.C., Marinho, C., Oliveira E.C., Candeias, G., Brito N.V., Vale A.P.
- 391 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DA ESPECIALIDADE GASTRONÓMICA “ARROZ DE SARRABULHO DE PONTE DE LIMA” 310
G. Candeias, A.P. Vale, I.M. Afonso, E.C.Oliveira, J.C. Lopes, J. Pereira, N.V. Brito
- 392 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS HIDROCOLÓIDES NO MELHORAMENTO DAS PROPRIEDADES ORGANÓLETICAS E NUTRICIONAIS DO *RISSOL*.... 317
 Ana Patricia Sousa, M. Rui Alves, M. Vaz Velho, Rita Pinheiro
- 394 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BOLO DO TACHO DE PAREDES DE COURA 325
Lopes J.C., Vale A.P., Serra, E., Oliveira E.C., Candeias, G., Brito N.V., Afonso I.M.
- 397 ESTUDIO DE ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE PECTINA-ACEITE DE MAÍZ CON UN PIGMENTO NATURAL..... 328
 García-Ignacio, H.M., Michicotl-Meneses, M.M., Garrido-Torres, Y., Sánchez-Minutti L, Calderón-Hernández, T., Tlecuitl-Beristain S y García-Barrientos, R

- 400 INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM SOBRE BIOCÓMPOSTOS DAS MACROALGAS 336
Campos, J. A., Branco, I. G., Branco, C. C. Z.
- 401 SECAGEM DE RESÍDUOS DE UVA 344
Rocha, L. C., Haminiuk, C. I., Moraes, I. C. F., Branco, I. G.
- 402 ISOTERMAS DE SORÇÃO E MODELAGEM MATEMÁTICA DE PÓ DE POLPA DE UVAIA OBTIDA POR FOAM MAT DRYING..... 351
Ivanise Guilherme Branco, Thatyana Tammy Kikuchi, Eliana Janet Sanjinez Argandoña
- 404 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE SEMILLAS DE QUINOA (*Chenopodium quinoa* Willd.) CULTIVADAS EN TRES ZONAS GEOGRÁFICAS DE CHILE..... 359
Miranda, M., Vega-Gálvez, A., López, J., Navarro, R., Martínez, E.A.
- 406 EFECTO DE LA COCCIÓN EN LA ACTIVIDAD QUELANTE DE MOLÉCULAS DE NATURALEZA PROTEICA DE CARNE DE CERDO Y PESCADO 366
García-Ignacio, H.M., Soledad-Cote, M., Santiago-Martínez, F., Ruíz-Flores, A., González-De Jesús L., García-Davila, J., Grandes-Blanco, I. A. Castro-Corona A. y García-Barrientos, R.
- 408 ENVASADO DE CEREZAS EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS CON BIOPOLÍMEROS COMO MATERIAL DE ENVASE 373
M. J. Pons , L. F. Vega , L. Olivares y S. Guri
- 409 EFECTO SINÉRGICO DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA Y EL ENVASADO CON DIÓXIDO DE CARBONO PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERADORES Y PATÓGENOS EN SALCHICHAS DE AVE..... 381
A. Al-Nehlawi, S. Guri, J. Saldo
- 411 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA BRASILEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) FRENTE À *LISTERIA MONOCYTOGENES* EXPERIMENTALMENTE INOCULADA EM HAMBÚRGUER..... 390
Dannenber, G. S., Iglesias, M. A., Fagundes, G. A., Sawitzki, M. C., Fiorentini, Â. M.
- 414 VIABILIDAD DE UNA NOVEDOSA MEZCLA DE GASES PARA LA CONSERVACIÓN DE ATUN FRESCO..... 398
Pardilla S., Vega L.F., Mor-Mur M., Guri S.
- 415 LOMBARDA (*Brassica oleracea*) COMO FUENTE DE PEROXIDASA TERMOESTABLE..... 406
Pellicer, J.A., Fortea, M.I., Serrano-Martínez, A., Lucas-Abellán, C., Núñez-Delicado, E.

- 416 EFECTO DE LA ADICIÓN DE GLICEROL Y SORBITOL EN LA CAPACIDAD DE SORCIÓN, EN LAS PROPIEDADES TERMOFÍSICAS DE PELÍCULAS A BASE DE GELATINA DE BOVINO Y SALMÓN EN ESTADO VÍTREO..... 413
 Vásquez, C., Díaz-Calderón, P., Matiacevich, S., Enrione, J.
- 417 COMPLEJACIÓN DE SULFATIAZOL EN B-CDS. CAMBIOS EN EL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA. 421
 Carmen Lucas-Abellán, María Teresa Mercader-Ros, José Antonio Pellicer, Ana Serrano-Martínez, José Antonio Gabaldón, Estrella Núñez-Delicado
- 423 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS DE PRODUCTOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR Y SUS EXTRACTOS. 426
Seguí, L., Barrera, C., Betoret, N. y Fito, P.
- 424 PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE PIÑA: UNA PROPUESTA DE MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA 435
Conesa, C., Bernat-Senent, I., Seguí, L., Fito, P.
- 426 EFECTO PREBIÓTICO *IN VITRO* DE CONCENTRADOS DE FIBRA DE PULPA DE CLADODIO DE TUNA (*Opuntia ficus-indica* L.) Y TESTA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)..... 445
Paulina Torres y Christian Encina
- 432 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO E LACTOSE POR ADSORÇÃO EM HIDROXIAPATITA SEGUIDO DE FILTRAÇÃO À VÁCUO..... 459
Monteiro, A. A., Falkoski, D. L. , Costa, A. R. , Garcia, N. H. , Brandão, S. C. C. , Carvalho, A. F. , Rezende, S. T. , Coimbra, J. S. R. C.
- 433 DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MEDIDA RÁPIDO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO EN GRASA DE LECHE 466
 Antonio Fuertes, Ana Fuentes, Nicolás Laguarda-Miro, Isabel Fernández-Segovia, Miguel Alcañiz, Rafael Masot, José Manuel Barat.
- 434 INFLUENCIA DEL CUCHILLO Y TIPO DE LAVADO EN LA TRANSFERENCIA DE LA CONTAMINACIÓN POR *Escherichia coli* Y *Listeria innocua*..... 474
 E. Doménech, S. Botella, MA. Ferrús, I. Escriche
- 435 ANÁLISIS DE ANTRANILATO DE METILO EN MIELES ESPAÑOLAS DE NARANJO 480
 M. Juan-Borrás, E. Doménech, A. Periche, I. Escriche
- 436 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* AISLADAS EN EMBUTIDO SECO Y CURADO 487
 E. Doménech, A. Jiménez, MA. Ferrús, JA. Amoros, I. Escriche

- 437 INFLUENCIA DE LA VARIEDAD DE MIEL, DEL APICULTOR Y DEL AÑO DE RECOLECCIÓN EN EL CONTENIDO DE HUMEDAD DE MIELES ESPAÑOLAS..... 493
M. Juan-Borrás, E. Domenech, A. Conchado , I. Escriche
- 439 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE UM PRODUTO CÁRNEO TRADICIONAL PORTUGUÊS 500
Samuel Jácome, Susana Fonseca, Rita Pinheiro, Manuel Rui Alves, Svetoslav Todorov, Lúcia Noronha, Joana Silva, Gonçalo Almeida, Manuela Pintado, Ana Gomes, Alcina M.M.B. Morais, Paula Teixeira & Manuela Vaz-Velho
- 440 AVALIAÇÃO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO E DE POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS *ESPÉCIES ASTROCARYUM VULGARE* MART. (TUCUMÃ) E *ENDOPLEURA UCHI* HUBER (UXI) NATIVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA: PROTEÍNA E FENOL..... 508
Bittencourt, A., Baeta, D. S., Barbosa, V. F., Leite, K. M. S. C., Toro, M. J. U., Oliveira, O. M. M. F.
- 441 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE SUCUUBA (*HIMANTHUS sucuuba*) FRENTE AO RADICAL DPPH 516
Barbosa, V. F., Baeta, D. S., Rocha, C. Q., Santos, L. C., Brunetti, I. L., Souza, D. R. S., Oliveira, O. M. M. F. .
- 442 PURIFICAÇÃO DE PECTINAMETILESTERASE DE GOIABA, CULTIVAR PALUMA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) E ESTUDOS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PARÂMETROS CINÉTICOS, TERMOESTABILIDADE E INIBIDORES 523
Baeta, D. S., Leite, K. M. S. C., Tadiotti, A. C., Oliveira, O. M. M. F.´
- 444 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN POLEN APÍCOLA COMO SUSTRATO PARA FERMENTACIÓN 533
Claudia Salazar-González, Carlos Zuluaga, Consuelo Díaz-Moreno, Carolina Gutiérrez-Cortés
- 448 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE *TAGETES FILIFOLIA* LAG. “ANÍS DE LA SIERRA” COMO FUENTE DE ACEITE ESENCIAL PARA USO AGROINDUSTRIAL..... 541
Barrena Gurbillón, Miguel Angel, Gamarra Torres, Oscar Andrés, Maicelo Quintana, Jorge Luis.
- 449 CINÉTICA DE SECADO DE LÚCUMA (*Pouteria Lucuma*)..... 549
Barrena Gurbillón, Miguel Angel., Gamarra Torres, Oscar Andrés.
- 450 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALISO (*Alnus Acuminata*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA..... 557
Edwin Baldeon', Guadalupe Hernandez, Samuel Verdú, Miguel Alcañiz, Rafa Masot, José M. Barat, Raúl Grau

451	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE HARINA DE SALVIA EN LA PANIFICACIÓN.....	566
	<u>Samuel Verdú</u> , Esteban Fuentes, Eugenio Ivorra, Joel Girón, Antonio Sanchez, José M. Barat, Raúl Grau	
452	ACEITABILIDADE SENSORIAL EM SALAME COM BAIXO TEOR DE SÓDIO UTILIZANDO KCl e CaCl ₂	576
	<u>Almeida, M. A.</u> , Kamimura, T., Gonçalves, A.C.R., Pinto, J.S.S., Monte-Villanueva, N.D., Contreras-Castillo, C.J. ,	
454	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS CHILENAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	584
	<u>Gustavo E. Zúñiga.</u> , Andrea Tapia., Ruth Paz y Marisol Pizarro.	
457	BIOCONVERSIÓN DE XILOSA Y GLUCOSA-XILOSA POR <i>DEBAYOMYCES HANSENI</i>	591
	<u>Lucas Tadeu Silva de Souza</u> , Janaína Teles de Faria, Attilio Converti e Fábio Coelho Sampaio	
462	CONOCIMIENTO LOCAL DE RECURSOS LEÑOSOS Y SU POTENCIAL MULTIPROPÓSITO EN FINCAS CAMPESINAS DE LA ZONA RURAL DE IBAGUÉ (TOLIMA)	600
	Cristina Rocha Rodríguez, <u>Jenny Catalina Romero Vargas & Jairo Mora Delgado</u>	
463	SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS	606
	M ^a Dolores Franco González, <u>Rosana Martínez García.</u>	

Actas Comunicaciones

INFLUENCIA DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA EN LA TEXTURA DE UN QUESO FRESCO DESLACTOSADO

Antezana Vásquez Cintya^a, Ludeña Urquiza Fanny^a, Linares García Laura^a

^aFacultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina
Av. La Molina s/n La Molina, Lima, Perú.

1. INTRODUCCIÓN

La lactosa es el principal azúcar de la leche y su digestión en el cuerpo humano depende de la presencia de una enzima intestinal llamada lactasa o β -galactosidasa, enzima ubicada en las células epiteliales del intestino delgado. La actividad de la lactasa permanece en niveles altos durante la niñez (salvo ausencia por causas genéticas) y luego declina a valores muy bajos en la adultez. La caída de la actividad de la lactasa, que lleva a una mala digestión de la lactosa, es un patrón fisiológico normal. Si la actividad de la lactasa es muy baja en relación a la cantidad de lactosa ingerida, ésta no puede ser totalmente hidrolizada y una cantidad considerable de la misma llega al colon, en donde una mínima parte es hidrolizada a monosacáridos por la lactasa bacteriana, pero la cantidad restante sufre fermentación con la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y formación de gases. El efecto osmótico de éstos productos metabólicos es causa de un aumento del flujo intraluminal y por consiguiente de una diarrea acuosa ácida, cuya intensidad dependerá de la carga de lactosa y del grado de deficiencia de la lactasa (Ravich y Bayless, 1983; Misselwitz *et al.*, 2013), y se producen otros malestares como distensión abdominal, dolor, náuseas y flatulencias; síndrome conocido como *intolerancia a la lactosa* (Holsinger y Hingerman, 1991).

La intolerancia a la lactosa es una patología común en muchas partes del mundo; se estima que alrededor del 70% de la población mundial se ve afectada por este problema (De Vrese *et al.*, 2001). En América del Sur, África y Asia la prevalencia es del 50%, pudiendo alcanzar un 100% en países como Japón y China (Vesa *et al.*, 2000). En Estados Unidos existen unos 50 millones de personas con este problema, variando la prevalencia desde un 15% en la población blanca hasta un 80% en la población negra. Solamente hay una escasa incidencia de personas intolerantes en Europa del Norte y Central, Islas Británicas, Australia y Nueva Zelanda (Messia *et al.*, 2007). El interés que recibe esta problemática, desde el punto de vista nutricional, es que priva a cierta parte de la población en el mundo a la ingesta de varios productos lácteos que son una excelente fuente de calcio y proteínas de alta calidad, como así también de otros minerales y vitaminas.

El mercado de productos lácteos reducidos en su contenido de lactosa surge en los EE.UU. en los años 80 para abastecer a aquellos individuos que presentaban intolerancia a la lactosa ya sea por su incapacidad de producir la enzima lactasa o tenerla disminuida en su concentración (Murphy *et al.*, 2002). En el caso del queso, la gran mayoría de lactosa es retirada con el suero ya que es soluble en él, no obstante, la persistencia de malestares gastrointestinales al consumir este producto indicaría que no siempre el desuerado es suficiente para atenuar los síntomas, ya que aún queda lactosa retenida en la cuajada por su alto contenido de humedad. Varias experiencias realizadas en Estados Unidos de América y en Europa en diversos tipos de queso, han demostrado que la hidrólisis previa de la lactosa contenida en la leche destinada a la fabricación de queso, aumenta la acidificación y se mejora la calidad organoléptica (textura y sabor) de los productos terminados (Alais, 1985).

Los quesos elaborados en el Perú, América Latina, el Caribe y México se conocen como de estilo hispánico, y la mayoría se basan en quesos europeos, pero modificados de acuerdo a las preferencias locales y a sus condiciones de fabricación (Van Hekken y Farkye, 2003). La poca información que existe sobre los mismos hace difícil definirlos y caracterizarlos. Uno de los principales quesos producidos en el Perú, es el queso fresco (típicamente consumido inmediatamente después de su elaboración). La textura es una de las características de calidad de mayor importancia para los consumidores de queso, la cual permite caracterizar tipos y edad de los quesos, además de evaluar su uniformidad, cambios por efecto del procesamiento, y tiempo de vida útil.

La textura de un queso es un atributo sensorial que resulta de la combinación de propiedades físicas que son percibidas por los sentidos de la vista, el tacto y hasta el oído (Pinho *et al.* 2004). A pesar de que esta experiencia sensorial no puede ser completamente duplicada por ningún procedimiento instrumental, estos últimos son considerablemente menos costosos y consumen menos tiempo que las pruebas sensoriales, siendo fidedignamente correlacionables con atributos sensoriales críticos que permiten estimar la aceptabilidad por parte del consumidor (Steffe, 1996). Un procedimiento realizado comúnmente en el queso es el Análisis de Perfil de Textura (TPA), una prueba que imita más o menos la acción de morder dos veces un trozo de comida (Tunick, 2000). El objetivo del presente estudio es optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de la lactosa, obteniendo una leche deslactosada que pueda ser utilizada en la elaboración de diversos productos lácteos, posteriormente elaborar un queso fresco con leche deslactosada y ver el efecto en su textura, como parámetro de calidad. El conocimiento generado facilitará la caracterización de quesos frescos elaborados en el Perú.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Optimización del Proceso de Hidrólisis Enzimática de la Lactosa

La hidrólisis enzimática de la lactosa se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación e Instrumentación de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Figura 1). Se utilizó leche pasteurizada y la enzima HA-LACTASA 2100 para la hidrólisis. Se incubó la leche con la enzima en baño maría con agitación a 45°C, monitoreando el punto de congelación con un Crioscopio. Para el cálculo del porcentaje de hidrólisis, se aplicó la fórmula proporcionada por la Ficha Técnica de la enzima DSM, la cual también la reporta (Lazo y Verdugo, 2011).

$$H\% = \frac{Y - 537}{2.74}$$

En donde Y es igual a los grados Horvet multiplicados por 1000 y H es el grado, expresado en porcentaje, de hidrólisis enzimática de la lactosa.

Para la optimización del proceso se utilizó el Método Superficie Respuesta (MSR) y el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XV.II, considerándose influyentes las siguientes variables: dosis y tiempo de acción de la enzima (Tabla 1). Se aplicó un diseño factorial completo a 3 niveles para 2 variables, con tres repeticiones.

2.2. Elaboración y Análisis de Textura del queso fresco deslactosado

La elaboración del queso fresco con leche hidrolizada se realizó en la Planta Piloto de Leche de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se utilizó leche fresca de vaca, que fue pasteurizada a 75°C por 15 segundos. Posteriormente la leche fue inoculada con un cultivo láctico liofilizado CHN-22 (CHr-Hansen), el cual contiene *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y *Lactococcus lactis subsp. lactis*, madurando la leche por 30 minutos a 37°C. Seguidamente se adicionó CaCl₂ al 20% y se enfrió a 34°C para coagular la leche con 1.5% de cuajo CHY-MAX por 45 min. Luego se cortó la cuajada, y se drenó el suero. Finalmente se añadió 1.5% de sal, para luego moldear y prensar los quesos. El almacenamiento se mantuvo a 4°C por 24 horas. Asimismo, se elaboró un tratamiento de queso fresco típico (sin hidrólisis), para compararlo.

El Análisis de Perfil de Textura (TPA) se realizó con un texturómetro QTS Texture Analyses, en muestras cilíndricas de 10 mm de diámetro y 10 mm de altura a 25°C de temperatura; comprimiéndolas al 50% de su altura en 2 ciclos, usando un accesorio cilíndrico de 40 mm de diámetro y a una velocidad del cabezal constante de 60 mm/min (Lu *et. al.*, 2010). (Figura 2)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Hidrólisis enzimática de la lactosa

En la Tabla 2 se presentan los resultados del porcentaje de hidrólisis (%GH) del modelo experimental. Como se puede observar, el grado de hidrólisis de la lactosa aumenta a mayor concentración y tiempo de acción de la enzima. El grado de hidrólisis se determinó mediante el punto de congelación con un crioscopio, siendo los métodos más utilizados HPLC o enzimáticos/UV, los cuales requieren procedimientos complejos, tiempos largos y equipos sofisticados, además de personal entrenado. La aplicación de la crioscopia se utiliza no sólo para determinar el porcentaje de hidrólisis, sino también para conseguir, variando temperaturas de trabajo y concentraciones enzimáticas diferentes condiciones operativas en planta.

La leche presenta un punto de congelación de -0.557°C menor que el del agua destilada (Alais, 1985), debido fundamentalmente a su contenido en minerales y lactosa. Durante la hidrólisis por el agregado de lactasa, la molécula de lactosa se hidroliza en glucosa y galactosa, aumentando los solutos de la solución, ocasionando el correspondiente descenso del punto de congelación de la solución (Murphy *et al.*, 2002)

La hidrólisis de la lactosa, se realizó considerando dos variables (dosis de enzima y tiempo de acción de la enzima), manteniendo la temperatura constante a 45°C , temperatura óptima de la actividad enzimática. Se utilizó un MSR para optimizar las variables en estudio, obteniéndose la ecuación polinomial (Ecuación 1) y la gráfica de Superficie de respuesta (Figura 3). Este modelo presenta un coeficiente de determinación $R^2 = 0.99$

Ecuación 1:

$$\%GH = 39.650 + 34.139 * X_1 + 0.2105 * X_2 - 4.99357 * X_1^2 - 0.0281806 * X_1 * X_2 - 0.000394974 * X_2^2$$

Donde: X_1 = dosis X_2 = tiempo

Al analizar los resultados del porcentaje de hidrólisis obtenidos (Tabla 2), se observa que con una dosis de 2.5 mL/L y a un tiempo mayor de 60 minutos, sobrepasa el 100% de hidrólisis de la lactosa, lo cual es ilógico. Esto se puede explicar debido a que la flora microbiana resistente a la pasteurización puede acidificar la leche, lo que aumenta el descenso crioscópico al formarse 4 moles de ácido láctico a partir de 1 mol de lactosa (Alais, 1985). Por lo tanto para la optimización se fija un máximo del grado de hidrólisis en 100%, obteniendo los valores óptimos de los factores que influyen en la hidrólisis (Tabla 3).

3.2. Elaboración y Análisis de Textura del queso fresco deslactosado

Utilizando los valores encontrados en la optimización de la hidrólisis enzimática de la lactosa, se obtuvo leche deslactosada, con la cual se elaboró queso fresco, según la

metodología descrita anteriormente. Esta técnica de elaboración es la misma con la que se elabora queso fresco en la Planta Piloto de leche de la Universidad Agraria La Molina, con la diferencia que para esta investigación se ha agregado cultivo a fin de repotenciar el sabor del queso. En la Tabla 4 se muestra el análisis proximal del queso fresco “La Molina”

Alais (1985), menciona que la hidrólisis previa a la elaboración del queso, estimula el desarrollo de la flora láctica, debido a que la glucosa liberada es un azúcar rápidamente asimilable. Asimismo, menciona que se hicieron estudios en queso Cheddar en el cual se utilizaba leche parcialmente hidrolizada, observándose una notable aceleración en la maduración del queso.

Las características de textura del queso fresco normal y del queso fresco deslactosado, se obtuvieron mediante un TPA, determinando dureza, gomosidad, cohesividad, adhesividad, elasticidad y masticabilidad (Tabla 5). Los resultados obtenidos en ambos quesos (fresco normal y fresco deslactosado) son muy parecidos, por lo que se podría decir que la hidrólisis no afectaría la textura del queso fresco deslactosado (Figura 4).

El queso deslactosado obtenido presentó una dureza de 6.36 N, similar al queso panela con 7.7 N (Lobato *et al.*, 2009), y al modelo miniatura del queso fresco con 7.59 N (Gutiérrez *et al.*, 2013). La dureza del queso está relacionada con la composición química, siendo la humedad un factor determinante en la textura final, donde bajos contenidos se asocian con quesos duros y poco elásticos (Adda *et al.*, 1982).

Por otro lado Lobato *et al.* (2009) reporta una cohesividad de 0.80 y una elasticidad de 2.8 mm para el queso panela y Chacón *et al.* (2009) menciona una cohesividad de 0.52 y una elasticidad de 0.72 mm en el queso de cabra del tipo Crottin de Chavignol. El contenido de grasa está asociada a la dureza y elasticidad del queso (Chacón *et al.*, 2009). Cuando la grasa está presente en alto contenido porcentaje, brinda mayor elasticidad y menor firmeza, obteniéndose quesos más duros y rígidos al bajar este porcentaje (Küçüköner y Haque, 2006).

En la determinación instrumental de la textura, el método utilizado (tipo y tamaño de la sonda, velocidad de la prueba, tipo de prueba, tamaño y forma de la muestra) tienen gran influencia en los resultados obtenidos, los que solo son comparables cuando han sido realizados exactamente en las mismas condiciones de medición. Al respecto, Bourne (2002) recomienda estandarizar todas las condiciones de la prueba con el fin de obtener la mejor resolución entre las diferentes muestras evaluadas. Debido a que la cohesividad es adimensional y la elasticidad puede transformarse en un valor relativo, son los únicos dos parámetros de textura medidos cuyos valores son comparables a los obtenidos de otros estudios con condiciones experimentales diferentes.

La elasticidad del queso obtenido se puede explicar porque es un queso fresco, que tienen una menor cantidad de cadenas proteicas de bajo peso molecular, las cuales se producen con el tiempo debido a diversos factores como la acción de los microorganismos (Serafin, 1999).

4. CONCLUSIONES

Con la aplicación del MSR se logró optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de la lactosa al 100%, al trabajar con una dosis de 1.9 ml/L y 125.5 minutos de tiempo de acción de la enzima, a una temperatura de 45 °C. La textura del queso fresco deslactosado no fue afectada por la hidrólisis enzimática de la lactosa; esto permitiría obtener queso fresco para poblaciones intolerantes; además facilita su aplicación en otros derivados lácteos. Asimismo, esta investigación podría servir de base para la caracterización de la textura como medida de calidad, y tiempo de vida útil en quesos hispánicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adda, j.; gripon, jc.; vassal, l. 1982. The Chemistry of flavor and texture generation in cheese. *Food Chemistry* 9 (1):115-119.
- Alais, Ch. 1985. *Ciencia de la Leche*. Editorial Reverté, S.A.
- Bourne, M. 2002. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press. New York.
- Buriti, F.; Okasaki, T. 2007. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57 (2): 179-185.
- Chacon, A.; Pineda, M. 2009. Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo “Crottin de Chavignol”. *Agronomía Mesoamericana* 20 (2): 297-309.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. 2001. Probiotics-compensation for Lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:421-9.
- Guerrero, C. 2012. Evaluación instrumental de la textura del queso elaborado con suero concentrado por ultrafiltración. Tesis para obtener el título como Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú
- Gutierrez, N.; Trancoso, N. 2013. Texture profile analysis of Fresh cheese and Chihuahua cheese using miniature cheese models. *Tecnociencia Chihuahua* 7(2): 65-74.
- Holsinger, V., And Kingerman, A. 1991. Applications of lactase in Dairy Foods and other Foods Containing lactose. *Food Technology*. 45 (1): p.92, 94-95
- Kücüköner, E.; Haque, Z. 2006. Physicochemical properties of low-fat and full-fat Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 59(3):166-170.

- Lazo, J. Y Verdugo, P. 2011. Estudio para optimizar la calidad tecnológica y sensorial del helado tipo mantecado con hidrólisis enzimática mediante diseño experimental. Tesis de graduación previa a la obtención de título de Ingeniero en Alimentos. Universidad del Azuay. Ecuador
- Lobato, C.; Lozano, I. 2009. Textura y Microestructura de quesos tipo Panela bajos en grasa y en colesterol: diferentes metodologías. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas* 1(1): 39-48.
- Messia M, Candigliota T, Marconi, E. 2007. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolysed milk. *Food Chemistry* 104 (3): 910-917.
- Misselwitz, B. ; Pohl, D.; Frühauf, H.; Fried, M.; Vavricka, S.; Fox, M. 2013. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology Journal*. 0 (0): 1-9
- Murphy, M.; Muset, G.; Rodriguez, G. 2002. Aplicación de la crioscopia a la medición de la hidrólisis enzimática de la lactosa. Centro de Investigación y Desarrollo de la Industria Láctea (CITIL). 4 Jornadas de Desarrollo e Innovación. 0(0):1-2.
- Pinho, O.; Mendes, E.; Alves, Mm. ; Ferreira, Implvo. 2004. Chemical, physical, and sensorial characteristics of “Terrincho” ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science* 87(2):249-257.
- Ravich, W.; Bayless, T.1983. Carbohydrate absorption and malabsorption. *Clinics in gastroenterology*. 12 (2):335-56
- Serafin, A. 1999. Use of a vibration technique to monitor the textural properties of cheese. Tesis M.Sc. Faculty of Graduate Studies, University of Guelph. Ontario. 98p
- Steffe, Jf. 1996. *Rheological methods in food process engineering*. 2 ed. Freeman Press, East Lansing, Michigan. 418 p.
- Tunick, M. 2000. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal Dairy Science*. 83:1892-1898.
- Van Hekken, D. Y Farkye, N. 2003. Hispanic cheese: the quest for queso. *Food Technology* 57: 32–38.
- Vesa T, Marteau P, Korpela, R.1998.Role of irritable bowel syndrome in subjective lactose intolerance. *The American journal of Clinical nutrition* 67: 710-715

Tabla 1. Variables independientes, códigos y valores utilizados en la optimización

Variable independiente	Unidades	Símbolo	Código de Niveles		
			-1	0	+1
Dosis de enzima	ml/L	X1	0.5	1.5	2.5
Tiempo	min	X2	60	120	180

Tabla 2. Porcentaje del Grado de Hidrólisis (%GH) de la lactosa *

DOSIS (ml/L)	TIEMPO (60 min)			TIEMPO (120 min)			TIEMPO (180 min)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0.5	66.02	65.04	63.54	75.47	74.42	74.12	77.77	77.63	77.66
1.5	89.82	88.87	89.16	93.76	94.34	93.72	97.66	96.57	95.62
2.5	101.97	100.95	100.04	103.29	103.61	104.67	107.15	106.86	107.12

*Datos obtenidos en la hidrólisis enzimática, calculados a partir del Punto de Congelación

Tabla 3: Valores Óptimos de los factores para obtener 100% de hidrólisis de la lactosa

FACTOR	BAJO	ALTO	OPTIMO
DOSIS (ml/L)	0.5	2.5	1.9028
TIEMPO (min)	60.0	180.0	125.495

Tabla 4. Análisis proximal del queso fresco "La Molina"

PARAMETRO	VALOR (%)
Grasa	24.08
Proteínas	18.82
Humedad	53.2
Cenizas	3.1
Acidez	0.65
pH	6.6

Fuente: Guerrero (2012)

Tabla 5. Características de perfil de textura del queso fresco normal y deslactosado

Parámetro evaluado	Queso Fresco Deslactosado	Queso Fresco Normal
	Valor promedio ± DS	Valor Promedio ± DS
Dureza (N)	6.36 ± 0.24	5.23 ± 0.26
Gomosidad (g)	481.79 ± 18.89	393.70 ± 27.98
Cohesividad	0.74 ± 0.01	0.74 ± 0.02
Adhesividad (gs)	0.82 ± 1.01	0.64 ± 1.03
Elasticidad (mm)	3.94 ± 0.07	3.83 ± 0.04
Masticabilidad (Nm)	0.02 ± 0.001	0.01 ± 0.001



Figura 1. Hidrólisis enzimática de la lactosa

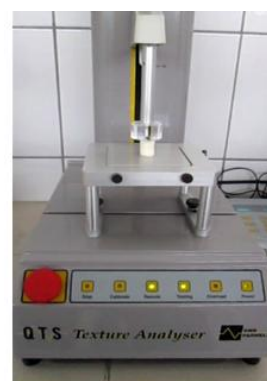


Figura 2. Análisis de Textura del queso fresco

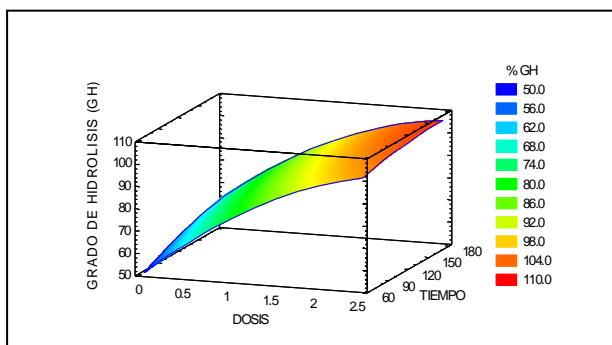


Figura 3: Superficie de respuesta de la hidrólisis enzimática de la lactosa

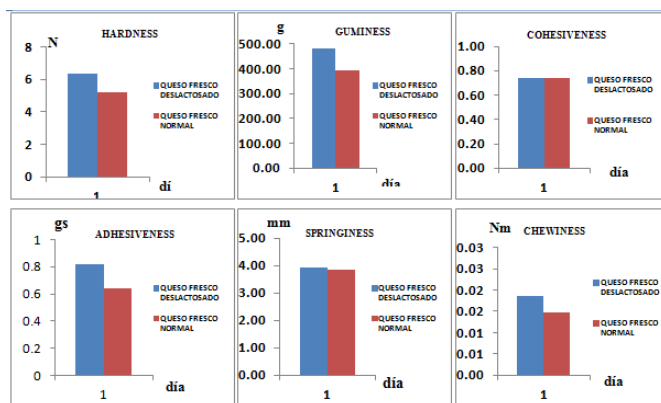


Figura 4. Comparación de las propiedades de textura del queso fresco normal y deslactosado.

OPTIMIZACIÓN Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE SECADO CON VACÍO COMO PRETRATAMIENTO AL BAGAZO DE MANZANA

Almeida-Trasviña, F.; Medina-González, S.; Ortega-Rivas, E.; Salmerón-Ochoa, I.; Pérez-Vega, S.*

School of Chemical Science, Autonomous University of Chihuahua, Circuit 1,
New University Campus, CP 31125 Chihuahua, Mexico.

*sama_1218@hotmail.com

1. RESUMEN

Se investigó el secado con vacío del bagazo de manzana para futuras extracciones de antioxidantes y se determinó el consumo energético empleando el simulador Aspen Plus. Se estableció un diseño experimental para evaluar las condiciones de secado (temperatura, tiempo y vacío) mediante RSM. Se analizó el efecto del secado sobre el contenido fenólico (PFT) y capacidad antioxidante (ORAC y DPPH) del bagazo de manzana procesado. Los resultados de PFT variaron de 1.89 a 2.67 mg GAE/g seco. Los valores para ORAC oscilaron entre 65.28 y 136.63 $\mu\text{mol TE/g}$ seco, mientras que para DPPH estuvieron entre 0.45 – 2.15. Los resultados concordaron con lo reportado.

La temperatura resultó ser el factor más significativo ($p < 0.05$) en la remoción de humedad. En PFT y ORAC los factores más significativos fueron la temperatura, el tiempo y las interacciones tiempo-vacío y temperatura-tiempo. Estos factores no fueron significativos en el DPPH. Las condiciones óptimas resultaron en 56.97 °C, 15.16 in Hg de vacío y 4.83 horas para sólidos con 10% de humedad. La simulación del proceso arrojó un consumo de energía de 998.58 kW a un flujo de 1,000 kg/h para las condiciones óptimas.

Análisis de sensibilidad mostraron que el proceso fue menos costoso con temperaturas del bagazo cercanas a la del secador, que elevando la temperatura al secador para acelerar el secado. Además, aumentar la temperatura del secador compromete las características antioxidantes del bagazo. Cada aumento de 5% en la humedad del bagazo implicó una variación de 70 kW en la operación del proceso. El nivel de vacío en el secador no impactó sustancialmente en el consumo energético.

Palabras clave: secado con vacío, optimización, simulación, bagazo de manzana.

2. INTRODUCCIÓN

Recientemente, las propiedades antioxidantes de diversas fuentes están siendo explotadas para aprovecharlas en el uso de cosméticos, farmacéuticos y alimentos en general

(Peschel *et al.*, 2006). El bagazo de manzana se apunta como una fuente de antioxidantes que genera altas expectativas pues tiene la ventaja de la disponibilidad en casi cualquier parte del mundo (Mahawar *et al.*, 2012). Sin embargo, los problemas relacionados con el manejo del bagazo de manzana están bien reportados en la literatura (Guyot *et al.*, 2003, Virost *et al.*, 2010, Pingret *et al.*, 2012). Esto se debe a su alto contenido de humedad, y tanto el manejo del material como su almacenamiento resultan complicados y a veces imprácticos.

Por lo anterior, las operaciones de secado son de suma importancia para un manejo más sencillo de la materia prima, evitar problemas de rancidez, reducir su volumen y ahorrar espacio en su almacenamiento (Peschel *et al.*, 2006). No obstante, altas temperaturas y tiempos prolongados del secado convectivo promueven la oxidación de estos compuestos de interés (Bazyma *et al.*, 2006). Por esto, una operación de secado con vacío se muestra como una opción a considerar.

El objetivo de este trabajo se centró en la evaluación, mediante experimentación y simulación de procesos, de la factibilidad de la implementación de un proceso de secado con vacío como pretratamiento al bagazo de manzana para futuras extracciones de compuestos de valor agregado.

3. METODOLOGÍA

Se evaluaron los parámetros de tiempo, temperatura y vacío en el secador. Se recurrió a un Diseño Central Compuesto (CCD), puesto en la Tabla 1, y se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para la optimización de las condiciones de operación.

Se eligió como respuesta el contenido final de humedad, el contenido total de polifenoles (PFT) y la capacidad antioxidante (ORAC y DPPH) del bagazo ya procesado. La optimización se realizó con el software estadístico Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA).

3.1 Determinación de Contenido de Humedad

El contenido final de humedad del bagazo se determinó de acuerdo a la ecuación (1):

$$\% \text{ Humedad Sólidos} = \left[\frac{(w_i \cdot X_{H_2O}) - (\Delta w)}{w_f} \right] \times 100 \quad (1)$$

donde X_{H_2O} es el contenido inicial de humedad y w_i y w_f son los pesos inicial y final de la muestra. Δw se interpreta como el agua removida del material.

3.2 PFT

La determinación de polifenoles totales en las muestras se llevó a cabo de acuerdo a la técnica Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). La cantidad de estos compuestos se determina por espectrofotometría a una longitud de onda de 765 ± 20 nm. Los resultados se expresan como equivalentes del estándar ácido gálico por unidad de masa seca (mg GAE/g ms).

3.3 Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante mediante la técnica ORAC se determinó según Huang *et al.* (2002). Los resultados son expresados como micromoles equivalentes del estándar Trolox por unidad de masa seca ($\mu\text{mol TE/g ms}$). En cambio, el ensayo DPPH se realizó de acuerdo a Mishra *et al.* (2012) y los resultados se expresan como una relación ‘mol antiox/mol DPPH’ (EC_{50}).

3.4 Simulación de Procesos

Se empleó el software Aspen Plus V7.3 (Aspen Technology, Massachusetts, USA) para llevar a cabo la simulación. El modelado del bagazo se realizó de acuerdo a su composición (Tabla 2).

Se alimentaron al simulador las condiciones óptimas de operación del proceso de secado del bagazo de manzana y se determinaron los gastos energéticos de operación. Se hicieron análisis de sensibilidad para observar el rendimiento de la planta al modificar las variables en el proceso.

4. RESULTADOS

4.1 Contenido de Humedad

La temperatura fue el único factor que presentó significancia con respecto al comportamiento de los experimentos de secado ($p < 0.05$). El modelo presentó un buen ajuste ($R^2 = 88.57$) y puede ser utilizado para predicciones de secado. Incrementar la temperatura mejoró la remoción de agua del bagazo (Figura 1). El tiempo y vacío no afectaron las curvas causadas por la temperatura.

4.2 PFT

El rango de los valores se mantuvo entre 1.89 y 2.67 mg GAE/g ms. Estos resultados son semejantes a los encontrados por Ćetković *et al.* (2008) quienes reportan contenidos fenólicos entre 2.03 – 4.16 mg GAE/g ms para bagazo de 6 cultivos diferentes. La temperatura y las interacciones tiempo–vacío y temperatura–tiempo afectaron

significativamente el contenido de fenólicos en el bagazo. El vacío y tiempo de secado también jugaron un papel importante.

El aumento en la temperatura incrementó el contenido fenólico hasta alcanzar un máximo y luego decayó ligeramente (Figura 2). Un fenómeno similar se ha reportado en la extracción fenólica en cutícula de cacahuete (Ballard *et al.*, 2009) y está relacionado con la degradación de estos.

4.3 ORAC

Los valores oscilaron entre 65.28 y 136.63 $\mu\text{mol TE/g ms}$. Los resultados resultaron ser afectados significativamente por la temperatura, las interacciones de los tres parámetros además del término lineal del tiempo de secado. El factor de temperatura fue el de mayor impacto ($p \ll 0.050$).

En la Figura 3 se aprecian las curvas generadas como respuesta al efecto que tiene la temperatura en el desempeño de los experimentos. Es por estas curvaturas que el término cuadrático resultó significativo. El potencial ORAC se incrementó cuando se eleva la temperatura hasta alcanzar un máximo a alrededor de los 50 °C.

4.4 DPPH

Los resultados variaron de 0.45 hasta 2.15 mol antiox/mol DPPH'. El análisis estadístico de varianza indicó que los resultados no fueron afectados por alguno de los parámetros manipulados en el proceso de secado. Sin embargo, el comportamiento de los experimentos no se ajustó tan bien al modelo matemático propuesto para su predicción. El modelo no presentó significancia ($p > 0.05$).

4.5 Optimización de Resultados

La optimización involucró maximizar el rendimiento en PFT y capacidad antioxidante (ORAC), pero manteniendo un bajo porcentaje de humedad en el bagazo.

El bagazo resultante tuvo un contenido fenólico de 2.4 mg GAE/g ms y un potencial antioxidante de 94.49 $\mu\text{mol TE/g ms}$. Se ajustó a un contenido de humedad final del 10%. La baja humedad imposibilita el crecimiento de microorganismos que causan deterioro de los alimentos e inhibe a las enzimas que promueven cambios químicos no deseados en el material (Earle, 1983).

Las condiciones óptimas concordaron con las de diferentes trabajos de secado con vacío de otros cultivos (Mongpraneet *et al.*, 2002, Bazyma *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2007, Šumić *et al.*, 2013).

4.6 Simulación de Procesos

La Tabla 3 muestra el resumen de balances de costos de la simulación del secado con vacío del bagazo de manzana a las condiciones óptimas. Se manejó un flujo de 1,000 kg/h.

Se estimó un consumo de 998.58 kW, es decir, un consumo de energía específico de 0.9986 kWh/kg. Fue un gasto bajo si se compara con los 1.6 – 2.5 kWh/kg del secado convectivo y aún con los 1.5 – 1.7 kWh/kg para los métodos conductivos (Bazyma et al., 2006).

4.7 Análisis de Sensibilidad

Se estudió el efecto de cinco variables del proceso: flujo de bagazo, contenido inicial de humedad, presión y temperatura del secador, y temperatura inicial del bagazo.

La Figura 4 muestra los análisis de sensibilidad desarrollados en la simulación. La demanda de energía subió 360 – 390 kW por cada incremento de 360 kg/h de la alimentación. Por su parte, cambios en 5% de humedad reflejaron variaciones de 70 kW.

Asimismo, subir la temperatura en el secador no generó grandes cambios en el gasto de energía. Además, elevar la temperatura compromete las cualidades antioxidantes del bagazo de manzana. Respecto al vacío, trabajar a bajas presiones no impactó sustanciosamente en el gasto de energía.

Por otro lado, entre más cercana sea la temperatura del bagazo a la del secador menor resultó la demanda de energía. Esto se debe a que se requirió más calor para primero calentar al bagazo y después poder evaporarle su contenido de humedad. Además, se observó que la variación de la temperatura del bagazo resultó ser más significativa que la del secador.

5. CONCLUSIONES

La optimización de los resultados reflejó condiciones de 56.97 °C y 15.16 in Hg de vacío durante 4.83 horas. Se maximizó el rendimiento en PFT y la capacidad antioxidante (ORAC), mientras que se ajustó el contenido de humedad en los sólidos a un 10%.

El secado del bagazo consumió 998.58 kW a un flujo dado de 1,000 kg/h. El consumo energético específico fue bajo comparado con el secado convectivo y aún contra lo reportado para secado con métodos por conducción.

BIBLIOGRAFÍA

Ballard, T. S.; Mallikarjunan, P.; Zhou, K. and O'Keefe, S. F. (2009). "Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 3064 - 3072.

Bazyma, L. A.; Guskov, V. P.; Basteev, A. V.; Lyashenko, A. M.; Lyakhno, V. and Kutovoy, V. A. (2006). "The investigation of low temperature vacuum drying processes of agricultural materials." *Journal of Food Engineering* 74: 410 - 415.

Ćetković, G.; Čanadanović-Brunet, J.; Djilas, S.; Savatović, S.; Mandić, A. and Tumbas, V. (2008). "Assessment of polyphenolic content and *in vitro* antiradical characteristics of apple pomace." *Food Chemistry* 109: 340 - 347.

Earle, R. L. (1983). *Unit Operations in Food Processing*. New Zealand, NZIFST.

Guyot, S.; Marnet, N.; Sanoner, P. and Drilleau, J.-F. (2003). "Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6240 - 6247.

Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A. and Prior, R. L. (2002). "High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4437 - 4444.

Joshi, V. K. and Attri, D. (2006). "Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products." *Natural Product Radiance* 5(4): 289 - 296.

Mahawar, M.; Singh, A. and Jalgaonkar, K. (2012). "Utility of apple pomace as a substrate for various products: A review." *Food and Bioproducts Processing* 90: 597 - 605.

Mishra, K.; Ojha, H. and Chaudhury, N. K. (2012). "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results." *Food Chemistry* 130: 1036 - 1043.

Mongpraneet, S.; Abe, T. and Tsurusaki, T. (2002). "Accelerated drying of welsh onion by far infrared radiation under vacuum conditions." *Journal of Food Engineering* 55: 147 - 156.

Peschel, W.; Sánchez-Rabaneda, F.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Gartzía, I.; Jiménez, D.; Lamuela-Raventós, R.; Buxaderas, S. and Codina, C. (2006). "An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes." *Food Chemistry* 97: 137 - 150.

Pingret, D.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Le Bourvellec, C.; Renard, C. M. G. C. and Chemat, F. (2012). "Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace." *Journal of Food Engineering* 111: 73 - 81.

Singleton, V. L.; Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). "Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent." *Methods in Enzymology* 299: 152 - 178.

Šumić, Z.; Tepić, A.; Vidović, S.; Jokić, S. and Malbaša, R. (2013). "Optimization of frozen sour cherries vacuum drying process." *Food Chemistry* 136: 55 - 63.

Viot, M.; Tomao, V.; Le Bourvellec, C.; Renard, C. M. G. C. and Chemat, F. (2010). "Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction." *Ultrasonics Sonochemistry* 17: 1066 - 1074.

Wu, L.; Orikasa, T.; Ogawa, Y. and Tagawa, A. (2007). "Vacuum drying characteristics of eggplants." Journal of Food Engineering 83: 422 - 429.

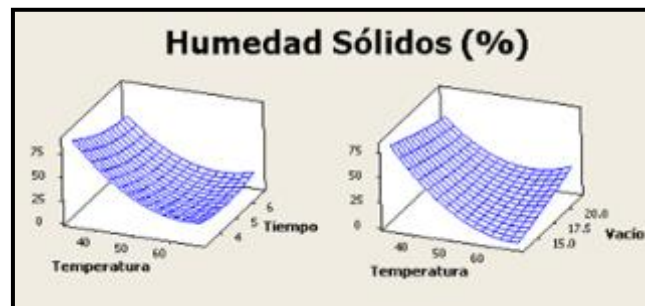


Figura 1. Gráficas de superficie del contenido de humedad en los experimentos.

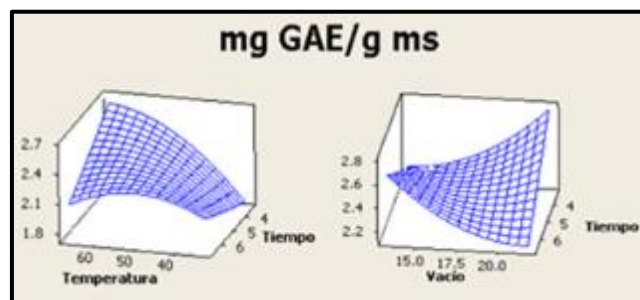


Figura 2. Gráficas de superficie de polifenoles totales en los experimentos.

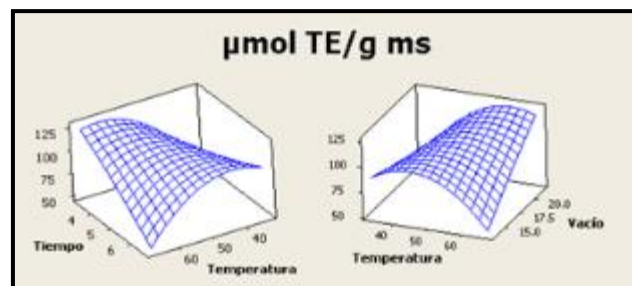


Figura 3. Gráficas de superficie de capacidad antioxidante (ORAC).

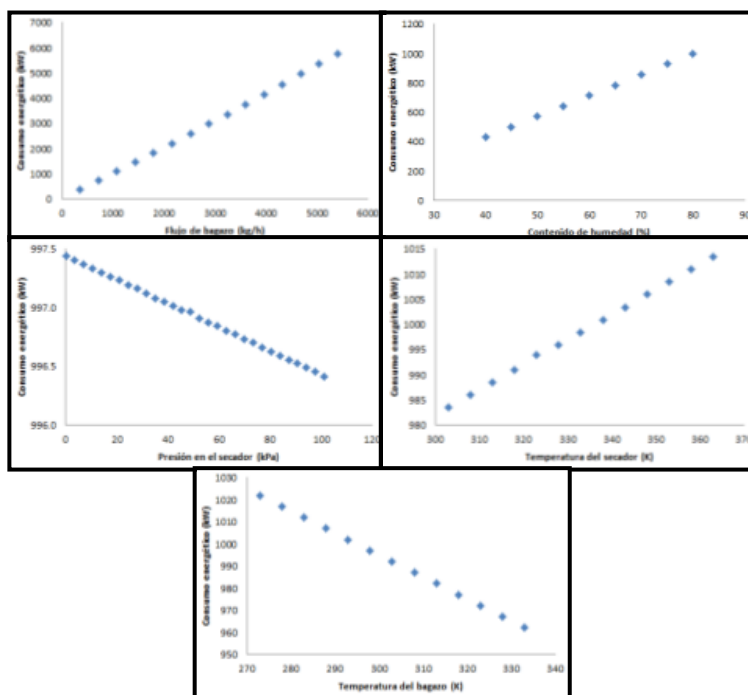


Figura 4. Casos de sensibilidad.

Tabla 1. Condiciones de experimentación para cada variable en términos codificados.

	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	33.2	40	50	60	66.8
Tiempo (h)	3.32	4	5	6	6.68
Vacío (in Hg)	13.3	15	17.5	20	21.7

Tabla 2. Composición del desperdicio de manzana por cada 100 g [adaptada de (Joshi and Attri, 2006)].

Constituyente	Bagazo Húmedo	Bagazo Seco
Humedad (%)	70.00	5.00
Polifenoles (%)	0.50	1.00
Fibra y Pectina (%)	9.50	39.00
Glucosa (%)	6.00	27.00
Vitamina C (mg)	1.50	15.00
Fructosa (%)	14.00	28.00
Total	100.00	100.00

Tabla 3. Resumen de costos de operación del secado a vacío.

	Secado a vacío
Precio (\$/kg)	1.55
Consumo energético (kW)	998.578
Costo (\$/h)	1,549.99

IMPACTO DE LA TRAYECTORIA TERMOHÍDRICA DE LA OPERACIÓN DE COCCIÓN SOBRE LA GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE PLATANO DE COCCIÓN

Andrés Giraldo^{1,2}, Olivier Gibert², Dominique Dufour^{2,3}, Julien Ricci², Philippe Bohuon^{1&2}

¹ Montpellier SupAgro, UMR QUALISUD, 1101 Avenue Agropolis, CS 24501, 34093 Montpellier Cedex 5, France

² Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR QUALISUD, 73 Rue Jean-François Breton, TA B-95/15, 34398 Montpellier, France

³ Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Km17 Recta Cali-Palmira, A.A. 6713 Cali, Colombia

INTRODUCCIÓN

Los bananos constituyen el alimento de base de millones de consumidores, representando el cuarto cultivo mas importante en producción y consumo en los países en desarrollo, con una producción total en el 2010 de 136 MT (Lescot, 2010). Bananos de postre, de cocción y plátanos pertenecen a la familia de las musáceas del género tipo *Musa*. Sin embargo estas musáceas comestibles son clasificadas genéticamente en variedades comestibles como AA, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB (Bakry, 2008), esta clasificación permite la diferenciación entre bananos de postres (AA, AAA, AAB), bananos de cocción (AAA, AAB, ABB), y bananos de cocción de tipo plátano (AAB) (Gibert, 2009). El almidón es el principal componente de bananos y plátanos en estado verde (Bello-Pérez, 2004), su contenido puede oscilar entre 74.2-88.2 % bs (Gibert, 2009), esta compuesto de dos polímeros de glucosa diferentes: un polímero principalmente linear (amilosa) que representa aproximadamente el 23,4 % del almidón total (Dufour, 2009) y un polímero ramificado que representa la fracción complementaria (amilopectina).

Cuando se aumenta la temperatura de una suspensión de almidón en exceso de agua, una transición irreversible de orden-desorden llamada gelatinización toma lugar (Donovan, 1979). Durante la gelatinización los gránulos de almidón absorben agua, se hinchan, pierden su cristalinidad y liberan amilosa (Parker, 2001). En consecuencia la gelatinización del almidón es un fenómeno de transición que es gobernado principalmente por el contenido de humedad y el tratamiento térmico aplicado (Fukuoka, 2002). Baks (2007) mencionó que cuando la cantidad de agua disponible en una suspensión de almidón es limitada para completar el hinchamiento y la destrucción de los gránulos, ellos solo perderán una parte de su estructura en una transición conocida como fusión de la parte cristalina de los gránulos de

almidón (Donovan, 1979). De acuerdo a lo anterior las condiciones termohídricas aplicadas durante la operación unitaria de cocción pueden provocar modificaciones importantes en la calidad funcional incluyendo la calidad nutricional del almidón (Holm, 1988), influyendo así en la calidad del producto final (Baleia, 2006). En consecuencia se hace necesario conocer el impacto producido en el grado de gelatinización del almidón sometido a condiciones termohídricas diferentes, ya que este es fuertemente dependiente del agua y la temperatura. Es entonces el objetivo de este trabajo desarrollar una técnica que permita posteriormente predecir el grado de gelatinización en función de las condiciones termohídricas de operación utilizadas para obtener una calidad funcional específica, utilizando como indicador resultados basados en medidas de calorimetría diferencial de barrido.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Materia prima

Para el estudio se utilizó la variedad colombiana Dominico Hartón (DH) que corresponde al grupo de bananos de cocción de tipo plátano (AAB). La harina de los frutos fue producida a partir de los dedos de la segunda mano del racimo de arriba hacia abajo. Se retiraron las cascaras y la pulpa se picó en rodajas con la ayuda de un procesador de alimentos. Las rodajas se secaron en un horno a 40 °C durante 48 horas. Las rodajas secas se molieron utilizando un molino de laboratorio. La harina obtenida se almacenó a 14 °C en bolsas plásticas selladas para análisis posteriores. Inmediatamente después de su producción, se determinó materia seca de la harina en un horno (105 °C; 24 horas por triplicado).

Harinas rehidratadas

A partir de la harina producida se tomaron 4 muestras que fueron rehidratadas a diferentes humedades 1.4, 1.5, 1.7 y 2.0 g de agua por g de harina seca de plátano. Las harinas rehidratadas se almacenaron en recipientes bajo vacío en presencia de Tymol al interior para evitar la formación de hongos. Previo a análisis posteriores se controló la humedad usando un horno a 105 °C durante 24 horas.

Métodos

Medida de la transición vítrea utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La harina rehidratada a 1.4 g.g⁻¹ bs se utilizó para determinar la temperatura de transición vítrea (Tg) usando el equipo DSC Perkin-Elmer DSC 7 (Perkin-Elmer Norwalk,

VA), de acuerdo al método utilizado por Slade (1988). El equipo fue calibrado frecuentemente con Indio (punto de fusión 156.6 °C). Las muestras húmedas fueron pesadas en capsulas de acero inoxidable (capacidad de 40 µl). Las capsulas se calentaron parcialmente hasta una temperatura determinada (desde 20°C hasta 60, 65, 70 y 75 °C) a una rata calentamiento de 10 °C/min, una vez alcanzada la temperatura definida la capsula se enfría, e inmediatamente se calienta una vez mas usando un perfil desde 25 °C hasta 140 °C a una rata de calentamiento de 10 °C/min. Los termogramas obtenidos permiten determinar la Tg operacional, la cual se utilizó como punto inicial en la integración de los termogramas en análisis posteriores. Todos los análisis se hicieron por duplicado.

Cálculo de la tasa de conversión del almidón α por (DSC)

Las entalpias de las harinas rehidratadas a diferentes humedades se determinaron utilizando el mismo equipo DSC. Las muestras se prepararon pesando en capsulas de acero inoxidable (7 mg de almidón seco) y se calentaron a una rata de calentamiento de 50 °C/ min hasta alcanzar diferentes temperaturas 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100 y 120 °C durante 10 minutos. Después la muestra fue enfriada a 25 °C por un minuto e inmediatamente la misma capsula se calentó por segunda vez usando un perfil de temperatura de 25 °C hasta 140 °C con una rata de calentamiento de 10 °C/min. En los termogramas obtenidos se calculó la entalpía residual (ΔH_r).

Un segundo análisis se realizó tomando una muestra de harina rehidratada. La muestra se pesó en una capsula de aluminio y se calentó utilizando un perfil de temperatura de 25 °C hasta 140 °C a una rata de calentamiento 10 °C/min, esto permite calcular la entalpía total del almidón nativo a una humedad especifica (ΔH_e). Para la integración de los termogramas se consideró la Tg operacional. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

El calculo de la tasa de conversión del almidón α para un tratamiento térmico y un contenido de humedad especifico esta definido por la Ec. 1.

$$\alpha(X_1, T) = \frac{\Delta H_e(X_1) - \Delta H_r(X_1, T)}{\Delta H_e(X_1)} \quad (1)$$

donde ΔH_r es el cambio de entalpia residual después de un tratamiento térmico aplicado, es decir la porción residual de almidón que no ha sido gelatinizada durante el primer tratamiento térmico y ΔH_e es el cambio de entalpia total obtenido para una humedad especifica.

Cálculo de la tasa de conversión del almidón α por DSC después de un tratamiento térmico usando dispositivo de cocción

Se tomaron dos muestras de harina de plátano Dominico Hartón y se llevaron a humedades diferentes (1.4 y 2,0 g.g⁻¹ bs), se hicieron diferentes tratamientos térmicos en un dispositivo de cocción sellado herméticamente (Figura 1). Este dispositivo fue diseñado en acero inoxidable como es indicado por Jiménez et al. 2010. La cocción se realizó en un baño de agua para temperaturas mas bajas (60 – 90 °C ± 0,6) y en un baño de aceite para temperaturas mas altas (100 y 120 °C ± 0,6). En cada baño se agitó el volumen de liquido y el flujo de la agitación producía una turbulencia que aseguraba la homogenización de la temperatura en todo el baño. La temperatura inicial al interior del dispositivo de cocción era de aproximadamente 21 °C. El dispositivo fue sumergido en el baño y se dejo 10 minutos después que la temperatura en el interior alcanzara la temperatura determinada para cada tratamiento. Después de cada tratamiento de calentamiento el dispositivo era enfriado en un baño de agua con hielo y secado con una toalla de papel. Posteriormente se recupera la muestra, e inmediatamente se mide la tasa de conversión de almidón α utilizando el DSC con un perfil de temperatura desde 25 hasta 140 °C con una rata de calentamiento de 10 °C/min. La humedad de la muestra después antes y después del tratamiento térmico se controló, midiendo su contenido en un horno a 105 °C durante 24h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Holm (1988) mencionó que el grado de gelatinización es un factor extremadamente importante en el procesamiento de alimentos. En muchos alimentos el almidón es solo parcialmente gelatinizado debido al limitado contenido de agua durante el proceso. Los gránulos de almidón sufren un ligero hinchamiento y la estructura interna de los mismos permanece parcialmente intacta. Donovan (1979) denominó este fenómeno la fusión de la parte cristalina de los gránulos de almidón. La temperatura de gelatinización de la harina de plátano de la variedad colombiana dominico hartón (DH) medida en una muestra de almidón en exceso de agua es 67.7 ± 2.2 °C (Dufour, 2009). En la figura 2 se observan los termogramas normalizados con substracción de la línea de base de las harinas rehidratadas a diferentes contenidos de humedad. En condiciones limitadas de agua ($X_1 = 1.4$ y 1.5 g.g⁻¹ bs), se observa la aparición de dos picos importantes que son también observados en trabajos anteriores y que comprenden el fenómeno de gelatinización de acuerdo a lo mencionado por Donovan (1980). El primer pico observado es denominado endotermo G por Donovan (1980)

y el segundo pico observado corresponde a la fusión del almidón y es denominado M1 por el mismo autor. Las muestras con mayor contenido de agua muestran que el endotermo G aumenta y M1 disminuye con el aumento de agua, fenómeno observado por otros autores (Lund, 1984; Donovan, 1980, Briffaz, 2013). Los fenómenos de transición térmica que ocurren cuando el almidón es sometido a calor en presencia de agua, permiten considerar que la tasa de conversión de almidón corresponde a la suma de todas las transiciones térmicas G + M1. La influencia del complejo amilosa-lípido no se observó en los termogramas debido al bajo contenido de lípidos en el plátano alrededor de 2 – 3 g/100g de plátano fresco (Adebayo, 2007). Otros eventos térmicos relacionados con la fusión del almidón durante el proceso de gelatinización fueron identificados (Slade, 1988) hecho que limitó la integración de los termogramas obtenidos a diferentes humedades. Por lo tanto se realizaron análisis para determinar la temperatura de transición vítrea que permitieron conocer de manera operacional la localización de la Tg, la cual para la harina de plátano del estudio se encuentra en el rango de 65-70 °C (Figura 3).

En la Figura 4 se observa la manera como fue calculada el área bajo la curva de los termogramas obtenidos a diferente humedad de la muestra. La Figura 4 (a) muestra el calculo sin tener en cuenta la Tg operacional, mientras que la Figura 4 (b) muestra el calculo teniendo en cuenta la Tg, de acuerdo a esto se observó una variación en el cambio de entalpia total (ΔH_e) para cada uno de los contenidos de humedad estudiados. Los valores entalpia total (ΔH_e) obtenidos son los siguientes 19.0 ± 1.1 Julios por g de almidón seco (1.4 g.g^{-1} bs), $19.6 \pm 1.3 \text{ J.g}^{-1}$ (1.5 g.g^{-1} bs), $19.9 \pm 1.1 \text{ J.g}^{-1}$ (1.7 g.g^{-1} bs), $20.5 \pm 0,9 \text{ J.g}^{-1}$ (2.0 g.g^{-1} bs), se observa que los valores para cada contenido de humedad aumentan en función de la cantidad de agua presente en la muestra como fue observado por Lund (1984).

La tasa de conversión del almidón α obtenida utilizando el DSC fue comparada con los resultados de α obtenidos usando el dispositivo de cocción, el cual permite realizar tratamientos termohídricos diferentes con un volumen de muestra mas elevado. Se observó que en ambos casos el valor de α alcanzan es aproximadamente equivalente (Figura 5). Asi el dispositivo de cocción facilita la realización de tratamientos termohídricos diferentes obteniendo valores de tasa de conversión equivalentes a los obtenidos con la DSC. El uso de una cantidad de muestra mas elevada permitirá realizar análisis posteriores a las muestras parcialmente gelatinizadas.

En la figura 6 se puede observar una relación existente entre la temperatura de gelatinización (Tgel), la temperatura final de fusión de los gránulos y la curva de gelatinización, la cual puede ayudar a estimar de manera simple el grado de gelatinización del

almidón. La temperatura de gelatinización y la temperatura final de fusión tienen una variación aparentemente lineal en función del tratamiento térmico aplicado, lo cual permite hacer una relación con el grado de gelatinización obtenido en cada tratamiento. La ventaja de este tipo de relación es que la temperatura de gelatinización principalmente a diferencia del ΔH no tiene relación directa con la cantidad de muestra utilizada en la DSC, sin embargo se debe tener en cuenta que estos valores varían de acuerdo a la materia prima utilizada, resultados similares han sido obtenidos por Parada, 2009.

CONCLUSIÓN

Se validó el método de cálculo de la tasa de conversión de almidón α para un tratamiento térmico y un contenido de humedad específico, validando también la utilización del dispositivo de cocción para simular el grado de gelatinización de una muestra de harina de plátano a diferentes tratamientos de cocción y con un volumen mayor de muestra, permitiendo así realizar una predicción previa del grado de gelatinización en función de las condiciones termohídricas. Se mostró la relación existente entre la temperatura de gelatinización obtenida con la DSC y el grado de gelatinización para un tratamiento térmico específico y su variación de acuerdo al contenido de humedad inicial de la muestra analizada. Finalmente el uso de esta técnica permitirá la evaluación posterior de la influencia potencial de la cocción sobre la calidad nutricional del plátano de cocción.

BIBLIOGRAFÍA

- Adebayo Adeniji, T., Oladimeji Sanni, L., Samuel Barimalaa, I., Hart, A. D. (2007) Nutritional Composition of Five New Nigerian Musa Hybrid Cultivars: Implications for Adoption in Human Nutrition. *Fruits*, 62, 135–142.
- Baks, T.; Ngene, I. S.; van Soest, J. J. G.; Janssen, A. E. M.; Boom, R. M. (2007) Comparison of Methods to Determine the Degree of Gelatinisation for Both High and Low Starch Concentrations. *Carbohydrate Polymers*, 67, 481–490.
- Bakry, F., Carreel, F., Jenny, C., Horry, J. P. (2008) Genetic Improvement of Banana, Chapter I. In *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*; Jain, S. M., Priyadarshan, P. M., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 3-50.
- Beleia, A., Butarelo, S. S., Silva, R. S. F. (2006). Modeling of Starch Gelatinization During Cooking of Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz). *LWT - Food Science and Technology*, 39, 400–405.
- Bello-Perez L.A., Sayago-Ayerdi S., Mendez-Montealvo G., Tovar J. (2004). In Vitro Digestibility of Banana Starch Cookies. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79–83.

- Briffaz, A., Mestres, C., Matencio, F., Pons, B., Dornier, M. (2013). Modelling starch phase transitions and water uptake of rice kernels during cooking. *Journal of Cereal Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.08.001>.
- Donovan, J. W., Mapes, C. J. (1980) Multiple phase-transitions of starches and nageli amyloextrins. *Starke*, 32, 190-193.
- Dufour D., Gibert O., Giraldo A., Sánchez T., Reynes M., Pain J.P., González A., Fernández A., Díaz A. (2009). Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 2. Thermal and functional characterization of some cultivated Colombian Musa sp. in relation to consumer preferences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (17), 7870–7876.
- Fukuoka, M.; Ohta, K.; Watanabe, H. (2002). Determination of the Terminal Extent of Starch Gelatinization in a Limited Water System by DSC. *Journal of Food Engineering*, 53, 39–42.
- Gibert O., Dufour D., Giraldo A., Sánchez T., Reynes M., Pain J.P., González A., Fernández A., Díaz A. (2009). Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 1. Morphological and physicochemical characterisation of some cultivated Colombian Musa sp. in relation to consumer preferences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (17), 7857–7869, Erratum [J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 9290.
- Holm, J., Lundquist, I., Björck, I., Eliasson, A. C. (1988). Asp, N. G. Degree of Starch Gelatinization, Digestion Rate of Starch in Vitro, and Metabolic Response in Rats. *American Journal Of Clinical Nutrition*, 47, 1010–1016.
- Jiménez N., Bohuon P., Lima J., Dornier M., Vaillant F., And Pérez A.M. (2010). Kinetics of Anthocyanin Degradation and Browning in Reconstituted Blackberry Juice Treated at High Temperatures (100-180 oC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 2314–2322.
- Lescot T. (2010). La diversité génétique des bananiers en chiffres. *Fruitrop*, 177 : 48-52.
- Lund, D., Lorenz, K.J., 1984. Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20, 249–273.
- Parker, R. & Ring, S. G. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, 34,1-17.
- Slade, L., Levine, H. (1988) Non-equilibrium melting of native granular starch: Part I. Temperature location of the glass transition associated with gelatinization of A-Type cereal starches. *Carbohydrate Polymers*, 8, 183-208.

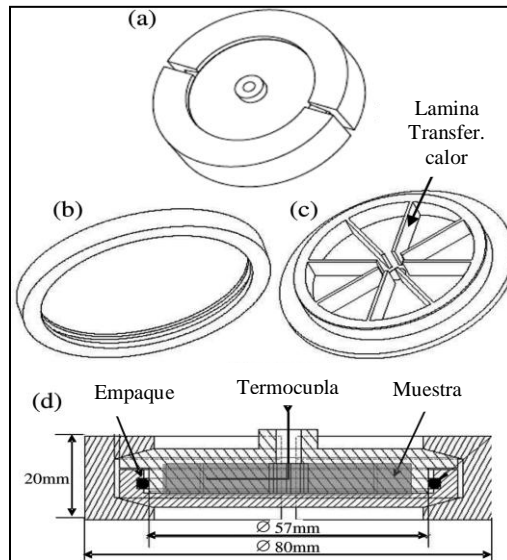


Fig. 1. Diagrama del dispositivo de cocción .(a) Imagen general, (b) tapa, (c) recipiente, (d) vista lateral del dispositivo

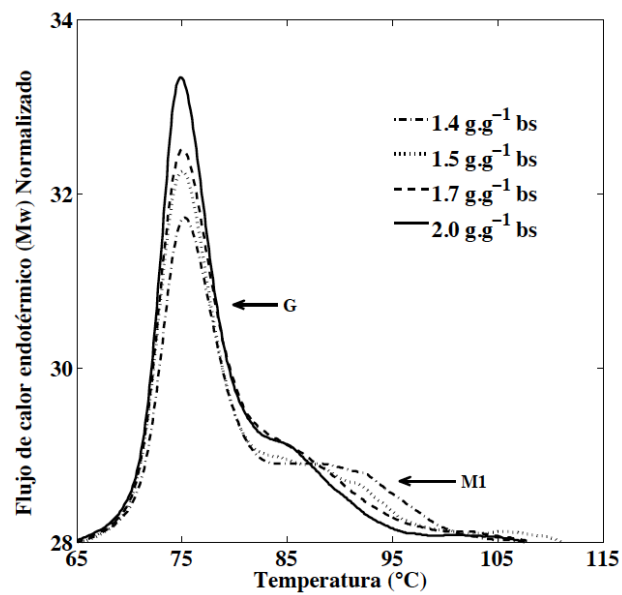


Fig. 2. Termogramas a diferentes contenidos de humedad

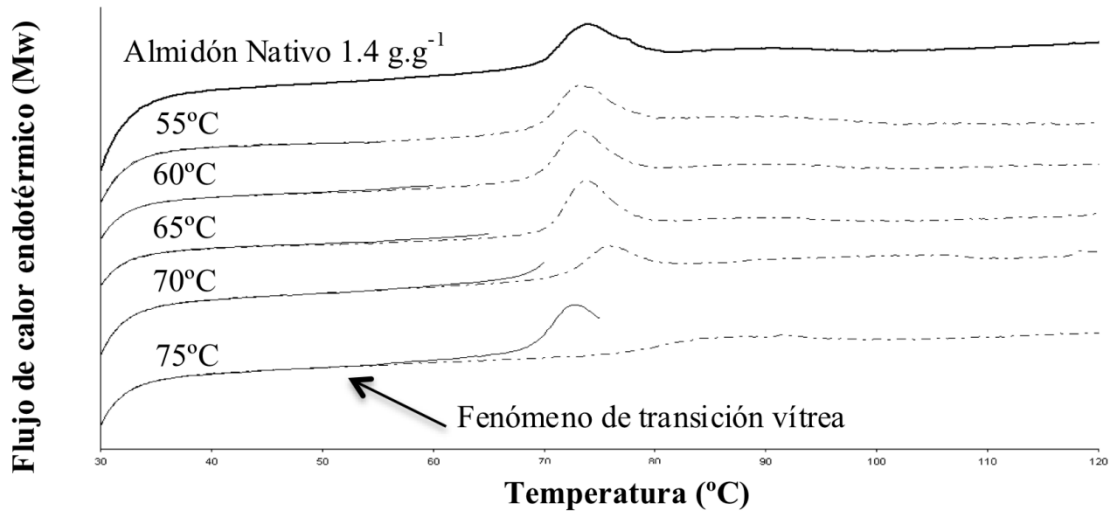


Fig. 3. Termogramas de harina de plátano (1.4 g.g⁻¹ base seca), líneas solidas = calentamiento parcial, líneas punteadas = calentamiento completo.

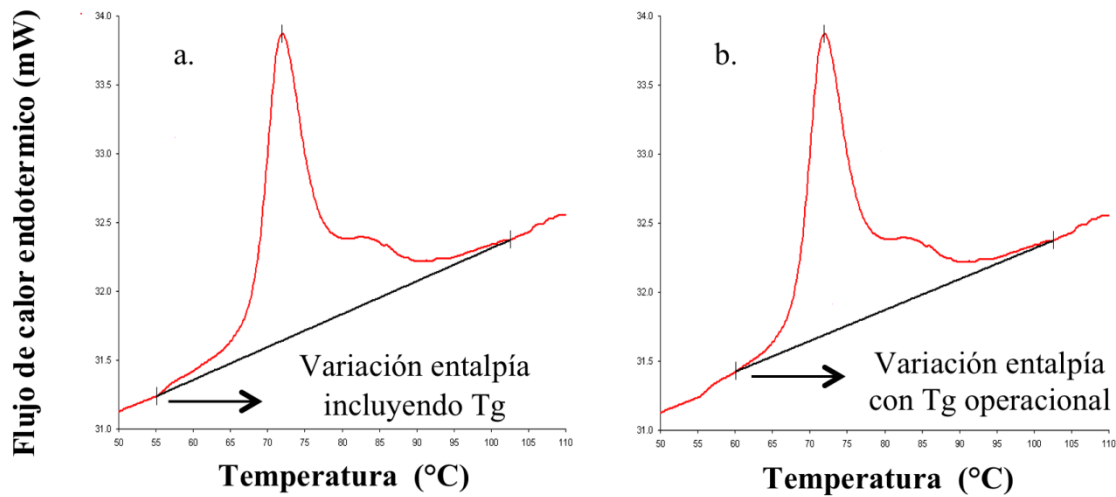


Fig. 4 a-b. Integración de termogramas en relación al fenómeno de transición vítrea

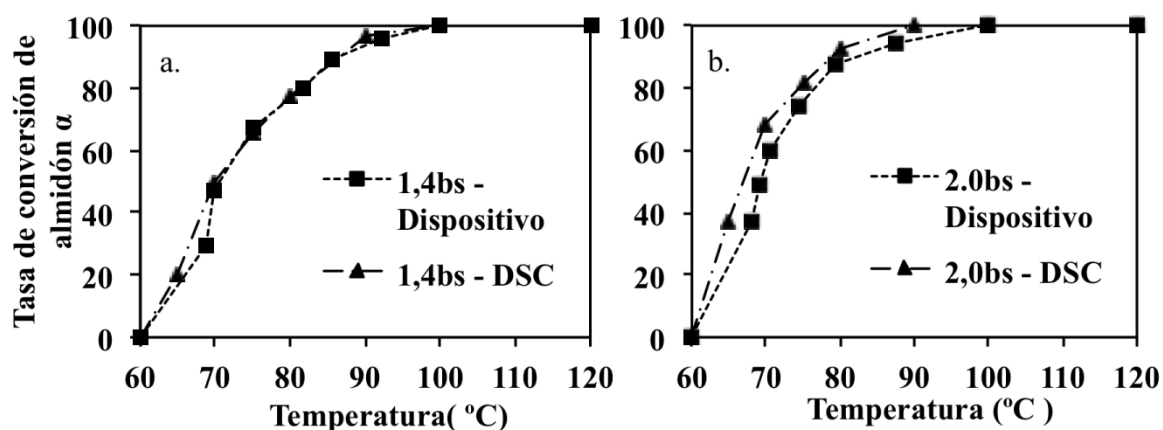


Fig. 5 a-b. Comparación del grado de gelatinización (tasa de conversión de almidón “ α ”) entre la DSC y el dispositivo de cocción para dos contenidos de humedad 1.4 y 2.0 g.g⁻¹ bs

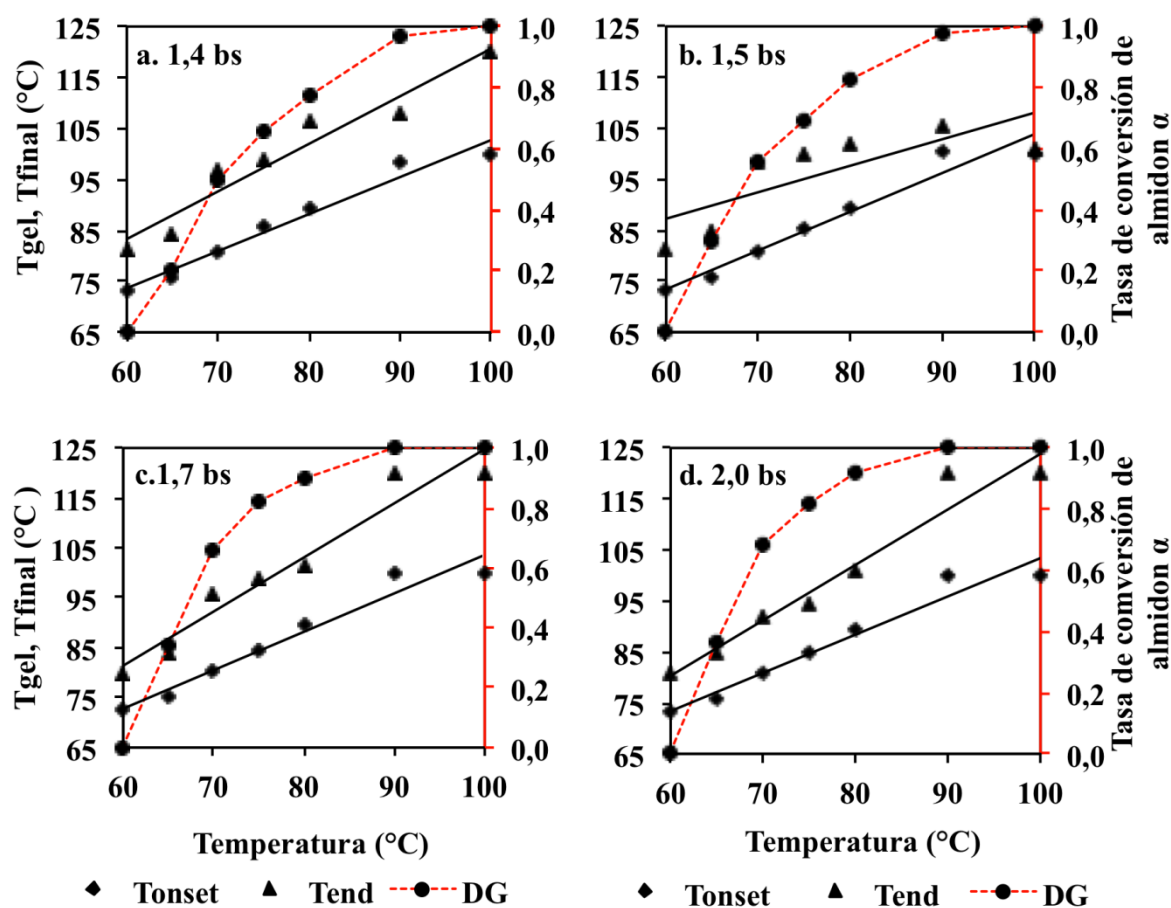


Fig. 6 a-b-c-d. Relación entre temperatura de gelatinización y tasa de conversión del almidón “ α ”

IMPACTO DE LA ADICIÓN DE GOMA ARÁBIGA Y CARBOXIMETILCELULOSA EN LA CALIDAD DE KIWI EN POLVO OBTENIDO POR LIOFILIZACIÓN Y ATOMIZACIÓN

Yishi Wu-Ng, María Benloch-Tinoco¹, Eva García-Martínez¹, Nuria Martínez-Navarrete¹

¹Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

INTRODUCCIÓN

El kiwi es una fruta con un elevado contenido en vitaminas (C y E), minerales (calcio, hierro, potasio y fósforo), fibra, compuestos fenólicos y elevada capacidad antioxidante (Beirão-da-Costa et al., 2008; Du et al., 2009; Park et al., 2008). Tanto los compuestos bioactivos como ciertos micronutrientes presentes en las frutas juegan un papel esencial en la prevención de ciertas enfermedades, con lo que un consumo regular de las mismas comúnmente se asocia con efectos beneficiosos para la salud (Hunter et al., 2010).

Las nuevas tendencias de consumo vienen marcadas por la preferencia de los consumidores por los alimentos procesados, mostrándose muy exigentes al respecto, y solicitando productos estables, a la par que saludables, inocuos y cuyas características sensoriales sean muy similares a las del producto fresco (“freshlike”) (Rémésy, 2004). Teniendo en cuenta estos aspectos, la posibilidad de comercializar fruta en polvo, particularmente kiwi, parece una alternativa interesante que podría satisfacer las exigencias de los consumidores, al mismo tiempo que fomentar el consumo de esta fruta, ya que podría incorporarse como ingrediente a otros alimentos o consumirse directamente tras su reconstitución.

La tecnología de la liofilización se basa en la eliminación del agua presente en un producto previamente congelado por sublimación (Berk, 2009). Dado que este proceso se lleva a cabo a baja temperatura, se asegura una máxima conservación de las propiedades organolépticas, nutricionales y funcionales del alimento. La liofilización, sin embargo, conlleva largos tiempos de proceso y elevados costes de producción, viéndose su aplicación limitada a la obtención de productos de gran valor añadido (Berk, 2009).

El secado por atomización consiste en la eliminación del agua contenida en un alimento que se encuentre en forma de disolución, emulsión, suspensión o dispersión líquida, al ser éste pulverizado en forma de partículas de muy reducido tamaño y posteriormente

entrar en contacto con una corriente de aire caliente (Miravet-Valero, 2009). Esta tecnología permite también obtener alimentos en polvo de gran calidad, ya que los cortos tiempos de residencia del alimento en el equipo permiten minimizar las pérdidas de los compuestos termolábiles.

Un aspecto adicional a tener en cuenta a la hora de obtener frutas en polvo es su elevado contenido en azúcares y ácidos orgánicos, responsables de la elevada higroscopicidad y pegajosidad del producto obtenido. Esto limita los procesos y hace necesaria la incorporación de vehículos favorecedores del mismo, como lo son algunos solutos de alto peso molecular con efecto encapsulante, antihumectante y antiapelmazante, tales como la goma arábiga y la carboximetilcelulosa. Estos solutos, además de mejorar la eficacia tecnológica del proceso, mejoran la estabilidad del producto obtenido frente a su humectación.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de una mezcla de solutos, compuesta por goma arábiga y carboximetilcelulosa, combinados en distintas proporciones, sobre algunos aspectos de la calidad del kiwi en polvo obtenido por procesos de atomización y de liofilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Como materia prima se emplearon kiwis (*Actinida deliciosa* variedad Hayward) adquiridos siempre en el mismo supermercado de la ciudad de Valencia. Para la liofilización se partió de puré de fruta (P) (Thermomix TM 21, Vorwerk, España). Para el proceso de atomización se requirió la elaboración de licuado (L) (De' Longhi S.p.A. – 31100, Treviso, Italia). Tanto al puré como al licuado se les añadieron goma arábiga (GA) y carboximetilcelulosa (CMC) (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany). La adición de GA se planteó en un intervalo entre 13-15 g/100 g P ó L (Mosquera et al., 2011). CMC se incorporó en proporción 0-2 g/100 g P ó L. Como requisito se estableció que el total de sólidos procedentes de estos aditivos en el producto fuera 15%. Las concentraciones de solutos aparecen en la Tabla 1.

Procesado

-LIOFILIZACIÓN: Las muestras dispuestas en bandejas (15 cm de diámetro y 5 cm de alto), formando capas de 5 mm, se almacenaron 24 horas en un criocongelador (CVF 525/86, Ing. Climas, España) a -86 °C. La liofilización se llevó a cabo a 0,026 mBar y -56,6 °C,

(liofilizador LioAlfa-6, Telstar, España). Tras la liofilización la muestra fue triturada en una picadora eléctrica (Moulinex, Moulinette:320). Las muestras en polvo se designaron como KL y se especificó la concentración de CMC añadida (0-2%).

-ATOMIZACIÓN: Se utilizó un atomizador Büchi (mini spray dryer B-290, Reino Unido). Se fijaron los siguientes parámetros: caudal de entrada: 9 g/min, T entrada y salida aire: 150°C y 90°C, respectivamente, flujo aspiración aire: 90% y flujo alimentación bomba peristáltica: 30%. Las muestras en polvo se designaron como KA y se especificó la concentración de CMC añadida (0-2%).

Análisis

Todos los análisis se realizaron por triplicado, en las 24h siguientes al procesado de las muestras, excepto la humedad que se determinó inmediatamente después del mismo.

-HUMEDAD (x_w): AOAC 934.06, 2000.

-HIGROSCOPICIDAD (H_i): según la metodología descrita por Cai y Corke (2000).

-VITAMINA E (Vit.E): por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Siguiendo el método descrito por Munzuroglu et al. (2003).

-VITAMINA C (Vit. C): se determinó por HPLC, según la metodología descrita por Xu et al. (2008), Sánchez-Mata et al. (2000) y Sánchez-Moreno et al. (2003).

-ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (AAO): se empleó el método del DPPH (Puupponen-Pimiä et al., 2003), utilizando Trolox (Sigma Aldrich) como patrón.

-ANÁLISIS ESTADÍSTICO: programa Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Va, USA). Para evaluar las diferencias existentes entre las muestras, se efectuaron análisis de la varianza (ANOVA) de carácter simple y multifactorial, para un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la materia prima

Los valores obtenidos para el puré y el licuado de kiwi empleados como materia prima se muestran en la Tabla 2. El puré de kiwi presentó un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) en cuanto vitaminas C y E que la muestra licuada, mientras que no se encontraron diferencias en cuanto la actividad antioxidante. Además, el puré mostró un valor de x_w significativamente ($p < 0,05$) menor. En general, todos los valores obtenidos fueron

similares a los publicados por otros autores para esta fruta (Antunes et al., 2010; De Ancos et al., 1999; Nishiyama et al., 2005). Estas diferencias pueden atribuirse al hecho de que durante el proceso de licuado, se elimina gran parte de la pulpa de esta fruta.

Caracterización del kiwi en polvo liofilizado y atomizado

En la Tabla 2 se muestran los valores correspondientes a los distintos parámetros físicos y funcionales analizados en el kiwi liofilizado y atomizado con las distintas concentraciones de solutos consideradas. La humedad de las muestras presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la concentración de solutos y a la tecnología empleada para la obtención del polvo. El proceso de liofilización dio lugar a muestras en polvo con mayor humedad. Si bien es cierto que ambas tecnologías resultan adecuadas para obtener productos altamente estables y con bajos niveles de humedad ($\approx 2\%$) (Murrieta et al., 2012). La presencia de CMC, favoreció la eliminación de agua en ambos procesos, permitiendo obtener kiwi en polvo con una humedad significativamente ($p < 0,05$) menor a la de la muestra con 15% GA. La higroscopicidad presentó diferencias significativas en cuanto a los dos factores considerados (soluteo y tecnología), siendo significativa la interacción entre ambos. La adición de CMC a bajas concentraciones ($< 1,5\%$ en el caso de las muestras atomizadas ó del 2% en el de las liofilizadas) conllevó una reducción de la higroscopicidad, respecto a la muestra que contenía exclusivamente GA. A esas concentraciones de CMC, la higroscopicidad de ambos tipos de productos no presentó diferencias significativas, mientras que en ausencia o con la máxima concentración de CMC, el producto liofilizado se mostró más higroscópico que el atomizado. La higroscopicidad se considera un parámetro de calidad importante que se relaciona con la estabilidad de los productos en polvo (Bhandari et al., 1998). Desde este punto de vista, la adición de pequeñas cantidades de CMC puede favorecer la calidad del producto, siendo menos susceptible a la ganancia de agua y, por tanto, a sufrir problemas de pegajosidad y apelmazamiento.

La actividad antioxidante mostró diferencias significativas en cuanto a la concentración de solutos y la tecnología empleada ($p < 0,05$). También en consonancia con la materia prima inicial empleada en cada tipo de procesado (Tabla 2), el kiwi en polvo atomizado presentó mayor AAO que el polvo liofilizado. Por otro lado, la sustitución de GA por CMC supuso una menor AAO. En general, el producto liofilizado mostró un contenido en Vit. E significativamente mayor ($p < 0,05$) que el atomizado a cualquiera de las concentraciones de CMC (0-2%) estudiadas. Este hecho puede ser consecuencia de las diferencias existentes entre el puré y el licuado de kiwi empleados como materia prima para

dichos procesos (Tabla 2). El contenido en vitamina E del kiwi atomizado no mostró cambio alguno como consecuencia del uso de CMC (0-2%). En lo referente a la vitamina C, no se observó ninguna tendencia clara en cuanto al efecto de la tecnología empleada ni de la concentración de solutos en su contenido. En ambos productos, en general, la adición de CMC en concentraciones inferiores al 1 %, implicó obtener un producto en polvo con mayor contenido en Vit. C que la muestra que contenía sólo GA. Sin embargo, a concentraciones mayores del 1% supuso una reducción significativa del contenido de esta vitamina.

CONCLUSIONES

Las dos tecnologías planteadas en el presente estudio permitieron obtener kiwi en polvo de alta calidad. Por un lado, con la atomización se obtuvo un producto en polvo menos higroscópico, con menor humedad residual y se aseguró una mejor preservación de las vitaminas y de la actividad antioxidante del kiwi. No obstante, la etapa previa de licuado implicó una reducción de gran parte de los compuestos estudiados. En consecuencia la calidad nutritiva y funcional del producto liofilizado fue mejor. Por otro lado, la adición de carboximetilcelulosa no supuso ninguna mejora perceptible de la calidad funcional del polvo obtenido utilizando sólo goma arábica, independientemente de la tecnología empleada. Sin embargo, añadida en una concentración inferior al 1,5% (p/p), permitió reducir la higroscopicidad y la humedad del producto, respecto al polvo que sólo contenía goma arábica.

REFERENCIAS

- Antunes, M.D.C.; Dandlen, S.; Cavaco, A.M.; Miguel, G. 2010. Effects of Postharvest Application of 1-MCP and Postcutting Dip Treatment on the Quality and Nutritional Properties of Fresh-Cut Kiwifruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6173–6181.
- Bhandari, B. R.; Howes, T. 1998. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40: 71-79.
- Beirão-da-Costa, S.; Cardoso, A.; Martins, L. L.; Empis, J.; & Moldão-Martins, M. (2008). The effect of calcium dips combined with mild heating of whole kiwifruit for fruit slices quality maintenance. *Food Chemistry*, 108, 191-197.
- Berk, Z. 2009. *Food Process Engineering and Technology*. Elsevier Inc, 511.
- Cai, Y.Z. & Corke, H. 2000. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, 65 (7):1248–1252.
- De Ancos, B.; Gonzáles, E.; Cano, M.P. 1999. Differentiation of raspberry varieties

- according to anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, 208:33-38.
- Du, G.; Li, M.; Ma, F.; Liang, D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry*, 113: 557-562.
- Hunter, D.; Skinner, M.; Ferguson, R.; Stevenson, L. 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. The New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd, Auckland, New Zealand.
- Miravet-Valero, G. 2009. Secado por Atomización de zumo de granada. Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Mosquera, L.H.; Moraga, G.; Martínez-Navarrete, N. 2010. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojón (Borojoa patinoi Cuatrec.) powder. *J. Food Eng.* 97 (1): 72–78.
- Munzuroglu, O.; Karatas, F.; Geckil, H. 2003. The vitamin and selenium contents of apricot fruit of different varieties cultivated in different geographical regions. *Food Chemistry*, 83: 205-212.
- Murrieta-Pazos, I.; Gaiani, C.; Galet, L.; Calvet, R.; Cuq, B.; & Scher, J. 2012. Food powders: Surface and form characterization revisited. *Journal of Food Engineering*, 112, 1-21.
- Nishiyama, I.; Fukuda, T.; Oota, T. 2005. Genotypic Differences in Chlorophyll, Lutein, and b-carotene contents in the fruits of actinidia species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6403-6407.
- Park, Y.S.; Jung, S.T.; Kang, S.G.; Heo, B.; Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Drzewiecki, J.; Namiesnik, J.; Gorinstein, S. 2008. Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits. *Food Chemistry*, 107: 640-648.
- Puupponen, P.; Hakkinen, S.; Aarni, M.; Suortti, T.; Lampi, A.; Eurola, M.; Piironen, V.; Nuutila, A.; Oksman-Caldentey. 2003. Blanching and longterm freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 83: 1389-1402.
- Rémésy, Christian. 2004. *Alimentación y salud*. Siglo xxi editores, s. a. 107 pp.
- Sánchez-Mata, M. C.; Cámara-Hurtado, M.; Díez-Marques, C.; Torija-Isasa, M. E. 2000. Comparison of HPLC and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans. *European Food Research International*. 210: 220-225.
- Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P. 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:430-439.
- Xu, G.; Liu, D.; Chen, J.; Ye, X.; Ma, Y.; Shi, J. 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106:545-551.

Tabla 1. Combinación de la concentración de solutos adicionada al licuado (L) o al puré (P) de kiwi previamente a la atomización y liofilización, respectivamente.

g CMC/100g L ó P	g GA/100g L ó P
0	15
0,5	14,5
1	14
1,5	13,5
2	13

Tabla 2. Valor medio (y desviación estándar) de humedad (x_w , g agua/100g), higroscopicidad (H_i , g agua/100 sólidos secos), vitamina C (vit. C, mg/100g), vitamina E (vit. E, $\mu\text{g}/100\text{g}$), y actividad antioxidante (AAO, mM Trolox/100g) analizados en puré de kiwi (P), en el licuado (L) y los productos de kiwi en polvo atomizado y liofilizado a las distintas concentraciones de solutos consideradas.

Muestra	x_w	H_i	Vit. C	Vit. E	AAO
P	85,5 (0,3) ^a	-	88 (8) ^b	2,34 (0,14) ^b	419 (9) ^a
L	87,86 (0,01) ^b	-	38 (4) ^a	1,7 (0,3) ^a	544 (10) ^a
KA 0%	1,94 (0,05) ^{a4}	54,06 (1,04) ^{a2}	2,4 (0,07) ^{a23}	0,012 (0,0005) ^{a1}	32,8 (0,4) ^{b2}
KA 0,5%	1,04 (0,13) ^{a1}	51,36 (1,07) ^{a1}	2,5 (0,08) ^{a34}	0,010 (0,00004) ^{a1}	34,2 (0,4) ^{b2}
KA 1%	1,311 (0,009) ^{a2}	51,3 (1,2) ^{b1}	2,6 (0,01) ^{b4}	0,009 (0) ^{a1}	33,8 (0,3) ^{b2}
KA 1,5%	1,68 (0,03) ^{a3}	55 (2) ^{b2}	2,20 (0,02) ^{b2}	0,012 (0,00014) ^{a1}	23,2 (0,6) ^{b1}
KA 2%	1,30 (0,04) ^{a2}	53,8 (0,7) ^{a12}	2,00 (0,005) ^{a1}	0,011 (0) ^{a1}	20,4 (0,2) ^{b1}
KL 0%	4,8 (0,8) ^{b23}	65 (9) ^{b2}	2,53 (0,04) ^{a2}	0,01879 (0,0005) ^{b2}	22 (2) ^{a2}
KL 0,5%	4,3 (0,3) ^{b12}	52,4 (0,9) ^{a1}	3 (0,03) ^{b3}	0,0097 (0,0013) ^{b1}	21 (2) ^{a2}
KL 1%	4,8 (0,7) ^{b23}	47,6 (0,2) ^{a1}	1,74 (0,018) ^{a1}	0,0175 (0,0012) ^{b2}	21 (2) ^{a2}
KL 1,5%	3,8 (0,4) ^{b1}	51 (2) ^{a1}	1,80 (0,12) ^{a1}	0,0194 (0,0006) ^{b2}	15 (2) ^{a1}
KL 2%	4 (1) ^{b1}	62 (16) ^{b3}	1,79 (0,11) ^{a1}	0,0105 (0,0019) ^{b1}	14,4 (1,5) ^{a1}

Superíndices: números diferentes (1,2,3,4,5) indican un efecto significativo ($p < 0,05$) de la concentración de solutos para cada tecnología de procesado; letras diferentes (a,b) indican un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la tecnología de procesado considerando todas las muestras en conjunto.

OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE SECADO COMBINADO PARA OBTENER KIWI EN POLVO DE ALTA CALIDAD

Juana Teresa Cervera Valero, María Benlloch-Tinoco¹, Eva García-Martínez¹, Nuria Martínez-Navarrete¹

¹ Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

INTRODUCCIÓN

Las frutas son alimentos que aportan nutrientes esenciales para el organismo, además de cierta cantidad de otros compuestos conocidos como “fitoquímicos”, que a pesar de no tener una función nutricional definida y, no ser considerados esenciales para la vida, conllevan un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad (Duttaroy y Jorgensen, 2004; Gorinstein et al., 2004). El kiwi, concretamente, es una fruta que destaca por su contenido en vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, fibras, clorofila y flavonoides (Cassano et al., 2006; Kaya et al., 2008). Pese al reconocido beneficio del consumo de frutas, factores como su estacionalidad y/o su corta vida útil limitan su disponibilidad. Por este motivo, ampliar la gama de productos procesados a base de fruta disponibles en el mercado, que cumplan las expectativas del consumidor (alimentos saludables, de alta calidad nutricional y semejantes al producto fresco) y al mismo tiempo que incentiven la ingesta de fruta por parte de la población, se plantea como un reto para la industria alimentaria (O'Donnell et al., 2010).

La liofilización es una tecnología que permite obtener alimentos deshidratados de alta calidad (Mosquera, 2010). Se basa en la eliminación del agua presente en un producto, previamente congelado, por sublimación. Hoy en día, muchos alimentos liofilizados en polvo sirven de base para la formulación de nuevos productos al ser añadidos como ingredientes (productos lácteos, galletas, pasteles, sopas instantáneas y platos preparados) (Vega-Gálvez et al, 2006). Sin embargo, la liofilización conlleva costes elevados y requiere largos tiempos de proceso (Menlik et al., 2010). La aplicación de otras técnicas de secado, a modo de pretratamiento, para eliminar parte del agua contenida en el alimento previamente a su liofilización, parece una opción válida en vistas a obtener un producto con una adecuada relación calidad/coste (Benlloch-Tinoco et al., 2012; Fahloul et al., 2009). Otro aspecto a considerar de los productos en polvo de frutas, es su elevada higroscopicidad y tendencia a sufrir cambios en sus propiedades físicas con el tiempo, dado su alto contenido en azúcares y ácidos orgánicos. Esto hace que sea recomendable incorporar solutos de alto peso molecular, como la goma arábiga, para que aporten estabilidad al actuar como barrera frente a la

adsorción de agua y también como encapsulantes, evitando la oxidación y la volatilización de los componentes responsables del flavor (Jittra et al., 2009).

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, se planteó como objetivo del estudio diseñar un proceso de secado por métodos combinados basado en la aplicación de energía microondas y una posterior etapa de liofilización, en vistas a obtener un producto en polvo de alta calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Se utilizaron kiwis (*Actinida deliciosa* variedad Hayward) adquiridos en un supermercado local de la ciudad de Valencia. Las piezas de fruta seleccionadas, peladas, lavadas, y cortadas en rodajas, fueron trituradas en una mezcladora eléctrica Thermomix (TM 21, Vorwerk, España). En algunos casos, al puré de kiwi así obtenido se le añadió goma arábiga (GA) (Sigma, España), en las cantidades descritas en el apartado siguiente.

Diseño experimental

Para estudiar el efecto del pretratamiento de secado por microondas y de la incorporación de GA en la calidad del producto obtenido se planteó un diseño de experimentos centrado compuesto rotatable y ortogonal, empleando el programa Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se consideraron como factores del proceso el porcentaje de goma arábiga adicionado al puré de kiwi y la humedad del producto antes de liofilizar (x_wAL). La adición de goma arábiga se planteó en un intervalo de 0-15%, teniendo en cuenta, que normalmente se incorpora en proporción a los sólidos solubles (°Brix) de la fase líquida del producto, manteniendo la relación: 1 kg de goma arábiga/1 kg de sólidos solubles (Mosquera et al., 2010). El intervalo de humedad del producto previamente a su liofilización se estableció en 65-85% (Benlloch-Tinoco et al., 2012). Las variables respuesta seleccionadas fueron: higroscopicidad (Hi), actividad antioxidante (AAO), cambio de color (ΔE) y propiedades mecánicas (Fuerza máxima, $F_{m\acute{a}x}$).

Procesado

-Liofilización: las muestras en bandejas de aluminio (15 cm de diámetro y 5 cm de alto) formando capas de 5 mm de espesor se almacenaron durante 24 horas antes de la liofilización a -86 °C (CVF 525/86, Ing. Climas, España). La liofilización se llevó a cabo a 0,026 mBar y -56,6 °C (liofilizador LioAlfa-6, Telstar, España).

-Pretratamiento: En algunos casos el puré de kiwi se sometió a un proceso de secado por microondas (NORM 3038GC, China) previamente a su liofilización para obtener los niveles de humedad establecidos en el diseño. La potencia de trabajo fue de 2 W/g. El tiempo de tratamiento se estableció en base a la humedad final objetivo.

Análisis

Los análisis se realizaron en las 24h siguientes a su procesado, excepto la humedad que se determinó inmediatamente tras el procesado correspondiente de las muestras.

La humedad (x_w) se determinó por el método oficial para alimentos ricos en azúcares (AOAC 934.06, 2000). Las propiedades mecánicas se analizaron de acuerdo con Telis y Martínez-Navarrete (2010). Se realizó un ensayo de compresión mecánica (texturómetro TA-XT Plus Stable Micro Systems, Ltd., Reino Unido) con una sonda cilíndrica de 10 mm de diámetro. El color se midió con un fotocolorímetro Minolta CM 3600D (Minolta Co. Ltd., Japón), se midió el espectro de reflectancia y a partir de él los resultados se expresaron de acuerdo con el sistema CIE $L^* a^* b^*$ (iluminante D65 y observador 10°). El potencial antioxidante se evaluó empleando el método del DPPH (Puupponen-Pimiä et al., 2003). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Con el fin de definir las condiciones óptimas de proceso, se empleó un análisis de tipo superficie respuesta. A la hora de definir los modelos que sirvieron para relacionar los datos experimentales con los factores del proceso sólo los términos significativos ($p < 0,05$) fueron incluidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la materia

El kiwi se caracterizó por presentar unos valores medios (con su desviación estándar) de humedad=86,0 (0,2) g agua/100 g fruta, °Brix=12,9 (0,2) g sólidos solubles/ 100 g fracción líquida de fruta, $L^*=36,5$ (0,5), $a^*=-3,2$ (0,2) y $b^*=23,9$ (0,5), actividad antioxidante=677 (15) mM Trolox/100g fruta. Todos estos valores fueron similares a los publicados por otros autores para esta fruta (Nishiyama et al., 2000).

Evaluación de los factores de proceso en la calidad del producto

Para analizar e interpretar los resultados obtenidos en el presente estudio, se utilizó una metodología de superficie respuesta, que permitió evaluar el efecto de los factores GA y x_w AL sobre las variables seleccionadas. En la Tabla 1 se muestran los modelos obtenidos,

junto con los valores de los parámetros R^2 -ajustado y la raíz cuadrada media del error (RMSE) correspondientes. Se puede considerar que, por un lado, se obtuvieron modelos capaces de predecir adecuadamente el comportamiento de las variables H_i , AAO, ΔE y F_{\max} , y por el otro, que ambos factores (x_wAL y GA) presentaron efectos significativos ($p < 0,05$) tanto lineales como cuadráticos. La Figura 1 muestra las gráficas de superficie respuesta correspondientes a la ΔE asociada al proceso de secado combinado (Figura 1(a)), así como la evolución de las propiedades mecánicas del polvo respecto a los factores estudiados (x_wAL y GA) (Figura 1(b)). Tanto la x_wAL como la GA presentaron un efecto lineal positivo sobre la diferencia de color del kiwi en polvo, resultando ser el factor GA el más relevante de los dos (Figura 1(a)). Por otro lado, el factor x_wAL no mostró efecto alguno sobre las propiedades mecánicas medidas en el polvo obtenido, pero la adición de goma arábica presentó efectos lineales positivos y cuadráticos negativos (Figura 1(b), Tabla 1). Desde este punto de vista, cuanto mayor es el porcentaje de goma arábica adicionado, mayor es la fuerza necesaria para comprimir el polvo. Mientras que, la aplicación del pretratamiento no afecta de forma negativa a las propiedades mecánicas del mismo.

La Figura 2 representa las superficies respuesta de la actividad antioxidante después del proceso de liofilización (a) y la higroscopicidad del producto en polvo (b). En cuanto al efecto de los factores de proceso sobre el comportamiento de la actividad antioxidante del kiwi en polvo (Figura 2(a)), tanto la adición de GA como la aplicación del pretratamiento de secado mostraron efectos significativos lineales positivos y cuadráticos negativos (Tabla 1). La actividad antioxidante del producto aumentó a medida que lo hizo la cantidad de goma arábica añadida, hasta alcanzar un máximo ($GA \approx 10$), a partir del cual, un aumento del porcentaje de goma implicó un ligero descenso de la actividad antioxidante. Por otro lado, la aplicación del pretratamiento conllevó un aumento de la actividad antioxidante del producto, alcanzando un valor máximo para humedades próximas a 75 g agua/100 g producto. Pese a que la exposición de un alimento a temperaturas elevadas ($T > 60$ °C) frecuentemente se asocia con una reducción de su capacidad antioxidante, diversos autores señalan que también se puede favorecer la liberación de formas conjugadas de determinados compuestos responsables de la actividad antioxidante del producto (Dewanto et al., 2002; Turkmen et al., 2005), sin embargo, tratamientos muy severos o prolongados pueden fomentar la degradación de dichos compuestos (Kaya et al., 2009). En cuanto a la higroscopicidad del polvo (Figura 2(b)), tanto x_wAL como GA afectaron de manera relevante, mostrando efectos lineales, positivos y negativos, respectivamente, así como un efecto cuadrático negativo del factor

x_wAL y una interacción entre ambos factores (Tabla 1). Mientras que la adición de goma arábica favoreció la reducción de la higroscopicidad del polvo, la aplicación de un pretratamiento produjo el efecto contrario (Cozic et al., 2009; Gabas et al., 2007). Por otro lado, la higroscopicidad del producto evolucionó de distinto modo frente a la variación de humedad, en función del contenido en solutos. Mientras que en ausencia de solutos una reducción de x_wAL conllevó un aumento de la higroscopicidad, la adición de solutos implicó que a medida que se redujo la humedad del producto antes de ser liofilizado, la higroscopicidad disminuía ligeramente, en este sentido, la incorporación de solutos parece aún más recomendable para muestras predeshidratadas.

Optimización múltiple del proceso

Con el fin de identificar las condiciones del proceso más adecuadas, se llevó a cabo una optimización múltiple a partir de los modelos que se muestran en la Tabla 1. De acuerdo con el resultado obtenido, el hecho de incorporar un 9% de goma arábica y predeshidratar el producto hasta alcanzar un 65% de humedad previamente a su liofilización, fueron las condiciones de proceso que permitieron maximizar la actividad antioxidante del polvo y la fuerza máxima necesaria para comprimirlo, al mismo tiempo que minimizar su higroscopicidad y diferencia de color asociada al proceso.

CONCLUSIONES

La aplicación de un proceso de secado por métodos combinados, basado en el empleo de energía microondas y una posterior etapa de liofilización, dio lugar a la obtención de kiwi en polvo de calidad. Este proceso fue favorable respecto a la textura e higroscopicidad de las muestras, no viéndose afectada la actividad antioxidante en gran medida. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el proceso planteado en el presente estudio se presenta como una alternativa interesante a la liofilización convencional, que podría reducir los costes del proceso sin repercutir excesivamente en la calidad del producto.

REFERENCIAS

- Benlloch-Tinoco, M., Varela, P., Salvador, A., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Effects of microwave heating on sensory characteristics of kiwifruit puree. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 3021-3031.
- Cassano, A., Figoli, A., Tagarelli, A., Sindona, G., Drioli, E. 2006. Integrated membrane process for the production of highly nutritional kiwifruit juice. *Desalination*, 189: 21–30.

- Cozic, C., Picton, L., Garda, M., Marlhoux, F., Le Cerf, D. 2009. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloids*, 23: 1930–1934.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, k. Liu, R. 2002. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3010-3014.
- Duttaroy, A. K., & Jørgensen, A. (2004). Effects of kiwi fruit consumption on platelet aggregation and plasma lipids in healthy human volunteers. *Platelets*, 15(5), 287-292.
- Fahloul, D., Lahbari, M., Benmoussa, H., Mezdour, S. 2009. Effect of osmotic dehydration on the freeze drying kinetics of apricots. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 7: 117-121.
- Gabas, A.L., Telis, V.R.N., Sobral, P.J.A., Telis-Romero, J. 2007. Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*, 82: 246–252.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y. S., Haruenkit, R., Lojek, A., Cíz, M., Caspi, A., Libman, I., & Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74, 309–315.
- Jittra, S., Ningsanond, S. and Steve W.C. 2009. Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, 114, 1301–1307
- Kaya, A., Aydın, O., Dincer, I. 2008. Experimental and numerical investigation of heat and mass transfer during drying of Hayward kiwi fruits (*Actinidia Deliciosa* Planch). *Journal of Food Engineering*, 88: 323-330.
- Menlik, T., Özdemir, M.B., Kirmaci, V. 2010. Determination of freeze-drying behaviors of apples by artificial neural network. *Expert Systems with Applications*, 37: 7669–7677.
- Mosquera, L.H., Moraga, G., Martínez-Navarrete, N. 2010. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec.) powder. *Journal of Food Engineering*, 97: 72–78.
- Nishiyama, I., Fukuda, Nishiyama, I., Fukuda, T., Oota, T. 2005. Genotypic Differences in Chlorophyll, Lutein, and b-carotene contents in the fruits of actinidia species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6403-6407.
- Puupponen, P.; Hakkinen, S.; Aarni, M.; Suortti, T.; Lampi, A.; Euro, M.; Piironen, V.; Nuutila, A.; Oksman-Caldentey. 2003. Blanching and longterm freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 83: 1389-1402
- Telis, V. R. N.; Martínez – Navarrete, N. 2010. Application of compression test in analysis of mechanical and color changes in grapefruit juice powder as related to glass transition and water activity. *LWT - Food Science and Technology*.43: 2010. 744-751.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93: 713–718.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Bilbao-Saínz, C., Uribe, E., Lemus-Mondaca, R.,(2006). Empirical modeling of drying process for apple(cv. Granny Smith) slices at different air temperatures.

Tabla 1. Modelos obtenidos para las variables: higroscopicidad (H_i , g de agua/100 g sólidos secos), actividad antioxidante (AAO, mM Trolox/ g sólidos totales de kiwi), diferencia de color (ΔE) y fuerza de compresión ($F_{m\acute{a}x}$, N/ g producto). Se incluyen valores del coeficiente de regresión ajustado ($R^2_{aj.}$) y la raíz cuadrada media del error (RMSE).

Variable Respuesta	Modelo	$R^2_{aj.}$	RMSE
Higroscopicidad	$H_i = -66,40 + 3,36x_{WAL} - 3,90GA - 0,03x_{WAL}^2 + 0,05x_{WAL} \cdot GA$	0,848	23,610
Actividad Antioxidante	$AAO = -575,53 + 17,30x_{WAL} + 1,20GA - 0,12x_{WAL}^2 - 0,13GA^2$	0,848	0,334
Diferencia de color	$\Delta E = -5,24 + 0,34x_{WAL} + 0,98GA$	0,858	0,183
Fuerza máxima	$F_{m\acute{a}x} = 246,70 + 84,13GA - 2,09GA^2$	0,821	17,539

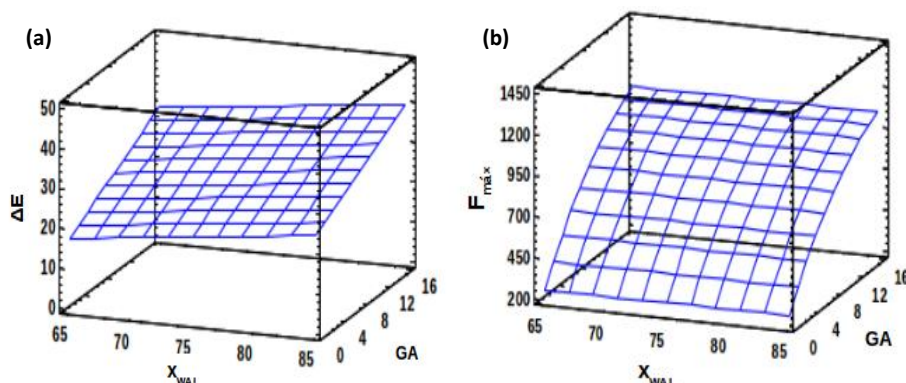


Figura 1. (a) Superficie de respuesta de la diferencia de color asociada al proceso de secado combinado (ΔE) y (b) de la fuerza máxima ($F_{m\acute{a}x}$, N/g de muestra) obtenida a partir del ensayo de compresión en función de la goma arábica (GA) añadida y de la humedad alcanzada ($x_{w,AL}$) durante el pretratamiento por microondas de la muestra.

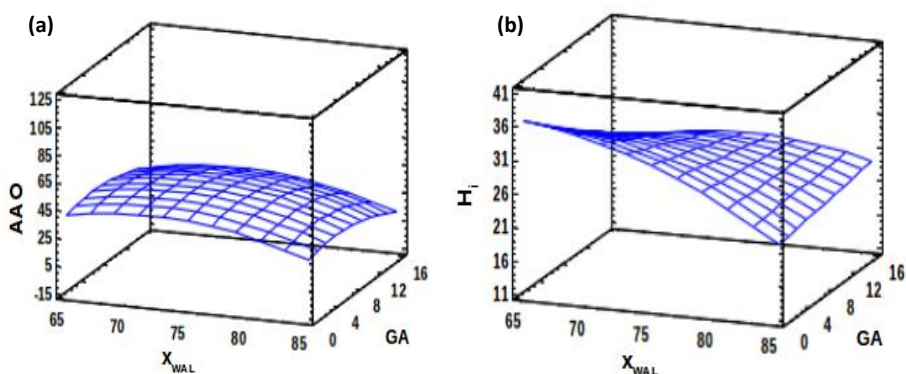


Figura 2. (a) Superficie de respuesta de la actividad antioxidante (AAO, mM Trolox/ g sólidos totales de kiwi) y (b) de la higroscopicidad (H_i , g de agua/100 g sólidos secos) en función de la goma arábica (GA) añadida y de la humedad alcanzada ($x_{w,AL}$) durante el pretratamiento por microondas de la muestra.

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA MATURAÇÃO NO CONTEÚDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DE MIRTILO

Marta Coelho^{1*}, Sara Silva¹, Eduardo M. Costa, M^a Manuela Pintado¹

¹CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal,

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido um aumento da procura por alimentos que possam trazer benefícios para a saúde. Este aumento, traduziu-se na oportunidade de desenvolver novos alimentos, que geralmente são designados como alimentos funcionais (Goey *et al.*, 2013). Esta possibilidade de promover o bem-estar através dos produtos alimentares, levou a comunidade científica a aprofundar o conhecimento sobre quais os compostos bioactivos responsáveis pelos benefícios, bem como a desenvolver novas abordagens que permitam a sua incorporação em diversas matrizes (Espínet *et al.*, 2007; Hoekstra *et al.*, 2008). Os frutos vermelhos, nos quais se destaca o mirtilo, têm sido introduzidos nos hábitos alimentares na Europa, e por isso vários factores associados ao fruto, nomeadamente o impacto da maturação, ou ao seu processamento têm sido alvo de estudo.

O mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) é rico em compostos fenólicos como as antocianinas, antocianidinas, proantocianidinas, flavonois e flavan-3-óis, compostos que lhes conferem as propriedades antioxidantes benéficas que frequentemente lhe são atribuídas (Kalt, 2006). Embora esteja bem aceite que o perfil fenólico varia durante o processo de maturação, os dados existentes são escassos, pelo que se torna necessário aprofundar o conhecimento quando se visa a valorização do fruto através da maximização da sua fracção bioactiva.

A produção de mirtilo na Europa pode ocorrer entre os meses de Abril e Agosto. Os frutos do mirtilo amadurecem em média, 2 a 3 meses após a floração, dependendo no entanto, da cultivar e das condições climáticas, e do vigor da planta (Sousa *et al.*, 2006). A sua maturação é um fator importante porque determina o tempo esperado de armazenamento do fruto fresco e das suas propriedades bioactivas.

Deste modo, o presente trabalho tem como principal objectivo avaliar a variação da capacidade antioxidante, dos compostos fenólicos totais e da análise qualitativa e quantitativa de ácidos fenólicos e flavonóides durante a maturação do mirtilo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

O fruto *Vaccinium corymbosum* de quatro cultivares, Ozarkblue, Bluecrop, Goldtraube e Duke foram colhidos em Sever do Vouga e foram avaliados durante 5 fases de maturação: fruto verde com coroa vermelha, fruto cor-de-rosa, fruto maduro oriundo de um cacho com 25% dos frutos maduros, frutos maduros oriundos de cachos contendo 75% dos frutos maduros e frutos sobremaduros, i.e. frutos que caíram da árvore.

Extracção

Para avaliar a composição fitoquímica do mirtilo, homogenizou o fruto (10% (m/v)) com metanol (Panreac, Barcelona, Espanha) acidificado a 0,01% (v/v) com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) recorrendo, para isso, a um Ultra-turrax T18 (IKA, Staufen, Alemanha) – 60000 rpm durante 1 min. Após 12 h, centrifugaram-se os extractos (Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha) a 6026.g durante 5 min e o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro de 4-7 µm (Prat Dumas, Couze St. Front, France).

Atividade antioxidante – Método do ABTS

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do ABTS (Sigma, St. Louis, EUA), preparado tal como descrito por Gião *et al.*, 2007. Uma alíquota de 10 µl foi adicionada a 1 mL de solução de ABTS diluída e deixou-se a reação ocorrer durante 6 min a ocorrer. A densidade ótica (DO) foi quantificada pelo espectrofotómetro UV-mini 1240 (Shimadzu, Tokyo, Japão), a 734 nm e o ácido ascórbico foi utilizado como padrão para a curva de calibração compreendida entre 0,021-0,5 g.L⁻¹. A percentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com a equação 1, em que DO_{ABTS+} é a DO inicial da solução de ABTS e DO_{Amostra} corresponde à DO da mistura de ABTS com a amostra, avaliada após 6 min. Todas as análises foram efetuadas em triplicado e os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico equivalente por grama de biomassa fresca (mg equivalente ácido ascórbico por g peso fresco).

$$PI = \frac{DO_{ABTS+} - DO_{Amostra}}{DO_{ABTS+}} \times 100 \quad (1)$$

Fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos foi determinada adaptando o protocolo descrito por Singleton e Rossi (1965). A 50 µL de cada extrato e a água ultrapura (branco) adicionaram-se 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha) (0,25 M), 1

mL Na₂CO₃ (1 M) (Sigma, St. Louis, EUA) e 1,4 mL água destilada. Após uma hora de incubação da mistura a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) os fenólicos totais foram quantificados através da medição da DO, a 750 nm, usando um espectrofotómetro UV-mini 1240 (Shimadzu, Tokyo, Japão), sendo o branco estabelecido como o zero.

Para a curva de calibração construída entre os valores 0,015-1,00 g.L⁻¹, utilizou-se o ácido gálico como padrão. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado e os compostos fenólicos foram reportados como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de biomassa fresca.

HPLC

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonóides foi efectuada utilizando um cromatógrafo de fase reversa, com um sistema de detecção de fotodiodos (DAD) (Waters Série 600, Mildford, Massachusetts), equipado com uma coluna de fase reversa Symmetry C18 (250 x 4,6 mm de tamanho de partícula de 5 µm e poros de 125 Å, mantida a 30 °C) e uma pré-coluna com o mesmo enchimento. Um gradiente de eluição foi realizado através da variação da proporção de solvente A (água:metanol:ácido fórmico numa proporção de 92,5:5:2,5 (v/v)) e de solvente B (água:metanol:ácido fórmico, 50:25:25). A composição da fase móvel começou com solvente A a 100%, seguido de um aumento linear de solvente B de 0 até 60% em 60 min (0,65 mL.min⁻¹), 60 a 10% em 5 min (0,5 mL.min⁻¹) e 5-0% em 5 min (0,5 mL.min⁻¹). O volume de injeção foi de 40 µL. A detecção foi conseguida utilizando um detector DAD em medição de comprimentos de onda entre os 200 e os 600 nm em incrementos de 2 nm. Os espectros a 320 foram analisados por comparação dos tempos de retenção com os espectros de diversos padrões cromatográficos. Todas as soluções preparadas foram filtradas através de membranas de 0,45 µm (Fisher Scientific) e a fase móvel foi desgaseificada antes da injeção em HPLC. Todas as análises foram efectuadas em triplicado. Utilizaram-se como padrões os seguintes compostos fenólicos: ácido clorogénico, neoclorogénico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, miricetina, ácido protocatecuico, quercetina-3-D-galactosideo, quercetina-3-D-glucosideo (Sigma, St. Louis, Missouri).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maturação de um fruto é determinante para a qualidade deste no período pós-colheita. Assim sendo, durante o período de amadurecimento do mirtilo, avaliaram-se os parâmetros fitoquímicos, como a capacidade antioxidante total, compostos fenólicos totais e

posteriormente procedeu-se também à análise dos ácidos fenólicos e flavonóides presentes nos extractos metanólicos do mirtilo por HPLC. Os ensaios de maturação contemplaram 5 fases de maturação distintas do fruto: F1 – Fruto verde com coroa vermelha; F2 – Fruto cor-de-rosa; F3 – Fruto maduro oriundo de um cacho com 25% dos frutos maduros; F4 – Frutos maduros oriundos de cachos contendo 75% dos frutos maduros; F5 – Frutos sobremaduros, *i.e.* frutos que caíram da árvore. Os resultados obtidos confirmam os descritos por Fredes *et al.* (2012), confirmando que tanto a capacidade antioxidante total como o teor de fenólicos totais varia tanto com a cultivar como com o estado de maturação da mesma.

De um modo geral, a capacidade antioxidante total aumenta à medida que o fruto amadurece (Figura 1). Prior *et al.* (1998), refere que a maturação afecta, de forma positiva, o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante total. Como se pode verificar pela cultivar Goldtraube, na qual apresenta o dobro da capacidade antioxidante total no estado maduro quando comparado com o estado imaturo. A cultivar Bluecrop é a mais estável ao longo do processo, enquanto as cultivares Duke e Ozarkbue no último estágio de amadurecimento estudado (frutos maduros caídos do arbusto) apresentam uma redução na capacidade antioxidante de 24,1 e 35,0%, respetivamente. Relativamente aos resultados dos fenólicos totais (Figura 2), verificou-se que mais uma vez a cultivar Goldtraube aumentou com o amadurecimento do fruto, no entanto nas primeiras duas fases manteve-se estável, apresentando um aumento significativo na Fase F3. No caso da cultivar Duke, observou-se um comportamento similar embora, neste caso o aumento seja relativamente constante nas fases F3 e F4 e se verifique um decréscimo um pouco acentuado quando se considera a fase F4. Os resultados obtidos poderão estar relacionados com diferentes factores. É de notar que os compostos fenólicos e/ou antioxidantes têm diferentes comportamentos ao longo da maturação do fruto, dificultando a percepção de tendências gerais de comportamento (Castrejón *et al.*, 2008). O aumento dos açúcares e a diminuição dos ácidos, no decorrer da maturação, poderão estar relacionados com a hidrólise de polissacarídeos e a formação de açúcar como produto secundário da conversão dos ácidos orgânicos (Sousa *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2007), 2007). Por outro lado, o facto de ser um fruto com diferentes compostos biactivos, estes podem funcionar como interferentes nos testes utilizados (ex. açúcares) também devem variar ao longo do amadurecimento do fruto, podendo introduzir um desvio às medições, que não se encontra contemplado e dificulta a percepção das variações reais (Castrejón *et al.*, 2008; Vermerris e Nicholson, 2008).

A determinação dos compostos antioxidantes individuais foi feita por HPLC-DAD (Figura 3). Os dados indicam a presença em maior quantidade de ácidos fenólicos como o

ácido clorogénico e o gálico e de flavonoides como a quercetina-3-glucosídeo. Ao longo da maturação, observou-se uma diminuição destes compostos nas diferentes cultivares, sendo significativa ($P < 0,05$) apenas na cultivar Ozarkblue. Os resultados obtidos não estão de acordo com os resultados observados para a capacidade antioxidante total e o teor de fenólicos totais durante o amadurecimento das quatro cultivares. Vários autores têm reportado uma redução destes compostos, durante a maturação que é compensada por um aumento dos níveis de antocianinas presentes no fruto, o que poderá explicar o aumento dos compostos totais face à diminuição dos ácidos fenólicos e dos flavonóis (Kader *et al.*, 1996; Prior *et al.*, 1998; Castrejón *et al.*, 2008).

CONCLUSÃO

O estágio de maturação é um parâmetro determinante na quantidade de compostos fitoquímicos presentes no fruto, no entanto o tipo de cultivar influencia de forma marcante estas propriedades. De um modo geral a maximização do teor dos compostos fitoquímicos analisados observou-se para o fruto e proveniente de cachos com 75% de frutos maduros.

BIBLIOGRAFÍA

- Castrejón, A. D. R. (2007) *Phenolic profile and antioxidant activity of Highbush*. Agro-divulgação agro pós colheita
- Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L., Huyskens-Keil, S. 2008. blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry* 109: 564- 572.
- Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. 2007. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* 68:2986-3008.
- Fredes, Carolina., Montenegro, Gloria., Zoffoli, Juan Pablo., Gómez ,Miguel., Robert, Paz. (2012). *Polyphenol content and antioxidant activity of Maqui (Aristotelia chilensis [Molina] Stuntz) during fruit development and maturation central Chile*. *Chilean Journal of agriculture Research*. 72(4)
- Goey AK, Mooiman KD, Beijnen JH, Schellens JH, Meijerman I. 2013. Relevance of in vitro and clinical data for predicting CYP3A4-mediated herb-drug interactions in cancer patients. *Cancer Treat Rev*.
- Hoekstra J, Verkaik-kloosterman J, Rompelberg C, Kranem Hv, Zeilmaker M, Verhagen H, Jong. Nd. 2008. Integrated risk-benefit analyses: Method development with folic acid as example. *Food and Chemical Toxicology* 46:893-909.
- Gião MS, González-Sanjósé ML, Rivero-Pérez MD, Pereira CI, Pintado ME, Malcata FX. 2007. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(14):2638-2647.

Jakobek, L., M. Seruga, et al. (2007). *Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices*. *Deutsche Lebensmittel-Randschau* 103(2): 58-64.

Kalt, W. 2006. *Vaccinium berry crops and human health*. *Acta Horticulturae* 715:533-536.

Kader, F.; Rovel, B.; Girardin, M.; Metche, M., Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chemistry* 1996, 55, 35-40.

Prior, R. L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G.; Mainland, C. M., Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46, 2686-2693.

Sousa, M.B., Curado, T., Lavadinho, C. e Moldão-Martins, M. 2006. A survey of Quality Factors in Highbush and Rabbiteye Blueberry cultivars in Portugal. *Acta Horticulturae* 715: 567-572.

Sousa, M. B., Curado, T.; Vasconcelos, F. N., Trigo, M. J. (2007). *Mirtilo – Qualidade pós-colheita*, Folhas de Divulgação AGRO 556, N°. 8.

Vermerris, W., Nicholson, R. (2008). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science, USA, pp.276.

FIGURAS

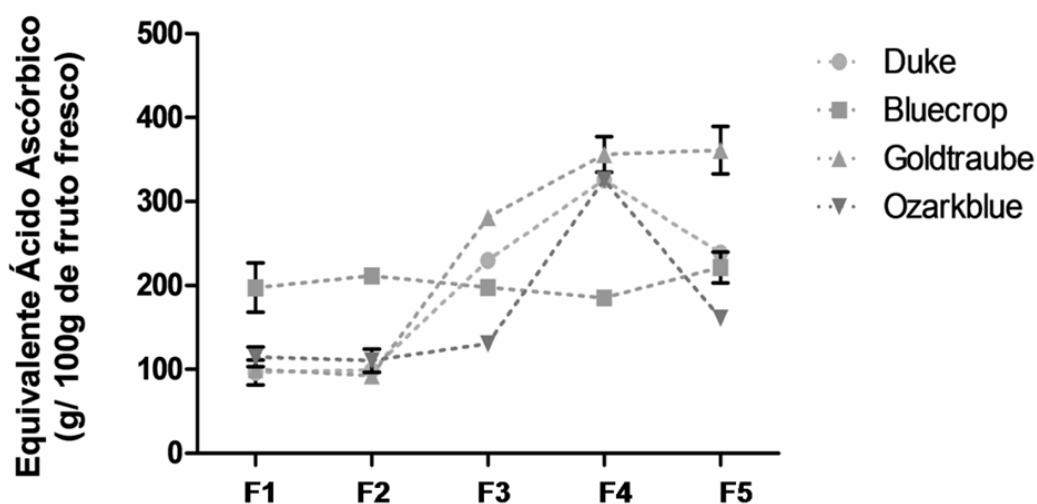


Figura 1- Variação da capacidade antioxidante total de acordo com os diferentes estados de maturação em estudo. Tire o título do gráfico basta estar na legenda

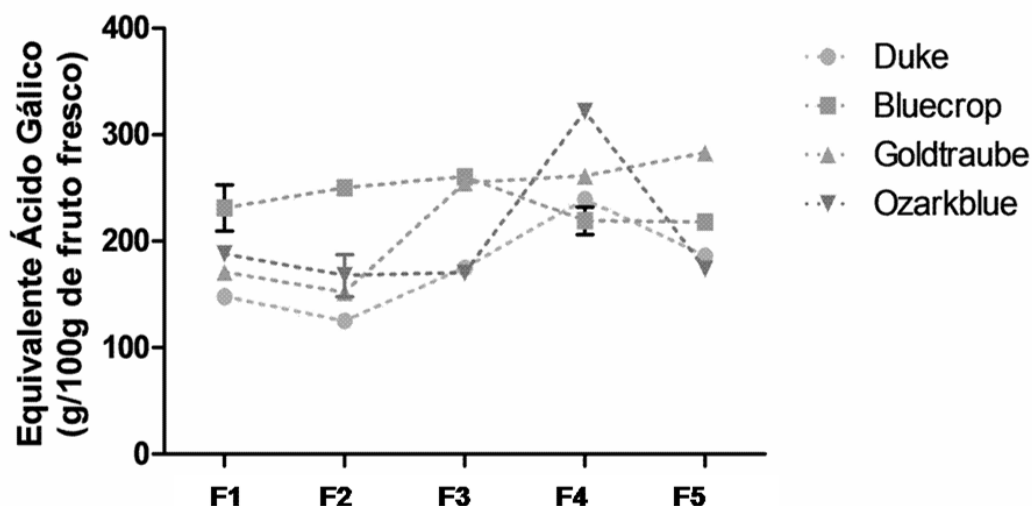


Figura 2 - Variação do teor de compostos fenólicos totais de acordo com os diferentes estados de maturação em estudo. Tire o título do gráfico basta estar na legenda

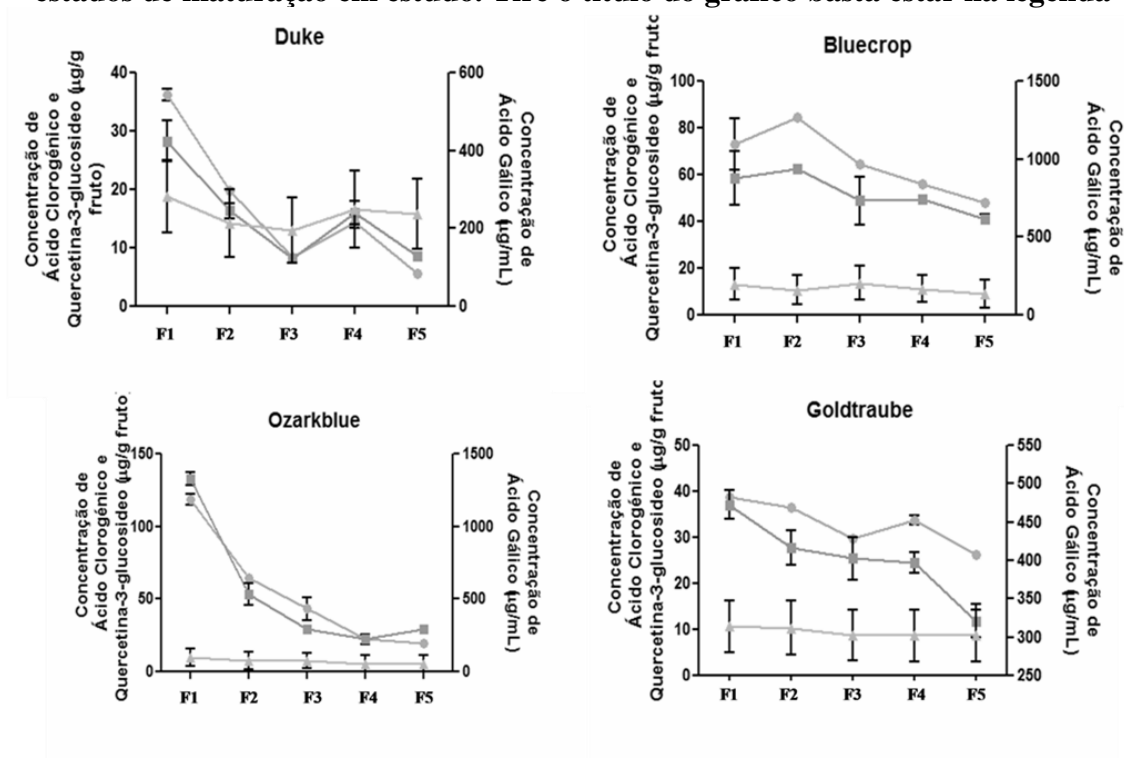


Figura 3 - Variação dos principais ácidos fenólicos e flavonóides durante o processo de amadurecimento em mirtilos das cultivares Duke, Ozarkblue, Bluecrop e Goldtraube. ● Ácido clorogénico; ■ Ácido Gálico; ▲ Quercetina-3-glucosídeo.

OPTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO FENÓLICA DE EXTRACTOS AQUOSOS DE MIRTILO (FOLHA E FRUTO SECO)

S. Silva¹, Coelho M.¹, Costa E.M., Pereira M.F.¹, Costa M.R.¹, Pintado M¹.

¹CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, têm surgido diversas evidências epidemiológicas que associam uma dieta rica em frutas e vegetais à prevenção de diversas patologias, demonstrando-se que os compostos fenólicos presentes nestes tecidos, são responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos benéficos destes alimentos (Gibson et al. 2000; Lee et al. 2002; Szajdek et al. 2008; Fraga 2009).

Os mirtilos têm sido reportados como sendo uma boa fonte de compostos fenólicos, os quais incluem uma elevada gama de antocianinas (monorabinosídeos, monoglicosídeos e monogalactosídeos de cianidina, delphinidina, malvidina e peonidina) e outros flavonoides (*e.g.* glucosídeos, galactosídeos e rhamnosídeos de catequina, epicatequina, quercetina) enquanto as folhas têm sido descritas como ricas em ácidos hidroxicinâmicos, particularmente o ácido clorogénico (Kader et al. 1996; Riihinen et al. 2008).

Atendendo à elevada aceitação, por parte do consumidor, de infusões e ao potencial funcional dos diferentes tecidos de *V. corymbosum*, o presente trabalho visou desenvolver infusões e decocções de folhas e de mirtilo seco ricas em compostos bioactivos e demonstrar o seu potencial antioxidante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Mirtilos de quatro cultivares distintas (*Vaccinium corymbosum* cultivares Duke, Bluecrop, Goldtraube e Ozarkblue) foram colhidos em Sever do Vouga e mantidos a -20 °C até serem secos. A secagem foi efectuada utilizando um desidratador alimentar (N3040, Telluer SA, França) e os frutos das diferentes cultivares foram misturados (1:1:1:1) antes de serem reduzidos a pó (A327R1, Moulinex, Espanha).

As folhas de mirtilo secas, adquiridas à empresa Mirtilusa Lda. (Sever do Vouga, Portugal), foram transformadas em pó.

Preparação dos extractos

Infusões

Água desionizada, aquecida a ca. 100 °C, foi adicionada ao pó de folha e de mirtilo de modo a obter suspensões de 2% (m/v) e 5% (m/v), respectivamente. Estas suspensões foram agitadas (500 rpm durante 15, 30, 45 e 60 min) e centrifugadas (Universal 320R Zentrifugen Hettich, Tuttlingen, Alemanha) durante 5 min a 6026 g. O sobrenadante foi recolhido para análise.

Fervuras

Soluções de folha seca (2% (m/m)) e mirtilo seco (5% (m/m)) foram aquecidas a 100 °C e mantidas a esta temperatura durante 15, 30, 45 e 60 min, sob agitação (500 rpm). Após este período, as soluções foram centrifugadas (Universal 320R Zentrifugen Hettich, Tuttlingen, Alemanha) durante 5 min a 6026 g e o sobrenadante foi recolhido para análise.

Capacidade Antioxidante total

A capacidade antioxidante total dos extractos foi determinada utilizando o método do catião radical ABTS^{•+} (Gião et al. 2007). Aliquotas de 10 µL das amostras foram adicionadas à solução de ABTS^{•+} (diluída de modo a obter uma densidade optica (DO), a 734 nm, de $0,700 \pm 0,020$ (Uvmini 1240, Shimadzu, Japão)) e deixou-se a reacção ocorrer durante 6 min. A percentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com a equação 1, em que $DO_{ABTS\bullet+}$ é a DO inicial da solução de ABTS e $DO_{Amostra}$ corresponde à DO da mistura de ABTS com a amostra, avaliada após 6 min. Os resultados foram convertidos em g/L de equivalente de ácido ascorbico utilizando uma curva de calibração. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

$$PI = \frac{DO_{ABTS\bullet+} - DO_{Amostra}}{DO_{ABTS\bullet+}} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

Teor de Fenólicos Totais

De modo a avaliar o teor de fenólicos totais dos extractos produzidos foi utilizado o método de Folin Ciocalteu, tal como descrito por Gião et al. (2007). A 50 µL aliquotas das amostras foram adicionados 50 µL do reagente de Folin Ciocalteu (Merk, Darmstadt, Alemanha), 1 mL de carbonato de sódio (75 g/L, Sigma, St. Louis, EUA) e 1,4 mL de água desionizada. Após 1 h a DO a 750 nm foi medida (Uvmini 1240, Shimadzu, Japão) e os resultados convertidos em g/L de equivalente de ácido gálico. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

Teor em Antocianinas Monoméricas

O teor de antocianinas monoméricas foi determinado de acordo com o método do pH diferencial (Jakobek et al. 2007). Para efectuar esta determinação, foram preparadas duas soluções: (i) cloreto de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,4 M, pH $1,0 \pm 0,05$; (ii) acetato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,04 M, pH $4,5 \pm 0,05$. As amostras foram misturadas com as soluções e, após 20 min, a DO foi medida (Uvmini 1240, Shimadzu, Japão) a 520 e 700 nm. Os resultados, expressos em equivalentes de cianidina-3-glucosídeo (C3glu) foram calculados de acordo com a equação 2 em que TAT é o teor de antocianinas totais (mg/L), PM é o peso molecular da C3glu (449,2 g/mol), FD é o factor de diluição, ϵ é o coeficiente de extinção molar (269 000 L/mol cm) e L corresponde ao percurso óptico (1 cm). Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

$$TAT = \frac{[(OD_{520\text{ nm}} - OD_{700\text{ nm}})_{pH\ 1,0} - (OD_{520\text{ nm}} - OD_{700\text{ nm}})_{pH\ 4,5}] \times PM \times FD}{\epsilon \times L}$$

HPLC

A identificação dos diferentes compostos fenólicos presentes em cada um dos extractos foi efectuada por HPLC de fase reversa com um sistema detector de fotodiodos (DAD) (Waters Série 600, Mildford, Massachusetts) equipado com uma coluna de fase reversa Symmetry C18 de fase inversa (250 x 4,6 mm de tamanho de partícula de 5 μm e poros de 125 Å, mantida a 30 °C) e uma pré-coluna com o mesmo enchimento. A separação cromatográfica foi conseguida utilizando um gradiente linear de dois solventes (A- 5% metanol, 2,5% ácido fórmico e 92,5% água ultra-pura; B – 25% metanol, 25% ácido fórmico e 50% água ultra-pura) nas seguintes condições: gradiente linear de 0 a 60% de solvente B em 60 min (0,65 mL/min), 60 a 10% em 5 min (0,5 mL/min) e 5-0% em 5 min (0,5 mL/min). O volume de injeção foi de 40 μL . A detecção foi conseguida utilizando um detector DAD em medição de comprimentos de onda entre os 200 e os 600 nm em incrementos de 2 nm. Os espectros a 320 e a 520 nm foram analisados por comparação dos tempos de retenção com os espectros de diversos padrões cromatográficos. Todas as análises foram efectuadas em triplicado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que respeita às infusões de folha, os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (Tabela 1) dos extractos aumenta directamente como o tempo de extracção até aos 45 min, pois aos 60 min tanto a infusão como a decocção registaram um decréscimo da capacidade antioxidante. Geralmente, uma extracção sólido – líquido exige a difusão dos componentes solúveis, através das partículas sólidas para o líquido logo, o aumento do tempo de contacto entre as duas fases pode explicar os resultados obtidos até aos 45 min (Dutta 2007). Por outro lado, os compostos fenólicos são conhecidos por serem sensíveis à temperatura e tempo de extracção, por isso é possível que, durante o processo de extracção, enquanto alguns compostos estão a ser extraídos, outros estão a ser degradados pelo efeito da persistência da temperatura, explicando assim a redução verificada aos 60 min.

Quando considerando os resultados obtidos para as extracções de fruto (Tabela 2), verificamos que, ao contrário do que se verificou no caso da folha, os compostos são fortemente afectados pela temperatura de extracção mesmo para tempos mais reduzidos. De facto, a variação significativa observa-se com a redução da capacidade antioxidante e do teor de fenólicos entre os 15 e os 30 min. Como a composição fenólica do fruto é muito diferente da constituição da folha, sendo as antocianinas (um grupo de compostos particularmente susceptíveis à degradação térmica) um dos principais constituintes do fruto fresco, a temperatura utilizada na extracção tem um papel mais determinante na degradação dos compostos que na folha, e a partir dos 30 minutos o efeito do tempo deixa de ser significativo (Riihinen et al. 2008).

Tendo em conta os resultados obtidos, seleccionou-se como sendo os extractos de maior interesse funcional: Infusão de folha, 45 min (IF); Decocção de folha, 30 min (DF); Infusão de mirtilo, 15 min (IM); Decocção de mirtilo, 15 min (DM). Estes extractos foram analisados quanto à sua composição fenólica tendo-se verificado que, para todos os extractos o principal constituinte era o ácido clorogénico (122 ± 0.1 , 112 ± 0.3 , 43.3 ± 0.5 e 52.4 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Para além deste composto foram ainda detectados os seguintes compostos: ácido cafeico ($17,5 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$ em IM, $88,2 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$ em IF e $107,1 \pm 1,6$ em DF), quercetina-3-glicosídeo ($43,5 \pm 5,3$ e $41,7 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$ em IF e DF, respectivamente) e ácido neoclorogénico ($7,7 \pm 0,01$; $8,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, foram detectadas algumas antocianinas que fazem parte da constituição do extracto embora em concentrações bastante reduzidas, as antocianinas são sensíveis a temperaturas elevadas pelo que a sua intervenção no processo de extracção poderá ter provocado a degradação

destes compostos, nomeadamente a cianidina-3-galactosídeo (IF e DF), cianidina-3-arabinosídeo (IF e DF), peonidina-3-glicosídeo (IM, IF e DF), delphinidina-3-galactosídeo (IM e DM) e malvidina-3-glucosídeo (IM e FM).

Em suma, pode-se concluir que os extractos de mirtilo (fruto e folha) produzidos no âmbito deste trabalho possuem um potencial bioactivo interessante, sendo ricos em compostos fenólicos (particularmente ácido clorogénico) que possuem uma capacidade antioxidante extensamente reportada. Adicionalmente, considerando o cariz não tóxico da tipologia de extracção empregue, os presentes extractos podem-se revelar como sendo de interesse para incorporação em alimentos de modo a reforçar a sua funcionalidade.

BIBLIOGRAFÍA

- Dutta, B. K. (2007). Principles of mass transfer and separation processes. New Delhi, India, Prentice-Hall of India.
- Fraga, C. G. (2009). Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology. New Jersey, USA, John Wiley & Sons Inc.
- Gião, M. S., M. L. González-Sanjosé, et al. (2007). "Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(14): 2638-2647.
- Gibson, G. R. and C. M. Williams (2000). Functional foods: Concept to product. Cambridge, England, Woodhead Publishing Limited.
- Jakobek, L., M. Seruga, et al. (2007). "Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices." *Deutsche Lebensmittel-Randschau* 103(2): 58-64.
- Kader, F., B. Rovel, et al. (1996). "Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.)." *Food Chemistry* 55(1): 35-40.
- Lee, J., R. W. Durst, et al. (2002). "Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments." *Journal of Food Science* 67(5): 1660-1667.
- Riihinen, K., L. Jaakola, et al. (2008). "Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*)." *Food Chemistry* 110(1): 156-160.
- Szajdek, A. and E. J. Borowska (2008). "Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review." *Plant Foods for Human Nutrition* 63(4): 147-156.

Tabela 1 – Variação da capacidade antioxidante (média ± desvio padrão) e do teor de fenólicos totais (média ± desvio padrão) nos extractos de folha seca de acordo com as diferentes condições de extracção.

	Tempo de Extracção	Capacidade Antioxidante Total ¹	Teor de Fenólicos Totais ²
Infusão de Folha	15	2,46 ± 0,56	1,20 ± 0,17
	30	4,96 ± 0,53	1,89 ± 0,05
	45	9,43 ± 1,61	2,63 ± 0,22
	60	6,65 ± 0,69	2,47 ± 0,08
Decocção de Folha	15	6,46 ± 0,96	2,07 ± 0,11
	30	6,83 ± 0,22	2,33 ± 0,15
	45	8,05 ± 1,30	2,63 ± 0,24
	60	5,72 ± 1,24	2,04 ± 0,38

¹, expresso em g/L de equivalente de ácido ascórbico; ², expresso em g/L de equivalente de ácido gálico

Tabela 2 – Variação da capacidade antioxidante (média ± desvio padrão), do teor de fenólicos (média ± desvio padrão) e antocianinas totais (média ± desvio padrão) nos extractos de fruto seco de acordo com as diferentes condições de extracção.

	Tempo de Extracção	Capacidade Antioxidante Total ¹	Teor de Fenólicos Totais ²	Teor de Antocianinas Totais ³
Infusão de Fruto	15	1,29 ± 0,12	0,54 ± 0,02	1,93 ± 0,20
	30	0,66 ± 0,06	0,49 ± 0,01	0,99 ± 0,18
	45	0,62 ± 0,05	0,44 ± 0,02	0,87 ± 0,20
	60	0,59 ± 0,06	0,46 ± 0,02	0,88 ± 0,07
Decocção de Fruto	15	0,42 ± 0,03	0,60 ± 0,15	0,60 ± 0,03
	30	0,46 ± 0,07	0,37 ± 0,03	0,51 ± 0,05
	45	0,50 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,42 ± 0,05
	60	0,50 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,41 ± 0,03

¹, expresso em g/L de equivalente de ácido ascórbico; ², expresso em g/L de equivalente de ácido gálico; ³, expresso em mg/L de equivalente de C3glu

IMPACTO DA METODOLOGIA DE CONGELAMENTO NO PERFIL FITOQUIMICO DE DUAS CULTIVARES DE MIRTILO (VACCINIUM CORYMBOSUM)

Marta Coelho^{1*}, Sara Silva¹, Helena Gomes², Pilar Morais² e M. Manuela Pintado¹

¹CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal,

²Frulact S.A., Rua do Outeiro, 589, 4475-150 Gemunde, Maia, Portugal

INTRODUÇÃO

O *Vaccinium corymbosum* (espécie de mirtilo americano) é produzido desde 1986 em Sever do Vouga, Portugal. Com formas e dimensões variadas, este fruto é rico em compostos bioativos, maioritariamente, antocianinas e ácidos fenólicos, o que lhe confere propriedades benéficas à saúde (Smith *et al.*, 2000; Seeram, 2008).

Os antocianinas são pigmentos hidrossolúveis, pertencentes à classe dos flavonoides, sendo estáveis entre os valores de pH 1 e 4 (Swartz *et al.*, 2009). As antocianinas mais comuns no mirtilo são monoglucosídeos, monoarabinosídeos e monogalactesídeos de cianidina, delfinidina, petunidina, malvidina pelargonidina e peonidina. O teor de compostos fenólicos neste fruto varia não só com o local de cultivo, com os fatores climáticos, mas também com a cultivar (Chitarra *et al.*, 2005).

Sendo o mirtilo rico em compostos bioativos e um fruto sazonal, é importante maximizar o teor destes compostos ao longo do tempo de vida não só do fruto mas também destes compostos.

A congelação é uma das metodologias mais utilizadas para conservar este fruto, pois aumenta o tempo de conservação por redução da atividade da água do mirtilo e permite preservar os compostos fitoquímicos (Davey *et al.*, 2000).

Assim, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o impacto de dois tipos de congelação (leito fluidizado e congelação passiva), sobre as propriedades fitoquímicas de duas cultivares de mirtilo (Duke e Goldtraube).

METODOLOGIA

O trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades biológicas de duas cultivares de *V. corymbosum*, Duke e Goldtraube, quando armazenados sob congelação durante 6 meses.

Após a colheita, os frutos foram congelados por dois métodos distintos: passivo (em câmara de congelação a -18 °C) e ativo (em túnel de congelação por ar forçado a -35 °C). Os frutos congelados foram armazenados a -18 °C em câmaras de congelação e foram retirados para análise ao longo do período de conservação. Os frutos foram analisados imediatamente após a congelação e após armazenamento por 3 e 6 meses, tendo-se considerado o fruto fresco como um controlo.

Extracção

Para determinar os compostos bioactivos presentes no fruto, os mirtilos foram extraídos do seguinte modo: os mirtilos de cada cultivar foram homogenizados (10% (m/v)) com metanol (Panreac, Barcelona, Espanha) acidificado com 0,01% de HCL 32% (Merk, Darmstadt, Alemanha) utilizando um Ultra-Turrax T18 (IKA, Staufen, Alemanha) a 60000 rpm durante 1 min. A extracção foi deixada a decorrer *overnight* após o que se efectuou uma centrifugação (Universal 320R Hettich, Tuttlingen, Alemanha) a 6026.g durante 5 min. Finalmente, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro com uma porosidade de 4 - 7 µm (Prat Dumas, Couze St. Font, França). As extracções foram efetuadas em triplicado.

Atividade antioxidante – Método do ABTS

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do ABTS (Sigma, St. Louis, EUA), preparado tal como descrito por Gião *et al.*, 2007. Uma alíquota de 10 µl foi adicionada a 1 mL de solução de ABTS diluída e deixou-se a reação ocorrer durante 6 min a ocorrer. A densidade ótica (DO) foi quantificada pelo espectrofotómetro UV-mini 1240 (Shimadzu, Tokyo, Japão), a 734 nm e o ácido ascórbico foi utilizado como padrão para a curva de calibração compreendida entre 0,021-0,5 g.L⁻¹. A percentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com a equação 1, em que DO_{ABTS•+} é a DO inicial da solução de ABTS e DO_{Amostra} corresponde à DO da mistura de ABTS com a amostra, avaliada após 6 min. Todas as análises foram efetuadas em triplicado e os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico equivalente por grama de biomassa fresca (mg equivalente ácido ascórbico por g peso fresco).

$$PI = \frac{DO_{ABTS\bullet+} - DO_{Amostra}}{DO_{ABTS\bullet+}} \times 100 \quad (1)$$

Fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos foi determinada adaptando o protocolo descrito por Singleton e Rossi (1965). A 50 µL de cada extrato e a água ultrapura (branco) adicionaram-se 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha) (0,25 M), 1

mL Na₂CO₃ (1 M) (Sigma, St. Louis, EUA) e 1,4 mL água destilada. Após uma hora de incubação da mistura a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) os fenólicos totais foram quantificados através da medição da DO, a 750 nm, usando um espectrofotómetro UV-mini 1240 (Shimadzu, Tokyo, Japão), sendo o branco estabelecido como o zero.

Para a curva de calibração construída entre os valores 0,015-1,00 g.L⁻¹, utilizou-se o ácido gálico como padrão. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado e os compostos fenólicos foram reportados como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de biomassa fresca.

Antocianinas totais

As antocianinas monoméricas totais foram determinadas de acordo com o método descrito por Jakobek *et al.*(2007). A cada 250 µL de extrato adicionou-se 750 µL ou do tampão de cloreto de potássio (0,4 M KCl) a pH 1,0 ± 0,05 e acetato de sódio (0,04 M CH₃CONa.3H₂O) a pH 4.5 ± 0,05 perfazendo um volume de 1 mL. Os valores de DO foram medidos a 520 e 700 nm nos dois tampões após 15 minutos de reação. Todas as análises foram efetuadas em triplicado e os resultados foram expressos de acordo com a equação mencionada, e de seguida convertidas em mg de cianidina-3-glucósido por 100 g de peso fresco.

$$A = (A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 1,0 - (A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 4,5$$

$$c \text{ (mg/L)} = (A \times \text{peso molecular} \times \text{factor de diluição} \times 1000) / (\epsilon L)$$

O peso molecular da cianidina-3-glucósido é 433,0 g.mol⁻¹ e o coeficiente de extinção molar (ε) é 26 900 mol.L⁻¹.

HPLC

A identificação e quantificação dos compostos foi efetuada utilizando um cromatógrafo de fase reversa, com um sistema de deteção de fotodiados (DAD) (Waters Série 600, Mildford, Massachusetts), equipado com uma coluna de fase reversa Symmetry C18 (250 x 4,6 mm de tamanho de partícula de 5 µm e poros de 125 Å, mantida a 30 °C) e uma pré-coluna com o mesmo enchimento. Um gradiente de eluição foi realizado através da variação da proporção de solvente A (água:metanol:ácido fórmico numa proporção de 92,5:5:2,5 (v/v)) e de solvente B (água:metanol:ácido fórmico, 50:25:25). A composição da fase móvel começou com solvente A a 100%, seguido de um aumento linear de solvente B de 0 até 60% em 60 min (0,65 mL.min⁻¹), 60 a 10% em 5 min (0,5 mL.min⁻¹) e 5-0% em 5 min (0,5 mL.min⁻¹). O volume de injeção foi de 40 µL. A deteção foi conseguida utilizando um

detector DAD em medição de comprimentos de onda entre os 200 e os 600 nm em incrementos de 2 nm. Os espectros a 320 e a 520 nm foram analisados por comparação dos tempos de retenção com os espectros de diversos padrões cromatográficos. Todas as soluções preparadas foram filtradas através de membranas de 0,45 µm (Fisher Scientific) e a fase móvel foi desgaseificada antes da injeção em HPLC. Todas as análises foram efectuadas em triplicado. Foram utilizados como padrões o cloreto de delfinidina-3-Orto-glucosídeo, cloreto de malvidina-3-Orto-glicosídeo, cloreto de malvidina-3-Orto-glicosídeo (Extrasynthese, Lyon, France), cloreto de petunidina-3-Orto-glucosídeo, (Polyphenols, Sandnes, Norway). cloreto de delfinidina-3-Orto-galactosídeo (Applichem, Darmstadt, Germany).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do impacto do congelamento sobre os mirtilos de duas cultivares (Duke e Goldtraube), foi efectuada considerando o impacto destes processos nas características fitoquímicas do fruto (capacidade antioxidante, antocianinas e fenólicos totais).

Os valores obtidos dos parâmetros avaliados em frutos com 6 meses de armazenamento encontram-se na tabela 1.

A variação do teor de compostos fenólicos ao longo do tempo de armazenamento, a -18 °C, de mirtilo congelado em leite fluidizado e de modo passivo, mostra uma diminuição significativa da quantidade de compostos fenólicos durante o período de armazenamento do fruto.

No caso das cultivares congeladas de forma passiva, verificou-se uma redução de c. 46%. Na cultivar Goldtraube congelada por leite fluidizado, observou-se também um decréscimo em ambos os parâmetros. A temperaturas negativas as reações químicas, embora mais lentamente, continuam a decorrer, o que poderá explicar a degradação dos compostos fitoquímicos observados, tal como Davey e os seus colaboradores reportam (Davey *et al.*, 2000). No entanto, a cultivar Duke aquando congelada em leite fluidizado, promoveu um aumento significativo do teor de fenólicos totais de 37% e de antocianinas monoméricas totais de 91%. Sendo cultivares diferentes, o tipo de compostos presentes e as características do tecido de revestimento do fruto também pode ser diferente. Além disso, algumas reações continuam a ocorrer após o período de colheita. Assim, o congelamento rápido pode ter provocado danos nos tecidos e um aumento da disponibilidade e extração dos compostos (De Ancos *et. al.*, 2000; Piljac-Žegarac e Šamec, 2011).

Após o congelamento de forma passiva, tanto a cultivar Duke como a Goldtraube apresentam reduções de antocianinas monoméricas totais de 27 e 32%, respetivamente. Os mirtilos da cultivar Goldtraube similarmente ao que se verificou para a cultivar Duke, apresentam reduções de c. 64-84% no teor de antocianinas totais após 3 meses de armazenamento, não se verificando diferenças significativas entre as metodologias de congelação. A degradação das antocianinas aparentemente é maior, em espaço de tempo mais curto do que os fenólicos totais, tal facto pode ser causado por ação de enzimas e de compostos fenólicos presentes que conduzem a reações de oxidação (Pinelo *et. al.*, 2004). Outras perdas significativas de antocianinas durante o armazenamento por congelação são reportadas (Chaovanalikit, 2004).

Após 6 meses de armazenamento do mirtilo congelado, a cultivar Duke apresentou uma redução de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de c. de 86%. No caso dos mirtilos da cultivar Goldtraube, verificam-se reduções após 6 meses de armazenamento de c. 93-96%. Após este tempo, os mirtilos desta cultivar não apresentam diferenças significativas entre os diferentes processos de congelamento.

Os resultados verificados por HPLC encontram-se na tabela 2. Verificou-se que o composto presente em maior quantidade é a malvidina-3-galactosideo em ambas as cultivares. Os resultados do HPLC vieram ao encontro dos resultados obtidos anteriormente. No caso da cultivar Duke, observou-se um aumento significativo deste composto após a utilização dos dois métodos de congelamento, enquanto que na cultivar Goldtraube observou-se uma diminuição mas não significativa.

CONCLUSÃO

Após 6 meses de congelação, verificaram-se reduções significativas relativamente ao teor de fenólicos e de antocianinas totais nas duas cultivares congeladas por dois métodos diferentes, congelação passiva e congelação de leito fluidizado. Apesar disso e de um modo geral, a congelação por leito fluidizado parece ter uma maior eficácia na preservação dos compostos fenólicos desta cultivar. O método de congelação utilizado influencia a degradação dos compostos fitoquímicos e por conseguinte a qualidade do mirtilo. Assim sendo, tendo em conta os dados recolhidos, o método escolhido para armazenar o fruto de modo a promover a manutenção dos compostos fitoquímicos seria a congelação por leito fluidizado, com recomendação de períodos inferiores a 3 meses.

BIBLIOGRAFÍA

- Chitarra, M., I. F.; Chitarra, A., B. (2005): *Pós-Colheita de Frutos e Hortalças: Fisiologia e Manuseio*. Lavras, ESAL/FAEPE.
- Chaovanalikit A., Wrolstad R.E. (2004): *Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries*. Journal of Food Science, 69: 73–83.
- Davey M. W., Montagu M. V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. (2000): *Plant Lascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*. J Sci Food Agric; 80:825-860.
- De Ancos B, Ibanez E, Reglero G, Cano MP. (2000): *Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit*. J Agric Food Cem 48(3):873-879.
- Jakobek, L., M. Seruga, et al. (2007). *Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices*. Deutsche Lebensmittel-Randschau 103(2): 58-64.
- Gião, M. S., M. L. González-Sanjósé, et al. (2007): *Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features*. Journal of the Science of Food and Agriculture 87(14): 2638-2647.
- Piljac-Žegarac J e Šamec D. (2011): *Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures*. Food Res Int 44(1):345-350
- Schwartz SJ, Von Elbe JH, Giusti M. (2008): *Colorants*. In Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR, editors. Fennema's food chemistry. 4th ed. Boca Raton: CRC Press. P. 571-638.
- Seeram NP. (2008): *Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health performance, and disease*. J. Agric Food Chem 56(3):627-629
- Smith MAL, Marley KA, Seigler D, Singletary KW, Melanie B. (2000): *Bioactive properties of wild blueberry fruits*. J. Food Sci 65(2):352-356

Tabela 1- Resultados de capacidade antioxidante total compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais (expressas em mg/100g de fruto fresco). (média ± desvio padrão), do fruto fresco, 24 h, 3 meses e 6 meses após a congelação,

		Capacidade Antioxidante		Fenólicos totais		Antocianinas monoméricas totais	
		(mg/100g de fruto fresco)		(mg/100g de fruto fresco)		(mg/100g de fruto fresco)	
		Ativo	Passiva	Ativo	Passiva	Ativo	Passiva
Duke	0	151,1 ±7,4	286,8±0,2	177,2±3,9	177,2±12,2	138,8±4,2	138,8±0,3
	24 h	289,6 ±3,3	164,6±6,3*	243,3±1,2	94,2±11,4*	146,3±4,5	94,2±3,0
	3 meses	36,2±8,6	24,6±6,0	36,2±0,6	4,0 ±4,6	60,5±0,4	50,3±1,1
	6 meses	0,1±0,2	0,1±10,4	0,2±4,9	0,3 ±10,1	0,8±8,5	0,75±2,6
	0	252,2±2,06	288,8±0,9	155,9±5,9	259,7±5,2	120,6±3,6	120,6±2,3
Goldtraube	24 h	159,1 ±13,08	152,5±11,6*	216,1±4,1	246,7±3,5	94,4±2,9	85,3±2,6
	3 meses	73,6±0,32*	65,4±10,1	11,8±2,4*	9,7 ±3,1	19,4±4,5*	20,1±2,6*
	6 meses	0,2±1,50*	0,3±8,0	0,1±4,4	0,1±12,0	1,2±5,6	1,5±2,3

*nível de significância, $p < 0,05$

Tabela 2- Análise quantitativa de compostos fenólicos individuais mais representativos (média ± desvio padrão), de mirtilos de duas cultivares após congelação por leito fluidizado e congelação passiva.

		Fruto Fresco	Cong. Leito Fluidizado	Cong. Passivo
		(mg/100g de fruto fresco)		
Duke	Del-3-gal	8,1±0,3	26,5±0,1	10,8±0,5
	Del-3-glu	7,6±0,3	26,6±0,09	12,8±0,4
	Pet-3-glu	6,6±0,5	18,6±0,1	10,4±0,5
	Mal-3-gal	42,8±0,5	88,1±0,2	59,5±0,4
	Mal-3-glu	18,9±0,5	34,4±0,2	23,9±0,6
Goldtraube	Del-3-gal	20,5±0,2	22,2±0,5	5,4±0,49
	Del-3-glu	6,2±0,2	7,6±0,5	22,1±0,4
	Pet-3-glu	13,3±0,2	3,3±0,4	11,0±0,4
	Mal-3-gal	38,2±0,4	28,4±0,5	22,4±0,3
	Mal-3-glu	20,8±0,4	17,0±0,5	2,6±0,3

Legenda: Delfinidina-3- galactosídeo (Del-3-gal); delfinidina-3- glucosídeo (Del-3-glu); Petunidina-3- glucosídeo (Pet-3-glu); Malvidina-3- glicosídeo (Mal-3-glu), Malvidina-3- galactosídeo (Mal-3-gal).

EXTRACCIÓN Y FORMULACIÓN DE ANTIOXIDANTES DE SALVADO DE TRIGO. APLICACIONES EN PANIFICACIÓN

Alexander Navarrete^a, Felicidad Ronda^b, Luis García^b, Sofia Fernández^b, María José Cocero^a

^aIngeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid.

^bDepartamento de Ingeniería Agrícola y Forestal. Tecnología de Alimentos. Universidad de Valladolid fronda@iaf.uva.es

INTRODUCCIÓN

El pan es uno de los productos alimenticios mejor posicionados en el mercado español. Entre el año 2012 y el año 2013 su consumo se incrementó en un 1,8% llegando a suponer una media de 36,12 kilos anuales por persona (Ministerio de Agricultura 2013).

Por otra parte, las dietas ricas en fibra dietética pueden tener efectos beneficiosos para la salud, tales como la prevención de enfermedades coronarias, diabetes, obesidad, hipertensión y trastornos gastrointestinales (Redgwell and Fischer 2005). Sin embargo, aunque el consumo de pan fresco integral ha aumentado en un 14.3%, esto llega a representar sólo el 7,5% del volumen de pan consumido en España (Ministerio de Agricultura 2013). Por tanto, deberían optimizarse los factores que afecten la aceptación de éste tipo de panes para aumentar su presencia en el mercado.

Los efectos benéficos del pan integral son derivados en gran parte de su contenido de antioxidantes. Entre ellos el ácido ferúlico destaca no sólo por sus potenciales beneficios sobre la salud (Dykes 2007). La presencia de ácido ferúlico durante la cocción del pan se ha identificado como un factor determinante en la inhibición de la formación de la 2-acetil-1-pirrolina que es el principal compuesto clave en el sabor del pan (Moskowitz, Bin et al. 2012).

Por tanto, la separación del ácido ferúlico del salvado de trigo sería una potencial solución para mejorar el sabor del pan integral y por ende su aceptación en el mercado. Sin embargo, al mismo tiempo, es deseable mantener los niveles de compuesto fenólicos por sus beneficios para la salud.

La industria alimentaria emplea diversos métodos para la extracción de los aceites contenidos en productos naturales. Una de las técnicas con más auge es la extracción mediante fluidos supercríticos que ya ha sido empleada para la extracción de ácido ferúlico (Sovová 2001). Ésta tecnología se basa en el empleo de compuestos a temperatura y presión

superiores a los valores críticos pero por debajo de la presión que se requiere para condensarlos en sólidos (Jessop and Leitner 2007).

En éste estado, la manipulación de la temperatura y la presión permiten obtener fracciones selectivas de extractos, permitiendo separar disolvente y soluto con facilidad de tal manera que no quedan trazas del solvente en el producto final (Brunner 1994).

Así, en éste trabajo se propone primero la extracción con CO₂ supercrítico y luego la encapsulación de los aceites del salvado de trigo. Finalmente, se fabrican panes integrales y se evalúa la influencia de la presencia de los encapsulados en el sabor final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Salvado de Trigo: El salvado empleado fue facilitado por la harinera Emilio Esteban, con la siguiente caracterización (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización del salvado

GRANULOMETRÍA (Micras)	1480	1149	670	500	212	PASA 212	
		8,60	19,20	34,30	16,86	19,29	1,54
Humedad	12,48%					Método NIR	
Proteína	16,32 % sss					Método NIR	
Grasa	5,51 % ssh/ con hidrólisis ácida					Método NIR	
Fibra	45,89 % ssh					Método NIR	

Extracción con dióxido de carbono supercrítico.

La planta de extracción sigue el esquema definido en la Figura 1. Todos los ensayos se realizaron con cargas de 700 g de salvado de densidad aparente húmeda de 0,218 g/cm³. La carrera de la bomba estuvo siempre fijada en el 100% para obtener un flujo máximo y estable. Las presiones en el extractor y separador fueron de 400 bares y 50 bares respectivamente. Las variables fueron el tiempo de operación (30', 60' y 120') y la temperatura del extractor (50, 60 y 70°C). Las muestras extraídas se recogieron en viales, conservadas en frío y protegidas de la luz. La fracción adherida a las paredes del separador se arrastró con acetona y posteriormente se separó en un rotavapor para determinar su masa.

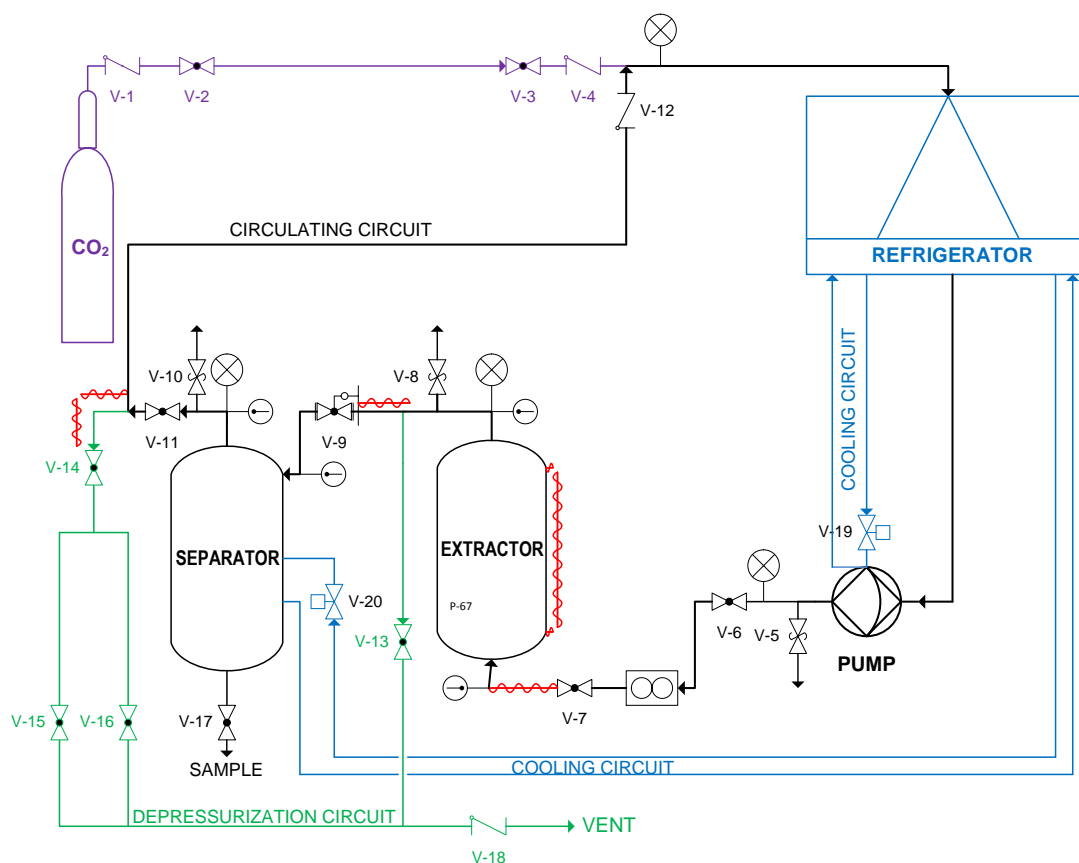


Figura. 1. Diagrama esquemático del proceso de extracción supercrítica.

Preparación de los encapsulados de extracto de salvado de trigo

Para preparar el encapsulado se partió de una emulsión del extracto. Para ello, se preparó una mezcla no polar compuesta por el extracto más ácido esteárico (9:1) y se mezcló con una disolución de lecitina (5.0%). A continuación se agitó a 80 °C durante 20 minutos para luego sonicar la emulsión durante 10 minutos, usando 50% de amplitud y un ciclo igual a 0,5 (UP400S Ultrasonic Processor, Hielscher, Germany). La emulsión resultante se dejó enfriar bajo agitación suave hasta temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se conservó la emulsión a 4°C para su posterior secado durante no más de tres días.

Para obtener partículas secas se usó secado por dispersión mediante un equipo Mobile Minor modelo MM-Basic PSR de GEA Niro. Éste equipo cuenta con una capacidad de de 4 l/h, máxima temperatura de entrada de aire 330 °C y una capacidad de admisión en la rotación del secadero de 15 N m³/h.

Análisis del contenido de ácido ferúlico

Los análisis del contenido de ácido ferúlico en los extractos obtenidos se realizaron por HPLC siguiendo el procedimiento descrito en (Saber-Tehrani, Givianrad et al. 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del extracto de salvado de trigo

La evolución de la extracción como función de la cantidad de CO_2 recirculado se muestra en la Figura 2.

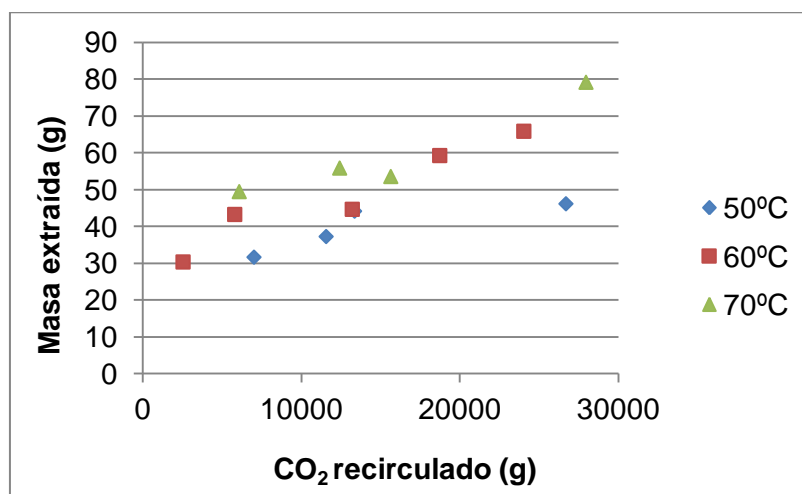


Figura. 2. Extracto total Vs. CO₂ recirculado

Las primeras fracciones de soluto extraído fueron aquellas que se encontraban libres, envolviendo el salvado externamente, así como la fracción más próxima al exterior y por tanto la menos ligada al sustrato. Así, la primera etapa de extracción, dominada por el equilibrio de disolución, presentó una forma lineal. En la gráfica apenas se advierte el final de esta etapa por haber ocurrido casi en su totalidad durante la primera media hora de recirculación. Son muy diversos los modelos que han intentado describir la extracción con fluidos supercríticos y se han realizado sobre sustratos y condicionantes diferentes (Perrut, Clavier et al. 1997).

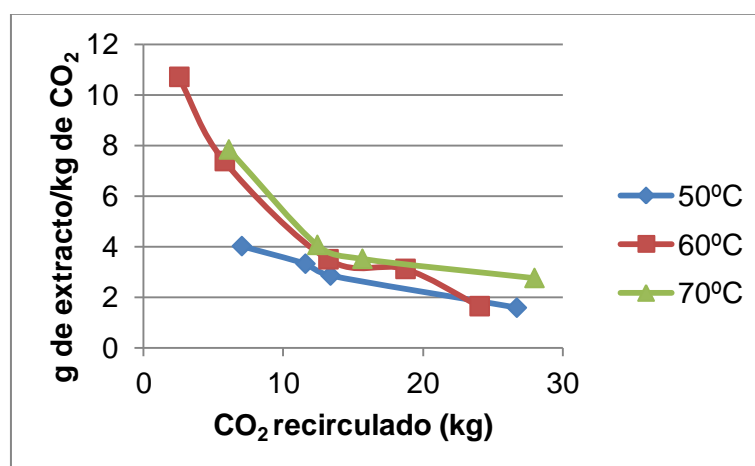


Figura 3. Gramos de extracto por kg de CO₂ Vs CO₂ recirculado.

La Figura 3 indica la cantidad de extracto que arrastra el disolvente a lo largo de la extracción. Entre los 10 y 13 kg de CO₂ recirculado se observaron inflexiones que marcan el inicio de la etapa en la que predomina la transferencia de masa. Agotado el soluto menos ligado, el fluido comienza a difundir más interiormente en la cascarilla de trigo extrayendo la fracción más ligada. Se observa que, a mayor temperatura, el punto de inflexión se produce habiendo recirculado una masa mayor de CO₂, coincidiendo con una mayor cantidad de masa extraída (Figura 2). Se deduce por tanto, que en las condiciones usadas, a mayor temperatura se incrementa la solubilidad del aceite del salvado.

Durante la fase inicial se observó similitud en el comportamiento a temperaturas de 60 y 70°C, con equilibrios de disolución muy superiores al de 50°C. Posteriormente, en las fases donde dominaba la transferencia de materia, la cantidad de soluto arrastrado se aproximó aunque la extracción a 70°C mantuvo unos niveles sensiblemente superiores a los registrados a 50 y 60°C. Esta caída anticipada significa que se están acercando a la máxima extracción posible mucho antes que a 70°C. Aún deberían realizarse ensayos más largos para lograr agotar la extracción.

En la Figura 4 se muestran en µg / g la concentraciones de ácido ferúlico en el extracto frente al CO₂ recirculado para tener una idea de la cantidad lograda durante la extracción.

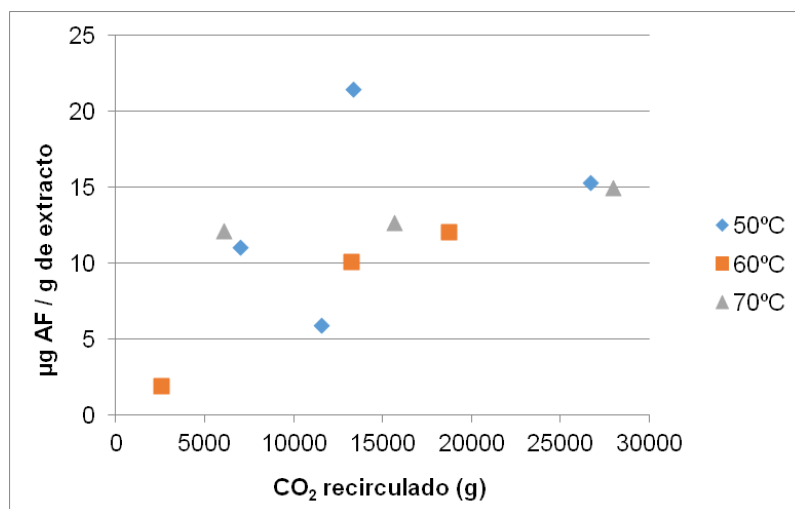


Figura 4. Concentración de ácido ferúlico (AF) en el extracto sobre CO₂ recirculado.

Los resultados muestran cierta linealidad en la extracción de ácido ferúlico a 60 y 70°C pero una dispersión notable de las extracciones a 50°C. Sin embargo son concentraciones muy inferiores a las encontradas en el salvado original (3,667 mg de ácido ferúlico por gramo de salvado).

En la Figura 5 puede verse una imagen SEM de las partículas obtenidas. Predomina la aglomeración de partículas.

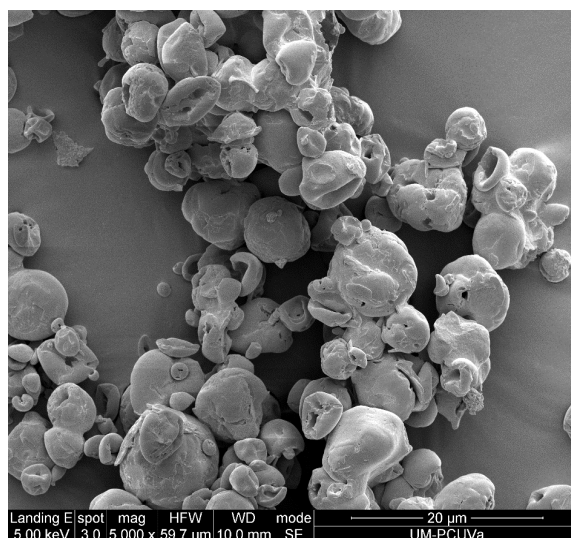


Figura 5. Imagen SEM de los encapsulados

Uso de los encapsulados en formulaciones de pan integral

Los extractos obtenidos y sus encapsulados fueron añadidos a panes de trigo de alta hidratación, tipo chapata, tanto blancos como integrales. Los panes integrales se elaboraron mezclando un 15 % de salvado de trigo con la harina blanca. La hidratación de las masas fue adaptada a los resultados farinográficos. El salvado de trigo utilizado fue tanto el salvado original como el salvado que había sido sometido a la extracción supercrítica. Las dosis de extracto y encapsulado aplicados a los panes, 0.64% y 2.6%, fueron aquellas que conseguían aportar la misma cantidad de extracto al retirado previamente en la extracción.

El empleo de salvado tratado por extracción condujo a panes con un volumen un 10% menor y una dureza un 70 % mayor que la de los panes integrales elaborados con el salvado original. El aporte del extracto no alteró significativamente las características de los panes obtenidos con ese salvado tratado. Igualmente, su adición a los panes blancos apenas afectó a la calidad original del pan.

La adición del extracto en forma encapsulada mejoró en todos los casos de forma muy sensible la calidad del pan integral obtenido, aumentando en un 10% su volumen y disminuyendo hasta un 30% su dureza.

Se comprobó la viabilidad del enriquecimiento nutricional del pan blanco con ácido ferúlico encapsulado, sin afectar al volumen ni la textura del pan.

CONCLUSIONES

Se han logrado detectar los puntos dónde la extracción pasa de estar dominada por el equilibrio a estar limitado por la transferencia de masa. Los extractos presentaron concentraciones bajas de ácido ferúlico.

Los extractos del aceite de salvado de trigo y sus encapsulados resultaron adecuados para su empleo en la formulación de pan integral y pan blanco permitiendo un enriquecimiento nutricional sin afectar significativamente a su calidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2012-35088) y por la Junta de Castilla y León (Proyecto VA252A12-2) para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Brunner, G. (1994). Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes.

Jessop, P. G. and W. Leitner (2007). Supercritical Fluids as Media for Chemical Reactions. Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids, Wiley-VCH Verlag GmbH: 1-36.

L. Dykes, L. W. R. (2007). "Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits." *Cereal Foods World* 52(3): 7.

M. Saber-Tehrani, M. H. Givianrad, et al. (2013). "Chemical Composition of Iran's Pistacia atlantica Cold-Pressed Oil." *Journal of Chemistry*.

Ministerio de Agricultura, A. y. M. A. (2013). Nota de prensa Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Moskowitz, M. R., Q. Bin, et al. (2012). "Influence of Endogenous Ferulic Acid in Whole Wheat Flour on Bread Crust Aroma." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(45): 11245-11252.

Perrut, M., J. Y. Clavier, et al. (1997). "Mathematical Modeling of Sunflower Seed Extraction by Supercritical CO₂." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 36(2): 430-435.

Redgwell, R. J. and M. Fischer (2005). "Dietary fiber as a versatile food component: An industrial perspective." *Molecular Nutrition & Food Research* 49(6): 521-535.

Sovová, H. (2001). "Solubility of Ferulic Acid in Supercritical Carbon Dioxide with Ethanol as Cosolvent." *Journal of Chemical & Engineering Data* 46(5): 1255-1257.

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA PARA EVALUAR LA VIDA ÚTIL DE LECHE FRESCA

David Canet¹, Ana Fuentes², Nicolás Laguarda¹, Isabel Fernández-Segovia², Rafael Masot¹, Miguel Alcañiz¹, José Manuel Barat².

¹Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. ²Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València (UPV). Cno. Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

RESUMEN

La fecha de caducidad de los alimentos envasados viene fijada en el etiquetado del producto. Algunos de estos productos frescos, como la leche fresca y otros productos lácteos, por ser altamente perecederos deben consumirse rápidamente. Sin embargo, las estadísticas muestran que cerca de 89 millones de toneladas de productos en buen estado se retiran en la UE de los lineales de los supermercados. Por ello, se estudia la posibilidad de modificar la normativa que regula las fechas de caducidad de algunos alimentos, aproximando la fecha del etiquetado a la caducidad real del alimento. Es por ello que las técnicas capaces de establecer de forma rápida y fiable la vida útil de los alimentos son cada vez más demandadas por productores, distribuidores y consumidores. El objetivo general del trabajo es evaluar la aplicación de la técnica de espectroscopía de impedancia (EI) como método rápido de determinación de la vida útil de leche fresca. Para evaluar la calidad de las muestras de leche durante su almacenamiento en refrigeración se llevaron a cabo análisis físico-químicos y microbiológicos, así como medidas de EI. Los resultados obtenidos en las determinaciones físico-químicas y microbiológicas mostraron el evidente deterioro de la leche fresca, estableciendo una vida útil inferior a 7 días en refrigeración tras la apertura del envase. Los valores obtenidos mediante la EI mostraron una buena correlación con los parámetros físico-químicos y microbiológicos indicadores de deterioro. Las mejores correlaciones se obtuvieron para parámetros como la acidez, concentración de O₂ y CO₂ en el espacio de cabeza y recuentos de aerobios mesófilos totales, parámetros estrechamente relacionados con el deterioro de la leche. A partir de estos resultados, se puede concluir que la técnica de EI podría ser una buena herramienta para la determinación de una forma rápida y económica de la vida útil de este tipo de producto.

1. INTRODUCCIÓN

La leche líquida es el producto lácteo más consumido en el mundo desarrollado (FAO, 2013), debido principalmente a sus excelentes propiedades nutricionales. La leche se caracteriza por su contenido en proteínas de alto valor biológico, así como por ser una fuente importante de minerales, como el calcio, fósforo, magnesio y potasio, y diversas vitaminas, como la vitamina A y ácido fólico. Sin embargo, la leche cruda es un alimento altamente perecedero por lo que para que su consumo sea seguro es necesaria la aplicación de algún tipo de procedimiento de conservación, como la pasteurización o esterilización, con el objetivo de garantizar al consumidor la inocuidad del producto.

La leche pasteurizada que se encuentra actualmente en el mercado presenta una caducidad de aproximadamente entre 8 y 10 días, y tal como indican la mayoría de los fabricantes se recomienda su consumo en 2-3 días tras la apertura del envase. Este tipo de leche es altamente apreciada por el consumidor ya que presenta mejores características organolépticas que las leches procesadas por otros tratamientos más severos de conservación, como la esterilización. Sin embargo, debido a esta menor intensidad del tratamiento, la caducidad de la leche pasteurizada es significativamente inferior a la de las leches esterilizadas o UHT.

La fecha de caducidad de los alimentos envasados viene indicada en el etiquetado del mismo, de manera que el consumo del producto a partir de esta fecha puede suponer un riesgo para la salud del consumidor. En los establecimientos comerciales, una vez alcanzada esta fecha de caducidad, los alimentos se retiran de los lineales para evitar que lleguen al consumidor productos no aptos para el consumo. Sin embargo, datos recogidos por la UE mostraron que cerca de 89 millones de toneladas de productos en buen estado se retiran cada año de los supermercados (European Commission, 2011). Estas retiradas suponen además de unas enormes pérdidas para el sector, la destrucción de productos que todavía son adecuados para su consumo. Es por ello que el Parlamento Europeo estudia la posibilidad de modificar la normativa que regula las fechas de caducidad de algunos alimentos, aproximando la fecha que aparece en el etiquetado a la caducidad real del producto. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas que permitan establecer de manera rápida y fiable el estado higiénico-sanitario del alimento y por tanto, determinar la aptitud para su consumo, es uno de los campos de la investigación con mayor interés para el sector agroalimentario.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la aplicación de la espectroscopía de impedancia para evaluar la vida útil de leche fresca almacenada en refrigeración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima y preparación de la muestra

En el presente estudio se analizó leche pasteurizada adquirida en un supermercado de la ciudad de Valencia. Se emplearon un total de 3 envases de 1,5 L, procedentes de un mismo lote y con la misma fecha de caducidad. Los envases se abrieron en condiciones asépticas y su contenido se distribuyó en barquetas de PP-EVOH-PP y dimensiones 15x11x5 cm, previamente desinfectadas y codificadas, de forma que cada una de estas barquetas contenía 50 mL de leche. Finalmente, las barquetas se sellaron empleando un film alta barrera de PP-PET y se almacenaron en refrigeración (4 °C) durante los 14 días de estudio. En el presente estudio se emplearon 18 barquetas en total, 3 barquetas por día de muestreo (6 días de muestreo), de manera que cada día de análisis se analizó una barqueta por cada envase original (3 envases de 1,5 L).

Durante el periodo de estudio se llevaron a cabo determinaciones físico-químicas, microbiológicas y de espectroscopía de impedancia. Dichos análisis se realizaron los días 0, 2, 4, 7, 9, 11 y 14 de almacenamiento en refrigeración, de forma que el último día de análisis correspondió con la fecha de caducidad de las muestras establecida por el fabricante.

2.2. Análisis físico-químicos y microbiológicos

Se determinó el contenido en O₂ y CO₂ del espacio de cabeza de los envases empleando un analizador Checkmate 9900 (PBI Dansensor, Ringsted, Denmark). El pH de las muestras se midió empleando un pH-metro Metler Toledo (mod. EASY-SEVEN, L'Hospitalet, España). La determinación de la acidez de la leche se llevó a cabo mediante una valoración con hidróxido sódico empleando como indicador una disolución alcohólica de fenoftaleína y expresando el resultado como porcentaje de ácido láctico (Marshall, 1992).

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos, se prepararon diluciones decimales a partir de las muestras de leche almacenadas en refrigeración, tal y como se describe en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). A partir de estas diluciones se realizaron determinaciones de microorganismos aerobios totales tal y como se describe en la normas ISO 4833:2003 (AENOR, 2003), respectivamente.

2.3. Medidas con el equipo de espectroscopía de impedancia

El equipo de espectroscopía de impedancia empleado en el presente estudio fue diseñado en el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Este sistema de medida consiste en una aplicación software que se ejecuta en un PC y de un equipo electrónico. Para la realización de

estas medidas se empleó un electrodo doble también diseñado por el IDM (UPV), este sensor consistió en dos agujas de acero inoxidable (diámetro de cada electrodo 1 mm y longitud efectiva 15 mm) alojadas en un bastidor de resina epoxi, siendo la distancia fija entre ambos electrodos de 10 mm.

2.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos se llevaron a cabo ANOVAs simples para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre estos parámetros. Para ello se empleó el programa Statgraphics Centurión XVI (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Por otro lado, con el objeto de evaluar la capacidad de la técnica de espectroscopía de impedancia para monitorizar el deterioro de la leche se realizaron análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). Mediante esta herramienta estadística se obtuvieron modelos de predicción de los parámetros físico-químicos y microbiológicos evaluados a partir las medidas de espectroscopía de impedancia. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el programa MATLAB® PLS Tool-box (Eigenvector Research, Inc.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Parámetros físico-químicos y microbiológicos

Los resultados obtenidos en las determinaciones físico-químicas y microbiológicas se muestran en la tabla 1.

La atmósfera de envasado presentó un contenido en O₂ y CO₂ similar a la composición inicial durante los primeros 7 días de almacenamiento, mostrando a partir del día 9 un incremento progresivo en el contenido en CO₂ y correspondiente descenso en O₂, lo que podría atribuirse a un incipiente desarrollo microbiano. Es interesante destacar como al final del estudio, el contenido en O₂ en los envases fue significativamente inferior respecto a los anteriores días de muestreo, esta reducción confirmaría la importante actividad bacteriana y un posible consumo de oxígeno como consecuencia de los procesos oxidativos de la materia grasa presente en la leche entera utilizada como materia prima en el estudio.

Las determinaciones de acidez y pH son parámetros especialmente importantes para estimar la acidez desarrollada en la leche como consecuencia de la proliferación bacteriana, por tanto, pueden considerarse como indicadores de la calidad higiénico-sanitaria de este tipo de producto (Walstra et al.,1999). En este sentido, un incremento de la acidez durante el almacenamiento nos indicaría la progresiva degradación microbiana de la lactosa y, en algunos casos también, una posible degradación lipídica (Negri, 2005). Diferentes autores

consideran que el límite sensorial de aceptación en la leche se correspondería con un valor de acidez próximo a 0.2% ácido láctico (Bassette et al., 1986); considerando este valor como referencia, en nuestro estudio podría establecerse que las muestras de leche no serían aceptadas organolépticamente por el consumidor a partir del noveno día de almacenamiento. Respecto al pH, es interesante destacar la variabilidad natural que puede aparecer en la leche como consecuencia de algunos factores como son su composición, el momento dentro del ciclo de lactación, la temperatura de la leche o una posible enfermedad del animal. A pesar de estas diferencias, el pH varía dentro de un rango muy reducido, donde valores inferiores a 6,5 o superiores a 6,9 indicarían la anormalidad de la leche. Se considera una leche rica en su composición y sin acidez desarrollada aquella que presenta un valor de pH próximo a 6,7. Las muestras analizadas en este estudio presentaron durante todo el periodo de almacenamiento valores similares al considerado como óptimo; sin embargo, el resto de parámetros analizados evidenciaron el deterioro del producto. Estos resultados indicarían que el pH de la muestra no puede ser considerado como un parámetro fiable del deterioro del producto en el presente estudio.

La carga microbiana de aerobios totales presente en las muestras puede ser considerada como el indicador principal para evaluar la vida útil. A partir de los resultados obtenidos en las determinaciones microbiológicas, y considerando como límite de aceptación el valor de 5 log ufc/mL tal y como indica el Reglamento UE 853/2004, podría considerarse que las muestras de leche analizadas en el estudio presentaron una vida útil entre 4 y 7 días de almacenamiento en refrigeración. Estos resultados confirmarían que la vida útil real del producto, en este caso, sería superior a la dada por el fabricante en el envase, donde se indica que el producto debe ser consumido en 2-3 días después de la apertura del mismo.

3.2. Espectroscopía de impedancia

Para estudiar la capacidad de la técnica de espectroscopía de impedancia como herramienta para evaluar el deterioro de la leche durante su almacenamiento en refrigeración, se establecieron modelos estadísticos (PLS). En este sentido se establecieron modelos de predicción para todos los parámetros indicadores del deterioro estudiados excepto para el pH, ya que su evolución durante el tiempo de almacenamiento no fue significativa. Para la elaboración de los modelos estadísticos PLS, se emplearon el 66% de las muestras en la fase de calibración, mientras el 33% restante de las muestras analizadas se empleó para la validación de los modelos previamente obtenidos. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los modelos de predicción.

Tal y como se muestra en la tabla anterior, se obtuvieron buenas correlaciones para todos los parámetros, con un R^2 cercanos o superiores a 0,9. La mejor correlación se obtuvo para los recuentos microbiológicos ($R^2= 0.972$) siendo este resultado especialmente interesante si se considera que este parámetro es empleado como criterio legal para establecer la fecha límite para un consumo óptimo desde el punto de vista sanitario. Estos resultados indicarían que la espectroscopía de impedancia es una herramienta útil para la determinación de los parámetros indicadores del deterioro de la leche.

4. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en las determinaciones físico-químicas y microbiológicas mostraron el evidente deterioro de la leche a lo largo del tiempo de almacenamiento en refrigeración, estableciendo un periodo de vida útil inferior a los 7 días en refrigeración. A partir de las medidas de impedancia se obtuvieron modelos robustos de predicción para los parámetros físico-químicos y microbiológicos evaluados. La buena correlación entre la respuesta del sistema de espectroscopía de impedancia y los parámetros indicadores de deterioro de la leche, especialmente con los recuentos microbianos, evidencian que la técnica de EI podría ser empleada para la determinación de una forma rápida y económica de la vida útil de este tipo de producto.

5. REFERENCIAS

- AENOR (2003) Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C. (ISO 4833:2003)
- AENOR (2004) Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca. (ISO 6887-3:2003)
- Bassette, R., Fung, D., & Mantha, V. (1986). “*Off-flavors in milk*”. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 24(1), 1-52.
- European Commission. Press Releases Database (2011). Questions and Answers on Food Waste Minimisation and Food Packaging Optimisation. http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-11-598_en.htm (consultado 27/11/2013).
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2013). <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/> (consultado 27/11/2013).

Marshall, R. (1992). Standard methods for the examination of dairy products (16th Ed.). Washinton DC: American Public Health Association.

Negri, L.M. (2005). *El pH y la acidez de la leche*. En: Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad. 2º ed. INTA.

Walstra, P., Geurts, T.J., Neomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. (1999). *Dairy technology-principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker Inc. New York, N.Y. USA.

TABLAS

Tabla 1. Parámetros físico-químicos y microbiológicos de leche fresca almacenada en refrigeración. Valores promedio \pm SD (n=3).

Tiempo almacenamiento (días)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	pH	Acidez (°D)	Aerobios mesófilos (log ufc/mL)
0	-	-	6.76 \pm 0.02 ^a	0.122 \pm 0.006 ^a	< 1 ^a
2	20.53 \pm 0.06 ^a	0.07 \pm 0.06 ^a	6.82 \pm 0.01 ^a	0.128 \pm 0.002 ^a	< 1 ^a
4	20.80 \pm 0.10 ^a	0.10 \pm 0.00 ^a	6.79 \pm 0.01 ^a	0.127 \pm 0.002 ^a	1.48 \pm 0.5 ^a
7	19.63 \pm 0.75 ^{ab}	0.37 \pm 0.46 ^a	6.73 \pm 0.04 ^{ab}	0.134 \pm 0.007 ^a	5.62 \pm 1.2 ^b
9	14.63 \pm 7.84 ^{ab}	4.33 \pm 5.29 ^{ab}	6.79 \pm 0.03 ^{ab}	0.189 \pm 0.007 ^b	5.89 \pm 1.7 ^b
11	12.99 \pm 6.89 ^b	5.67 \pm 4.63 ^b	6.70 \pm 0.11 ^{ab}	0.200 \pm 0.048 ^b	8.13 \pm 0.8 ^c
14	3.73 \pm 2.05 ^c	12.17 \pm 1.16 ^c	6.70 \pm 0.16 ^b	0.321 \pm 0.008 ^c	8.54 \pm 0.1 ^d
α	**	***	ns	***	***

Letras iguales en la misma columna indican pertenencia a grupos homogéneos. Nivel de significación (α): ns: no significativo; ** p <0,01; *** p <0,001

Tabla 2. Parámetros estadísticos obtenidos en los análisis PLS de los parámetros físico-químicos y microbiológicos a partir de las medidas de espectroscopia de impedancia.

	R ²	RMSEP	LV	a	b
O ₂	0.8631	2.6999	3	0.9727	-0.1466
CO ₂	0.8686	1.8346	3	0.9732	0.3626
Acidez	0.9004	0.0233	3	0.9474	0.0118
Aerobios mesófilos	0.9721	1.2170	2	0.7800	1.7581

R²: coeficiente de determinación; RMSEP: Error cuadrático medio de predicción; a: pendiente; b: ordenada en el origen

CINÉTICA DE INACTIVACIÓN DE PECTIN METILESTERASA EN TRITURADO DE NARANJA POR MEDIO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y TEMPERATURA

Viridiana Alejandra Tejada-Ortigoza, Zamantha Escobedo-Avellaneda, Aurora Valdez-Fragoso, Hugo Mújica-Paz, Jorge Welti-Chanes.

Centro de Biotecnología, FEMSA, Escuela de Biotecnología y Alimentos, Tecnológico de Monterrey, Avenida Eugenio Gaza Sada No. 2501 Sur 64849, Monterrey, Nuevo León, 64849, MÉXICO. viridianatejada@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Hoy en día el consumo de frutas y vegetales es parte importante de la dieta actual, el consumo de alimentos “frescos” se ha incrementado en los últimos años en respuesta a campañas multidisciplinares que han procurado un consumidor más consciente e informado con aspectos concernientes a su salud (Tapia y Welti-Chanes, 2012). El tratamiento térmico, usado como el método de conservación por excelencia en la actualidad, puede afectar de manera considerable algunas características organolépticas y nutrimentales del alimento (Valdez-Fragoso et al., 2011). Dado lo anterior, la industria de alimentos ha promovido investigación en nuevos métodos y tecnologías para conservar alimentos que mantengan sus características nutrimentales y sensoriales sin sacrificar la inocuidad alimentaria. Así, surgen nuevos métodos como las altas presiones hidrostáticas (APH), el ultrasonido y los pulsos eléctricos, que satisfacen las demandas del consumidor actual en cuanto a conveniencia, características sensoriales e inocuidad (Alzamora et al., 2012; Mújica-Paz et al., 2011; Sampedro et al., 2008).

En particular, las APH son una tecnología que ha sido adoptada fácilmente por la industria como método de conservación de mínimo procesamiento ya que provee productos de calidad superior a los obtenidos por tecnologías convencionales, además de inactivar microorganismos y enzimas (Valdez-Fragoso et al., 2011). En el caso de la inactivación enzimática, esta tecnología aunada al uso de temperatura ha sido usada ampliamente en alimentos con enzimas que muestran resistencia a la inactivación térmica, como lo es la pectin metilesterasa (PME) (Sampedro et al., 2008; Van den Broeck et al., 2000). Para la industria de bebidas, la inactivación de esta enzima es de suma importancia ya que afecta las propiedades organolépticas de jugos, néctares y bebidas refrescantes a base de frutos cítricos. El reto de la industria es la inactivación de PME sin alterar las características físico-químicas y nutrimentales del alimento con las nuevas tecnologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

-Materia prima: Naranja, *Citrus Sinesis* L. variedad Valencia fue adquirida en la central de Abastos de Guadalupe en Nuevo León, México en marzo 2012.

-Elaboración de triturado de naranja: Las naranjas fueron lavadas, secadas y pesadas para la extracción del jugo con un equipo Turmix rudo (TURMIX, México); posteriormente el bagazo se separó en forma manual y el flavedo con ayuda de un cuchillo. Finalmente, se trituraron los componentes utilizando un 72, 16 y 12% p/p de jugo, flavedo y albedo, respectivamente en una licuadora industrial LJR (746W/ 1 HP) hasta obtener una pasta homogénea.

-Tratamiento de APH: Se utilizó el equipo High Pressure Food Processor de Flow Autoclave Systems (Ohio, EUA) con capacidad de 2L. En cada ciclo de presión se introdujeron 6 bolsas de triturado de ≈ 50 gramos. La temperatura inicial del producto fue de 4°C; los tratamientos fueron los establecidos de acuerdo a un diseño experimental, procurando la aleatorización de las muestras. Una vez procesadas, las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

-Determinación de actividad de pectin metilesterasa por titulación potenciométrica: La extracción de la enzima tuvo lugar a 4°C utilizando una solución de NaCl 2N en proporción 2:1 con respecto al triturado. Una vez extraída, se añadieron 5 ml del extracto a una solución de pectina (1% p/v) ajustada a pH 7 ± 0.1 . La mezcla se mantuvo homogénea y a temperatura constante (30°C) por medio de una plancha de calentamiento con agitación magnética Thermo Scientific Cimarec (EUA). Inmediatamente se agregó NaOH 0.1N para regresar el pH a un valor cercano a 7 y se mantuvo así durante 3 minutos. Posteriormente, se agregaron 50 μ l de NaOH 0.1N y se registró el cambio en los valores de pH que se producen con la formación de ácidos pectínicos durante la catálisis de PME; además, se registró el tiempo que tarda en retornar el valor de pH a 7. Estos cambios se registraron con un equipo Thermo Scientific Orion 3 Star (EUA). Cada determinación se hizo por triplicado; la actividad de la enzima se determinó usando la Ecuación 1:

$$A_{PME} = \frac{(V)(N)(1000)(f_D)}{(t)(V_M)} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A_{PME} es una unidad de la actividad de la PME, que se define como un μ -equivalente de éster hidrolizado / mililitro de extracto enzimático / minuto; V es volumen de NaOH añadido tras mantener el pH de la solución de pectina a valores de 7 ± 0.1 durante 3 min (50 μ l); N es la concentración del NaOH utilizado para titular (0.1N); t es el tiempo que requiere

la solución en regresar a pH 7 tras la adición de V; V_M es el volumen del extracto enzimático (5 ml); y f_D es el factor de dilución en la extracción salina (0.5).

-Diseño de Experimentos: Se usó un diseño central compuesto (DCC), se evaluaron tres factores: tiempo (1, 5.5 y 10 min), presión (350, 450 y 550 MPa) y temperatura (41, 56 y 68°C); y una variable de respuesta (actividad residual $[A/A_0]$ de PME). Asimismo, se evaluó el efecto del tiempo que tarda el equipo en alcanzar la presión programada (CUT en minutos) y, como sistema control se utilizó el producto sin tratamiento.

-Análisis estadístico: El efecto del tiempo, presión y temperatura en sus términos simples, cuadráticos y en sus interacciones, se ajustó a un modelo cuadrático de regresión lineal utilizando superficies de respuesta por medio de Minitab 14. Para el ajuste al modelo, se utilizaron únicamente las variables estadísticamente significativas a un 95% de confianza.

-Determinación de parámetros cinéticos enzimáticos: Considerando una cinética de inactivación de primer orden, se calcularon las constantes de velocidad de inactivación k (min^{-1}) y los valores de D. Para la determinación de los parámetros V_a (volumen de activación, E_a (energía de activación) se utilizaron las ecuaciones (2) y (3)

- V_a (cm^3/mol): El volumen de activación se calcula utilizando la ecuación de Eyring (Eisenmenger et al., 2009).

$$k = k_{ref} \cdot \exp \left[\frac{V_a}{RT} (P_{ref} - P) \right] \quad (2)$$

- E_a (KJ/mol): La energía de activación se calcula utilizando la ecuación Arrhenius (Eisenmenger et al., 2009).

$$k = k_{ref} \cdot \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (3)$$

Donde k_{ref} es la constante de velocidad a la temperatura (T_{ref}) y presión (P_{ref}) de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de cinética de inactivación enzimática parece seguir un modelo de primer orden como se muestra en la Figura 1, se observa una disminución de la actividad que pudiera considerarse exponencial para un tratamiento a 56°C y 450 MPa. Dado lo anterior, se graficó el logaritmo de la actividad residual con respecto al tiempo para los datos experimentales (Figura 2). Cuando se procesó a 41 y 68°C con 550 MPa, se observó un comportamiento fraccionado de la inactivación, es decir la pendiente de la gráfica relacionada

directamente con la constante de inactivación k es mayor en el primer minuto del procesamiento y del minuto 1 al 10, la pendiente es menor. Este efecto fue más notorio a 68°C, donde el efecto del CUT disminuyó la actividad aproximadamente en 50%, dado lo anterior la enzima no puede ser inactivada a la misma velocidad que al principio, independientemente del tiempo de procesamiento. Este comportamiento ya ha sido reportado para PME por diversos autores (Ly-Nguyen et al., 2002; Ly-Nguyen et al., 2003; Marília-Castro et al., 2006; Rastogi et al., 2007) que sugieren un modelo de conversión fraccional, que aplica cuando la muestra de la enzima contiene una fracción de la misma que es estable y que no es afectada dadas las condiciones de procesamiento (Ly-Nguyen et al., 2003).

Por otra parte, también se evaluó la inactivación de la enzima con los datos predichos por el modelo de superficie de respuesta generado:

$$\% \frac{A}{A_0} = 406.560 - 0.392 \cdot P - 6.793 \cdot T - 4.076 \cdot t + 0.038 \cdot T^2 + 0.531 \cdot t^2 + 0.004 \cdot P \cdot T - 0.108 \cdot T \cdot t \quad (4)$$

En general se observó que la predicción del modelo generado describió una inactivación enzimática de primer orden, como se había observado con los datos obtenidos experimentalmente. Para los datos experimentales, a 56°C se observó una tendencia creciente de la constante de velocidad k de inactivación de PME (de 0.119 a 0.254 min⁻¹), lo que sugiere que la inactivación de PME en triturado de naranja se favoreció conforme aumentó la presión a esta temperatura. A 41 y 68°C se obtuvieron dos valores de k a 550 MPa ya que durante el primer minuto de procesamiento la reducción de la actividad se da a una tasa distinta que de 1 a 10 min. A 41°C el valor de k disminuye aproximadamente 4 veces cuando se procesa de 0 a 1 min en comparación con el procesamiento de 1 a 10 min, a 68°C esta disminución es de 14 veces. Lo anterior corrobora lo comentado anteriormente acerca de que la mayor reducción de la actividad enzimática ocurre durante el primer minuto de procesamiento.

Por otra parte, los valores predichos con el modelo de superficie de respuesta confirmaron que la inactivación de la enzima fue mayor conforme se incrementó el valor de la temperatura, la presión y el tiempo. Estos valores fueron muy cercanos a los obtenidos en el experimento sobre todo a 56°C en el rango de presión estudiado y a 68°C con 350 y 450 MPa, donde se obtuvo una diferencia máxima en el valor D de 7.44 min (56°C/ 350 MPa) y una mínima de 0.42min (56°C/ 550 MPa).

El efecto de la temperatura en la constante de inactivación k se observa en la Tabla 2. En los datos experimentales, de 41 a 56°C la enzima tendió a inactivarse con mayor

velocidad a 350 MPa; lo anterior dado su valor de E_a (216.3 KJ/mol) que es del orden de 4 veces mayor que para las otras dos presiones (450 y 550 MPa). Por otra parte, la enzima redujo su velocidad de inactivación, lo que se observó en la pendiente positiva de esta fracción de la gráfica o en su valor negativo de energía de activación (-74.7 KJ/mol). Por su parte de acuerdo a la predicción, la inactivación de PME se facilitó conforme se incrementó el tiempo, la temperatura y la presión. Se observó que el mejor ajuste al modelo cuadrático generado se obtuvo a los 450 MPa para todas las temperaturas y a 350 MPa para el rango de temperaturas comprendido entre 41 y 56°C. Se observó en la Tabla 3 que los valores de E_a son muy parecidos cuando se procesa a 450 MPa, 56.8 KJ/mol de 41 a 56°C y 56.7 KJ/mol de 41 a 68°C para los datos experimentales y predichos, respectivamente.

CONCLUSIONES

En general, el efecto sinérgico las altas presiones y temperaturas favorece la inactivación de la PME en distintos niveles dependiendo de la combinatoria de factores utilizada. La inactivación enzimática sigue una cinética de primer orden y en algunas condiciones de procesamiento se observa un comportamiento fraccionado de la enzima. Los datos generados de la inactivación enzimática se ajustaron a un modelo de superficie de respuesta en $\approx 80\%$ y este modelo pudo predecir adecuadamente los parámetros cinéticos de la PME.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo otorgado del Tecnológico de Monterrey (CAT-200 y CDB081) y de CONACYT-SEP (Proyecto de investigación 101700 y beca 420889).

BIBLIOGRAFÍA

- Alzamora, S., Welti-Chanes, J., Guerrero, S. y Gómez, P. “Rational Use of Novel Technologies: A comparative Analysis of the Performance of Several New Food Preservation Technologies for Microbial Inactivation”, *Novel Technologies in Food Science*, p. 421, 2012.
- Eisenmenger, M., & Reyes-De-Corcuera, J. (2009). High Pressure enhancement of enzymes: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 331–347.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A., Fachin, D., Verlent, I., Indrawati, & Hendrickx, M. (2002). Partial purification, characterization, and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5437-5444.

Ly-Nguyen, B., Van Loey, A., Smout, C., Eren Özcan, S., Fachin, D., Verlent, I., Hendrickx, M. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: a kinetic study. *Journal of Food Science*, 68(4), 1377-1383.

Marília-Castro, S., Van-Loey, A., Alexandre-Saraiva, J., Smout, C., & Hendrickx, M. (2006). Inactivation of pepper (*Capsicum annuum*) pectin methylesterase by combined high-pressure and temperature treatments. *Journal of Food Engineering*, 75, 50-58.

Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Tonello-Samson, C., Welti-Chanes, J., y Torres, A. "High- Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods", *Food and Bioprocess Technology*, p. 969-985, 2011.

Rastogi, N., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 69-112.

Sampedro, F., Rodrigo, D., y Hendrickx, M. "Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal–high pressure treatment in an orange juice–milk beverage", *Journal of Food Engineering*, p. 133-139, 2008.

Tapia, M. y Welti-Chanes J. "Hurdle technology principles applied in decontamination of whole and fresh-cut produce", *Decontamination of fresh and minimally processed produce*, p. 576, 2012.

Valdez-Fragoso, A., Mújica-Paz, H., Welti-Chanes, J., y Torres, A. "Reaction Kinetics at High Pressure and Temperature: Effects on Milk Flavor Volatiles and on Chemical Compounds with Nutritional and Safety Importance in Several Foods", *Food and Bioprocess Technology*, p. 986- 995, 2011.

Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L., Van Loey, A., y Hendrickx, M. "Inactivation of orange pectinesterase by combined high pressure and temperature treatments: A kinetic study", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, p. 1960-1970, 2000.

Welti-Chanes, J. "Cinética aplicada al tratamiento térmico de alimentos". *Procesos emergentes para conservación de alimentos*. Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Enero-Mayo 2012.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la inactivación de PME en triturado de naranja.

Temperatura (°C)	Presión (MPa)	k (min ⁻¹) ^a	k (min ⁻¹) ^b	D (min) ^a	D (min) ^b
41	350	0.003	0.0351	841.8	65.55
	450	0.059	0.047	39.3	49.04
	550	0.322	0.0712	7.1	32.35
		0.086		26.8	
56	350	0.119	0.0861	19.3	26.74
	450	0.158	0.1263	14.6	18.23
	550	0.254	0.2653	9.1	8.68
68	350	0.159	0.1592	14.5	14.47
	450	0.233	0.2616	9.9	8.8
	550	0.775	0.5546	3	4.15
		0.054		42.9	

^a Parámetros obtenidos a partir de los datos experimentales y ^b con los datos predichos utilizando un modelo de superficie de respuesta.

Tabla 2. Energía de inactivación de PME en triturado de naranja.

Presión (MPa)	E _a (KJ/mol)		
	41-56°C ^a	56-68°C ^a	41-68°C ^b
350	216.3	22.5	50
450	56.8	30.1	56.7
550	53.4	-74.7	68.2

^a Parámetros obtenidos con los datos experimentales y ^b con los predichos utilizando un modelo de superficie de respuesta.

Figura 1. Efecto del tiempo de procesamiento sobre la actividad de PME a 56°C y 450 MPa en triturado de naranja (CUT=1.05±0.00 min).

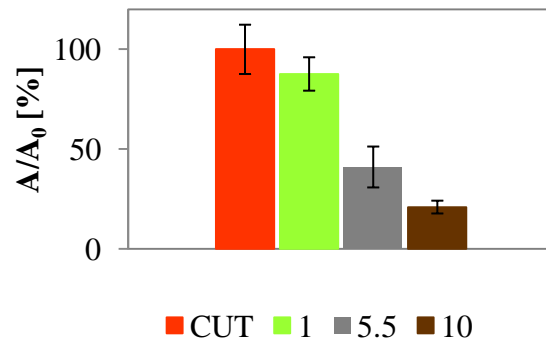
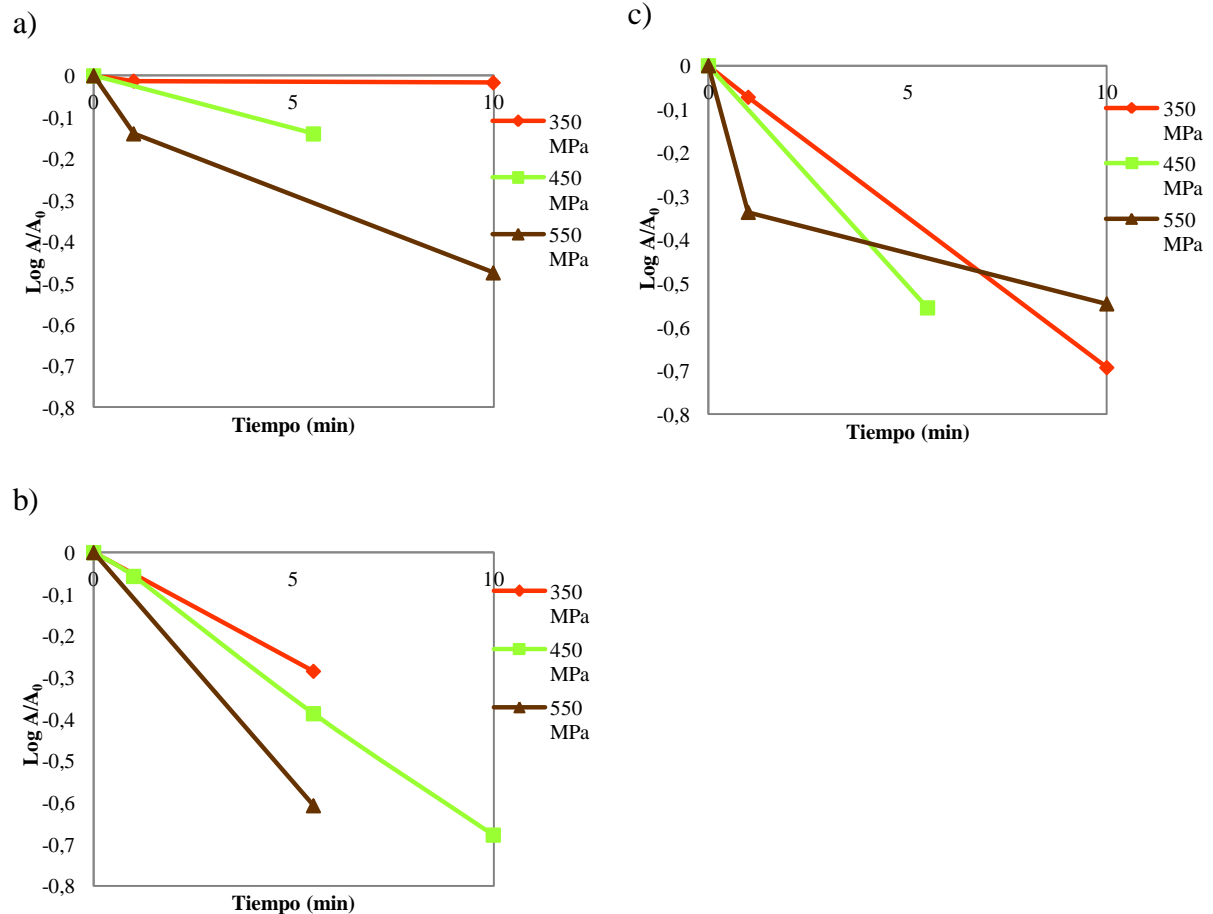


Figura 2. Cinética de inactivación de PME a 350, 450 y 550 MPa a a) 41, b) 56 y c) 68°C en triturado de naranja.



INFLUENCIA DEL TIPO DE ROBLE Y GRADO DE TOSTADO DE LA BARRICA EN LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y POLIFENÓLICA DE VINOS TINTOS

Lizama, V.; García M.J.; Sevilla, G.; Álvarez, I. y Alexandre, J.L.

Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universidad Politécnica de Valencia
Av. Fausto Elio s/n. 46022-Valencia.

La crianza del vino en barrica es una etapa fundamental, ya que permite potenciar sus características organolépticas y favorecer su posterior envejecimiento en botella. Las técnicas toneleras y el origen del roble, ejercen una gran influencia en la extracción de compuestos aromáticos y polifenólicos del vino durante el proceso de crianza. El grado de tostado de la barrica, así como el origen del roble, son dos factores que pueden provocar una variación de los compuestos químicos de la madera, y por lo tanto, el vino puede evolucionar de una manera distinta.

El objetivo principal de este trabajo es encontrar las diferencias que aporta el empleo de barricas con diferente intensidad de tostado (media y fuerte) y de distinta procedencia del roble (francés y húngaro) mediante el estudio de la evolución de los compuestos polifenólicos y la composición aromática durante un período de tiempo de ocho meses.

A tenor de los resultados obtenidos, se demuestra que las barricas fabricadas a partir de roble húngaro, son una buena alternativa a las barricas de roble francés en la crianza de vino tinto, ya que permiten una correcta evolución de la materia colorante. Sin embargo, un incremento de la intensidad de tostado, hará disminuir la concentración de elagitaninos presentes en el roble, de manera que, los vinos mantenidos en una barrica de roble húngaro y francés de tostado fuerte presentaron una menor estabilidad de la materia colorante que aquellos conservados en una barrica sometida a una intensidad de tostado media.

INTRODUCCIÓN.

La capacidad para el envejecimiento en barrica de los vinos tintos está relacionada en gran medida con su composición en compuestos fenólicos (básicamente de antocianinas responsables del color rojo, y de procianidinas responsables de parte del color amarillo y del gusto amargo, así como de la astringencia y del cuerpo del vino). La crianza en barrica es una etapa fundamental en la vida del vino, ya que permite potenciar sus características organolépticas y favorecer su posterior envejecimiento en botella. Este proceso debe dirigirse convenientemente para obtener unos vinos armoniosos y equilibrados y su duración deberá

adaptarse a la personalidad y características intrínsecas de cada vino para que la madera no las enmascare. Un vino en barrica alcanza su equilibrio óptimo cuando los compuestos cedidos por el roble se mezclan con los demás sabores y aromas del vino; la madera tiene que estar al servicio del vino y no al contrario.

La crianza en barrica permite una oxigenación moderada que tiene lugar a través de la misma porosidad de la madera, a través de las juntas interduelas y/o a través del esquivé. La microoxigenación natural que experimenta el vino en barrica favorece la formación de compuestos coloreados, asegurando el color de los vinos envejecidos (combinación antociano-procianidina). Hay que tener en cuenta, que el grado de microoxigenación dependerá del origen del roble (porosidad), así en el roble americano se produce un menor paso de oxígeno que en el roble francés, ya que la madera del roble americano es más densa que la del francés, por tanto la evaporación de agua, de alcoholes y de aromas en general es menor en este tipo de madera. Además, este proceso de microoxigenación puede favorecer la formación de piroantocianos y flavanil-piroantocianos a través de cicloadiciones antociano-acetaldehído (Cano-López *et al.*, 2009). De este modo se producirá una estabilización del color del vino y una suavización de la astringencia (Pérez-Prieto *et al.*, 2002). Así mismo, se producirá una cierta precipitación de parte de la materia colorante del vino, evitando que esta parte inestable del color precipite después en la botella.

El roble pertenece al género *Quercus*, que está formado por más de 600 especies (Fernández de Simón y Cadahía, 2008). Las dos principales especies utilizadas en tonelería son *Q. petraea* o *sessilis* y *Q. robur* o *pedunculata*. Se encuentran prácticamente repartidas por todo el continente europeo, también en España, pero el principal productor es Francia, donde se cultivan unos tres millones de hectáreas de robledales. Por su fuerte hibridación, no es fácil distinguir entre *Q. robur* y *Q. petraea*. Otra especie de roble menos utilizada, pero no por eso de menor calidad es la denominada *Q. frainetto* que crece en el nordeste de Hungría, en la zona de Szigtvar, es resistente a las heladas, de crecimiento lento, por lo que tendrá un grano fino, y con anillos regulares.

MATERIALES Y MÉTODOS.

El estudio se ha realizado con un vino procedente de la D.O. Utiel-Requena, vinificado por el sistema tradicional en vinos tintos. Se han analizado 6 vinos criados en barricas de distinto origen y/o grado de tostado (medio y fuerte). El estudio se ha llevado a cabo durante ocho meses y el vino control es el inicial conservado en un depósito de acero

inoxidable.

Todas las barricas utilizadas son bordelesas de 225 litros de capacidad, nuevas y el secado de la madera ha sido natural. Los tipos de roble utilizados en las barricas ensayadas son, roble francés Allier (*Q. petraea*) y roble húngaro (*Q. frainetto*).

Para estimar los efectos del tipo de barrica sobre la estabilidad del color de los vinos, se ha determinado la *intensidad colorante* (IC), así como el *porcentaje de antocianos copigmentados, libres y polimerizados* (Blouin, 1977) y concentración de *antocianos totales* por el método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet, (1965). Con el objeto de determinar las variables relacionadas con los taninos, se determina el *Índice de Polifenoles Totales* (Ribereau-Gayon, 1979), la concentración de *taninos condensados* (Sun *et al.*, 1959), el *índice de gelatina*, que puede ser considerado como un reflejo de la astringencia del mosto o vino, (Glories, 1978). En este sentido, otro método utilizado para evaluar el *grado de polimerización de los taninos* del mosto es el método de *p*-dimetilaminocinamaldehído (DMACH) propuesto por Vivas *et al.*, (1996).

El tratamiento estadístico de los resultados ha consistido en un análisis simple de la varianza (ANOVA) para cada una de los parámetros, teniendo en cuenta el efecto del tipo de barrica empleado en el envejecimiento, es decir tipo de madera y grado de tostado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El período de crianza de los vinos en la barrica va a tener como consecuencia, además de la extracción de compuestos aromáticos y fenólicos de la madera, una microoxigenación controlada hacia el interior de la barrica, que permitirá la estabilización de materia colorante, reduciendo el porcentaje de antocianos libres (fácilmente oxidables) y polimerizarlos con los flavonoles, contribuyendo a su estabilización, reduciendo el riesgo de precipitaciones; además de permitir la unión entre otros polifenoles como los taninos, con la consecuente disminución de astringencia. En el presente estudio, nos hemos encontrado con que, para algún parámetro estudiado, la variabilidad entre las barricas de un mismo tipo es equiparable a la que se encuentra entre dos clases de barricas, por lo que no se puede atribuir el resultado obtenido a una variable concreta.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en los análisis realizados al vino inicialmente. En la tabla 2, se muestran los resultados que tiene que ver con el color del vino, es decir, I.C., concentración de antocianos totales y tono. El efecto favorable al incremento de la IC (tabla 2), se debe, por una parte, a que la madera de roble, aporta ácido gálico y el

elágico que pueden participar en la evolución del color del vino tinto mediante su contribución como posibles copigmentos, y mediante su posible efecto protector de la oxidación de los antocianos (Vivas y Glories, 1996). La barrica de tostado medio, aporta más elagitaninos al vino comparada con la de tostado fuerte, pudiendo ser la razón de su mayor incremento. Otra de las razones que explican el incremento de IC es la microoxigenación que se produce a través de los poros de la madera y del espacio interduela. El oxígeno, indirectamente provoca la transformación de alcohol etílico en acetaldehído, que hará de puente de etilo entre moléculas de antociano y tanino, estabilizando materia colorante (Cano-Lopez *et al.*, 2009; Sims y Morris, 1986, Atanasova *et al.*, 2002). Por otra parte, la tendencia de los vinos criados en barrica es la de incrementar el tono debido al aporte de elagitaninos, que son de color amarillo (Fernández de Simón y Cadahía, 2008), aunque este incremento es proporcional al tiempo de permanencia en barrica, debería ser superior en los vinos procedentes de las barricas de roble francés de tostado medio que en las de tostado fuerte, ya que aunque el roble húngaro (*Q. frainetto*), contenga una mayor cantidad de elagitaninos, (Fernández de Simón y Cadahía, 2008), el grado de tostado fuerte, provocará una degradación de los elagitaninos, los cuales no pasarán al vino y por tanto no incrementarán la componente amarilla de los vinos envejecidos en las barricas de roble húngaro.

En relación a la composición en antocianos totales, se produce una reducción significativa de la cantidad de antocianos decolorables a lo largo de todo el período de conservación, bien sea en el depósito de acero inoxidable (testigo) o en las diferentes barricas. Esto es debido a formación de moléculas que estabilizan el color, es decir moléculas antociano-tanino, y que resultan no decolorables por el bisulfito además de reacciones de precipitación y oxidación de antocianos.

Las reacciones de copigmentación de los antocianos, son debidas a la unión con copigmentos, procedentes de la uva y presentes en los vinos. Tal y como se observa en la tabla 3, a los 8 meses, el porcentaje de antocianos copigmentados del vino en barrica es inferior al encontrado en los vinos conservados en depósito (vino testigo), por que la microoxigenación tiene lugar en las barricas. Los vinos que permanecen en los depósitos, se encuentran en condiciones reductoras, y los antocianos copigmentados pueden ser responsables de hasta un 40% de la intensidad colorante, perdiéndose este efecto cuando se produce una crianza en barrica. Además, el porcentaje de antocianos libres se mantiene en los vinos que han sido conservados en depósitos, debido a que el carácter reductor y la ausencia de microoxigenación impiden las reacciones de polimerización con otros compuestos que conducirá a una estabilización de materia colorante. Durante la crianza y envejecimiento de

los vinos en barrica, la concentración de antocianos libre va disminuyendo, sin que este hecho se traduzca en una pérdida del color rojo, como se observó en el estudio de la intensidad colorante. Las reacciones de estabilización, tienen en la mayoría de las veces, origen en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos. El descenso de antocianos libres en los vinos introducidos en barrica, es sensible en los ocho meses de crianza aunque no aparecen diferencias significativas.

El incremento del valor de IPT (tabla 4) en los vinos que se introducen en barrica con respecto a los conservados en depósitos de acero inoxidable se debe a la cesión de elagitaninos por parte de la madera, y esta cesión estará relacionada con el origen de la madera, así como con el grado de tostado; siendo menor cuanto mayor es el grado de tostado. La concentración de elagitaninos que aporta el roble francés *Quercus petrea* es inferior a la de *Quercus frainetto* (roble húngaro) (Fernández de Simón y Cadahía, 2008). Los elagitaninos en los vinos, una vez extraídos, sufren reacciones de oxidación, polimerización e hidrólisis que disminuyen su concentración final. Los resultados del presente trabajo, confirman los obtenidos por Vivas *et al.* (1996), ya que aunque la evolución no muestra diferencias significativas en cada una de las barricas, excepto en las de tostado fuerte de roble húngaro, se observa un descenso de IPT a los 8 meses de crianza. Para la concentración de taninos condensados en los vinos, tras 8 meses de estancia en barrica, encontramos diferencias significativas entre alguna barrica del lote de tostado fuerte, con respecto al testigo y a las de roble francés con tostado medio (aunque se encuentra una gran variabilidad entre las barricas de un mismo tipo). Las barricas aportarán elagitaninos, los cuales, provocan una reducción en la astringencia, ya que favorecen las reacciones de condensación de antocianos y taninos actuando como regulador tampón de las reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos (Vivas y Glories, 1996). El grado de tostado y la especie de roble, están directamente relacionadas con el aporte de elagitaninos y el tamaño de poro con la microoxigenación. De las barricas ensayadas, las de tostado medio, son las que más elagitaninos aportan en comparación a las de tostado fuerte. Conforme se incrementa el tiempo de crianza, gracias a la microoxigenación, se producirá una precipitación de taninos condensados, reduciendo su concentración, aunque no se encuentran diferencias significativas. En los vinos conservados en depósito de acero inoxidable, no se observa reducción en la concentración de taninos condensados, porque la ausencia de microoxigenación no permite la polimerización de éstos. Por otra parte, el índice de DMACH nos indica el grado de polimerización de los taninos, varía normalmente entre 10 y 200 en sentido inverso a la masa molecular de los taninos y por tanto a su grado de polimerización.

Los resultados muestran que los vinos criados en barricas, poseen valores de Índice de DMACH, próximos a 50, a los 4 meses de envejecimiento en barrica y cercanos a 35 cuando tienen 8 meses de crianza. La disminución en el Índice de DMACH, indica un incremento en la polimerización de los taninos a los encontrados en los vinos conservados en depósito de acero inoxidable, donde no se favorecen las condiciones para la polimerización de taninos que afectaría a una bajada de los valores de Índice de DMACH.

El índice de PVPP nos muestra el porcentaje de taninos combinado con antocianos. En la tabla 4, se puede observar como el porcentaje de estas uniones se incrementa durante el período de conservación de los vinos, siendo mayor en los vinos que se encuentran en las barricas, con respecto a los vinos conservados en depósitos de acero inoxidable. Este índice presenta un comportamiento lógico, gracias a que la microoxigenación, potencia estas uniones, mediante el puente de etilo, que aporta una mayor estabilidad de estos compuestos, tanto de los antocianos, responsables del color rojo de los vinos tintos, y como de los taninos, con la finalidad de rebajar su astringencia debido a la menor reactividad de los taninos. Este comportamiento ha sido enunciado anteriormente por otros autores (Perez-Magariño et al., 2007), siendo este efecto el que busca la incorporación de oxígeno al vino. Sin embargo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes barricas empleadas, a excepción del roble francés de tostado fuerte donde las uniones antociano-tanino son algo superiores en la barrica de tostado medio, pudiéndose explicar este hecho por que la cesión de elagitaninos será superior a las barricas de tostado fuerte.

CONCLUSIONES.

La microoxigenación de las barricas, permite una mejor estabilización de la materia colorante de los vinos, estimada por las determinaciones polifenólicas de Intensidad Colorante, Antocianos Polimerizados e Índice de PVPP. La intensidad de tostado y la composición química de la madera influye en el incremento de la Intensidad Colorante y el Tono de los vinos, así las barricas de tostado medio al poseer más elagitaninos, provocarán un incremento mayor de las dos variables que las de tostado fuerte.

La estabilización de la materia colorante, cuantificada por el porcentaje de antocianos polimerizados, es superior en los vinos criados en las barricas con tostado medio frente a las barricas de tostado fuerte. El mayor incremento de polifenoles totales se dará en las barricas de roble francés de tostado medio, aunque no hay diferencias significativas respecto al roble

húngaro de tostado fuerte. El aporte de elagitaninos provoca en los vinos un incremento de la astringencia, pero también una condensación de taninos desde el principio.

BIBLIOGRAFÍA

Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M., 2002. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458, 15–27.

Blouin J., 1977. Manuel pratique d'analyse des moûts et des vins. Chambre d'Agriculture de la Gironde.

Cano-López, M.; López-Roca, J.M.; Pardo-Minguez, F.; Gómez Plaza, E., 2009. Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour *Food Chemistry* 119, 191–195.

Fernandez, B.; Cadahía, E.; Sanz, M.; Poveda, P.; Perez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Gonzalez-Huerta, C., 2008. Volatile compounds and sensorial characterization of wines from four spanish denominations of origin, aged in spanish rebollo (*Quercus pyrenaica* Willd) oak wood barrels. *J. Food Chem.* 56, 9046-9055.

Glories, Y., 1978. *Recherches sur la matière colorante des vins rouges*. Thèse a L'Université de Bordeaux II.

Pérez-Magariño, S.; Sánchez-Iglesias, M.; Ortega-Heras, M.; González-Huerta, C.; González-Sanjosed, L., 2007. Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation *Food Chemistry* 101, 881–893.

Pérez-Prieto, L.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A.; Pardo Mínguez, F.; Gómez-Plaza, E., 2002. Maturing Wines in Oak Barrels. Effects of Origin, Volume, and Age of the Barrel on the Wine Volatile Composition.

Ribéreau-Gayon, P. 1979. The chemistry of red wine colour. *The Chemistry of Winemaking*. A. D. Webb. Washington.

Ribéreau-Gayon, P.; Stonestreet, E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin Société Chimique Française*, 9, 119–142.

Sims, C.; Morris, J., 1986. Effects of acetaldehyde and tannins on the color and chemical age of red muscadine wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 163-165.

Sun, B.S.; Leandro, C.; Ricardo-Da Silva, J.M., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4267-4274.

Vivas, N. ; Glories, Y.; Bourgeois, G.; Vitro Y., 1996. Les ellagitanins de bois de coeur de diferentes espèces de chênes (*Quercus* sp.) et de châtaigner. Dosage dans les vins rouges élevés en barrique. *J. Sci. Tech. Tonnell.*, 3: 25-49.

Vivas, N.; Glories, Y., 1996. Role of oak wood ellagitanins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47 (1) p.103-107.

TABLAS
Tabla 1. Parámetros polifenólicos del vino después de la fermentación maloláctica.

PARÁMETROS POLIFENÓLICOS	MEDIA + DS
Índice de Polifenoles Totales (IPT)	67,25±1,41
Antocianos totales (mg/L)	786,67±104,21
Antocianos copigmentados (%)	33,71±5,15
Antocianos libres (%)	42,81±5,15
Antocianos polimerizados (%)	23,48±2,55
Intensidad Colorante	12,63±0,028
Taninos Condensados Totales (g/L)	2,65±0,15
Índice de PVPP (%)	24,32±3,35
Índice de DMACH (%)	71,87±7,13
Índice de Gelatina (%)	74,55±1,56

Tabla 2. Determinaciones de I.C. Tono y antocianos totales después de 8 meses de crianza en barrica de roble francés y húngaro de tostado medio y fuerte.

Roble/Tostado	I. C.	Tono	Antocianos mg/L
Testigo Depósito	13,6±0 a	70,0±0 a	470,0±4,242 a
R. F. T.M. (1)	15,9±0 a	73,9±0 a	445,3±0,144 b
R. F. T.M. (2)	16,2±0 a	73,9±0 a	435,8±3,290 c
R. F. T.F. (3)	15,4±0 a	74,3±0 a	455,5±5,898 b
R. F. T.F. (4)	14,7±0 a	75,6±0 a	464,6±1,722 a
R. H. T.F. (5)	15,0±0 a	74,3±0 a	463,6±1,667 a
R. H. T.F. (6)	15,4±0 a	74,7±0 a	490,5±0,194 d

Tabla 3. Proporción de antocianos copigmentados, libres y polimerizados después de 8 meses de crianza en barrica de roble francés y húngaro de tostado medio y fuerte.

Roble/Tostado	Ant. Copig.	Ant. Libres (%)	Ant. Polim. (%)
Testigo Depósito	22,0±2,8 a	43,0±4,2 a	30,0±1,4 b
R. F. T.M. (1)	19,6±1,4 ab	40,5±0,1 a	39,8±0,1 a
R. F. T.M. (2)	18,7±1,4 a	39,1±3,2 a	42,0±0,4 a
R. F. T.F. (3)	19,2±1,4 ab	39,8±5,8 a	40,8±0,3 a
R. F. T.F. (4)	20,0±1,4 b	38,2±1,7a	41,7±0,6 a
R. H. T.F. (5)	18,2±2,8 a	40,5±1,6 a	41,2±1,7 b
R. H. T.F. (6)	18,8±1,4 a	40,240±0,1 a	40,8±0,1 a

Tabla 4. Valores de IPT, taninos condensados (g/L), índice de DMACH, índice de Gelatina e índice de PVPP después de 8 meses de crianza en barrica de roble francés y húngaro de tostado medio y fuerte.

Roble/Tostado	IPT	Taninos condensados g/L	Índice DMACH	Índice de PVPP	Índice de Gelatina
Testigo Depósito	70,0±0,0 a	2,9±0,0 bc	53,0±1,4 c	22,0±2,8 a	50,0±2,8 a
R. F. T.M. (1)	82,2±2,8 b	2,4±1,0 a	35,4±1,3 ab	26,5±1,0 a	69,8±1,4 b
R. F. T.M. (2)	82,2±1,4 b	2,7±0,8 bc	35,0±1,4 ab	26,1±2,3 a	70,0±2,8 b
R. F. T.F. (3)	79,7±1,4 b	2,6±0,1ab	37,3±0,7 b	26,5±0,4 a	69,6±0,0 b
R. F. T.F. (4)	79,8±0,1 b	2,8±0,9 bc	35,1±1,4 ab	25,2±8,4 a	67,2±0,0 b
R. H. T.F. (5)	78,8±1,4 b	2,8±0,6 bc	34,8±2,8 a	23,6±1,3 a	67,4±1,4 b
R. H. T.F. (6)	78,3±0,2 b	3,1±0,4 c	34,0±1,4 a	22,9±0,4 a	67,1±0,0 b

EFFECTOS DE LA COFERMENTACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICO SENSORIALES DE LOS VINOS OBTENIDOS CON LAS VARIEDADES SYRAH Y VIOGNIER.

J.L. Aleixandre-Tudó, L. Genoves, J.L. Aleixandre, I. Alvarez, M.J. García y V. Lizama

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universidad Politécnica de Valencia
Camino de Vera, s/n
46022 Valencia (España)

RESUMEN

La fermentación conjunta o cofermentación de variedades ha demostrado que la presencia de una cantidad limitada de uvas de variedad blanca en vendimia de una cepa tinta podría contribuir al incremento en los niveles de compuestos fenólicos capaces de comportarse como cofactores de la copigmentación. En el presente trabajo se seleccionaron las variedades Syrah y Viognier realizándose cofermentaciones con distintos porcentajes de Viognier, con el objetivo de estudiar el efecto sobre el color y las características sensoriales de los vinos elaborados. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los parámetros físico-químicos y del color analizados. Por el contrario, aquellos vinos con un 15 y 30% de Viognier fueron los mejor valorados por los catadores en el análisis sensorial, mejorando significativamente tanto la calidad como la intensidad aromática. Los vinos elaborados con un 30% de Viognier mostraron una menor intensidad del color, causada probablemente por un efecto de dilución, por lo que la adición de 15 % de Viognier se presenta como la técnica adecuada para mejorar la calidad sensorial de los vinos elaborados mediante cofermentación de ambas variedades.

Palabras clave: copigmentación, color, calidad sensorial, Syrah, Viognier

ABSTRACT

The co-fermentation between different varieties has shown that the small addition of white grapes to a red wine fermentation could increase those phenolic compounds that can act as copigments, increasing the color due to copigmentation reactions. Syrah and Viognier varieties were selected and several treatments with different amounts of Viognier were performed with the aim to study the effect of Viognier addition on wine color and sensory quality. The results obtained show no statistical differences on color and wine parameters. Otherwise wines added with 15 and 30% of Viognier were the best rated by the sensory

panellists with an improvement on wine aroma intensity and quality, although wines added with 30% of Viognier show lower color density, probably due to a dilution effect. Therefore 15% Viognier addition appeared as the treatment that shows the highest improvement on wine sensory quality.

Palabras clave: copigmentation, color, sensory quality, Syrah, Viognier

1. INTRODUCCIÓN

El color es sin lugar a dudas uno de los atributos sensoriales más importantes de los vinos. Así, el color de un vino permite conocer su edad, su concentración, su estado de conservación e incluso permite predecir algunos defectos que pueden aparecer posteriormente en la fase gustativa de la cata (Aleixandre y Aleixandre-Tudó, 2011).

Los compuestos fenólicos son los que dan al vino su color y gran parte de su sabor. Se clasifican en dos grandes subgrupos: los no flavonoides y los flavonoides. Entre los no flavonoides los más importantes son los ácidos fenólicos, que a su vez se subdividen en ácidos benzoicos y cinámicos. Estos ácidos fenólicos carecen de color en el espectro visible aunque pueden ejercer un cierto papel como copigmentos (Brouillard et al., 1991; Darías-Martin et al., 2001, 2002) y participar por tanto en el color de los vinos tintos jóvenes gracias al fenómeno de la copigmentación. Los flavonoides, entre ellos los antocianos y los flavanoles, influyen en mayor medida sobre el color, su evolución y otras características organolépticas que definen la calidad de los vinos tintos.

Durante muchos años se ha trabajado en la identificación de los pigmentos responsables del color del vino, así como en establecer los mecanismos que conducen a su estabilidad. El fenómeno de la copigmentación se fundamenta en la forma de las moléculas de antocianos, que al ser planas pueden formar asociaciones entre ellas mismas o con otras moléculas, como los copigmentos, dando lugar a estructuras tipo sándwich o complejos de apilamiento vertical (Boulton, 2001). Las uniones entre estas moléculas son de tipo débil (Van der Waals o interacciones hidrofóbicas). Alrededor de estos complejos se genera un entorno hidrofóbico que impide el acceso de las moléculas de agua, de tal manera que no se produce ningún ataque nucleófilo, reduciéndose la formación de bases hidratadas incoloras (carbinol) y desplazándose el equilibrio hacia la formación de estructuras coloreadas (catión flavilio) (Bakowska et al., 2002). El efecto de las reacciones de copigmentación se debe fundamentalmente a dos fenómenos. En primer lugar, se observa un efecto hipercrómico con el incremento de la absorbancia máxima, generándose una mayor intensidad del color. En

segundo lugar, también se observan cambios de la tonalidad del color generalmente hacia tonos azulados, lo que se conoce como efecto batocrómico, con desplazamiento de la longitud de onda máxima hacia valores más elevados (Baranowski y Nagel, 1983; Bloor y Flashaw, 2000).

Moléculas como la cafeína, el ácido clorogénico o los ácidos flavonosulfónicos se han descrito como copigmentos muy activos. Considerando únicamente los posibles copigmentos presentes en el vino, la mayoría de las publicaciones hacen referencia a la (-)-epicatequina, la (+)-catequina, la quercetina, miricetina, el ácido gálico y el ácido cafeico. Este último parece ser un copigmento bastante eficaz (Darias-Martin et al., 2001, 2002, Gris et al., 2005; Malien-Aubert et al., 2001, Schwarz et al., 2005, Kunsági-Máté et al., 2009). Además los taninos del vino (procianidinas) y los taninos aportados por las barricas de roble (taninos elágicos) también pueden actuar como copigmentos, si bien su eficacia no parece ser muy elevada.

La fermentación conjunta o cofermentación de variedades de distinto color es poco conocida. Sin embargo algunos estudios han demostrado que la presencia de una cantidad limitada de uva blanca en mostos de uva tinta podría conducir a incrementar los niveles de compuestos fenólicos capaces de comportarse como cofactores en la copigmentación. Además, la cepa blanca aportaría sus sabores y aromas florales y frutales sin perder las notas típicas de la variedad tinta (Diago-Santamarí y Boulton, 2003).

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el fenómeno de la copigmentación en los vinos obtenidos a partir de la fermentación conjunta de las variedades Syrah y Viognier, así como analizar si la cofermentación ha modificado la intensidad del color y las características organolépticas de los vinos elaborados.

2. MATERIALES Y METODOS

Para la realización del trabajo se eligieron las variedades Syrah y Viognier procedentes de los viñedos de Cold Creek, situados en la denominación Horse Heaven Hills, en Columbia Valley. La vendimia se realizó de forma mecanizada en el momento óptimo de madurez (25-27 °Brix). El proceso de vinificación se llevo a cabo en el Departamento de Investigación de la Bodega Chateau Ste. Michelle (Stimson Lane), situada en el término de Paterson, estado de Washington (EEUU).

Una vez vendimiada la uva se seleccionó, pesó y se distribuyó con el fin de establecer la proporción de Syrah y Viognier deseada, realizándose una fermentación conjunta de Syrah con distintos porcentajes de Viognier (5%, 15%, 30% y 15% con solo hollejos) bajo

condiciones controladas (Tabla 1). Las distintas proporciones de Syrah y Viognier (tratamientos T1, T2, T3, T4) fueron colocadas en una tolva de recepción previamente al despalillado y estrujado de la uva. Las vinificaciones se realizaron en depósitos de acero inoxidable de 200 litros.

Tabla 1 Diseño experimental. Tratamientos realizados

TRATAMIENTOS	
T1	100% Syrah (156 kg)
T2	95% Syrah (148 kg) + 5% Viognier (8 kg)
T3	85% Syrah (132,5 kg) + 15% Viognier (23,5 kg)
T4	70% Syrah (109 kg) + 30% Viognier (47 kg)
T5	85% Syrah (132,5 kg) +15% Viognier solo hllejos (23,5 kg)

En el caso del tratamiento T4 el despalillado estrujado del Syrah y Viognier se hizo por separado. Para el Syrah se siguió el mismo proceso explicado anteriormente, mientras que para el Viognier se realizó primero un tratamiento muy suave en una prensa hidráulica manual, se separó el mosto obtenido y finalmente se despalilló manualmente. Los hollejos del Viognier así obtenidos fueron agregados al mosto de Syrah continuando el proceso de modo similar al descrito para el resto de los tratamientos.

A los depósitos de cada tratamiento se les añadió anhídrido sulfuroso (SO₂) en forma de metabisulfito potásico, en una cantidad de 0,06 g/kg de uva. Posteriormente se adicionó una enzima pectolítica líquida (Endozym ICS 10 Rouge, AEB), para facilitar la extracción de los compuestos fenólicos y aromas, realizándose a continuación la siembra de levaduras *Sacharomyces bayanus* de la marca comercial Red Star (Premier Cuvée) para una óptima evolución de la fermentación. Al tercer día de iniciada la fermentación se corrigió la acidez con ácido tartárico hasta 6 g/L y se adicionaron 450 mg/L de difosfato amónico, la mitad al inicio de la fermentación y la otra mitad al cuarto día para evitar una sobredosis de nitrógeno y mejorar el rendimiento del proceso fermentativo.

La fermentación-maceración se llevo a cabo a una temperatura de 23°C y la aireación del mosto se realizó mediante dos bazuqueos diarios, uno por la mañana y otro por la tarde. Para un correcto seguimiento de la fermentación, inmediatamente después de cada bazuqueo se realizaron controles de temperatura y determinación del contenido en azúcares (°Brix). Una vez finalizada la fermentación alcohólica el vino se descubó separándose por escurrido, prensándose los orujos con una prensa hidráulica de pequeño tamaño. Los vinos obtenidos

por escurrido (vino yema) y por prensado (vino prensa) se almacenaron en dos depósitos diferentes de acero inoxidable de 50 litros de capacidad.

El control de la fermentación maloláctica se llevo a cabo controlando periódicamente la evolución del ácido málico. Tras analizar el sulfuroso libre y total, los vinos elaborados se corrigieron hasta alcanzar 30 mg/L de SO₂ libre y así asegurar una correcta conservación. A continuación se realizó la estabilización por frío, dejando luego reposar los vinos durante una semana antes de proceder al embotellado.

Diariamente y durante 8 semanas se realizaron análisis de pH, acidez volátil, Intensidad Colorante (IC), tono o matiz, Índice de Polifenoles totales (IPT) y porcentaje del color debido a la copigmentación (Boulton, 1996). Las medidas espectrofotométricas se realizaron con un espectrofotómetro Milton Roy 1001 Plus, Ivyland, Palo Alto (EEUU). Del vino terminado se analizaron además de los parámetros mencionados, el grado alcohólico, acidez total, sulfuroso libre (SO₂L) y total (SO₂T), y azúcares reductores siguiendo los métodos de análisis de la OIV (1990).

El análisis sensorial de los vinos elaborados se realizó con un panel de 12 catadores especializados, valorándose los seis atributos sensoriales del color, intensidad y calidad aromática, intensidad y calidad del sabor y evaluación final, utilizando una escala numérica de 1 a 10.

Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1, realizando un Análisis de la varianza ANOVA para ver si existen diferencias significativas entre los parámetros analizados de los diferentes tratamientos. Para un mismo atributo los valores de las columnas con la misma letra indican que no existen diferencias significativas, y con distinta letra que existen diferencias significativas al 95% según el test de Rango Múltiple de Tukey.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 2 vienen los valores medios del grado Brix, pH y acidez total (expresada en g/L de ácido tartárico) de los mostos obtenidos en los diferentes tratamientos. Los valores medios de los parámetros característicos del mosto de Viognier fueron: 28,2 °Brix, 3,82 de pH y una acidez total expresada en g/L de ácido tartárico de 5.

Tabla 2. Valores medios de los parámetros característicos de los mostos obtenidos en cada uno de los tratamientos realizados.

TRATAMIENTO	°Brix	pH	Acidez total (g/L ác. tartárico)
Syrah Control	26,4±1.58	3,97±0.26	4,39±0.23
5% Viognier	25,5±2.36	3,86±0.41	4,65±0.13
15% Viognier	25,7±0.99	3,89±0.34	4,41±0.44
30% Viognier	27±3.46	3,85±0.11	4,8±0.52
15% Viognier-hollejos	26,3±2.51	3,89±0.23	4,73±0.41

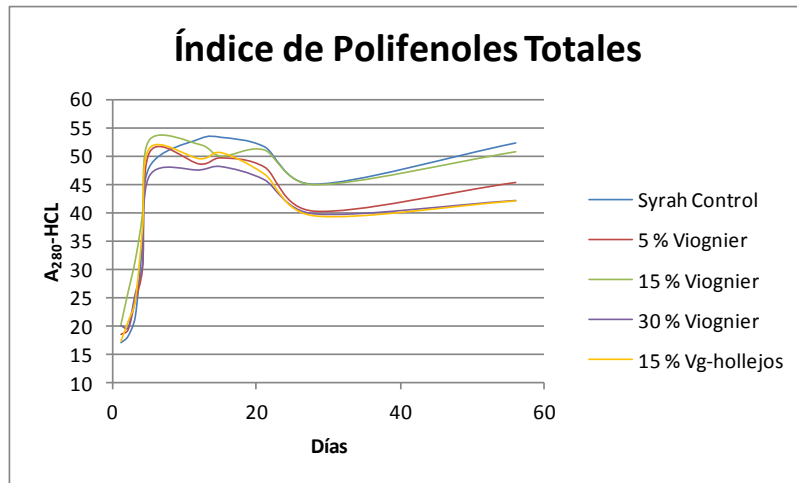
Los valores medios obtenidos del grado alcohólico, acidez total, pH, acidez volátil, SO₂ libre, SO₂ total y azúcares reductores en los vinos analizados se muestran en la Tabla 3. Como puede observarse todos ellos están dentro de los valores normales obtenidos en los vinos con similares características.

Tabla 3. Valores medios de los parámetros característicos determinados en los vinos obtenidos.

Tratam.	Grado alcohólico	Acidez total (g/L ac. tartárico)	pH	Acidez volátil (g/L ac. acético)	SO ₂ L	SO ₂ T	Azúcares reductores (g/L)
T1	13,85±1.26	5,89±0.46	4,05±0.34	0,45±0.02	23,46±3.12	155,0±20.34	1,0±0.06
T2	14,04±1.49	5,23±0.37	3,87±0.26	0,50±0.01	27,60±2.79	160,2±16.29	1,1±0.03
T3	14,15±2.05	5,89±0.81	4,04±0.41	0,44±0.02	27,76±3.63	170,3±14.74	1,1±0.02
T4	13,79±1.66	5,72±0.29	3,98±0.12	0,42±0.02	24,42±3.24	166,4±10.23	1,2±0.03
T5	13,85±1.46	5,43±0.22	3,96±0.09	0,45±0.02	25,36±4.51	168,0±11.59	1,0±0.02

En la Gráfica 1 puede verse la evolución del Índice de Polifenoles Totales (IPT) en función del tiempo para cada uno de los tratamientos realizados. Los vinos elaborados no presentan notables diferencias en cuanto a su contenido fenólico. La materia prima utilizada en todos los tratamientos (uvas de Syrah y Viognier) procedían del mismo viñedo y se siguió un proceso de vinificación muy similar en todos ellos, esto explicaría la similitud existente en la extracción de la materia colorante y en el contenido final de polifenoles.

El espectro de absorción de la materia colorante de los vinos revela mucha información acerca de su composición. La mayoría de los vinos jóvenes tiene un máximo de absorbancia de 520-535 nm y un mínimo de 420 nm. A medida que el vino envejece, y debido a la transformación de los antocianos monómeros en formas polímeras, la absorbancia a 520 nm decrece mientras que a 420 nm aumenta.

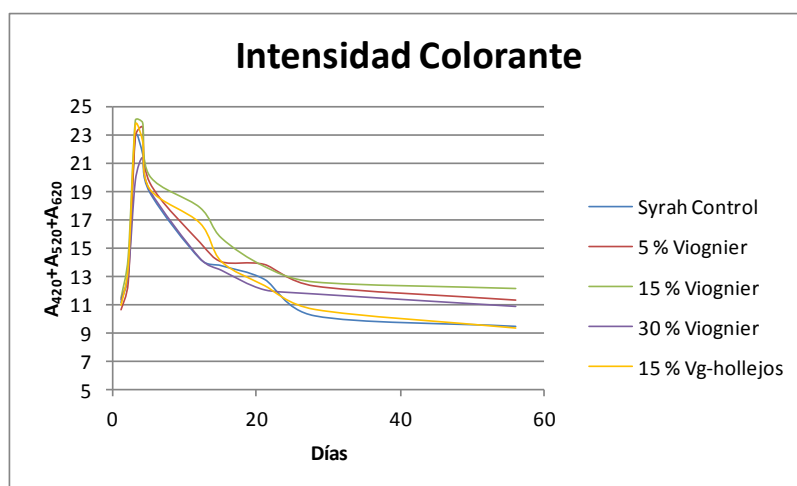


Gráfica 1. Evolución del Índice de Polifenoles Totales para cada tratamiento

En el trabajo realizado por Diago-Santamaria y Boulton (2003), donde se hicieron cofermentaciones de variedades tintas con un pequeño porcentaje de blancas, se encontraron diferencias significativas en la concentración fenólica de los vinos obtenidos. También, en otros trabajos donde se adicionaban copigmentos a las vinificaciones de variedades tintas se observó un incremento en la extracción de antocianos (Álvarez et al., 2008, Fernandez-Iglesias et al., 2004; Schwarz et al., 2005).

La evolución del IPT para los distintos tratamientos puso de manifiesto que los tratamientos T1 y T3 son los que presentaban los valores más elevados de IPT, diferenciándose de los tratamientos T2, T4 y T5, todos con adición de Viognier, que fueron significativamente inferiores.

Como puede observarse en la Gráfica 2 la Intensidad Colorante (IC), en general, aumentó con la adición de Viognier a la variedad Syrah, excepto para el tratamiento T5 (con 30 % de hollejos). Por lo tanto este último tratamiento no es recomendable si lo que se requiere es mantener la intensidad del color. La disminución de la intensidad colorante del vino puede deberse a distintos fenómenos, tales como la fijación de antocianos en las partes sólidas de la uva (como hollejos y pepitas), la absorción por parte de las levaduras de antocianos y taninos, las reacciones de óxido reducción que se producen durante la fermentación y que transforman los antocianos en formas incoloras, y por último al estado de saturación del medio (Aleixandre y Aleixandre-Tudó, 2010).



Gráfica 2. Evolución de la Intensidad Colorante para cada tratamientos.

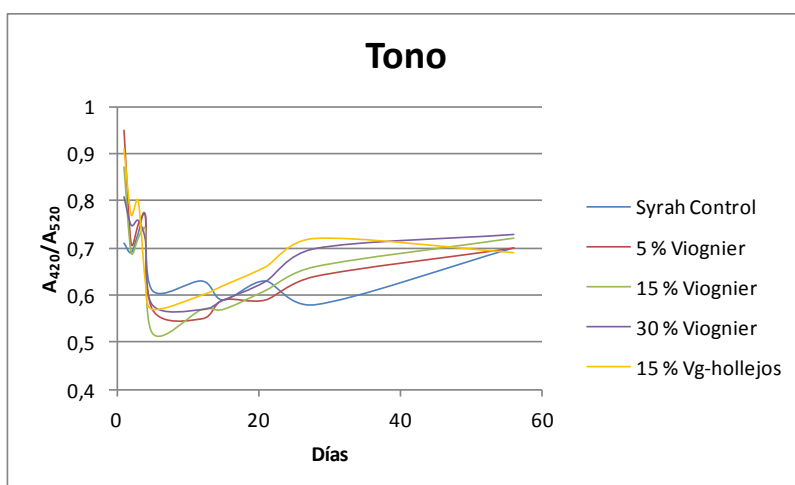
En algunas de las experiencias donde se adicionaban copigmentos antes de la fermentación se observó que dicha adición provocaba un incremento de la intensidad colorante (González-Manzano et al., 2008), siendo más efectivos unos copigmentos que otros. Sin embargo estos efectos no se observaron con la adición de hollejos de uva blanca (Fernández-Iglesias et al., 2004). Además otros autores citan como la intensidad colorante disminuye con el tiempo y mucho más rápidamente en las muestras testigo sin copigmentos (Darías-Martin et al., 2001, 2002) tal y como observamos en los resultados obtenidos, considerando un incremento en la concentración de copigmentos en aquellos vinos elaborados con distintas proporciones de Viognier.

El tratamiento T1 obtuvo finalmente la menor IC junto con el tratamiento que tenía un 15% de hollejos de Viognier. Los tratamientos T2, T3 y T4 resultaron significativamente superiores, destacando el tratamiento con 15% de Viognier.

Los estudios con soluciones modelo demostraron un claro aumento del color (Boulton, 2001; Liao et al., 1992; Eiro e Heinonen, 2002; Schwarz et al., 2005), pero es evidente que el vino es una solución mucho más compleja y existen muchos más compuestos que influyen decisivamente en el color.

El tono o matiz se define como la relación A_{420}/A_{520} y es más una medida de la tonalidad del color de vino, que de su intensidad. En la Gráfica 3 se muestra la evolución del tono para los valores obtenidos en los distintos tratamientos. Los vinos presentan valores comprendidos entre 0,55 y 0,73 aproximadamente, por lo que están dentro de los valores normales. No existen diferencias importantes entre los distintos tratamientos. En el trabajo realizado por Fernández-Iglesias et al. (2004) se observó que el vino con adición del

copigmento ácido cafeico presentaba un tono más bajo, poniéndose de manifiesto el efecto estabilizador de este copigmento (Aleixandre-Tudó, 2012; Gauche et al., 2010).



Gráfica 3. Evolución del Tono para cada uno de los tratamientos realizados

En la Tabla 4 vienen los valores medios del porcentaje del color debido a la copigmentación en los diferentes vinos elaborados. Todos los valores se mantienen en un porcentaje de copigmentación similar, destacando los tres tratamientos a los que se les adicionó un 5, 15 y 30 % de Viognier. El tratamiento T5, donde solo se adicionaron los hollejos de la uva blanca, presenta un porcentaje de copigmentación ligeramente inferior al tratamiento control.

Tabla 4. Porcentaje del color que corresponde a las reacciones de copigmentación en cada uno de los tratamientos.

TRATAMIENTO	% Copigmentación
T1	19,65
T2	20,74
T3	21,62
T4	24,09
T5	18,93

Los estudios realizados por Hermosin-Gutierrez et al. (2003) en vinos de Cencibel de Castilla la Mancha pusieron de manifiesto que la contribución de la copigmentación al color de los vinos fue importante en algunos vinos con contenidos en etanol normales en vinos tintos, mostrando un aumento de hasta el 53 y 57%. En los trabajos realizados en vinos tintos de Cabernet Sauvignon en California (USA) se encontraron porcentajes de copigmentación del 25-50% (Levengood, 1996). Boulton (2001) en sus investigaciones asevera que no se

produce ninguna mejora si la variedad tinta utilizada tiene una cantidad suficiente de copigmentos o si las variedades blancas añadidas no tienen suficientes copigmentos, poniendo en evidencia que no todos los cultivares blancos presentan la misma concentración fenólica y que existen muchas combinaciones posibles que podrían ser experimentadas, obteniéndose posiblemente resultados más satisfactorios.

En la Tabla 5 aparecen los valores medios de los atributos evaluados en el análisis sensorial de los vinos. Los resultados obtenidos en el análisis de la varianza realizado muestran diferencias significativas entre las puntuaciones medias del color de un tratamiento a otro para un nivel de confianza del 95 %. Aunque la mayor puntuación correspondió al vino de Syrah control, ya que no presentó diferencias significativas con respecto al color de los vinos obtenidos con los tratamientos T2 y T3.

Tabla 5. Influencia de los distintos tratamientos sobre los valores medios de los atributos considerados en el análisis sensorial de los vinos.

	AROMA			SABOR		EVALUACION FINAL
	COLOR	INTENSIDAD	CALIDAD	INTENSIDAD	CALIDAD	
T1	7,58 ± 0,79 a	6,50 ± 1,16 b	6,58 ± 1,16 bc	6,33 ± 0,49 b	6,50 ± 0,52 a	6,50 ± 0,67 b
T2	7,25 ± 0,96 abc	6,42 ± 1,08 b	6,17 ± 1,11 c	6,33 ± 1,07 b	5,83 ± 0,83 b	6,42 ± 0,67 b
T3	7,42 ± 0,51 ab	6,83 ± 0,83 b	7,00 ± 0,60 ab	7,08 ± 0,79 a	6,42 ± 0,66 ab	7,00 ± 0,74 ab
T4	6,75 ± 0,62 c	9,72 ± 0,79 a	7,67 ± 0,49 a	6,92 ± 0,90 ab	6,67 ± 0,77 a	7,42 ± 0,79 a
T5	7,00 ± 0,60 bc	6,50 ± 1,16 b	6,75 ± 0,86 bc	6,50 ± 0,79 ab	6,25 ± 0,96 ab	6,58 ± 0,90 b

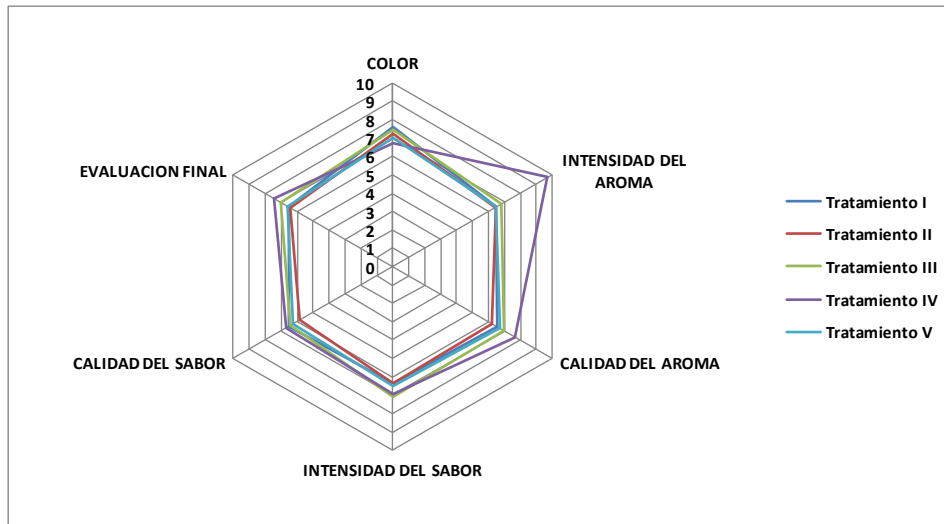
Letras diferentes para cada una de las columnas indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95 %.

El vino con un 30% de Viognier obtuvo la menor puntuación presentando diferencias significativas con respecto al Syrah control y al vino con un 15% de Viognier. Por lo tanto, la adición de un 30% de Viognier no es favorable en la evaluación del color del vino.

El vino 15% Viognier-hollejos tampoco destacó por su color. Algunos estudios realizados ponen de manifiesto que los copigmentos que contribuyen al incremento del color se encuentran en los hollejos de la uva y no en el mosto (Boulton, 2001). En este trabajo el comportamiento respecto al color del vino obtenido con 15% Viognier-hollejos no produjo el incremento del color esperado.

En cuanto a la intensidad del aroma el tratamiento con 30% Viognier presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los restantes tratamientos. Por otra parte el vino elaborado con un 15% Viognier-hollejos presentó menor intensidad y calidad del aroma que el de 15% solo Viognier, por lo que no se justifica el trabajo previo de obtener solo hollejos si el resultado es más favorable añadiendo uva entera.

En la Gráfica 4 puede verse que el vino elaborado con un 30% de Viognier destaca tanto por la intensidad como por la calidad del aroma. A partir del tratamiento estadístico realizado se observó que son necesarias adiciones superiores al 5% para que se produzca una mejora en el aroma de los vinos estudiados.



Grafica 4. Diagrama de tela de araña del análisis sensorial de los vinos

El sabor fue evaluado como más intenso para los vinos con un 15% y un 30% de Viognier, aunque solo para el vino elaborado con 15% de Viognier se observaron diferencias significativas con respecto al vino Syrah control y el de 5% Viognier. En cuanto a la calidad del sabor los resultados son similares, presentando solamente diferencias los vinos obtenidos con los tratamientos T2 y T4, siendo el T4 el mejor valorado por su sabor. Al añadir Viognier los sabores a especias, pimienta o canela y la sensación astringente característica de un Syrah clásico se suavizan. Se obtienen así vinos más armónicos con un postgusto más agradable. El sabor tampoco se ve favorecido con la adición de bajas cantidades de Viognier. Por último en el vino 15% Viognier-hollejos no se observa una mejora del sabor por lo que no se justifica el trabajo adicional que conlleva este tratamiento.

Los vinos que obtuvieron mayor puntuación en la evaluación final fueron los elaborados con el 15 y 30% Viognier, no existiendo diferencias significativas entre ellos. El vino obtenido con la adición de un 30% de Viognier presentó diferencias significativas respecto a los vinos obtenidos con los tratamientos T1, T2 y T5.

Hay que destacar que el vino con 30% de Viognier fue el preferido por los catadores, aún cuando en la evaluación del color no fue el mejor valorado (Gráfica 4). Por otro lado los vinos Syrah control y 5% Viognier fueron los que menor puntuación obtuvieron tanto en la

evaluación global como en la mayoría de los atributos analizados. Las características organolépticas percibidas por el panel de catadores para cada tipo de vino pueden resumirse de la forma siguiente:

- Syrah control: presenta el flavor típico de la variedad (aromas y sabores especiados, con notas a ciruelas pasas, pimienta y frutos del bosque). El final de boca es amargo y astringente, lo que revela un alto contenido en taninos.
- 5% Viognier: presenta las mismas características del Syrah control, pero con la aparición de ligeros aromas a plátano y melocotón, característicos del Viognier.
- 15% Viognier: las características del Syrah se mantienen pero se perciben notoriamente las características organolépticas típicas del Viognier, destacando por aromas y sabores florales, principalmente de melocotón y pera.
- 30% Viognier: las notas típicas aportadas por el Syrah se pierden en medio del aroma floral y frutal característico del Viognier, obteniéndose un vino suave y sumamente agradable al paladar.
- 15% Viognier-hollejos: a diferencia del 15% Viognier presenta un sabor herbáceo y en el final de boca aparece un ligero sabor amargo y astringente.

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el trabajo se pone de manifiesto que los vinos obtenidos únicamente presentan pequeñas diferencias con respecto a la intensidad colorante, alcanzando los vinos de los tratamientos con 5, 15 y 30% de Viognier valores ligeramente superiores a los demás. La composición fenólica fue similar en todos los vinos así como el tono y los demás parámetros físico-químicos analizados. Es posible que la variedad Syrah elegida tuviera una cantidad suficiente de copigmentos y no necesitara el aporte de otras variedades, o bien que la variedad Viognier no tuviera suficientes cofactores como para influir significativamente en el fenómeno de la copigmentación.

En la valoración sensorial sí que se observaron diferencias significativas en los vinos analizados, siendo los procedentes de la adición de un 5 y 30% de Viognier los mejor evaluados, ya que obtuvieron una puntuación significativamente mayor para los atributos de intensidad y calidad del aroma. El vino con un 15% de Viognier obtuvo una puntuación significativamente mayor que el de un 30%, respecto al color. Sin embargo, en la puntuación final ambos vinos fueron los mejor valorados. Es importante poner de manifiesto que en el vino obtenido con la adición de un 30% Viognier se resaltan las características del Viognier y se pierde la esencia típica del Syrah.

Así pues, la cofermentación de Syrah con un 15% de Viognier mejora las características organolépticas del Syrah y Viognier sin que haya una pérdida en la intensidad del color. Este tratamiento conjuga los sabores intensos a especias, canela, pimienta y frutos del bosque del Syrah con el delicado aroma floral y afrutado aportado por el Viognier. Se obtiene así un vino más complejo, de gran personalidad, sumamente agradable al paladar, con buena intensidad colorante, y características sensoriales nuevas y poco comunes en un vino clásico de la variedad Syrah.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aleixandre, J.L.; Aleixandre-Tudó, J.L. (2010). Manual de Vinos y bebidas. Editorial Universidad Politécnica de Valencia, 389 págs.

Aleixandre, J.L.; Aleixandre-Tudó, J.L. (2011). Conocimiento del vino. Cata y degustación.. Editorial Universidad Politécnica de Valencia, 480 págs.

Aleixandre-Tudo, J.L. (2012). Efecto de la adición de copigmentos sobre la composición fenólica de vinos tintos de Tempranillo elaborados por distintas técnicas de vinificación. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Álvarez, I.; Aleixandre, J.; García, M.J.; Lizama, V.; Aleixandre-Tudó, J.L. (2008). Effect of the prefermentative addition of copigments on the phenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *Eur. Food Res Technol.* 228: 501-510.

Bakowska, A.; Kucharsca, A.Z.; Oszmianski, J. (2002). The effects of Heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry* 81 (2003) 349 – 355.

Baranowski, E.S.; Nagel, C.W. (1983). Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model solutions. *J. FoodSci.* 38, 932-936.

Bloor, S.J.; Falshaw, R. (2000). Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers. *Photochemistry*, 53, 575-579.

Boulton, R. (2001). The copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 , 67–87.

Boulton, R. B. (1996). Methods for the assement of copigmentation in red wines. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV

Brouillard, R., Wigand, M. C., Dangles, O., Cheminat, A. (1991). PH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin by polyphenols, purine and pyrimidme derivates. *J. Chemical Society Perkin Trans. 2*, 1235-1241.

Comisión Europea, (1990). Reglamento (CEE) No 2676/90 de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos oficiales de análisis de vinos, zumos y mostos de uva. En: *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L272* (3 de octubre de 1990). Comisión Europea ed. Bruselas. Bélgica: 0001-0192.

Darias-Martín, J., B. Martín, M. Carrillo, R. Lamuela, C. Díaz And R. Boulton (2002). The effect of caffeic acid on the color of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50 (7): 2062-2067.

- Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Díaz, E.; Boulton, R.B. (2001). "Enhancement of wine colour by prefermentation addition of copigments". *Food Chemistry* 73 (2001) 217–220.
- Diago-Santamaria, M.P.; Boulton, R.B. (2003). Effect of cofermentation of red grapes with different amounts of White skins on the color of young red wines. UC Davis Thesis. 54th Annual ASEV Meeting.
- Eiro, M. Y Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 7461-7466.
- Fernandez-Iglesias, C.M.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. (2004). La copigmentación en vinos tintos. Efecto de la adición de cofactores. *Enólogos. Revista oficial de la Federación Española de Asociación de Enólogos*, 29: 34-38.
- Gauche, C.; Da Silva-Malagoli, E.; Bordiguen-Luiz, M. (2010). Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids. *Sci. Agric. (Piracicaba, Brazil)* V.67, n-1, p. 41-46.
- Gonzales-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J.; Escribano-Bailon, T. (2008). Color implication of self-association processes of wine anthocyanins. *Eur. Food Res. And Technol.* 226: 483-490.
- Gris, E.F.; Ferreira, E.A.; Falcao, Ld; Bordignon-Luiz, M.T., (2005). Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extract in model system. *Food Chemistry*, en prensa.
- Hermosín Gutiérrez, I. Y González, P. (2003). Influence of ethanol content on the extend of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem*, 51, 4079-4083.
- Kunsagi-Mate, S.; Kumar, A.; Sharma, P.; Kollar, L.; Nikfardjam, M. (2009). Effect of molecular environment on the formation kinetics of complexes of malvidin-3-o-glucoside with caffeic acid and catechin. *J. Phys. Chem. B.* 113: 7468-7473.
- Levengood, J. (1996). A study of copigmentation in 1995 Cabemet Sauvignon wines. M.S. Thesis, Univ. Of California. Davis, CA.
- Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. (1992). "Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines", *J. Sci. Food. Agric.*, 1992; 59: 299-305.
- Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M.J. (2001). Color stability of commercial based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 170-176.
- OIV (1990). *Recopilación de los Métodos internacionales de Análisis de vinos.*
- Schwarz, M.; Picazo-Bacete, J.J.; Winterhalter, P.; Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *J. Agric. Food Chem*, 53, 8372-8381.
- Schwarz, M.; Picazo-Bacete, J.J.; Winterhalter, P.; Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *J. Agric. Food Chem*, 53, 8372-8381.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos.* 21-22. AMV. Ediciones, Madrid.

EVALUACIÓN QUÍMICO SENSORIAL DE VINOS DE FONDILLÓN ELABORADOS CON DIFERENTES TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN

I. Alvarez, J.L. Aleixandre, A. Martínez, M.J. García, V. Lizama, J.L. Aleixandre-Tudó

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universidad Politécnica de Valencia
Camino de Vera, s/n
46022 Valencia (España)

RESUMEN

El Fondillón es un vino noble producido en la Denominación de Origen Alicante, cuya calidad es mundialmente reconocida. Se elabora con uvas de Monastrell sobremaduradas en la cepa, en su fermentación únicamente intervienen levaduras autóctonas y la riqueza alcohólica adquirida es debida exclusivamente a la transformación del azúcar presente en el mosto durante la fermentación. El proceso de fermentación es muy largo y su crianza se realiza en toneles mediante un sistema de soleras con una estancia mínima de 10 años. Tradicionalmente se realizaban maceraciones cortas y largas crianzas, dando lugar a un vino con poca capa de color y muy marcado por el envejecimiento. En el momento presente este tipo de vinos convive con otros de corte más moderno, elaborados con largas maceraciones y menor tiempo de envejecimiento. En este trabajo se han caracterizado los vinos de fondillón que existen en el mercado en función de su composición polifenólica y su valoración organoléptica, encontrando dos grupos muy diferenciados, uno que se corresponde con aquellos vinos muy marcados por el envejecimiento, y un segundo grupo formado por vinos con más carga polifenólica debido a un proceso más largo de maceración y menor tiempo de envejecimiento. La valoración organoléptica realizada por un panel de catadores formado por expertos y por consumidores, puso de manifiesto la mayor aceptación de los vinos del segundo grupo, de corte más moderno. En cambio, si se analiza exclusivamente los resultados de la cata realizada por el panel de expertos, entrenados para catar este tipo de vinos, no se observan diferencias significativas entre los dos grupos, encontrándose diferencias entre las distintas marcas analizadas, independientemente del grupo al que pertenezcan.

INTRODUCCIÓN

Las primeras noticias escritas sobre el Fondillón datan del periodo árabe, siendo por tanto el primer vino con nombre propio en el mundo. Su nacimiento se atribuye a un régimen

especial de arrendamiento de las tierras, que consistía en que mientras quedaran viñas en producción, la explotación de los terrenos seguía siendo derecho del arrendatario. Como consecuencia de este peculiar sistema, a pesar de que las plantas se iban extinguiendo y agotando, el viticultor seguía cultivando y recolectando con el fin de no perder sus derechos, aunque la recogida se hacía tardía, con uvas casi pasificadas, y la fermentación y crianza se realizaba en los toneles más viejos de las bodegas durante largos períodos de tiempo.

El Fondillón en el siglo XV ya era uno de los más afamados vinos del mundo; la filoxera y los cambios en la tipología de los vinos y en los gustos de los consumidores, trajeron consigo la casi desaparición de este vino durante la primera mitad del siglo XX, recuperándose posteriormente y gozando de nuevo en la actualidad de un gran prestigio enológico. Este vino, en sus características organolépticas clásicas, se asemeja a los vinos rancios de Oporto, Madeira, Marsalas o a los Palos Cortados, Olorosos y Amontillados de Andalucía, aunque en la actualidad algunos elaboradores no son partidarios de someter al Fondillón a un envejecimiento tan prolongado, elaborando unos vinos de un corte más moderno.

La variedad utilizada para elaborar los vinos Fondillón es la Monastrell, cuyo origen es el levante español, variedad de la que se obtienen vinos tintos bastante alcohólicos y coloreados, con baja acidez, muy expresivos y afrutados en nariz con taninos vivos en boca y con gran estructura. El peculiar proceso de elaboración de los vinos Fondillón da lugar a vinos característicos y diferenciado de otros, más marcados por la elaboración que por la variedad de procedencia, con un tono del violáceo al ámbar con matices de teja a medida que envejece, es abocado o ligeramente dulce con aromas de pasa y madera noble, siendo su graduación alcohólica alta, estando especialmente recomendado como vino de postre o de aperitivo.

La caracterización de los vinos basada en su composición ácida, aromática, polifenólica, etc., puede realizarse en función de la variedad de uva, la denominación de procedencia, clima, suelo, prácticas de cultivo, técnicas de elaboración, etc. (Aleixandre, 200; Álvarez et al., 2003; Saurina, 2010; Soto et al., 2011), utilizándose los perfiles de estos vinos como posibles descriptores de su calidad. A pesar de ser uno de los vinos más antiguos del mundo, no existe una caracterización físico-química ni organoléptica de los vinos de Fondillón, tal como sucede en los vinos de Jerez desde 1987 (Martínez de la Osa et al., 1987), caracterizándose estos vinos en función de su composición en aminoácidos (Botella et al., 1990), aromática (Cortés et al., 1998; Freitas et al., 1999; Zea et al., 2001; Ortega et al., 2003, 2008), polifenólica (Barón et al., 1997; Fabios et al., 2000). La caracterización aromática de

los vinos de Oporto ha sido realizada por numerosos autores (Williams et al., 1983; Freitas et al., 1999), así como la relación entre la degradación de carotenoides y compuestos volátiles y el grado de envejecimiento (Silva et al., 2008), y en función del proceso de elaboración (Silva et al., 2004). También se ha realizado la predicción del tiempo de añejamiento de los vinos de Madeira en función de diversos parámetros aromáticos y polifenólicos (Pereira et al., 2011). Los cambios de las concentraciones de ácidos grasos, ésteres, alcoholes superiores y compuestos fenólicos observados durante el envejecimiento de los vinos de Oporto, Jerez, Madeira y Marsala, permitió la predicción de la edad de estos vinos y su autenticidad, encontrándose que aquellos compuestos volátiles más marcados por el envejecimiento, contribuyen a la percepción sensorial del sabor (Pecorainoa et al., 2008).

La caracterización de los vinos de Fondillón desde los distintos aspectos mencionados es un reto aún no abordado. En este trabajo se han caracterizado estos vinos en función de su composición polifenólica y su valoración organoléptica, relacionando su composición con el proceso de elaboración y crianza realizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se han utilizado todos los vinos de Fondillón existentes en este momento en el mercado:

Gran Reserva Fondillón Salvador Poveda 1987

Solera Fondillón Francisco Gómez 1972

Vinos de Algueña Fondillón 1980

Terra Natura Fondillón 1988

Gran Reserva Brotons 1964

Gran Reserva Fondillón Alone 1987

Gran Reserva Primitivo Quiles Solera 1972

Reserva Especial Tesoro De Villena Solera 1982

Gran Mañán Fondillón Solera 1982

Casta Diva Fondillón Bodegas Gutierrez De La Vega Solera 1987

Se ha establecido la composición química de estos vinos mediante la determinación de su grado alcohólico, acidez volátil, concentración de azúcares reductores, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, glicerina, acetaldehído, siguiendo los métodos oficiales de la UE (1977, 1979, 1981). Los antocianos totales (Revilla et al., 2001) se determinaron por cromatografía líquida, analizándose por métodos espectrofotométricos la

absorbancia a 420, 520 y 620 nm, la Intensidad Colorante, el Índice de Folin-Ciocalteu, la concentración de catequinas, la concentración de taninos, la concentración de polifenoles, el Índice de PVPP, el Índice de Dmach y el Índice de gelatina (Álvarez et al., 2009). Los vinos han sido catados por 10 catadores seleccionados, entrenados y controlados según las normas UNE 87024-1:1995, UNE 87013:1996 y UNE 87024-2:1996), y 10 consumidores no expertos. Para el análisis de datos se usó el paquete Statgraphic Plus 5.1, realizándose análisis discriminante y ANOVA para establecer la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos vinos de Fondillón.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra la composición media de los 10 vinos analizados. El ANOVA realizado con cada uno de los parámetros muestra diferencias significativas en la mayor parte de los vinos, y esa gran dispersión no permite establecer tendencias. Para agrupar estos vinos en función de sus características comunes, se ha realizado un Análisis Discriminante utilizando los parámetros químicos evaluados, encontrando que con las dos primeras funciones discriminantes obtenidas se explica el 91,91 % de la variabilidad, representando la primera el 89,48 % y la segunda el 2,43 %. En la figura 1 podemos observar que mediante este análisis se establecen 2 grupos claramente diferenciados, uno de ellos formado por 8 de los 10 vinos, y un segundo grupo que engloba a los vinos 2 y 10, siendo la primera función discriminante la responsable de esta diferenciación, estando la primera función discriminante asociada principalmente a los parámetros polifenólicos estudiados: absorbancia a 420, 520 y 620 nm, intensidad del color, concentración de antocianos, taninos y polifenoles.

En la tabla 2 se muestra el ANOVA realizado considerando estos 2 grupos establecidos en el análisis discriminante. Además de los parámetros polifenólicos, también existen diferencias en la composición en ácidos de estos dos tipos de vinos, encontrándose que los vinos con mayor concentración en polifenoles, también presentan mayor concentración en ácido cítrico, málico y tartárico. Aunque no existen diferencias significativas, es interesante destacar que los vinos de este grupo tienen los valores más bajos de grado alcohólico.

Las diferencias entre estos vinos pueden ser debidas a la materia prima, ya que su grado alcohólico y su composición ácida indican que las uvas no han sufrido una sobremaduración en la cepa, pero sobre todo las diferencias pueden atribuirse al proceso de vinificación, en el cual la extracción polifenólica ha sido mucho más elevada en el segundo

grupo, buscando una tipología de vinos más modernos, más coloreados y estructurados, que aguanten el envejecimiento sin sufrir una oxidación intensa.

Para establecer que tipología de vinos son los mejor valorados y los más aceptados por el consumidor, se realizó una valoración organoléptica mediante un panel de catadores formado por expertos y por consumidores. Si analizamos conjuntamente los resultados del análisis organoléptico de todos los catadores, podemos observar la mayor aceptación de los vinos del segundo grupo, de corte más moderno. En cambio, si se analiza exclusivamente los resultados de la cata realizada por el panel de expertos, entrenados para catar este tipo de vinos, no se observan diferencias significativas entre los dos grupos, encontrándose diferencias entre las distintas marcas analizadas, independientemente del grupo al que pertenezcan. En las figuras 2 y 3 se muestran los diagramas en tela de araña de los parámetros sensoriales valorados, considerando la totalidad de los vinos, y los 2 grupos definidos en el análisis discriminante. Podemos observar que los vinos del grupo 2 son los más coloreados, presentando un matiz caoba, a diferencia de los vinos tradicionales que presentan mayor tonalidad teja y ámbar, pero son también los más estructurados, amargos y astringentes, menos suaves y alcohólicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis químico, ya que los vinos 2 y 10 son los que tienen mayor concentración polifenólica, mayor color, un mayor índice de gelatina y por tanto mayor astringencia, mayor concentración de taninos.

CONCLUSIONES

Los vinos de Fondillón que se encuentran en el mercado pueden clasificarse en dos grupos en función de su composición polifenólica y su valoración organoléptica, un grupo que corresponde a vinos de uva sobremadurada, poco macerados y sometidos a largos períodos de envejecimiento, y un segundo grupo formado por vinos con más carga polifenólica debido a un proceso más largo de maceración y menor tiempo de envejecimiento. La valoración organoléptica de estos vinos confirma estos resultados y pone de manifiesto la mayor aceptación por parte del consumidor no experto de los vinos del segundo grupo, de corte más moderno y menos marcados por la oxidación.

BIBLIOGRAFÍA

Aleixandre, J.L.; Lizama, V.; Álvarez, I. Et García, M.J. 2000. Contribución a la diferenciación de vinos tintos varietales de la Comunidad Valenciana a partir del contenido en alcoholes y polioles, *Food Sci. Tech. Int.*, 6, (1), 39-45.

Álvarez, I.; Aleixandre, J.L.; García, M.J.; Casp, A.; Zúnica, L. 2003. Geographical differentiation of white wines from three subzones of the designation of origin Valencia. *Eur Food Res Technol.*, 217:173–179.

Alvarez. I.; Aleixandre, J.; García, M.J.; Lizama, V. JL. 2009. Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *Europ Food Research and Techn.*, 218: 501-510.

Baron, R., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. 1997. Changes in phenolic compounds and browning during biological ageing of Sherry Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1682–1685.

Botella, M. A., Perez-Rodriguez, L., Domecq, B., Valpuesta, V. 1990. Amino acids content of fino, and oloroso sherry wines. *American Journal of Enol. and Viticulture*, 41, 12-15.

Cortes, M. B., Moreno, J., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. 1998. Changes in aroma compounds of Sherry wines during their biological ageing carried out by *Saccharomyces cerevisiae* races bayanus and capensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2389-21394.

Fabios, M., Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. 2000. Phenolic compounds and browning in Sherry wines subjected to oxidative and biological ageing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2155–2159.

Freitas, V.; Ramalho, P.; Azevedo, Z.; Macedo, A. 1999. Identification of some volatile descriptors of the rock-rose like aroma of fortified red wines from Douro Demarcated Region. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4327-4334.

Martinez de la Ossa, E., Perez, L., Caro, I. 1987. Variations of the major volatiles through agins of Sherry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(4), 321–325.

Ortega, A. F., Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. 2003. Changes in color and phenolic compounds during oxidative aging of Sherry white wine. *Journal of Food Science*, 68(8), 2461–2468.

Ortega, A.; Mayen, M.; Medina, M. 2008. Study of colour and phenolic compounds in two models of oxidative ageing for Sherry type white wines. *Food Control*, 19, 949-956.

Pecorainoa, G.; Scalicib, L.; Avello, G.; Ceraulob, L. 2008. Distribution of volatile organic compounds in Sicilian groundwaters analysed by head space-solid phase micro extraction coupled with gas chromatography mass spectrometry. *Water Research*, 42, 3563-3577.

Revilla, I.; Gonza´lez-San Jose´, M. L. 2001. Effect of different oakwoods on aged wine color and anthocyanin composition. *Eur.Food Res. Technol.*, 213, 281-285.

Rudnitskaya, A.; Delgadillo, I.; Legin, a.; Rocha, S. 2007. Prediction of the Port wine age using an electronic tongue. *Chemometrics and Intelligent Laborator Systems*, 88, 125-131.

Saurina, J. 2010. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 29, No. 3, 234-245.

Silva Ferreira, A.C.; Guedes de Pinho, P. 2004. Nor-isoprenoids profile during Port wine ageing: influence of some technological parameters. *Anal. Chimica Acta*, 513, 169-176.

Silva Ferreira, A.C.; Monteiro, J.; Oliveira, C.; Guedes de Pinho, P. 2008. Study of aromatic compounds in Port wines from carotenoid degradation. *Food Chemistry*, 110: 83-87.

Soto, E.; Vazquez, S.; Segade, R.; Cortes, D. 2011. Classification of red and white wines by denomination of origin according to phenolic composition and colour characteristics and correlation with standard parameters. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 542-548.

UE. Métodos oficiales de Análisis de Vinos (B.O.E. 22-7-1977, 23-7-1977, 25-7-1977, 26-7-1977, 27-7-1977, 30-8-1979 y 14-10-1981).

Williams, A.A.; Lewis, M.J.; May, H.V. 1983. The volatile flavour components of commercial Port wines. *J. Sci. Food Agric.*, 343, 11-18.

Zea, L.; Moyano, L.; Moreno, J.; Cortes, B.; Medina, M. 2001. Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chem*, 75:79-84

TABLAS

Tabla 1. Composición media de los vinos de Fondillón.

VINO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Azúcar	5,32	6,28	1,20	1,40	8,00	2,56	1,20	1,84	8,24	9,68
° alcohólico	16	16	18	18	18	16	16	16,5	17	16
Acetaldehído	25,00	48,00	10,00	19,00	24,00	128,00	51,00	18,00	46,00	8,00
Glicerol	9,85	9,97	10,26	7,08	11,00	7,54	7,80	10,36	6,43	6,80
Ac. Volátil	1,09	1,11	1,53	0,58	1,17	1,19	0,66	0,34	0,54	0,85
Ac. Cítrico	0,13	0,26	0,16	0,16	0,29	0,10	0,26	0,10	0,23	0,36
Ac. Málico	0,34	0,88	0,26	0,62	0,77	0,03	0,43	0,34	0,59	1,11
Ac. Láctico	1,20	1,10	1,78	0,75	1,23	1,46	1,03	2,65	0,86	0,33
Ac.Tartárico	1,80	1,90	0,50	0,90	0,60	0,70	1,60	0,50	1,20	2,50
A420	2,94	4,70	2,41	1,91	3,71	1,59	2,34	2,91	1,82	5,50
A520	1,61	3,16	1,14	0,86	1,32	0,78	1,16	1,34	1,28	2,61
A620	0,41	0,88	0,35	0,31	0,47	0,21	0,29	0,36	0,30	0,77
IC	4,96	8,74	3,90	3,08	5,49	2,57	3,79	4,60	3,40	8,88
Ant. mg/L	360,53	659,36	172,00	151,73	218,07	130,26	237,33	265,56	258,80	626,59
Polif. mg/L	1700,4	2224,8	1236,7	1008,1	1834,8	1699,3	1282,7	1611,7	1291,8	2591,3
Índice Fólín	22,65	29,03	18,59	13,59	25,70	16,12	14,62	24,29	17,49	34,22
Tanino mg/L	1043,8	1450,4	1086,1	750,1	1436,9	1227,3	844,6	1133,8	860,2	2175,8
Ín. Etanol	12,88	19,52	26,20	17,45	21,88	47,09	38,88	13,06	20,39	43,94
Ín. DMACH	28,86	38,86	12,03	12,64	7,80	15,61	12,89	7,87	13,64	17,30
Ín. PVPP	31,48	25,85	35,31	45,10	25,96	31,98	40,12	19,82	41,37	17,00
Ín. Gelatina	18,50	71,23	42,14	21,16	20,12	61,65	56,87	55,10	55,23	70,55

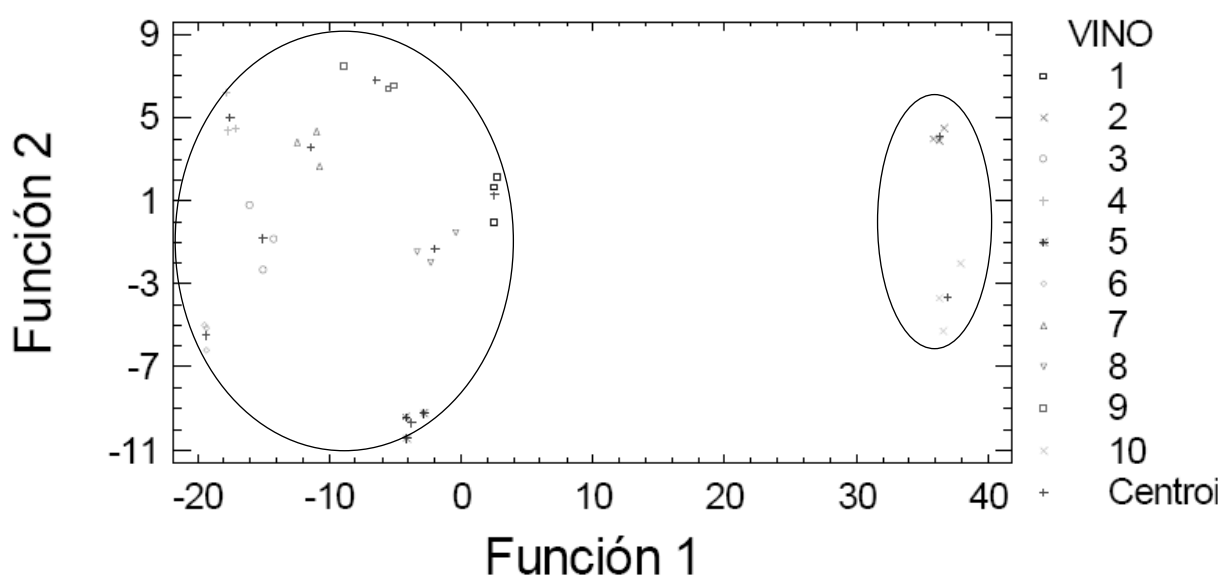


Figura 1. Representación de los vinos en función de las 2 primeras funciones discriminantes.

Tabla 2. ANOVA considerando los 2 grupos establecidos en el análisis discriminante.

GRUPO	°alcoh	Ac.Cítric	Ac.Málico	Ac.Lác.	Ac.Tartár	A420	A520
1	b	a	a	b	a	a	a
2	a	b	b	a	b	b	b
F-ratio	6,33	18,34	35,95	6,58	34,04	75,85	193,28
P-valúe	0,0417	0,0000	0,0000	0,0150	0,0000	0,0000	0,0000
GRUPO	Ant.mg/L	Polf.mg/L	Ín. Fólín	Tanin.mg/L	Cate.mg/L	Í.Etanol	Í.DMACH
1	a	a	a	a	a	a	a
2	b	b	b	b	b	a	b
F-ratio	193,60	58,57	42,97	152,20	12,65	1,48	15,54
P-valúe	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0010	0,2330	0,0000

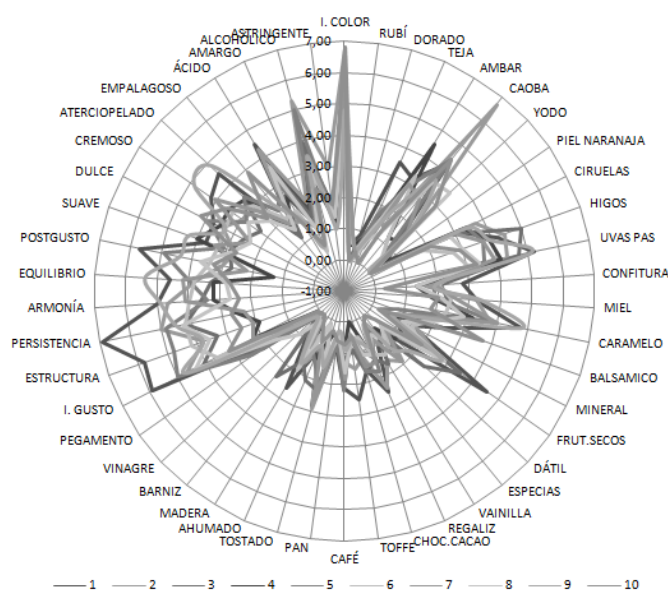


Figura 2. Representación de los parámetros sensoriales en los vinos de Fondillón.

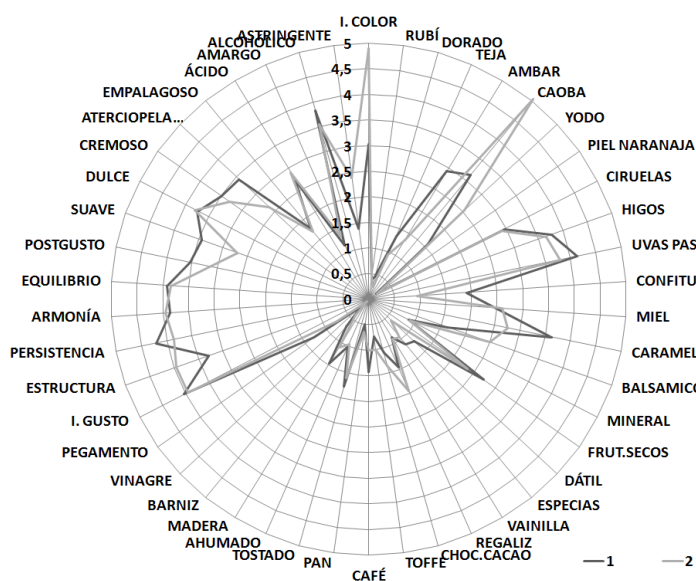


Figura 3. Representación gráfica de los parámetros sensoriales en los dos grupos establecidos.

ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ELABORACIÓN DE BEBIDAS FERMENTADAS A PARTIR DE NARANJA Y MANDARINA

M.J. García, L. Cano, J.A. Anaya, I. Alvarez, V. Lizama, J.L. Aleixandre

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universidad Politécnica de Valencia
Camino de Vera, s/n
46022 Valencia (España)

RESUMEN

La elaboración de bebidas alcohólicas procedentes del zumo de naranja y de mandarina, se plantea como alternativa a la industrialización de los cítricos ofreciendo al consumidor nuevos productos. En este sentido el objetivo de este estudio ha sido determinar la influencia de distintas operaciones finales en la elaboración del vino de naranja y mandarina (adición de diferentes clarificantes, adición de sales de cobre y maceración con corteza de naranja y mandarina) sobre las características fisicoquímicas, parámetros de color y composición volátil de los vinos elaborados. Los vinos de mandarina clarificados con bentonita presentan menor concentración de compuestos volátiles y este efecto es significativo para los compuestos acetato de isoamilo, 2 feniletanol, alcohol isoamílico, decanoato de etilo y citronerol. Sin embargo en los vinos de naranja no se han obtenido los mismos resultados ya que el tipo de clarificante no afecta significativamente al perfil volátil. La adición de sales de cobre y cortezas de naranja y mandarina afectan negativamente al perfil volátil de los vinos.

1. INTRODUCCIÓN

La naranja (*Citrus sinensis*) y la mandarina (*Citrus reticula*) son los cítricos más conocidos y consumidos en el mundo. Estas variedades son cultivadas en zonas tropicales y subtropicales donde se dan las condiciones y suelos adecuados para ello. En el caso concreto de España, se puede decir que es el máximo productor de cítricos de la Unión Europea y uno de los mayores en el mundo según el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y la FAO.

La mayoría de la producción se dedica a consumo en fresco, elaboración de zumos, concentrados o no, y mermeladas (Pino y Queris, 2011). Sin embargo, por razones económicas y de mercado sería interesante estudiar nuevas alternativas para su

industrialización, ofreciendo al consumidor nuevos productos. Una posibilidad es la elaboración de bebidas alcohólicas procedentes del zumo (Ferreyra et al., 2009), como es el caso del vino de fruta.

El objetivo de este estudio ha sido determinar la influencia de distintas operaciones finales en la elaboración del vino de naranja y mandarina (adición de diferentes clarificantes, adición de sales de cobre y maceración con corteza de naranja y de mandarina) sobre las características fisicoquímicas, parámetros de color y concentración de compuestos aromáticos, en vinos de naranja y mandarina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

El estudio se ha realizado a partir de naranjas de la variedad Valencia (11,5 °Brix) y mandarinas de la variedad Clementinas (12,5°Brix) procedentes de Sagunto (Valencia)

Las naranjas fueron recolectadas en febrero 2013 y las mandarinas en noviembre de 2012.

2.2. Proceso de elaboración bebidas fermentadas

La elaboración de las bebidas fermentadas comienza con la recolección de las naranjas y mandarinas en cajas de 25 Kg. Posteriormente, la fruta se exprime para obtener el zumo y mediante bombeo se lleva a los depósitos de acero inoxidable.

A cada muestra de zumo se le adicionó el azúcar necesario para obtener el grado alcohólico establecido (9,5-10 °A), teniendo en cuenta que se pretende elaborar un vino con 25 g/L de azúcar residual aproximadamente.

Una vez está el zumo en los depósitos, se inoculan las levaduras *Sccharomycescerevisae*, (20g/hL) y se adicionan enzimas pectolíticos (5g/hL) y nutrientes fermentativos (corteza de levadura, tiamina y fosfato biamónico) a razón de 30g/hL. La fermentación alcohólica se realizó a 15°C durante 14 días.

Concluida la fermentación se procede al descube. El vino obtenido, se somete a una clarificación para lo cual se han ensayado dos clarificantes: bentonita (5g/hL) y protomix (20g/hL) (bentonita, PVPP y celulosa).

Terminada la clarificación se realizan varias filtraciones pasando desde 4µm hasta 0,5µm para posteriormente proceder al embotellado en botellas de cristal de 75cL que se conservaron a 20°C.

Previo a la filtración y en el caso de los vinos a los cuales se les ha añadido *Revelarom*, el cobre se adicionó después de la clarificación a razón de 10g/hL. En el caso de los vinos que han macerado con las cortezas (20g/hL), después de la filtración se dejó macerar con las cortezas durante un día a 15°C.

En la tabla 1 se recoge la materia prima, los clarificantes y los tratamientos realizados en las diferentes muestras, así como nomenclatura de los vinos

Tabla 1. Nomenclatura y características de los tratamientos aplicados

Materia Prima	Clarificante	Tipo	Vinos
Mandarina	Bentonita	Testigo	1 (MBT)
		Cobre	2 (MBC)
		Cobre + corteza	3 (MCC)
	Protomix	Testigo	4 (MPT)
		Cobre	5 (MPC)
		Cobre + corteza	6 (MPCC)
Naranja	Bentonita	Testigo	7 (NBT)
		Cobre	8 (NBC)
		Cobre + corteza	9 (NBCC)
	Protomix	Testigo	10 (NPT)
		Cobre	11 (NPC)
		Cobre + corteza	12 (NPCC)

2.3. Métodos analíticos

La determinación analítica de los parámetros físico-químicos tales como acidez total, azúcares reductores, grado alcohólico y pH se realizó según los métodos que aparecen en el Reglamento Oficial de la Unión Europea (O.I.V., 1979).

Se ha utilizado el método establecido por la Comisión Internacional de L'Eclairage (CIE-Lab, 1986), basándose en la determinación de valores triestímulo: L*, a* y b*. Por otra parte, las coordenadas a* y b* pueden transformarse en las coordenadas esféricas H* (Tono) y C* (Croma o Saturación).

Para los cálculos se tuvieron en cuenta como condiciones estándar un observador de CIE 1964 10° (ángulo de percepción de un observador humano) y un iluminante D₆₅ (luz del día).

Para las medidas de color primero se centrifugaron las muestras a 4000rpm en la centrifuga VWR modelo CT6E y a continuación se procedió a la medida de color en el colorímetro Minolta CM 3600d.

El método de extracción utilizado es el que propone Dolores Herranz (1999) y que se basa en el propuesto por Cocito et al. (1995), con ciertas modificaciones realizadas por la autora mencionada con el objeto de optimizar la técnica.

El tratamiento estadístico se ha llevado a cabo con el programa *STATGRAPHICS plus 5.1*. Se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar la influencia de los distintos clarificantes y de las diferentes prácticas tecnológicas. El análisis estadístico empleado es Tukey con niveles de significancia del 95% ($p < 0,05$) y 99% ($p < 0,01$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los valores medios de los parámetros convencionales de los vinos antes de la clarificación y de la adición de sulfato de cobre y maceración con corteza de naranja y de mandarina dependiendo el tipo de vino.

En los resultados de color, se aprecian diferencias significativas en los diferentes tipos de vinos, tanto de naranja como de mandarina, se puede observar en las tablas 3 y 4, para casi la totalidad de los parámetros a un 95% de confianza y que tanto el factor del tipo tratamiento realizado al vino (adición de cobre y la maceración con las cortezas) como el clarificante empleado ejercen un efecto sinérgico.

En cuanto a la influencia de la clarificación y de la adición de cobre y de corteza de naranja y mandarina sobre la fracción volátil de los vinos, las Tablas 5 y 6 muestran los 13 compuestos volátiles identificados en los vinos cítricos elaborados pertenecientes a diferentes familias químicas. Con la finalidad de evaluar el comportamiento de cada compuesto individualmente en relación a la clarificación y tratamientos aplicados, se ha realizado un ANOVA multifactor considerando los factores “Clarificación” y “Tratamiento”. Las Tablas muestran los valores medios obtenidos para cada compuesto, así como los grupos homogéneos y la significación del análisis resultado del ANOVA.

Para un mismo compuesto volátil, los valores de las filas con la misma letra indican que no existen diferencias significativas entre los vinos obtenidos, y con distinta letra que existen diferencias significativas al 95%.

Como se observa en las Tablas 5 y 6, las variables introducidas en el proceso, es decir la adición de sulfato de cobre y la maceración con corteza de mandarina o de naranja dependiendo del vino, influye significativamente sobre la concentración de muchos de los compuestos volátiles analizados, pero este efecto es distinto según el clarificante utilizado y la materia prima de partida.

Es importante señalar que en los vinos elaborados a partir de zumo de mandarina y clarificados con Protomix, la adición de cobre y la maceración con corteza de mandarina no tiene un efecto significativo sobre el perfil aromático de estos vinos, como muestra la tabla 4.

Los resultados muestran que en el vino de naranja, la adición de sulfato de cobre para eliminar los posibles olores a reducción, provoca una pérdida de volátiles, aunque esta es solo significativa en el caso de los compuestos: etilisovaleriato y alcohol isoamílico. Al comparar estos vinos con los que se adiciona además corteza de naranja, también hay una disminución significativa de la concentración de etilisovaleriato, lactato de etilo, decanoato de etilo, dietilglutarato, β -pineno y 2 feniletanol.

En los vinos elaborados a partir de mandarina (y clarificados con bentonita) se observa el efecto contrario, la adición de cobre provoca un aumento significativo en muchos de los compuestos analizados como muestra la Tabla 4. Esto podría explicarse porque en este caso, el vino testigo presenta unas concentraciones muy bajas de compuestos volátiles, debido posiblemente a una mala conservación antes de los tratamientos ya que no ocurre lo mismo en los vinos clarificados con Protomix.

En los vinos que además se adiciona la corteza de mandarina, lo mismo que ocurría en los vinos de naranja, se produce una pérdida significativa de volátiles: etilisovaleriato de etilo, acetato de isoamilo, lactato de etilo, dietilglutarato, y 2 feniletanol. Estos compuestos son importantes porque contribuyen al aroma del vino, así el 2-feniletanol es el único alcohol varietal que puede contribuir positivamente al aroma ya que posee un característico olor a rosas (Palomo, 2005) y el conjunto de ésteres representan los aromas afrutados característicos de los vinos jóvenes.

Los gráficos 1 y 2 muestran el efecto de la clarificación sobre la composición volátil de los vinos de mandarina elaborados. Se observa que los vinos clarificados con bentonita presentan menor concentración de compuestos volátiles y este efecto es significativo para los compuestos acetato de isoamilo, 2 feniletanol, alcohol isoamílico, decanoato de etilo y citronerol. Es importante señalar que acetato de isoamilo, responsable del olor a banana y pera, es uno de los ésteres más importantes desde el punto de vista sensorial, aunque se hidroliza con el paso del tiempo (Ramsey y Ough, 1980) y el 2-feniletanol constituye uno de los alcoholes superiores más importantes y se relaciona con el olor a rosa (Dubois, 1994) al igual que el citronerol.

Sin embargo en los vinos de naranja no se han obtenido los mismos resultados ya que el tipo de clarificante no afecta significativamente a la concentración de los compuestos volátiles estudiados como muestran los gráficos 3 y 4.

El efecto de la bentonita puede explicarse porque esta es capaz de interaccionar también con las moléculas responsables del aroma del vino (Lubbers et al., 1995). Su capacidad por fijarlos varía de una bentonita a otra, pero puede llegar a ser del 25%, una cantidad nada menospreciable. Se puede afirmar que el empleo de la bentonita afecta a las sensaciones olfativas y gustativas apreciadas en el vino reduciendo la calidad sensorial (Martínez-Rodríguez y Polo, 2003). Mientras que el mecanismo de la acción desproteinizante de las bentonitas se da mediante un intercambio de cationes, en el caso de los compuestos aromáticos la fijación tiene lugar por mecanismos de adsorción en los que intervienen enlaces débiles tipo puente de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.

4. CONCLUSIONES

El vino de naranja es una alternativa emergente para la elaboración y comercialización en el mercado de un nuevo producto cuya trayectoria es corta en el campo de la investigación. Es importante continuar investigando en lo referente a los vinos cítricos, especialmente en nuestro país donde los trabajos se han centrado fundamentalmente en el vino de uva.

Los resultados del estudio muestran que la adición de sulfato de cobre a los vinos para evitar aromas de reducción produce una pérdida significativa de algunos compuestos como etilisovaleriato y el alcohol isoamílico.

La adición de sulfato de cobre más corteza de naranja y mandarina a los vinos tiene un efecto negativo sobre su composición volátil ya que estos presentan concentraciones menores de: etilisovaleriato, acetato de isoamilo, lactato de etilo, dietilglutarato, y 2 feniletanol, compuestos que contribuyen favorablemente al aroma del vino. Esto puede ser debido a algún fenómeno de adsorción.

En cuanto al efecto de los clarificantes ensayados, los resultados han mostrado que el Protomix permite obtener vinos más ricos en compuestos volátiles frente a la bentonita, sobretodo en el caso del vino de mandarina.

En fin, las referencias presentadas en este trabajo de investigación pretenden servir de aportaciones concretas y modestas al ámbito de estudio del vino de naranja, en la confianza de su continuación y progreso para la mejora y expansión de este producto en el entorno científico, legal, comercial y social.

BIBLIOGRAFÍA

Dubois, P. 1994. Les arômes des vins et leurs défauts. *Revue Française d'Oenologie*, nº 145, 27-39; y nº 146, 39-50.

M.D. Herranz, *Talanta* 50 (1999) 413.

Ferreira, M.M.; Schwab, M.C.; Gerard, L.M.; Zapata, L.M.; Davies, C.V.; Hours, R.A. 2009. Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae*. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, Nº39, Año XX

Lubbers, S.; Guerreau, J.; Feuillat, M. 1995. A study on the efficiency of protein removal of commercial bentonites on must and wines of Chardonnay and Sauvignon vine varieties. *Bulletin de l'OIV* 68 (769–770), 224–244

Martínez-Rodríguez, A. J.; Polo, M. C. 2003. Effect of the addition of bentonite to the tiraje solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry*, 81, 383–388.

Pino, J.A.; Queris, O. 2011. Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry*, 125 1141-1146

] O.I.V, Recopilación de los métodos internacionales de análisis de vinos, 1990, p. 16.

Ramey, D.D.; Ough, c.s., (1980). Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 928–934.

Tabla 2. Valores medios de los parámetros físico-químicos en los vinos de mandarina y naranja

	VINO DE MANDARINA	VINO DE NARANJA
pH	3,78 ± 0,10	3,75 ± 0,03
Acidez total. Expresada en Ác Cítrico (g/L)	5,78 ± 0,15	5,44 ± 0,05
Azúcares reductores	24,27 ± 0,15	25,83 ± 1,18
° Alcohólico	9,80 ± 0,11	9,65 ± 0,11

Tabla 3. Parámetros Cielab para mandarina según el clarificante y el tratamiento de vino

Clarificante	BENTONITA			PROTOMIX			ANOVA		
	Testigo	Cobre	Cobre+ Corteza	Testigo	Cobre	Cobre+ Corteza	T	C	T*C
L*	98,735± 0,109 a	97,105 0,003 b	96,473 ± 0,099 c	98,687 ± 0,017 a	96,875± 0,008 b	97,272 ± 0,009 c	2657,08 **	49,68 **	152,29 **
a*	-2,688 ± 0,016 a	-2,214 ± 0,005 b	-2,759 ± 0,008 c	98,687± 0,017 a	-2,213 ± 0,011 b	-2,129 ± 0,005 c	1223,24 **	16862,47 **	4441,97 **
b*	10,956 ± 0,096 a	11,122 ± 0,007 b	14,210 ± 0,025 c	9,321 ± 0,008 a	12,006 ± 0,003 b	10,286 ± 0,005 c	5752,54 **	7401,14 **	5220,87 **
C*	11,281 0,090 a	11,341 0,006 a	14,475 ± 0,023 b	9,507 ± 0,008 a	12,208± 0,004 b	10,504 ± 0,005 c	5875,50 **	9214,54 **	6066,50 **
H*	-1,330 ± 0,001 a	-1,374 ± 0,001 b	-1,379 ± 0,001 c	-1,373 ± 0,001 a	-1,388 ± 0,001 b	-1,367 ± 0,001 c	798,33 **	485,23 **	597,62 **

T: Tratamiento; C: Clarificante; ns: no hay diferencias significativas; * p < 0.05; ** p < 0.01
Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%.

Tabla 4. Parámetros Cielab para naranja según el clarificante y el tratamiento de vino

Clarificante	BENTONITA			PROTOMIX			ANOVA		
	Testigo	Cobre	Cobre+ Corteza	Testigo	Cobre	Cobre+ Corteza	T	C	T*C
L*	96,981 ± 0,007 a	93,997 ± 0,007b	96,312 ± 0,021 c	97,057 ± 0,017 a	94,234 ± 0,020b	96,552 ± 0,042 c	38035,16 **	410,86 **	35,79 **
a*	-2,138 ± 0,002 a	-2,396 ± 0,003b	2,577 ± 0,009 c	-2,179 ± 0,002 a	-2,553 ± 0,007b	-2,721 ± 0,004 c	18815,97 **	2987,53 **	308,64 **
b*	11,295 ± 0,003 a	24,841 ± 0,008b	14,531 ± 0,009 c	11,223 ± 0,007 a	23,911 ± 0,010b	13,981 ± 0,016 c	4030124,62 **	17101,43 **	3933,32 **
C*	11,496 ± 0,003 a	24,956 ± 0,008b	14,758 ± 0,011 c	11,432 ± 0,007 a	24,047 ± 0,010b	14,243 ± 0,016 c	3734253,65 **	14766,43 **	3590,83 **
H*	-1,384 ± 0,001 a	-1,475 ± 0,001b	-1,395 ± 0,001 c	-1,379 ± 0,001 a	-1,464 ± 0,001b	-1,379 ± 0,001 c	100594,93 **	3510,86 **	370,50 **

T: Tratamiento; C: Clarificante; ns: no hay diferencias significativas; * p < 0.05; ** p < 0.01
Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%.

Tabla 5. Valores medios de los compuestos volátiles (mg/L) y resultado del ANOVA estadístico (grupos homogéneos: letras; F-ratio y significación estadística) según clarificación y tratamiento con cobre y cortezas en el vino de mandarina.

Clarificante	Bentonita			Protomix			ANOVA F ratio		
	Testigo	Cobre	Cobre + corteza	Testigo	Cobre	Cobre + corteza	T	C	T°C
Etilisovaleriato	1,024 ± 0,256 a	6,122 ± 0,117 b	1,038 ± 0,050 a	6,090 ± 0,411 a	6,955 ± 1,146 a	3,574 ± 0,787 a	4,63 ns	5,81ns	1,11 ns
â-pinén	0,040 ± 0,004 a	0,472 ± 0,078 b	0,526 ± 0,032 b	0,505 ± 0,038 a	0,555 ± 0,031 a	0,447 ± 0,107 a	19,79**	20,81**	22,14**
Acetato de isoamilo	0,476 ± 0,109 a	8,610 ± 0,128 b	4,945 ± 0,603 c	8,708 ± 0,232 a	9,810 ± 2,064 a	8,202 ± 2,400 a	12,31**	30,77**	7,49*
Alcohol Isoamílico	0,021 ± 0,002 a	0,905 ± 0,111 b	0,663 ± 0,028 b	0,974 ± 0,101 a	0,968 ± 0,035 a	0,887 ± 0,048 a	44,28**	114,67**	50,30**
Acetato de hexilo	0,057 ± 0,016 a	0,856 ± 0,029 b	0,816 ± 0,018 b	0,949 ± 0,063 a	0,968 ± 0,049 a	0,853 ± 0,124 a	49,29**	94,31**	58,44**
Lactato de etilo	0,278 ± 0,093 a	7,986 ± 1,368 b	2,139 ± 0,507 a	6,021 ± 0,292 a	7,900 ± 1,329 a	6,973 ± 1,143 a	16,83**	25,43**	6,82*
Decanoato de etilo	0,057 ± 0,010 a	0,427 ± 0,064 a	0,126 ± 0,078 a	0,633 ± 0,059 a	0,631 ± 0,161 a	0,840 ± 0,126 a	0,50 ns	10,08*	0,95 ns
Citronerol	0,069 ± 0,011 a	2,272 ± 0,765 b	0,975 ± 0,005 ab	2,040 ± 0,167 a	2,378 ± 0,686 a	2,967 ± 0,288 a	8,85*	28,41**	6,05*
Dietilglutarato	0,921 ± 0,105 a	11,446 ± 1,198 b	24,422 ± 0,239 c	10,793 ± 0,050 a	11,168 ± 0,509 a	10,718 ± 0,304 a	443,50**	18,16**	451,33**
γ-Octolactona	0,336 ± 0,045 a	1,412 ± 0,196 a	3,513 ± 0,249 a	2,045 ± 0,242 a	2,643 ± 0,182 a	1,526 ± 0,158 a	1,23 ns	0,21 ns	2,76 ns
2-Feniletanol	0,500 ± 0,047 a	28,431 ± 5,765 b	3,148 ± 0,225 a	25,120 ± 1,037 a	27,711 ± 4,394 a	25,099 ± 3,881 a	24,97**	61,17**	16,92**
Ácido Decanoico	0,098 ± 0,029 a	0,542 ± 0,045 ab	0,585 ± 0,177 b	0,285 ± 0,043 a	0,183 ± 0,058 a	0,451 ± 0,005 a	2,43 ns	0,71 ns	1,72 ns
Vainillina	0,013 ± 0,005 a	0,439 ± 0,036 a	0,119 ± 0,069 a	0,000 ± 0,000 a	0,681 ± 0,064 a	0,346 ± 0,155 a	1,79 ns	0,40 ns	0,12 ns

T: Tratamiento; C: Clarificante; ns: no hay diferencias significativas; * p < 0.05; ** p < 0.01
Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%.

Tabla 6. Valores medios de los compuestos volátiles (mg/L) y resultado del ANOVA estadístico (grupos homogéneos: letras; F-ratio y significación estadística) según clarificación y tratamiento con cobre cortezas en el vino de naranja.

Compuesto volátil	Clarificante Bentonita			Clarificante Protomix			ANOVA F ratio		
	Testigo	Cobre	Cobre + corteza	Testigo	Cobre	Cobre + corteza	T	C	T°C
Etilisovaleriato	6,181 ± 0,634 a	9,975 ± 1,113 b	0,804 ± 0,175 c	5,050 ± 0,114 ab	9,797 ± 1,130 b	0,806 ± 0,089 a	26,42**	0,18 ns	0,12 ns
â-pinén	0,479 ± 0,004 a	0,520 ± 0,109 a	0,460 ± 0,058 a	0,430 ± 0,009 ab	0,180 ± 0,055 a	0,504 ± 0,048 b	1,41 ns	2,89 ns	2,91 ns
Acetato de isoamilo	8,941 ± 0,663 a	7,667 ± 1,479 ab	4,566 ± 0,627 b	7,815 ± 0,412 a	7,617 ± 1,761 ab	4,307 ± 0,294 b	16,53**	0,65 ns	0,31 ns
Alcohol Isoamílico	0,943 ± 0,027 a	0,580 ± 0,122 b	0,542 ± 0,079 b	0,858 ± 0,022 a	0,635 ± 0,121 ab	0,545 ± 0,063 b	21,31**	0,04 ns	0,74 ns
Acetato de hexilo	0,868 ± 0,057 a	0,588 ± 0,128 a	0,669 ± 0,132 a	0,777 ± 0,012 a	0,712 ± 0,198 a	0,720 ± 0,104 a	2,21 ns	0,16 ns	0,82 ns
Lactato de etilo	8,073 ± 0,669 a	6,966 ± 0,724 a	2,364 ± 0,135 b	7,196 ± 0,932 a	6,422 ± 0,423 a	2,246 ± 0,625 b	39,83**	0,97 ns	0,18 ns
Decanoato de etilo	0,797 ± 0,034 a	0,660 ± 0,155 a	0,257 ± 0,011 b	0,795 ± 0,091 a	0,411 ± 0,081 a	0,252 ± 0,006 b	4,73 ns	0,35 ns	0,32 ns
Citronerol	2,537 ± 0,457 a	2,054 ± 0,640 a	1,262 ± 0,118 a	2,689 ± 0,308 a	1,689 ± 0,472 ab	1,013 ± 0,101 b	13,60**	0,44 ns	0,46 ns
Dietilglutarato	10,880 ± 0,111 a	9,321 ± 1,379 a	27,422 ± 2,965 b	10,561 ± 0,670 a	11,671 ± 0,461 a	25,485 ± 1,546 b	114,71**	0,00 ns	1,61 ns
γ-Octolactona	2,781 ± 0,206 ab	2,183 ± 0,565 a	4,683 ± 0,842 b	2,815 ± 0,219 a	0,000 ± 0,000 b	3,946 ± 0,480 a	46,23**	12,34*	5,63*
2-Feniletanol	26,703 ± 1,955 a	21,583 ± 2,481 a	4,002 ± 0,748 b	25,847 ± 3,243 a	25,051 ± 1,009 a	3,423 ± 0,631 b	77,85**	0,18 ns	0,76 ns
Ácido Decanoico	0,495 ± 0,001 a	0,339 ± 0,110 a	0,582 ± 0,103 a	0,502 ± 0,093 a	0,221 ± 0,313 a	0,715 ± 0,060 a	6,19*	0,01 ns	0,71 ns
Vainillina	0,518 ± 0,009 a	0,399 ± 0,086 a	0,315 ± 0,066 a	0,326 ± 0,077 a	0,182 ± 0,058 a	0,000 ± 0,000 a	3,77 ns	9,41*	0,23 ns

T: Tratamiento; C: Clarificante; ns: no hay diferencias significativas; ns: no hay diferencias significativas; * p < 0.05; ** p < 0.01
Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 95%.

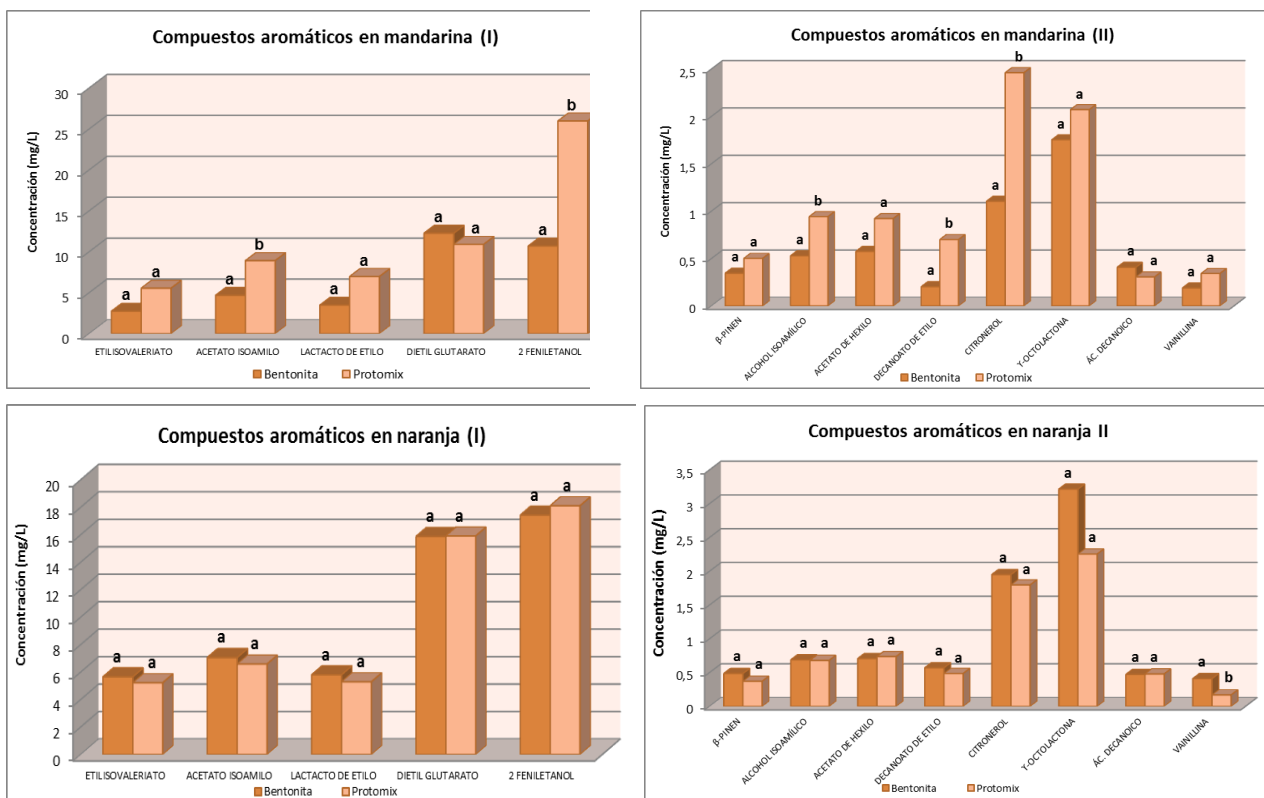


Figura 1. Representación gráfica de la concentración de compuestos volátiles en vinos de mandarina según el tipo de clarificante. Letras distintas en la misma indican diferencias significativas al 95%.

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SECAGEM DE CORTES DE CARNE BOVINA SALGADOS

Bampi, M.¹, Domschke, N.N.¹, Schmidt, F. C.², Laurindo, J.B.¹

¹Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina. EQA/CTC/UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.

²Departamento de Engenharia de Alimentos. Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. DEA/ICTE/UFTM, Uberaba - MG, Brasil.

1.INTRODUÇÃO

No Brasil, os produtos cárneos salgados e desidratados mais conhecidos são a carne-de-sol, o charque e o *jerked beef* (Bros et al., 2012). O charque é um produto tipicamente brasileiro, caracterizado como um produto cárneo de umidade intermediária (45 %) e com concentração de sal de aproximadamente 15 % de NaCl e atividade de água de 0,75 (Shimokomaki et al., 1998). No entanto, o seu processo de fabricação ainda é bastante artesanal, sendo a etapa de secagem uma das limitantes em termos de tempo de processamento, uma vez que é comumente realizada ao sol (Arnau et al., 2007).

Os processos de secagem com ar quente (secagem convectiva) são os mais utilizados na indústria de alimentos. Normalmente, apresentam baixas taxas de desidratação e são relativamente lentos devido à baixa condutividade térmica dos alimentos, podendo ocasionar perda nas propriedades nutritivas e sensoriais (Fellows, 2000; Figiel, 2010; Wang et al., 2011). Um dos principais problemas na secagem de produtos cárneos com circulação de ar quente é o ressecamento superficial, o qual se comporta como uma película rígida de baixa permeabilidade, dificultando a migração da água do interior do produto para a superfície e consequentemente interferindo na qualidade do produto final (Muñoz et al., 2012).

Vários métodos de desidratação têm sido propostos como alternativa ao método de secagem convectiva, com o intuito de otimizar o tempo de processo e a qualidade dos produtos desidratados. Dentre esses métodos, podem ser citados: a secagem a vácuo (que utiliza temperaturas mais baixas que o processo de secagem convencional), a liofilização (que é realizada em condições abaixo do ponto triplo da água, promovendo a sublimação do gelo) e o uso de novas fontes de aquecimento como micro-ondas e aquecimento de rádio frequência (Vega-Mercado et al., 2001; Jangam et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de secagem na cinética de desidratação de cortes de carne bovina salgada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo das amostras

Para a realização dos experimentos, foram utilizados cortes de carne bovina *in natura* (acém) cortados em formato de paralelepípedos de dimensões de 8,0 x 8,0 x 1,5 cm (largura, comprimento e espessura, respectivamente). As amostras foram previamente submetidas à salga em solução saturada de NaCl (26 % em massa) a 10 °C por 6 horas. Posteriormente, as mesmas foram armazenadas a 10 °C por 48 horas para a homogeneização da concentração de sal. Após esse período, as amostras salgadas foram cortadas em quatro partes iguais (de dimensões 4,0 x 4,0 x 1,5 cm) e submetidas a três diferentes métodos de secagem.

2.2. Metodologia experimental e determinações analíticas

Os métodos de secagem avaliados foram: (i) secagem convectiva (SC); secagem a vácuo (SV) e (c) secagem por micro-ondas a vácuo (SMV).

A SC foi realizada em estufa com circulação de ar (TECNAL, modelo TE 394/2, Brasil) a 40 °C e com umidade relativa e velocidade do ar de aproximadamente 28 % e 0,78 m.s⁻¹, respectivamente. A SV foi realizada em estufa a vácuo (Ethik Technology, modelo 440/DE, Brasil) conectada a uma bomba de vácuo (DVP, modelo LC.305, Itália) e a um sistema de aquecimento de placas (Novus, modelo N480D, Brasil). Entre a estufa a vácuo e a bomba foi utilizado um *trapping*. A secagem a vácuo foi realizada a 40 °C e a uma pressão de 13mbar. O monitoramento da temperatura do ar e das amostras foi realizado através de termopares conectados a um sistema de aquisição de dados (Agilent, modelo 34970 A, Malásia). O monitoramento da pressão no interior da câmara foi realizado através de um vacuômetro digital (ILMVAC, Alemanha). No método de SMV, as amostras de carne salgadas foram desidratadas em um aparato experimental especialmente desenvolvido, o qual consiste de um micro-ondas (Electrolux, modelo MEX55, Brasil) ao qual foi acoplado uma cuba cilíndrica de acrílico hermeticamente fechada para o acondicionamento das amostras. A cuba foi conectada a uma linha de bombeamento de ar, composta por um *trapping* e uma bomba de vácuo. O processo foi realizado com potência de 30 W e pressão final de 36 mbar.

Para tempos de secagem pré-definidos (a cada hora nas primeiras 12 horas e cada 2 horas nas 12 horas subsequentes para os métodos SC e SV e a cada quatro minutos para o método SMV), foram determinadas a umidade (método gravimétrico, AOAC 2007) e atividade de água (higrômetro digital –Aqualab, modelo Devices, USA) de três amostras individualmente.

O pH e os parâmetros de cor das amostras de carne foram determinados no início e no final do processo de secagem. Na determinação do pH, foi utilizado um potenciômetro digital com eletrodo de penetração (Analion, modelo PH- 730, Brasil), previamente calibrado com solução tampão de pH 7,0 e 4,0. O sistema de leitura de cor utilizado foi o CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) L*, a*, b*. Os parâmetros de cor foram determinados através de um colorímetro (Hunterlab, Miniscan EZ, EUA), com observador de 10° e iluminante D65 e a variação da cor foi calculada através da Equação 1, assumindo como referência a cor da carne no início do processo de secagem.

$$\Delta E^*_{ab^*} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (2.1)$$

em que ΔL^* , Δa^* e Δb^* são os valores da diferenças de L*, a* e b* da amostra em relação à referência de cor (Minolta, 2007).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Curvas de secagem de cortes de carne bovina salgados

As curvas de secagem dos cortes de carne bovina salgados e submetidos aos métodos de secagem convectiva (SC), secagem a vácuo (SV) e secagem a vácuo por micro-ondas (SMV) são apresentadas na Figura 1.

Observa-se na Figura 1 que as curvas de secagem das amostras submetidas aos métodos SC e SV apresentaram um comportamento semelhante e, para ambos os métodos, a redução da umidade foi mais intensa nas primeiras 12 horas. Após esse período, os valores de umidade das amostras submetidas a SC e a SV foram de aproximadamente 1,0 e 0,8 g água/g de sólidos secos, respectivamente. A maior redução do teor de umidade das amostras submetidas ao método de SV no mesmo período de tempo se deve à aplicação da baixa pressão durante o processo. As amostras submetidas ao método SMV apresentaram uma rápida redução da umidade, atingindo aproximadamente 0,8 g água/g de sólidos secos após 0,3 horas de processo. A redução do tempo de secagem das amostras submetidas ao método de SMV em relação aos demais métodos ocorre devido à dissipação da energia eletromagnética diretamente nas amostras através da combinação dos mecanismos de polarização e condução iônica (Wang et al., 2011).

O tempo médio necessário para reduzir em 40 % o teor de umidade inicial das amostras de carne bovina salgada (nível de redução desejada na fabricação do charque)

submetidas aos processos de SC, SV e por SMV foi de 10, 8 e 0,17 horas, respectivamente. Esses valores indicam uma redução no tempo de secagem das amostras de aproximadamente 20 % para o método SV e de 98 % para o método SMV, ambos em relação ao método SC. Isso demonstra a maior contribuição do método de aquecimento por micro-ondas na desidratação das amostras, em comparação com os mecanismos de transferência de calor condutivo e convectivo presente na SC.

As cinéticas de variação da atividade de água (a_w) das amostras de carne bovina salgada submetidas aos três diferentes métodos de secagem (SC, SV e SMV) são apresentadas na Figura 2. As curvas de variação da atividade de água das amostras submetidas aos processos de SC e SV apresentaram comportamento similar durante a secagem. A redução da atividade de água também ocorreu de forma mais intensa nas primeiras 12 horas. Após esse período, a atividade de água das amostras praticamente não sofreu alterações. Conforme observado na redução da umidade das amostras, a redução da atividade de água foi mais intensa no processo de SMV em relação aos demais processos, o que pode ser verificado no detalhe da Figura 2. O tempo necessário para as amostras atingirem os valores de atividade de água de 0,78 nos processos de SC, SV e SMV foi de 24, 22 e 0,35 horas, respectivamente. De acordo com Shimokomaki et al. (1998) um produto cárneo com valor de atividade de água próxima de 0,75 é caracterizado como um produto de umidade intermediária e pode ser armazenado a temperatura ambiente.

3.2. Análise de pH e parâmetros de cor

Os resultados das análises de pH e cor dos cortes de carne bovina salgada submetidos aos métodos SC, SV e SMV são apresentados na Tabela 1.

Ao final da secagem, todas as amostras apresentaram uma pequena elevação no pH independente do método de secagem ao qual foram submetidas. O pH final das amostras submetidas aos processos SV e SMV foi similar ao encontrado por Facco (2002), que observou valores entre 5,6 e 5,8 para amostras de charque submetidas à secagem solar.

Os valores dos parâmetros de cor das amostras submetidas aos métodos de SC, SV e SMV ao final do processo de secagem também foram semelhantes aos determinados por Facco (2002) em amostras de charque secas ao sol. Esse autor observou valores entre 30,8 e 42,4 para o parâmetro L^* , entre 4,2 e 10,4 para o a^* e entre 5,9 a 9,8 para o b^* . A variação de cor das amostras submetidas aos métodos SC, SV e SMV foi de 4,92, 21,84 e 9,62 respectivamente, indicando uma maior influência do método de SV na alteração de cor dos cortes de carne bovino salgado durante o processo de secagem.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram a maior contribuição do método de aquecimento por micro-ondas na desidratação das amostras, em comparação com o mecanismo de transferência de calor condutivo presente no método SV. Assim, o método de SMV pode ser considerado uma alternativa viável para a redução do tempo de secagem de cortes de carne. No entanto, um estudo detalhado do impacto desse processo sobre a qualidade do produto final precisa ser avaliado.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Association Of Official Analytical Chemists, 2007. *Official methods of analysis*. 18ed. Washington, USA.
- Arnau, J.; Serra, X.; Comaposada, J.; Gou, P.; Garriga, M., 2007. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, 77, 81–89
- Bros, M.; Arnaud, E.; Loiseau, G.; Talon, R.; Collignan, A, 2012. Feasibility of coupling dehydration-impregnation by soaking treatment of meat with fermentation by lactobacillus sakei. *Journal of Food Science*, 77, M434-M442.
- Facco, E.M.P., 2002. *Parâmetros de qualidade do charque relacionados ao efeito da suplementação de vitamina e na dieta de bovinos da raça nelore em confinamento*. 100p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Fellows, P. J., 2000. *Food Processing Technology - Principles and Practice*. 2ª.ed. Cornwall: Woodhead Publishing Limited, pp. 575.
- Figiel, A., 2010. Drying kinetics and quality of beetroots dehydrated by combination of convective and vacuum-microwave methods. *Journal of Food Engineering*, 98, 461–470.
- Jangam, S.V., & Mujumdar, A.S., 2010. *Drying of foods vegetables and fruits, vol. 1*. Singapore: Jangam, S.V., Law, C.L. and Mujumdar A. S, pp. 202.
- Minolta, 2007. *Precise color communication: color control from perception to Instrumentation*. Japan: Minolta Co. Ltd.
- Muñoz, I., Garcia-Gil, N., Arnau, J., Gou, P., 2012. Rehydration kinetics at 5 and 15 °C of dry salted meat. *Journal of Food Engineering*, 110, 465–471.
- Shimokomaki, M., Franco, B.D.G.M.; Biscontin, T.M.; Pinto, M.F.; Terra, N.N.; Zorn, T.M.T., 1998. Charqui meats are hurdle technology meat products. *Food Reviews International*, 14 (4), 339-349.
- Vega-Mercado, H., Góngoranieto, M. M., Barbosa-Cánovas, G. V., 2001. Advances in dehydration of foods. *Journal of Food Engineering*, 49, 271-289.
- Wang, Y.; Li, Y.; Wang, S.; Zhang, L.; Gao, M.; Tang, J., 2011. Review of dielectric drying of foods and agricultural products. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 4 (1), 1-19.

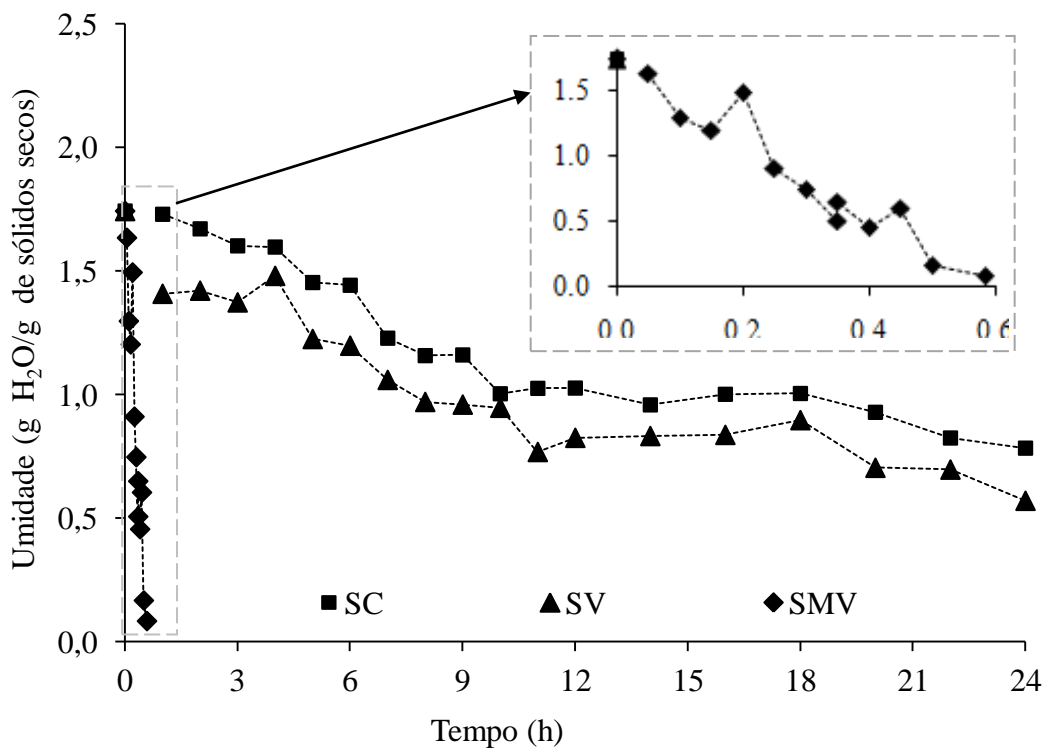


Figura 1. Curvas de secagem de cortes de carne bovina salgados submetidos aos processos de SC, SV e SMV.

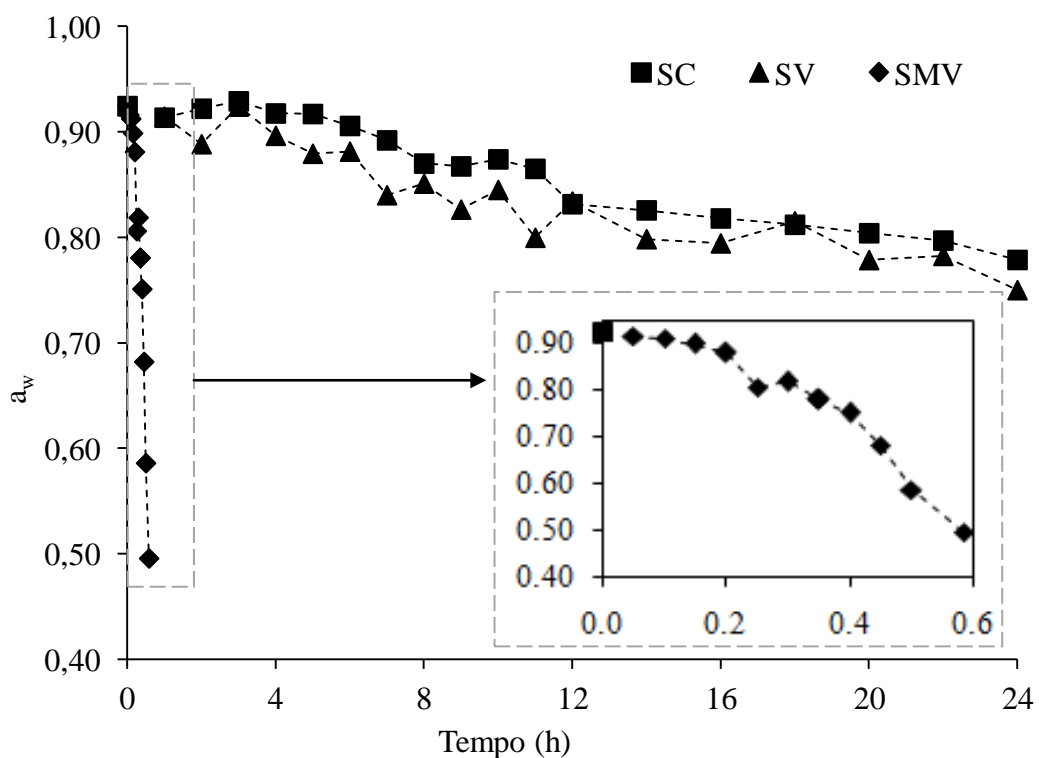


Figura 2. Variação da atividade de água dos cortes de carne bovina salgados submetidos aos métodos de secagem SC, SV e SMV.

Tabela 1. Resultados da variação do pH e cor dos cortes de carne bovina salgados submetidos aos métodos SC, SV e SMV.

Análise	SC		SV	SMV
	Início (t = 0 h)	Final (t = 24 h)	Final (t = 24 h)	Final (t= 0,6 h)
pH	5,22 ± 0,083 ^a	5,37 ± 0,017 ^{ab}	5,58 ± 0,041 ^{bc}	5,66 ± 0,07 ^c
Cor				
L*	34,61 ± 2,84 ^a	38,75 ± 1,58 ^{ab}	55,75 ± 25 ^c	42,28 ± 1,17 ^b
a*	7,43 ± 0,56 ^b	4,80 ± 0,32 ^a	4,75 ± 1,40 ^a	8,84 ± 0,04 ^c
b*	9,66 ± 1,69 ^a	10,08 ± 0,04 ^b	14,48 ± 0,73 ^c	15,30 ± 1,06 ^c
ΔE		4,92 ± 1,48 ^a	21,8 ± 1,40 ^b	9,62 ± 1,20 ^c

Valores seguidos de mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste Tukey com um nível de significância de 5%.

TRATAMENTO TÉRMICO DE CARNE DE MEXILHÃO EM EMBALAGENS FLEXÍVEIS TERMOESTERILIZÁVEIS (*RETORT POUCHES*)

G. Tribuzi^a, F. C. Schmidt^b, J. B. Laurindo^{a*}

^aDepartamento de Engenharia Química e de Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina, EQA/CTC/UFSC, 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil.*e-mail: joao@enq.ufsc.br

^bDepartamento de Engenharia de Alimentos Universidade Federal do Triângulo Mineiro, DEA/ICTE/UFTM, 38025-180, Uberaba - MG, Brasil.

1.INTRODUÇÃO

A utilização das embalagens flexíveis termoesterilizáveis “*retort pouch*” (RP) no tratamento térmico (TT) de alimentos apresenta-se como uma interessante alternativa ao uso de materiais tradicionais, tais como a lata e o vidro. As RP são bolsas formadas por um filme plástico/metálico flexível multicamadas, resistente ao calor e que oferece boa resistência mecânica e térmica, barreira a gases e propriedade de termosoldagem (Holdsworth e Simpson, 2007). Esse tipo de embalagem apresenta diversas vantagens em comparação com os materiais e formatos tradicionais de embalagens, como a rápida penetração do calor durante o tratamento térmico (proporcionando melhores características nutricionais e sensoriais do alimento processado) e a facilidade no armazenamento, transporte e abertura. Por outro lado, essas embalagens exigem uma atenção especial no controle de parâmetros do tratamento térmico (como, por exemplo, a pressão de operação). Além disso, o seu uso é restringido a alimentos que não necessitem de proteção mecânica.

Embora a aplicação de RP para o acondicionamento e conservação de frutos do mar seja amplamente difundida em muitos países, no Brasil o seu uso é incipiente e aplicado principalmente para produtos a base de atum. A literatura científica tem relatado resultados sobre o uso de RP com diferentes tipos de peixes e moluscos, tais como atum (Cristianini, 1998), carne de mexilhão frita (Bindu et al., 2004), berbigão (Bindu et al., 2007), salmão (Byun et al., 2010), entre outros.

No Brasil, os mexilhões são comercializados principalmente frescos ou cozidos e desconchados e mantidos sob refrigeração. Isso dificulta uma ampla difusão desse produto no mercado nacional, em virtude da necessidade de transporte rápido e refrigerado devido à alta perecibilidade do produto. Assim, o desenvolvimento de alternativas para um melhor beneficiamento dos mexilhões através de processos que permitam a extensão da vida útil desse tipo de produto é de grande relevância. Nesse contexto, este trabalho teve como

objetivo avaliar o tratamento térmico (TT) da carne de mexilhão acondicionada em embalagens flexíveis termoesterilizáveis, com a finalidade de desenvolver um produto estável a temperatura ambiente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria prima e preparo das amostras

A carne do mexilhão pré-cozida foi adquirida em uma indústria local (Cavalo Marinho SA, Palhoça - SC, Brasil). Os experimentos foram realizados com três lotes diferentes (12 kg cada): (i) lote controle (L_o); (ii) lote salgado com concentração final de aproximadamente 2 % de NaCl (L_s); e (iii) lote marinado com aproximadamente 2 % de NaCl e 0,2 % de ácido acético (L_m). Essas concentrações foram escolhidas com base nas concentrações de sal e ácido de frutos do mar enlatados (Adams e Otwell, 1982). Posteriormente, a carne de mexilhão foi manualmente triturada, pesada (400 g para cada embalagem), acondicionada em RP (PET/Al/BOPP/ CPP) sob vácuo e tratadas termicamente.

O diagrama do processamento da carne de mexilhão pré-cozida é apresentado na Figura 1.

Tratamento térmico

O TT foi realizado em uma autoclave vertical de laboratório descontínua e com capacidade de 50 L (marca Phoenix, modelo AV-50, Brasil). Tal autoclave foi equipada com um sistema de controle de temperatura (marca Expectron, modelo Climflex PLUS, Brasil), uma linha de contrapressão de ar e uma linha de água para o resfriamento. Um suporte de aço inoxidável com bandejas perfuradas foi utilizado para a acomodação das embalagens no interior da autoclave.

Foram realizados testes preliminares (com amostras do lote L_o) para definir o tempo total de processo necessário para alcançar um valor F_o requerido de 7 min (*C. botulinum* tipo A). Tal tempo foi determinado através do método geral revisitado (Simpson, Almonacid, & Teixeira, 2003). As condições de temperatura (inicial e final da autoclave) avaliadas nos ensaios preliminares estão apresentadas na Tabela 1. A temperatura ótima de processo foi determinada com base no valor de cozimento para a tiamina $C_{100}^{33.1\text{ }^\circ\text{C}}$ (C_T) e no rendimento do produto (calculado como razão entre a massa das amostras drenadas após o TT e a massa inicial das amostras, Equação 1).

$$\text{Rendimento \%} = \left(\frac{\text{MD}}{\text{MI}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

onde MD é o massa drenada e MI é a massa inicial da amostra.

A temperatura de processo selecionada foi a 118 °C e nessa condição foi realizado o TT para os três lotes estudados (L_o , L_s , L_m). Após o processamento, as amostras foram armazenadas a 25 °C e cada 4 semanas foram avaliados o pH, a capacidade de retenção de água (CRA) e o rendimento das mesmas. As medidas de pH foram realizadas após a trituração e homogeneização da amostra em água destilada (na proporção mássica de 1:1) com o auxílio de um pHmetro digital (marca Quimis, modelo Q400A, Brasil). A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada nas amostras drenadas. Para tal, 5 g da amostra foram envoltas em papel filtro e gaze e centrifugadas em tubos Falcon de 50 mL (contendo uma camada de algodão no fundo) a 465 g por 10 minutos a 4 °C (marca Sigma, modelo 4k15, Alemanha). As amostras foram pesadas antes e após a centrifugação e a CRA foi calculada de acordo com a Equação 2 (razão entre a massa de água retida pela amostra após a centrifugação e a massa de sólidos secos da amostra).

$$\text{CRA (g água/g amostra seca)} = \frac{(m_a \cdot x_w) - (m_a - m_d)}{m_a \cdot (1 - x_w)} \quad (2)$$

onde m_a é a massa da amostra antes da centrifugação, m_d é a massa da amostra após a centrifugação e x_w é a umidade da amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros da penetração do calor nas RP preenchidas com 400 g de mexilhão e de rendimento do produto após o tratamento térmico nas diferentes condições estudadas em ensaios preliminares são apresentados na Tabela 2.

O valor de cozimento (C_T) é uma medida relacionada com a degradação dos nutrientes e alterações de textura que ocorrem durante o TT. Para as condições de processo “a” e “b”, nos quais a temperatura da autoclave foi fixada em 110 °C foram observados valores elevados de C_T , considerando que valores de cozimento acima de 100 minutos são considerados um limite para o qual a qualidade do alimento é comprometida (Awuah, Ramaswamy, and Economides, 2007). Por outro lado, os valores de C_T para as condições de processos “a” e “b” não foram afetados pela temperatura inicial autoclave. Para as condições de processo “c” e “d”, com temperaturas da autoclave de 118 °C e 121 °C, respectivamente, observaram-se valores de cozimento adequados (inferiores a 100 minutos). Similarmente ao observado para os valores de C_T , o rendimento foi significativamente influenciado pelo aumento temperatura da autoclave. Os valores de rendimento das amostras submetidas ao tratamento térmico nas condições de processo “a” e “b” foram em média 6,5 % menores que

os valores observados para as amostras submetidas às condições “c” e “d”. Dessa forma, a temperatura de 118 °C (condição de processo “c”) foi considerada como a melhor condição de processo, uma vez que na temperatura de 121 °C (condição “d”) a pressão de processo encontrava-se no limite de operação de segurança da autoclave.

Os três lotes pré-tratados (L_o , L_s , L_m) processados na temperatura de 118 °C foram armazenadas durante um ano à temperatura de 25 °C. Os valores de rendimento do produto durante o período de armazenamento são apresentados na Figura 2. Após o TT, as amostras apresentaram uma redução da massa drenada de aproximadamente 20 %, em virtude da exsudação de água e perda de sólidos solúveis. Além disso, o rendimento dos mexilhões do lote L_s foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que os observados para os lotes L_o ($\approx 5,5$ %) e L_m ($\approx 6,5\%$) durante o armazenamento. As perdas de água e sólidos solúveis durante o TT devem-se, principalmente, à desnaturação das proteínas induzida pelo calor (Almonacid et al., 2012). Por outro lado, como o sal solubiliza as proteínas, resultando em um aumento de interações proteína-proteína e proteína- água (Kong et al., 2008), essas perdas foram menores no lote L_s . No entanto, o efeito positivo do sal sobre o rendimento foi limitado pela adição de ácido acético ao produto (L_m). Aidos, Lie e Espe (1999) relataram que o colágeno do salmão é particularmente solúvel em ácidos diluídos, o que também poderia explicar o baixo rendimento dos mexilhões marinados.

Na Figura 3 são apresentados os resultados de CRA da carne do mexilhão antes e após o TT e durante o armazenamento a 25 ° C. Os valores de CRA antes do processamento foram influenciados pelo pré-tratamento (salga ou marinação). O TT causou uma redução de aproximadamente 9 % nos valores CRA para todos os lotes avaliados. Durante o período de armazenamento, a CRA da carne de mexilhão manteve-se praticamente constante e não foram observadas diferenças significativas entre os três lotes avaliados.

O pH apresentou valores praticamente constantes durante todo o período do armazenamento. Os valores dos lotes L_o , L_s e L_m foram de 6,39, 6,37 e 5,22, respectivamente, indicando uma estabilidade do produto à temperatura ambiente.

4. CONCLUSÕES

A conserva de carne de mexilhão triturada e tratada termicamente em embalagens flexíveis termoesterilizáveis apresenta-se como uma interessante alternativa para facilitar a difusão desse produto no país, especialmente em regiões onde não há infraestrutura adequada para o transporte rápido e refrigerada, necessário para a distribuição do produto fresco.

O tratamento térmico na temperatura de 118 °C apresenta-se como a melhor condição entre as estudadas. Além disso, o pré-tratamento de salga da carne de mexilhão favorece um aumento do rendimento após o tratamento térmico, enquanto que a adição de ácido incrementa a desnaturação proteica e a consequente perda de líquidos.

5. REFÊRENCIAS

- Adams, J. P., & Otwell, W. S. (1982). *Suitability of seafood to retort pouch processing*. University of Florida, Department of Food Science and Human Nutrition, Gainesville, Florida.
- Aidos, I., Lie, Ø., & Espe, M. (1999). Collagen Content in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47 (4), 1440-1444.
- Almonacid, S. B., Simpson, R., Urtubia, A., Pinto, M., & Teixeira, A. (2012). Commercially Sterilized Mussel Meats (*Mytilus chilensis*): A Study on Process Yield. *Journal of Food Science* , 77 (6), 127-135.
- Awuah, G., Ramaswamy, H., & Economides, A. (2007). Thermal processing and quality: principles and overview. *Chemical Engineering and Processing* , 46, 584–602.
- Bindu, J., Ravishankar, C., & Srinivasa Gopal, T. (2007). Shelf life evaluation of a ready-to-eat black clam (*Villorita cyprinoides*) product in indigenous retort pouches. *Journal of Food Engineering* , 78, 995–1000.
- Bindu, J., Srinivasa Gopal, T., & Nair, T. (2004). Ready-to-eat Mussel Meat Processed in Retort Pouches for the Retail and Export Market. *PACKAGING TECHNOLOGY AND SCIENCE* , 17, 113-117.
- Byun, Y., Bae, H., Cooksey, K., & Whiteside, S. (2010). Comparison of the quality and storage stability of salmon packaged in various retort pouches. *LWT - Food Science and Technology* , 43, 551-555.
- Cristianini, M. (1998). *Estudo da distribuição de temperaturas durante o processo de esterilização de atum (*Katsuwonus pelanis*) em bolsa flexível*. Universidade Estadual de Campinas, Ciencia dos alimentos, Campinas (SP), Brazil.
- Holdsworth, D., & Simpson, R. (2007). *Thermal Processing of Packager Foods* (Second Edition ed.). Springer.
- Kong, K., J., T., Lin, M., & Rasco, B. (2008). Thermal effects on chicken and salmon muscles: Tenderness, cook loss, area shrinkage, collagen solubility and microstructure. *LWT , Food Science and Technology* , 41, 1210–1222.

Tabela 1. Condições de temperatura da autoclave avaliadas nos ensaios preliminares.

Ensaio	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)
a	20	110
b	100	110
c	100	118
d	100	121

Tabela 2. Parâmetros da penetração do calor nas RP e rendimento das amostras de mexilhão após o tratamento térmico nas condições estudadas nos ensaios preliminares (médias ± Desvio padrão).

Ensaio	Temperatura inicial autoclave (°C)	Temperatura de operação da autoclave (°C)	Tempo de subida (min)	Tempo de cozimento (min)	Tempo total de processo (min)	F_0 (min)	C_T (min)	Rendimento %
a	20	110	71	82,0	165	7,07±0,05	197,9±0,3	73,5±2,2
b	100	110	13	92,0	117	7,07±0,09	194,5±3,1	73,4±1,5
c	100	118	19	23,5	57	7,10±0,04	84,3±1,9	78,1±1,3
d	100	121	22	15,0	53	7,04±0,11	72,9±2,1	78,2±0,9

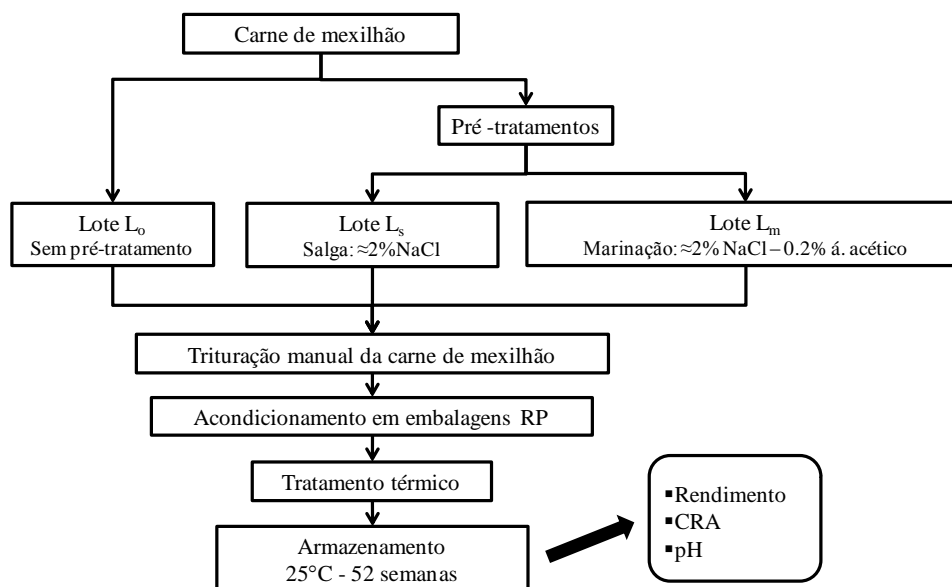


Figura 4. Diagrama do tratamento térmico da carne de mexilhão pré-cozida acondicionada em embalagens flexíveis termoesterilizáveis.

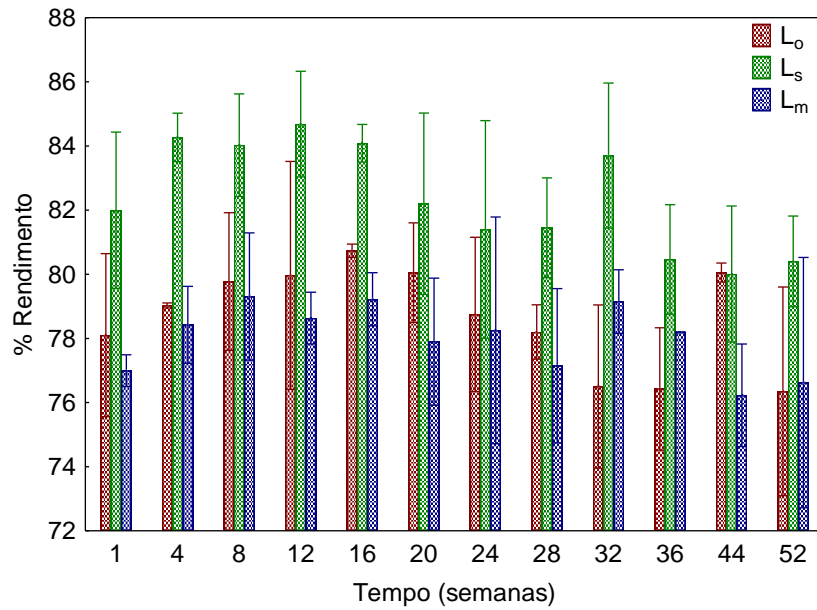


Figura 5. Rendimento da carne pré-cozida de mexilhão tratada termicamente (lotes L_0 , L_s , L_m) durante o armazenamento a 25 °C.

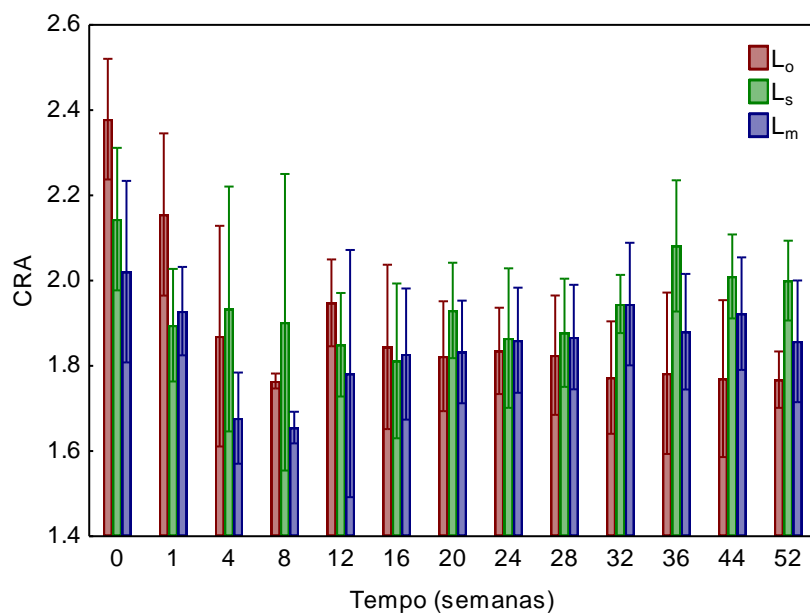


Figura 6. Capacidade de retenção de água (CRA) da carne pré-cozida de mexilhão tratada termicamente (lotes L_0 , L_s , L_m) durante o armazenamento a 25 °C.

DIAGRAMA OPERACIONAL DOS PROCESSOS DE SALGA E MARINAÇÃO DE CARNE PRÉ-COZIDA DE MEXILHÃO (*Perna perna*)

G. Tribuzi^a, F. C. Schmidt^b, J. B. Laurindo^{a*}

^aDepartamento de Engenharia Química e de Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina, EQA/CTC/UFSC, 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil.*e-mail: joao@enq.ufsc.br

^bDepartamento de Engenharia de Alimentos Universidade Federal do Triângulo Mineiro, DEA/ICTE/UFTM, 38025-180, Uberaba - MG, Brasil.

1.INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor de moluscos bivalves do Brasil, contribuindo com 95% da produção nacional, com maior destaque para os mexilhões. Segundo a EPAGRI (2013), o Estado de Santa Catarina produziu cerca de 21.027 toneladas de mexilhões na safra de 2012, representando uma importante realidade para a economia da região.

No Brasil, os mexilhões são comercializados principalmente frescos ou cozidos e desconchados e mantidos sob refrigeração. Isso dificulta uma ampla difusão desse produto no mercado nacional, em virtude da necessidade de transporte rápido e refrigerado. Dessa forma, a comercialização do produto é concentrada nas áreas próximas às áreas de produção, tornando-o muito pouco consumido em outras áreas do país. Assim, o desenvolvimento de alternativas para um melhor beneficiamento dos mexilhões por meio de processos que permitam a extensão da vida útil desse tipo de produto é de grande relevância.

O tratamento osmótico de mexilhões com soluções salinas (salga) ou com soluções salinas adicionadas de ácidos orgânicos (marinação) apresenta-se como uma boa alternativa de processamento para obtenção de produtos com maior valor agregado e com maior vida útil. Muitos estudos têm sido apresentados sobre a salga e marinação de diferentes espécies de pescados, principalmente sardinha, bacalhau e salmão (Poligne e Collignan 2000; Barat, et al., 2003; Bellagha et al., 2007; Gallart-Jornet et al., 2007a, 2007b). No entanto, a salga de mexilhões é pouco reportada na literatura.

O tratamento de carnes e pescados com soluções salinas envolve a transferência de sal e de água no mesmo sentido ou em sentidos opostos, dependendo da concentração de sal na solução na qual o produto está imerso e da presença de outros solutos, tais como ácidos (Lawrie, 2005). Assim, esse processo pode levar à hidratação ou à desidratação do produto (Offer e Trinick, 1983; Gallart-Jornet et al., 2007b; Schmidt et al., 2008; Volpato et al., 2007). Dessa forma, o conhecimento da cinética da variação dos conteúdos de umidade e de

sal durante o processamento é de extrema importância, pois permite otimizar o tempo de processo ou estimar o tempo de imersão necessário em função da composição desejada para o produto final. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da concentração de sal e ácido na salmoura e do tempo de imersão no tratamento osmótico (salga e marinação) da carne de mexilhão pré-cozida. A partir dos resultados experimentais, dois diagramas operacionais foram propostos para prever os conteúdos de água e de sal nos mexilhões submetidos aos processos de salga e marinação ácida com diferentes concentrações de sal na salmoura.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

As amostras utilizadas nos experimentos foram mexilhões cultivados da espécie *Perna perna* adquiridos em uma fazenda marinha local (Palhoça, SC, Brasil). Os mexilhões frescos foram rapidamente transportados para o laboratório, liberados das incrustações superficiais e cozidos por 5 minutos no vapor a 100 °C. Após o cozimento, os mesmos foram resfriados por imersão em uma mistura de água e gelo por 5 minutos, atingindo uma temperatura média de 8 ± 2 °C. Posteriormente, a carne dos mexilhões foi cuidadosamente separada da concha e foram selecionadas amostras com massa de 10 ± 3 g. Essas foram rapidamente congeladas e conservadas a -18 °C, visando obter amostras com características uniformes. Vinte e quatro horas antes dos experimentos, os mexilhões foram descongelados em refrigerador a 4 °C. As possíveis alterações estruturais induzidas pelo congelamento e descongelamento foram negligenciadas. As soluções osmóticas foram preparadas com cloreto de sódio comercial, ácido acético P.A. e água destilada.

Dispositivo experimental

Os experimentos de salga e marinação ácida de mexilhões pré-cozidos foram realizados no dispositivo experimental esquematizado na Figura 1. Esse dispositivo consiste em uma câmara encamisada, na qual a temperatura é controlada pela circulação de água à temperatura constante na camisa, utilizando um banho termostático (marca Quimis, modelo Q214M2, Brasil). A agitação da solução foi realizada por meio de duas bombas submersas (marca Atman, modelo AT-10, Brasil).

Metodologia experimental

Para o processo de salga dos mexilhões, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de NaCl na salmoura (b_s) nos parâmetros de transferência de massa (sal e água): 5, 10, 15 e 20 % de NaCl (m/m). No processo de marinação ácida, foi avaliada o efeito da presença de ácido acético ($m_a = 2$ %, m/m) a diferentes concentrações de NaCl (m_s : 5, 10, 15 e 20 %, m/m).

Para todas as condições avaliadas, as amostras de mexilhão pré-cozidas foram pesadas individualmente, identificadas e alocadas em redes de nylon. As redes contendo as amostras foram imersas nas diferentes soluções avaliadas, mantidas na temperatura de 5 ± 0.5 °C. Uma relação mássica de 1:20 de amostras e solução foi utilizada com o objetivo de evitar variações significativas nas concentrações de sal e ácido da solução durante os ensaios. Para tempos de imersão pré-definidos (1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas), quatro amostras foram retiradas da solução, drenadas, pesadas individualmente e preparadas para as análises de umidade e de concentração de sal. Todos os experimentos de salga e marinação ácida foram realizados em triplicata.

O conteúdo de umidade das amostras foi determinado através do método gravimétrico (AOAC, 2000) e a concentração de NaCl foi determinada em um analisador automático de cloretos (marca Cole Parmer, modelo 926, USA) (Fuentes, 2007).

Avaliação da transferência de massa e diagrama operacional

Durante o tratamento osmótico da carne de mexilhão, foram avaliados os parâmetros de ganho de sal (GS) e de ganho de água (GA), os quais foram calculados através das Equações 1 e 2, respectivamente.

$$GS = \frac{m_{s(t)} - m_{s0}}{m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

$$GA = \frac{m_{w(t)} - m_{w0}}{m_0} \cdot 100 \quad (2)$$

onde $m_{s(t)}$ é a massa de sal no tempo t , m_{s0} é a massa de sal inicial, m_0 é a massa inicial da amostra, $m_{w(t)}$ é a massa de água no tempo t , e m_{w0} é a massa inicial de água. Para as amostras marinadas, o conteúdo de água ($m_{w(t)}$) foi determinado através da Equação 3, considerando que o ácido acético é volatilizado durante a determinação de umidade pelo método gravimétrico (Goli et al., 2011).

$$m_{w(t)} = I - m_{ds} - m_{a(t)} \quad (3)$$

onde $m_{a(t)}$ é a massa de ácido acético no tempo t e m_{ds} é a massa de amostra seca.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o efeito de diferentes concentrações de NaCl na salmoura (b_s) na cinética do ganho de água (GA) pelos mexilhões, observou-se um ganho de água expressivo para as amostras tratadas com b_s até 15% de NaCl. Para o processo de salga com b_s de 20% de NaCl as amostras de mexilhão apresentaram uma perda de água (GA negativo) a partir da segunda hora de processo. Por outro lado, as amostras de mexilhão submetidas ao processo de marinação ácida apresentaram uma perda de água (GA negativo) para todas as concentrações de NaCl e ácido acético analisadas.

A partir dos dados experimentais do GA e do GS das amostras de mexilhão obtidos durante os processos de salga e marinação ácida em salmouras com diferentes concentrações de sal e ácido, determinou-se o conteúdo de água (M%, definido como a porcentagem de massa de água na amostra) e o conteúdo de sal das amostras (S%, definido como a porcentagem de massa de sal na amostra), de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente (Schmidt et al., 2008).

$$M\% = \frac{GA + M_o}{GS + GA + 100} \quad (4)$$

$$S\% = \frac{GS}{GS + GA + 100} \quad (5)$$

onde M_o é o conteúdo médio de água inicial da amostra ($M_o = 76,9\%$).

Através do ajuste dos dados de S% e M% em função da concentração da salmoura (b_s entre 5 e 20 % de NaCl para o processo de salga e m_s entre 5 e 20% de NaCl + m_a de 2% de ácido acético para o processo de marinação), observou-se um comportamento linear para ambos os processos avaliados nos diferentes tempos de imersão analisados (R^2 entre 0,947 e 0,999). As equações dos ajustes juntamente com os coeficientes de correlação (R^2) são apresentados na Tabela 1.

A partir dos ajustes lineares dos valores de S% e de M% apresentados na Tabela 1, construiu-se um diagrama operacional para cada processo analisado. Tais diagramas são apresentados na Figura 2; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Nos gráficos, as linhas cinza representam os valores de S% e as linhas pretas representam os valores de M%, ambos em função da concentração de sal na solução osmótica utilizada. O mesmo tipo de linha (sólida, tracejada, etc.) para os dois grupos de linhas (S%-cinza e M%-pretas) indicam o mesmo tempo de imersão (1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas).

Esses diagramas representam uma ferramenta útil para a otimização do processo de salga e marinação ácida em função da composição desejada para o produto final ou para

predizer os valores de S% e M% nas amostras tratadas com determinada concentração de NaCl na salmoura (b_s ou m_s , entre 5 e 20% de NaCl) por um dado tempo de imersão (1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas). Por exemplo, com o objetivo de otimizar o tempo de processo para atingir uma concentração de sal nos mexilhões de 3 % (na faixa de concentração de sal na salmoura avaliada: 5 a 20 % de NaCl) e uma umidade final próxima de 75 %, por meio do diagrama apresentado na Figura 2a é possível verificar que uma salmoura com b_s de aproximadamente 8,7 % de NaCl poderia ser utilizada para que o tempo necessário de imersão fosse de 1 hora. Dessa forma, o conteúdo final de água da amostra seria de 75,1%. Por outro lado, para obter a mesma concentração de sal no produto através do processo de marinação ácida (com m_a de 2 % de ácido acético) (Figura 2b) para o mesmo tempo de imersão, seria necessário utilizar uma salmoura com m_s de aproximadamente 7,2 % (inferior ao valor obtido no processo de salga, em função da desidratação provocada pelo ácido) e o conteúdo final de água na amostra seria de 74,8 %.

É importante observar que este diagrama é específico para o processo sobre o qual foi construído. De fato, qualquer variação na temperatura de processo e no nível de agitação, bem como na adição de outros solutos à salmoura influenciariam na transferência de massa e conseqüentemente na composição do produto final (Schmidt et al., 2008).

4.CONCLUSÕES

A partir dos diagramas operacionais propostos pode-se prever de forma simples a concentração de sal e água final das amostras submetidas aos processos de salga e marinação ácida, em dadas condições de processo (temperatura, nível de agitação, etc.). Esses resultados demonstram que as variáveis concentração de sal na salmoura e tempo de imersão podem ser manipuladas para a obtenção da concentração de NaCl e água desejadas na carne de mexilhão submetida a tratamento osmótico, contribuindo cientificamente e tecnologicamente para o desenvolvimento de alternativas para um melhor beneficiamento dos mexilhões por meio de processos que permitam a extensão da vida útil desse tipo de produto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, .
- Barat, J., Rodríguez-Barona, S., Andrés, A., & Fito, P. (2002). Influence of increasing brine concentration in the cod salting process. *Journal of food science*, 67 (5), 1922-1925.
- Bellagha, S., Sahli, A., Farhat, A., Kechaou, N., & Glenza, A. (2007). Studies on salting and drying of sardine (*Sardinella aurita*): Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering* , 78, 947–952.
- EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca. Santos, A. A., Novaes, A. L. T., Silva, F. M., Souza, R.V., Costa, S.W.Síntese Informativa da Maricultura 2011. Retrieved 30/01/2013 from www.epagri.sc.gov.br.
- Fuentes, A. (2007). *Desarrollo de productos ahumados a partir de lubina (*Dicentrarchus labrax L.*)*. Valencia, Spain: Universidad Politecnica de Valencia.
- Gallart-Jornet, L., Barat, J., Rustad, T., U., E., Escriche, I., & Fito, P. (2007a). A comparative study of brine salting of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Engineering* , 79, 261–270.
- Gallart-Jornet, L., Barat, J., Rustad, T., U., E., Escriche, I., & Fito, P. (2007b). Influence of brine concentration on Atlantic salmon fillet salting. *Journal of Food Engineering*, 80, 267–275.
- Goli, T., Bohuon, P., Ricci, J., Trystram, G., & Collignan, A. (2011). Mass transfer dynamics during the acidic marination of turkey meat. *Journal of Food Engineering*, 104, 161-168.
- Lawrie, R. (2005). *Ciência da carne* (sixth ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Offer, G., & Trinick, J. (1983). On the mechanism of water holding in meat – the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Science*, 8, 245–281.
- Poligne, I., & Collignan, A. (2000). Quick Marination of Anchovies (*Engraulis encrasicolus*) Using Acetic and Gluconic Acids. Quality and Stability of the End Product. *LWT - Food Science and Technology*, 33 (3), 202-209.
- Schmidt, F., Carciofi, B., & Laurindo, J. (2008). Salting operational diagrams for chicken breast cuts: hydration–dehydration. *Journal of Food Engineering*, 88, 36-44.
- Volpato, G., Michielin, E., Ferreira, S., & Petrus, J. (2007). Kinetics of the diffusion of sodium chloride in chicken breast (*Pectoralis major*) during curing. *Journal of Food Engineering*, 79, 779–785

Tabela 1. Equações e coeficientes de correlação (R^2) observados no ajuste dos valores de S% versus b_s ou m_s e M% versus b_s ou m_s para diferentes tempos de imersão.

Tempo (h)	S%		M%		
	Equação	R^2	Equação	R^2	
Salga	1	$S = 0,26 + 0,32b_s$	0,992	$M = 77,46 - 0,27b_s$	0,959
	2	$S = -0,53 + 0,51b_s$	0,980	$M = 78,97 - 0,47b_s$	0,977
	3	$S = -0,24 + 0,57b_s$	0,997	$M = 79,19 - 0,57b_s$	0,993
	4	$S = -0,20 + 0,60b_s$	0,998	$M = 79,37 - 0,57b_s$	0,990
	6	$S = 0,30 + 0,60b_s$	0,999	$M = 79,11 - 0,58b_s$	0,992
	24	$S = 0,07 + 0,67b_s$	0,996	$M = 79,55 - 0,64b_s$	0,997
Marinação ácida	1	$S = 0,32 + 0,37m_s$	0,986	$M = 77,02 - 0,38m_s$	0,963
	2	$S = -0,70 + 0,46m_s$	0,980	$M = 77,02 - 0,46m_s$	0,980
	3	$S = -0,75 + 0,60m_s$	0,981	$M = 77,10 - 0,58m_s$	0,947
	4	$S = -0,64 + 0,65m_s$	0,992	$M = 77,22 - 0,66m_s$	0,959
	6	$S = -0,70 + 0,63m_s$	0,998	$M = 76,81 - 0,65m_s$	0,975
	24	$S = 0,14 + 0,65m_s$	0,999	$M = 75,84 - 0,63m_s$	0,962

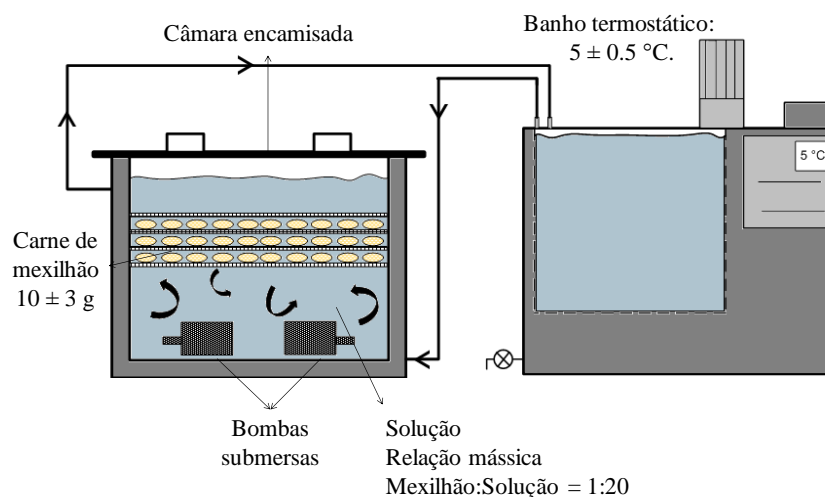


Figura 1. Dispositivo experimental utilizado nos processos de salga e marinação ácida de mexilhões.

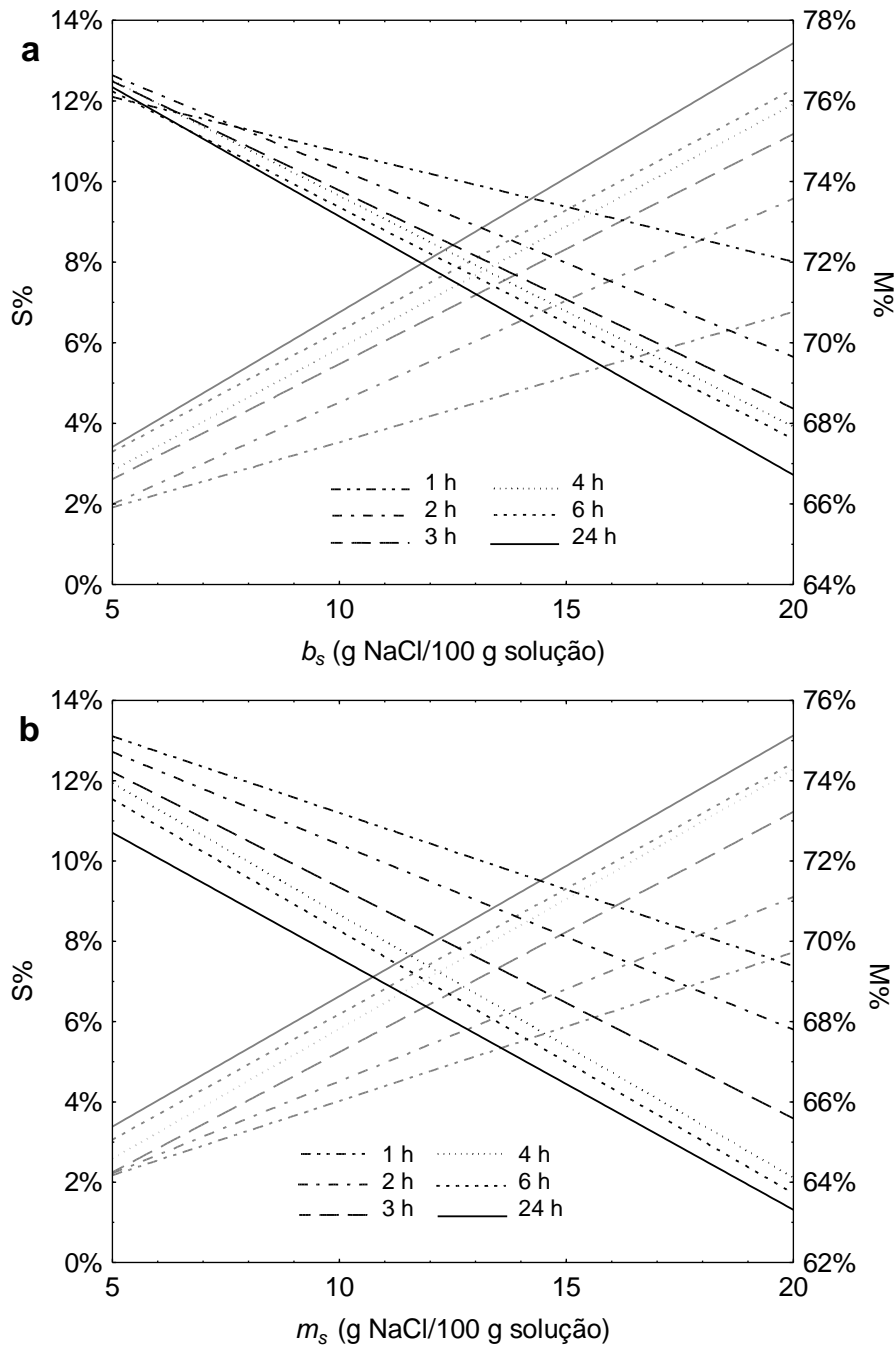


Figura 2. Diagrama operacional para o tratamento osmótico de mexilhões. (a) Salga; (b) marinação ácida.

RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS PELA *SPORODIOBOLUS pararoseus* POR DIFERENTES MÉTODOS ABRASIVOS

Lopes, Almeida Nathalie¹; Remedi, Rafael Diaz¹; Sá, Carolina Dos Santos¹; Burkert, Janaína Fernandes De Medeiros¹

¹ Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

INTRODUÇÃO

Carotenoides é uma das mais importantes classes de pigmentos naturais que podem ser obtidos por leveduras intracelularmente, onde sua parede celular atua como limitador da extratibilidade dos pigmentos produzidos (MONKS et al., 2013).

A utilização de métodos abrasivos é um processo simples e efetivo para o rompimento da parede celular de diferentes tipos de micro-organismos. O rompimento celular se dá pela combinação da colisão, agitação e/ou moagem dos grânulos. A eficiência da ruptura depende do tamanho e da composição das pérolas, velocidade do agitador e do tempo de residência (MIDDELBERG, 1995; LEE, LEWIS & ASHMAN, 2012). Para leveduras e bactérias, diâmetros maiores e menores que 0,5 mm, respectivamente, são considerados ótimos (MEDEIROS et al., 2008).

O presente trabalho compara dois métodos abrasivos para a ruptura celular, com o objetivo de identificar uma metodologia eficiente na recuperação de carotenoides em escala laboratorial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivos dos micro-organismos

A bioprodução de carotenoides foi realizada com a levedura *Sporodiobolus pararoseus*, isolada de amostras ambientais por Otero (2011), em erlenmeyers de 500 mL com 225 mL do meio de produção YM a pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo, sendo as condições operacionais do processo 25 °C, 180 rpm por 168 horas (SILVA, 2009). As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas até o término do processo, a fim de acompanhar biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais.

Tratamento da biomassa pós-cultivo

A biomassa da *S. pararoseus* foi recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1745xg por 10 minutos) e o sedimento lavado com água destilada. Logo após as amostras foram submetidas à secagem por 48 horas a 35 °C (FONSECA et al., 2011), sendo maceradas

em grau e passada em peneira com mesh 115 (CIPOLATTI, 2012), onde parte da biomassa foi submetida ao congelamento a -18°C por 48 horas (MORAES et al., 2010) e a outra parte sem congelar.

Abrasão com Pérolas de Vidro

Na ruptura celular utilizando pérolas de vidro, foram utilizados tubos de ensaio contendo 6 mL de acetona e 0,5 g de biomassa seca da levedura submetida ou não ao congelamento durante 48 horas, sendo adicionados uma carga 1,1 g/mL de pérolas de vidro (0,5 $d > 0,59$ mm). Após os tubos foram submetidos à agitação vigorosa em agitador tipo vórtex por 10 minutos (MEDEIROS et al., 2008). A separação do sobrenadante contendo os carotenoides foi realizada por centrifugação (1745xg por 10 minutos) a fim de sedimentar os debris celulares.

Maceração com Terra Diatomácea

A ruptura celular através da maceração com terra diatomácea foi realizada durante 10 minutos, com 0,5 g de biomassa seca submetida ou não ao congelamento por 48 horas, juntamente com 0,5 g de terra diatomácea em almofariz com auxílio de um pistilo, sendo adicionado 6 mL de acetona (VALDUGA et al., 2009). Após foi realizada a centrifugação (1745xg por 10 minutos) para a separação do sobrenadante.

Extração dos carotenoides

A extração dos carotenoides foi determinada através da adição de 6 mL de acetona, sendo a separação do sobrenadante realizada por centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente (MICHELON et al., 2012).

Determinação da concentração dos carotenoides

A concentração de carotenoides totais (CT) foi determinada nos extratos em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, china) através do valor médio da máxima absorvância a 448 nm (CABRAL et al., 2011), segundo a Equação 1 (DAVIES, 1976), sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de = 2592).

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_{1\%}^{1\text{cm}} \cdot 100 \cdot m_{amostra}} \quad (1)$$

Onde:

CT = concentração específica de carotenoides de totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); A = absorvância; V = volume (mL); $m_{amostra}$ = massa celular seca (g); $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ = absortividade específica.

Extratibilidade dos carotenoides

A extratibilidade de carotenoides foi determinada a partir da Equação 2, que relaciona a concentração específica de carotenoides recuperados (CR) utilizando as diferentes técnicas de ruptura celular e a concentração específica de carotenoides totais (CT) determinada pelo método de ruptura celular utilizando dimetilsulfóxido (XIÃO et al., 2009).

$$EC (\%) = \frac{CR}{CT} * 100 \quad (2)$$

Análise estatística

Os processos de ruptura celular, utilizando os métodos abrasivos, foram realizados em triplicatas, sendo os resultados submetidos à análise de variância e, quando detectadas diferenças significativas ao nível de significância 5% ($p < 0,05$), seguidos por teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração específica dos carotenoides (CEC) não foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelo congelamento, alcançando $76,9 \pm 2,1 \mu\text{g/g}$ e $75,1 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$ quando utilizado a ruptura com pérolas de vidro empregando a biomassa não congelada e congelada, respectivamente. A recuperação de carotenoides com o uso da terra diatomácea foi inferior, atingindo $33,1 \pm 8,5 \mu\text{g/g}$ e $45,8 \pm 2,7 \mu\text{g/g}$ empregando a biomassa não congelada e congelada, respectivamente, sendo que o processo de congelamento influenciou ($p > 0,05$) na recuperação dos carotenoides por este método (Figura 1).

De acordo com a figura 2, a extratibilidade dos carotenoides obtidos quando utilizada a ruptura com pérolas de vidro, foi influenciada significativamente ($p > 0,05$) pelo congelamento, atingindo $88,3 \pm 6,7\%$ de extratibilidade com a biomassa que não sofreu congelamento e $66,2 \pm 3,6\%$ para a biomassa que foi congelada. Para a ruptura utilizando a maceração com terra diatomácea, a extratibilidade não foi afetada pelo congelamento ($p < 0,05$), onde a biomassa congelada apresentou $64,5 \pm 3,8\%$ de extratibilidade e a biomassa não congelada $46,6 \pm 8,9\%$ de extratibilidade.

A extratibilidade dos carotenoides não foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) quando aplicado o método de ruptura com pérolas de vidro e terra diatomácea, utilizando biomassa não congelada (Figura2).

Medeiros et al., (2008) estudaram a extração da β -galactose de *Kluyveromyces marxianus* utilizando o processo de ruptura com pérolas de vidro, por um período de 30 minutos, proporcionando um rendimento do processo de extração de $597,04 \text{ U/g}$.

Técnicas de maceração com terra diatomácea e abrasão com pérolas de vidro também foram estudadas por Michelin et al., (2011). Na maceração com terra diatomácea, foram encontrados 88.80 e 93.13 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides quando utilizado a biomassa não congelada e congelada, respectivamente. Para a abrasão com pérolas de vidro, foram observados 70.51 e 75.42 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides na biomassa não congelada e congelada, respectivamente.

CONCLUSÃO

O congelamento para o método que utiliza a terra diatomácea promoveu um incremento significativo ($p < 0,05$) de 27,8% na recuperação dos carotenoides. No entanto, resultados 2,3 vezes superiores foram obtidos com o método de abrasão com pérolas de vidro, sem a necessidade da operação do congelamento da biomassa.

Agradecimentos: CNPq e CAPES.

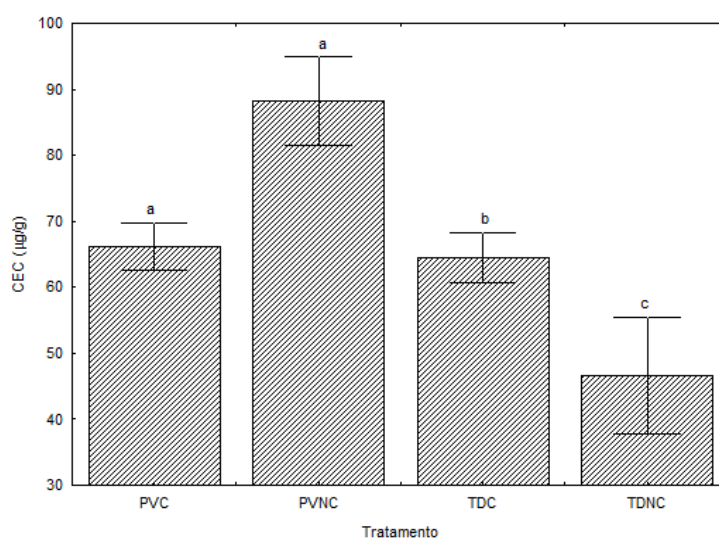


Figura 1: Médias \pm desvios padrões da concentração específica (mg/g) dos carotenoides utilizando pérolas de vidro e terra diatomácea para ruptura celular na biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. PVC= Pérolas de vidro utilizando biomassa congelada, PVNC= Pérolas de vidro utilizando biomassa não congelada, TDC= Pérolas de vidro utilizando biomassa congelada e TDNC= Pérolas de vidro utilizando biomassa não congelada.

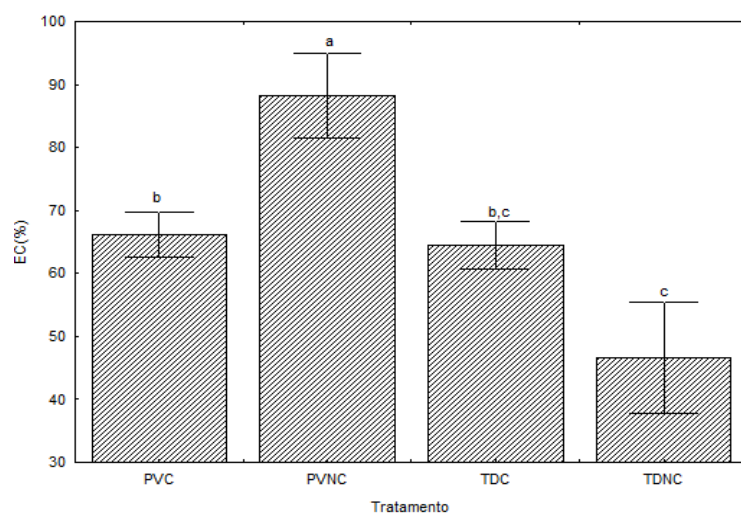


Figura 2: Médias \pm desvios padrões da concentração específica (mg/g) dos carotenoides utilizando pérolas de vidro e terra diatomácea para ruptura celular na biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. PVC= Pérolas de vidro utilizando biomassa congelada, PVNC= Pérolas de vidro utilizando biomassa não congelada, TDC= Pérolas de vidro utilizando biomassa congelada e TDNC= Pérolas de vidro utilizando biomassa não congelada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cabral, M. M. S.; Cence, K.; Zeni, J.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L. Toniazzi, G.; Valduga, E.; Treichel, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Eur Food Res Technol*, v. 233, p. 159-166, 2011.
- Cipolatti, E. P. Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande.
- Davies, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London: Academic Press. cap. 2, p. 39-165. 1976.
- Fonseca, R. A. S.; Rafael, R. S.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 1165-1171, 2011.
- Lee, A. K.; Lewis, D. M.; Ashman, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bio Energy*. v. 46, p. 89-101. 2012.
- Medeiros, F.; Alves, F. G.; Lisboa, C. R.; Martins, D.; Burkert, C. A. V.; Kalil, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 336-339. 2008.
- Michelon, M.; Matos, B. T.; Rafael, R. S.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. *Food Science and Biotechnology*, v. 21, p. 1-8. 2012.
- Middelberg, A. P. J. Process-scale disruption of microorganism. *Biotechnology Advances*, v. 13, n. 3, p.491-551, 1995.

Monks, L. M.; Rigo, A.; Mazutti, M. A.; Vladimir Oliveira, J.; Valduga E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 2, p. 165–169. 2013.

Moraes, C. C.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J. C-phycoerythrin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, v. 34, p. 133-148, 2010.

Otero, D. M. Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides. 2011, 114f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

Silva, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

Valduga, E.; Valério, A.; Tatsch, P. O.; Treichel, H.; Furigo Jr, A.; Di Luccio, M. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Food and Bioprocess Technology*, v. 2, p. 234-238, ago. 2009.

Xião, A.; Ni, H.; Cai, H.; Li, L.; Su, W.; Yang, Q. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, in press, 2009.

USO DE LIOFILIZAÇÃO NA BIOMASSA MICROBIANA DA *SPORODIOBOLUS pararoseus* PARA A RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES

Lopes, Almeida Nathalie 1; Remedi, Rafael Diaz 1; Sá, Carolina Dos Santos 1; Burkert, Janaína Fernandes De Medeiros ¹

¹ Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

INTRODUÇÃO

Além de ser um importante atrativo para os consumidores, os carotenoides proporcionam a diversos produtos suas cores naturais, além de possuir ações biológicas, sendo a atividade antioxidante uma das mais importantes, despertando grande interesse em empresas de alimentos e farmacêutica (GOUVEIA et al., 2006).

Os carotenoides produzidos pelas leveduras estão localizados no interior da célula microbiana, tornando-se necessário utilizar um método de ruptura para a liberação do pigmento (MICHELON et al., 2012). Para isto, são utilizados métodos de secagem da biomassa para posterior processo de ruptura.

O método de secagem é uma técnica antiga para preservação de alimentos, contudo, existem diversos tipos de secagem, como leito fixo ou liofilização, na qual promovem desidratação na amostra interferindo diretamente no grau dos constituintes do produto, podendo remover mais água ou acarretar maior dano nas propriedades nos alimentos (SANTOS et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi comparar a liofilização com a secagem convencional por circulação de ar forçado na biomassa microbiana, avaliando seu efeito na extração dos carotenoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a levedura carotenogênica *Rhodotorula mucilaginosa* isolada de amostras ambientais por Otero (2011) dos ecossistemas gaúcho Litoral Médio e Escudo Sul-Rio-Grandense.

Cultivos em frascos agitados

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 500 mL com 225 mL do meio YM, com pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo, sendo as condições operacionais do

processo 25 °C, 180 rpm por 168 horas (SILVA, 2009). Para realizar o acompanhamento da biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais, foram retiradas amostras em intervalos de 24 horas até completar 168 horas.

Recuperação e tratamento da biomassa pós-cultivo

A biomassa da *S. pararoseus* foi recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1745xg por 10 minutos) e o sedimento lavado com água destilada, sendo parte da biomassa submetida ao processo de secagem convencional e parte submetida ao processo de liofilização.

Secagem convencional

As amostras foram submetidas à secagem convencional por 48 horas a 35 °C (FONSECA et al., 2011), sendo trituradas em grau e passada em peneira com mesh 115 (CIPOLATTI, 2012), onde parte da biomassa foi submetida ao congelamento a -18°C por 48 horas (MORAES et al., 2010) e a outra parte sem congelar.

Liofilização

As amostras foram liofilizadas (-80 °C/48 horas, em ultrafreezer, seguido do processo de liofilização até alcançar 2% de umidade da amostra), sendo a biomassa submetida ou não ao processo de congelamento.

Ruptura celular

Para a quantificação de carotenoides em escala laboratorial, é utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) como técnica padrão. Esta técnica consiste em pesar 0,05 g de biomassa seca pelo processo convencional ou pela liofilização, submetida ou não ao congelamento e adicionar 2 mL de dimetilsulfóxido a 55 °C, sendo homogeneizadas em vórtex, a cada intervalo de 15 minutos, até completar um período de 1 hora de contato (FONSECA et al., 2011).

Extração de carotenoides

Após o processo de ruptura, utilizando a biomassa proveniente do processo de secagem convencional ou pela liofilização, foi adicionado 6 mL de acetona, a fim de promover a extração dos carotenoides. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1745xg por 10 minutos e a fase solvente separada e o procedimento de ruptura repetido até o branqueamento total da célula.

Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, serão adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p.v⁻¹) e 10 mL de éter de petróleo. Após a formação de duas fases será coletado a

fase polar e o excesso de água será retirado com sulfato de sódio (Na₂SO₄), dando origem aos extratos carotenogênicos (MICHELON et al., 2012).

Determinação da concentração total de carotenoides

De acordo com a equação 1 de Davies (1976), a determinação da concentração total de carotenoides (CT) foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, china) através do valor médio da máxima absorvância a 448 nm (Cabral et al. 2011), sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de = 2592).

$$CT = \frac{A*V*10^6}{A_{1cm}^{1\%}*100*m_{amostra}} \quad (1)$$

Onde:

CT = concentração específica de carotenoides de totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); A = absorvância; V = volume (mL); $m_{amostra}$ = massa celular seca (g); $A_{1cm}^{1\%}$ = absortividade específica.

Análise estatística

Os ensaios de ruptura celular utilizando a biomassa previamente seca por liofilização ou por secagem convencional foram realizados em triplicatas, e os resultados submetidos à análise de variância e, quando forem detectadas diferenças significativas ao nível de significância 5% ($p < 0,05$), seguidos por teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração específica dos carotenoides utilizando a liofilização foi de $98,55 \pm 2,9$ e $93,94 \pm 2,4$ $\mu\text{g}/\text{g}$ com a biomassa congelada e não congelada, respectivamente. Na secagem convencional, a concentração específica dos carotenoides foi de $78,17 \pm 3,3$ e $72,74 \pm 9,8$ $\mu\text{g}/\text{g}$ utilizando a biomassa congelada e não congelada, respectivamente (Figura 1).

O processo de liofilização provocou um aumento de cerca de 20% na concentração específica dos carotenoides, quando comparado com o processo de secagem convencional. Este fato pode ser explicado pela passagem direta do estado sólido para o gasoso, ocorrendo mudança de estado físico por sublimação, tornando o produto mais estável devido à diminuição da atividade de água.

O processo de congelamento da biomassa não influenciou significativamente ($p < 0,05$), podendo ser eliminada do processo.

Segundo Machado (2013), o processo de liofilização remove a água livre do sistema, enquanto que no processo de secagem convencional, ocorre a trituração da amostra, gerando atrito e liberando calor, provocando possivelmente uma redução no teor de carotenoides. Além disso, quando a biomassa é macerada e padronizada (mesh 125) ocorre um maior tempo de exposição com o ambiente, possibilitando também perdas no teor de carotenoides.

CONCLUSÃO

A secagem da biomassa através do processo de liofilização provocou um aumento de cerca de 20% na concentração específica dos carotenoides, tornando-se uma alternativa interessante na secagem da biomassa, pois possibilita o aumentando do rendimento na recuperação dos carotenoides.

Agradecimentos: CNPq e CAPES.

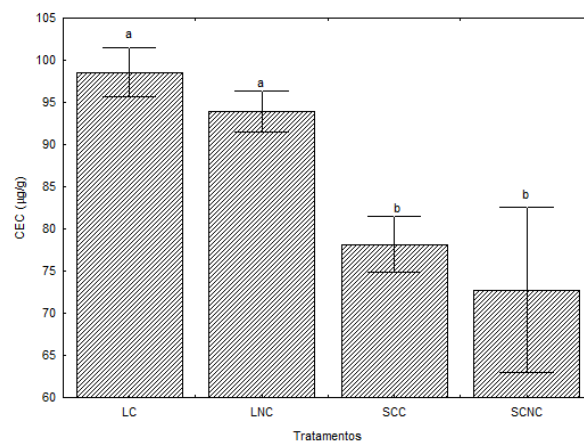


Figura 1: Médias \pm desvios padrões da concentração específica (mg/g) dos carotenoides utilizando liofilização e secagem convencional, utilizando biomassa submetida ou não ao processo de congelamento. LC= Liofilização utilizando biomassa congelada, LNC= Liofilização utilizando biomassa não congelada, SCC= Secagem convencional utilizando biomassa congelada e SCNC= Secagem convencional utilizando biomassa não congelada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cabral, M. M. S.; Cence, K.; Zeni, J.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L. Toniazzi, G.; Valduga, E.; Treichel, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Eur Food Res Technol*, v. 233, p. 159-166, 2011.

Cipolatti, E. P. Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande.

Davies, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London: Academic Press. cap. 2, p. 39-165, 1976.

Fonseca, R. A. S.; Rafael, R. S.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 1165-1171, 2011.

Gouveia, L.; Raymundo, A.; Batista, Ap; Sousa, I; Empis, J. *Chlorella Vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*. v. 222, p. 362-367, 2006.

Machado, W. R. C. Otimização da produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande.

Michelon, M.; Matos, B. T.; Rafael, R. S.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. *Food Science and Biotechnology*, v. 21, p. 1-8, 2012.

Moraes, C. C.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, v. 34, p. 133-148, 2010.

Otero, D. M. Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides. 2011, 114f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

Santos, G.; Oliveira, M. C.; Moraes, M. H.; Pagani, A., A., C. Comparative study of coriander coriander (*Coriandrum sativum L.*) obtained in dry different drying method, *Geintec*, v. 2, n. 3, p. 236-244, 2012.

Silva, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS QUÍMICAS NA RUPTURA CELULAR DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR *Rhodotorula mucilaginosa*

Lopes, Almeida Nathalie¹; Remedi, Rafael Diaz¹; Sá, Carolina Dos Santos¹; Burkert, Janaína Fernandes De Medeiros¹

¹ Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

INTRODUÇÃO

Carotenoides são compostos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelho de muitos alimentos (BOTELLA-PAVÍA & RODRIGUEZ- CONCEPCIÓN, 2006). Além de ser um importante atrativo para os consumidores, por proporcionar a diversos produtos suas cores naturais, os carotenoides possuem ações biológicas, sendo a atividade antioxidante uma das mais importantes (GOUVEIA et al., 2006).

A produção de carotenoides pode ser realizada através de leveduras, bactérias e fungos, sendo que o aumento da demanda por produtos naturais motivou a procura pela bioprodução deste pigmento. O principal interesse em utilizar micro-organismos na produção de carotenoides, se dá pela simplicidade do aumento de produção através da manipulação das condições de cultivo (ZENI et al., 2011).

Apesar das vantagens, a produção de carotenoides a partir de leveduras possui limitações devido à resistência da parede celular, limitando a disponibilidade dos pigmentos produzidos (MICHELON et al., 2012).

Com isso, o objetivo do trabalho é avaliar métodos de ruptura celular, utilizando para isso os ácidos clorídrico, láctico e acético, a fim de encontrar uma metodologia eficaz para a extração de carotenoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada a levedura carotenogênica *Rhodotorula mucilaginosa* isolada de amostras ambientais por Otero (2011). Os cultivos submersos foram realizados em meio YM modificado, incubado a 25 °C, 180 rpm, durante 168 horas (SILVA, 2009).

A biomassa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foram recuperadas do caldo fermentado por centrifugação (1745xg por 10 minutos), após submetida a secagem por 48 horas a 35 °C (FONSECA et al., 2011), sendo maceradas em grau e passada em peneira com mesh 115 conforme padronizada por Cipolatti (2012), onde parte da biomassa foi submetida

ao processo de congelamento a -18°C por 48 horas (MORAES et al., 2010) e outra parte sem congelar.

Para a ruptura química, foi utilizado 0,5 g de biomassa seca da levedura submetida ou não ao congelamento e 7,5 mL de uma solução 4 mol/L de ácido clorídrico, acético e láctico, sendo estes submetidos durante 5 minutos a banho agitado a 35°C . Após foi realizada centrifugação (1745xg por 10 minutos) descartando-se o precipitado e o sedimento lavado duas vezes com 7,5 mL de água destilada para eliminar resíduos ácidos.

Para a ruptura com dimetilsulfóxido, foi utilizada 0,05 g de biomassa seca submetida ou não ao congelamento por 48 horas. Após adicionou-se 2 mL de dimetilsulfóxido a 55°C , sendo homogeneizadas em vórtex, a cada intervalo de 15 minutos, até completar um período de 1 hora de contato (FONSECA et al., 2011).

Para a extração dos carotenoides foi adicionado 6 mL de acetona e a separação do sobrenadante foi realizada por centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente (MICHELON et al., 2012).

A determinação da concentração específica dos carotenoides totais (CT) nos extratos foi realizado em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, china) através do valor médio da máxima absorvância a 448 nm (CABRAL et al., 2011), utilizando a Equação 1 (Davies, 1976), e sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de $= 2592$).

$$CT = \frac{A*V*10^6}{A_{1cm}^{1\%}*100*m_{amostra}} \quad (1)$$

Onde:

CT = concentração específica de carotenoides de totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

A = absorvância;

V = volume (mL);

$m_{amostra}$ = massa celular seca (g);

$A_{1cm}^{1\%}$ = absortividade específica.

A extratibilidade de carotenoides (EC) foi determinada a partir da Equação 2, que relaciona a concentração específica de carotenoides recuperados (CR) utilizando as diferentes

técnicas de ruptura celular e a concentração específica de carotenoides totais (CT) determinada pelo método de ruptura celular utilizando DMSO (XIÃO et al., 2009).

$$EC (\%) = \frac{CR}{CT} * 100 \quad (2)$$

Os ensaios de ruptura celular foram realizados em triplicatas, e os resultados submetidos à análise de variância e, quando detectadas diferenças significativas ao nível de significância 5% ($p < 0,05$), seguidos por teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o percentual de extratibilidade e a concentração específica de carotenoides empregando diferentes técnicas químicas de ruptura celular da biomassa submetida ou não ao processo térmico de congelamento.

De acordo com a tabela 1, os maiores valores encontrados para a concentração específica e extratibilidade dos carotenoides foram para o DMSO, verificando uma influência significativa ($p < 0,05$) na utilização do congelamento. Segundo Michelin et al., (2012), quando utilizaram a *Phaffia rhodozyma* para produção de carotenoides, este resultado era esperado, visto que esta técnica é considerada padrão para a quantificação de carotenoides em escala laboratorial, porém, limitada para escalonamento devido a sua toxicidade.

Na tabela 1 observa-se que a recuperação dos carotenoides pelos ácidos não sofreu influência significativa ($p > 0,05$) do congelamento, exceto para a EC do ácido láctico que diminuiu. Assim, a etapa de congelamento pode ser eliminada do processo, visto que não apresentou melhorias na recuperação dos carotenoides.

Com relação à biomassa que não sofreu congelamento, foi detectada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), onde os maiores valores foram encontrados para os ácidos acético e láctico, seguido do ácido clorídrico.

Michelon et al., (2011) e Monks et al., (2013) quando utilizaram a *Phaffia rhodozyma* e a *Sporodiobolus salmonicolor*, respectivamente, na ruptura celular com os ácidos acético, clorídrico e láctico, observaram comportamento semelhante, apresentando melhores resultados quando utilizado o ácido clorídrico, seguido do ácido láctico e acético.

Segundo Michelin et al., (2011), esse fenômeno pode estar associado aos valores da intensidade ácida (pKa), quanto mais intenso é o ácido, maior é a eficiência de perturbação na célula de levedura. Porém, os resultados encontrados diferem para a *Rhodotorula*

mucilaginoso, onde o ácido clorídrico que apresenta valor de pKa -7, mostrou-se menos eficiente na recuperação dos carotenoides. A ação do ácido na parede celular da levedura pode ter sido tão intensa que além de romper a parede, degradou os carotenoides liberados, assim, ao invés de promover uma maior ruptura da parede celular da *R. mucilaginoso*, o ácido clorídrico interferiu negativamente na recuperação dos pigmentos.

CONCLUSÃO

A recuperação dos carotenoides obtidos pela ruptura química com os ácidos estudados foi aproximadamente três vezes menor, em relação à ruptura com DMSO, porém o extrato obtido possui menor toxicidade, podendo ser otimizado o seu uso na continuidade do trabalho.

Agradecimentos: CNPq e CAPES.

Tabela 1 - Médias \pm desvios padrões da concentração específica ($\mu\text{g/g}$) e da extratibilidade (%) de carotenoides, utilizando diferentes técnicas químicas de ruptura celular na biomassa seca submetida ou não ao processo de congelamento.

Técnica	CEC ($\mu\text{g/g}$)		EC (%)	
	Congelamento			
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
1	93,2 \pm 8,9 ^{bA}	89,2 \pm 5,8 ^{bA}	31,6 \pm 5,4 ^{aA}	38,1 \pm 2,1 ^{aA}
2	78,4 \pm 7,3 ^{bA}	63,8 \pm 8,5 ^{cA}	26,5 \pm 3,4 ^{aA}	27,3 \pm 3,9 ^{bA}
3	76,9 \pm 8,5 ^{bA}	81,7 \pm 7,3 ^{bA}	25,7 \pm 2,3 ^{aB}	34,9 \pm 2,6 ^{aA}
4	297,6 \pm 27,7 ^{aA}	234,1 \pm 4,0 ^{aB}	100	100

Médias \pm desvios padrões (n=3); 1: Ácido acético; 2: Ácido clorídrico; 3: Ácido láctico; 4: Dimetilsulfóxido (DMSO); CEC: Concentração específica de carotenoides; EC: Extratibilidade de carotenoides; Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna (p<0,05) e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha (p<0,05).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Botella-Pavía, P.; Rodríguez- Concepción, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, v. 126, p. 369-381, 2006.
- Cabral, M. M. S.; Cence, K.; Zeni, J.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L. Toniazzo, G.; Valduga, E.; Treichel, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Eur Food Res Technol*, v. 233, p. 159-166, 2011.
- Cipolatti, E. P. Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande.
- Davies, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London: Academic Press. cap. 2, p. 39-165, 1976.
- Fonseca, R. A. S.; Rafael, R. S.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 1165-1171, 2011.
- Gouveia, L.; Raymundo, A.; Batista, Ap; Sousa, I; Empis, J. *Chlorella Vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*. v. 222, p. 362-367, 2006.
- Michelon, M.; Matos, B. T.; Rafael, R. S.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. *Food Science and Biotechnology*, v. 21, p. 1-8, 2012.
- Monks, L. M.; Rigo, A.; Mazutti, M. A.; Vladimir Oliveira, J.; Valduga E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 2, p. 165–169, 2013.
- Moraes, C. C.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, v. 34, p. 133-148, 2010.
- Otero, D. M. Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides. 2011, 114f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- Silva, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.
- Xiã, A.; Ni, H.; Cai, H.; Li, L.; Su, W.; Yang, Q. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, in press, 2009.
- Zeni, J.; Colet, R.; Cence, K.; Tiggemann, L.; Toniazzo, G.; Cansian, R. L.; Di Luccio, M.; Oliveira, D.; Valduga, E. Screening of microorganisms for production of carotenoids. Selección de microorganismos para la producción de carotenóides. *CyTA - Journal of Food*. v. 9, nº2, p. 160-166, 2011.

CIRCULACIÓN DE AIRE A TRAVÉS DE LECHOS FORMADOS POR GRANOS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*)

Melgarejo S, Valdivia R, Chire G, Salas W

Departamento de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú

Correspondiente autor: smelgarejo@lamolina.edu.pe

INTRODUCCION

El almacenamiento de granos es una etapa en el proceso de producción requerida en plantas de alimentos a nivel industrial de consumo masivo y exportación, donde se debe controlar las características del aire que está en contacto con los granos. Una aireación apropiada es fundamental en todo sistema de almacenamiento de granos y es esencial para mantener la calidad del mismo, evitando la infestación de insectos y la migración de humedad, disminuyendo el deterioro de los granos con importante ahorro de dinero.

Sistemas de ventilación exhaustiva se requieren para controlar el polvo en granos de pepita de algodón (Tabak, 2004). Cuando un gas circula a través de un lecho granular estático, experimenta una pérdida de presión que está íntimamente relacionada con la velocidad del gas, el espesor del lecho y el tamaño y forma de los granos. Para seleccionar los ventiladores o sopladores que han de impulsar el gas a través del lecho granular, y para conocer la energía que van a consumir es imprescindible poder calcular esta pérdida de presión (Escardino, 1970)

La ecuación de Kozeny-Carman es una relación utilizada en el campo de la dinámica de fluidos para calcular la caída de presión de un fluido que fluye a través de un lecho poroso, esta ecuación es válida sólo para el flujo laminar. Lleva el nombre de Josef Kozeny y Philip C. Carman porque la ecuación fue primero propuesta por Kozeny (1927) y modificada posteriormente por Carman (1937). Si el flujo del fluido a través de los canales es laminar se podrá aplicar la siguiente ecuación:

$$v = \frac{(-\Delta P)}{\eta L} = \frac{\varepsilon^2}{K''(1-\varepsilon)^2 (a_{so})^2} \quad (1)$$

Donde: K'' : constante de Kozeny,

En lechos donde la porosidad y superficie específica no varían con el espesor del lecho, se ha encontrado experimentalmente que ésta constante posee un valor de 5 ± 0.5 (Ibarz *et al*, 2005). En realidad su valor depende del tipo de relleno y de la porosidad,

tomando distintos valores según sea la forma de las partículas y porosidad del lecho. En el caso de que las partículas sean de forma esférica el valor de ésta constante es de 4.8 ± 0.3 .

Carman, citado por Coulson y Richardson (1978), encontró que los datos obtenidos para flujo de fluidos a través de lechos rellenos con partículas sólidas graficados en coordenadas logarítmicas, f y Re podía correlacionar aproximadamente a una curva simple, ésta ecuación general se presenta a continuación:

$$f = 5Re^{-1} + 0.4Re^{-0.1} \text{ para } 2 < Re < 100. \quad (2)$$

En el presente trabajo se estudió el flujo de aire a través de una columna de partículas sólidas estacionarias (quinua), teniendo como objetivos: Determinar el efecto que genera un lecho formado por granos de quinua en la caída de presión cuando circula aire a diferentes velocidades, validar un modelo para la caída de presión y la velocidad del aire a través de un lecho de 2 variedades de granos de quinua y un modelo que relaciona el factor de fricción (f) con el número de Reynolds.

MATERIALES Y METODOS

Lugar: Se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos, en la Unidad de Agitación y Separaciones Mecánicas, Facultad de Industrias Alimentarias y en el Laboratorio de Control de Calidad del Programa de Alimentos Balanceados de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Material y Equipo:

Materiales: Granos de quinua de dos variedades (Rosada de Huancayo y UNALM-LM89) como material de relleno, soporte para la cama granular, aceite de soya, regla, papel milimetrado, placas de metal, desecador de vidrio con agente deshidratante, espátulas, bolsas de polipropileno, material de vidrio (probetas, placas petri, embudo, etc).

Equipos: Estufa, balanza analítica, balanza de precisión, selladora, anemometro, equipo de lecho poroso (Figura 1), mangueras y conductores de agua, manometro de agua, equipo rotab, juego de tamices Retsch Laboratory Test Sieve ASTM: 11 Haan Germany, compresor de aire, manómetro analógico, manómetro en U (tubo de vidrio).

Método y Procedimientos:

Metodología Experimental.- Se desarrollaron las siguientes etapas:

Caracterización de los granos de quinua: Para la humedad de la quinua, se empleó el método AOAC 945.15 (2005). Para el análisis granulométrico se pesa 100 g de muestra, se

dispone sobre el conjunto de tamices especificado debidamente colocados, se tapa el conjunto y se dispone en el equipo tamizador, donde se mantiene 10 minutos (o el tiempo especificado para el producto), se pesan las porciones retenidas en cada tamiz, expresando los resultados en tanto por ciento (Método 204.1 de la Norma MIL-STD-650, 1962). Para la porosidad se usó el método convencional del laboratorio con aceite.

Desarrollo experimental: Determinación de parámetros físicos en el lecho: Cada variedad de quinua con su nivel de humedad y porosidad fue colocada en el lecho a dos alturas distintas (Tabla 01). Obteniendo valores de caída de presión (en mm H₂O), velocidad del aire (m/s) y temperatura del aire (Grados Celsius) para distintas presiones manométricas (psi) de aire comprimido que ingresa al equipo de lechos porosos. Las medidas se realizaron primero en forma ascendente desde una presión mínima (5 psi) hasta una presión máxima (13 psi) y posteriormente en forma descendente desde la presión máxima hasta la presión mínima. Obteniendo un promedio en los resultados de caída de presión (en mm H₂O) en cada punto.

Procesamiento de Datos.- Correlación de los parámetros: primero la caída de presión con la velocidad del aire y segundo el factor de fricción con el número de Reynolds modificado para las variedades de quinua, utilizando el programa estadístico Statgraphics® (p<0,05). Obtención de un modelo matemático por regresión utilizando el programa estadístico Statgraphics® (p<0,05), que describe la relación entre la caída de presión con la velocidad del aire para las variedades de quinua estudiadas.

Diseño del Modelo Estadístico

Se empleó un arreglo factorial 2² en DCA y dos repeticiones, para determinar el efecto (p<0,05) de los factores: longitud del lecho y variedad de la quinua.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización de los granos de quinua:

Humedad: La humedad para la quinua de la variedad Rosada de Huancayo fue de 13.69% ± 0.77 y para la variedad UNALM LM 89 fue de 14.23% ± 0.59, ambos en base seca. INDECOPI (2009), indica que la humedad es de 13.5% también en base seca.

Granulometría: El tamaño de partícula para la variedad Rosada de Huancayo fue de 0.00151 m y para la variedad UNALM LM89 fue de 0.00158 m que comparados con INDECOPI (2009), corresponde a tamaño de grano mediano. Según Gómez (2011) clasifica los granos en pequeños cuando el diámetro es menor a 0.0018 m.

Porosidad del lecho con granos de quinua: La porosidad del lecho con granos de quinua variedad Rosada de Huancayo fue de 0.379 ± 0.006 y para la variedad UNALM LM 89 fue de 0.417 ± 0.012 , al respecto Verboven *et al* (2004) encontraron que la porosidad del lecho con manzanas colocadas al azar fue de 0.435.

Desarrollo experimental:

Los valores de la caída de presión/longitud de lecho debido a la velocidad de aire a través de lechos de granos de dos variedades de quinua (Rosada de Huancayo y UNALM LM89) y dos longitudes de lecho (0.050 y 0.150m) se presentan en la Figura 2 y presentan una relación potencial, donde la caída de presión/longitud de lecho depende de la velocidad de flujo de aire elevado a una potencia, presentando valores de coeficientes de regresión entre 0.9955 a 0.9972, según éste valor podemos decir que el lecho con variedad de quinua UNALM LM 89 y 0.15m de longitud de lecho se ajusta más al modelo de Shedd con la siguiente expresión:

$$\Delta P/L = 4044.4V^{1.6704} \quad (3)$$

Dónde:

$\Delta P/L$: Caída de presión/longitud de lecho (Pa/m).

V : Velocidad de flujo de aire (m/s).

La tasa de flujo de aire por unidad del área transversal del lecho varió desde 0.65 a $1.09 \text{ (m}^3 \text{ s}^{-1}\text{)m}^2$; Tabat *et al* (2004) trabajaron con velocidades de aire entre 0.025 a $0.22 \text{ (m}^3 \text{ s}^{-1}\text{)m}^2$. A medida que la velocidad de flujo de aire aumenta, la caída de presión/longitud de lecho aumentó para las dos variedades y 2 longitudes de lecho, de la siguiente forma: para las dos variedades de quinua y longitud de lecho de 0.15m aumentó desde 2200 a 4600Pa/m, así como para las dos variedades pero con longitud de lecho de 0.05m la caída de presión aumentó desde 2400 a 5000Pa/m. Al respecto Tabat, *et al*. (2004) indican que a medida que la velocidad de flujo de aire aumenta la caída de presión es mayor, variando desde 133.33 a 1713.3 Pa/m en 0.150 m en un lecho de semillas de algodón con vello y en un lecho de 0.15m con semillas de algodón sin vello la caída de presión vario desde 133.33 a 1460 Pa/m. Las diferencias que se muestran entre los autores citados y el presente trabajo se deben a que las velocidades de flujo de aire en el presente trabajo son mayores generando mayores pérdida de presión por metro de lecho.

En relación a la caída de presión/longitud de lecho, Tabat, et al. (2004) indican que aumentó de aproximadamente 280 a 1700 Pa/m para semillas con vello y a 1480 Pa/m para semillas de algodón sin vello para longitud de lecho de 0.050 m.

En la Figura 03 se muestra los valores del factor de fricción debido al número de Reynolds modificado que se obtienen para lechos de granos de las dos variedades de quinua y las dos longitudes de lecho estudiadas, el tratamiento Rosada de Huancayo con 0.15m de longitud de lecho es el que presenta menor factor de fricción para diferentes valores del número de Reynolds por lo que afectaría en el menor consumo de potencia (perdida de presión). En la Tabla 02 se muestran los modelos ajustados para los cuatro tratamientos.

El factor de fricción (f) disminuye con respecto al número de Reynolds modificado. El factor de fricción f varía de manera potencial con el número de Reynolds modificado encontrándose un modelo del tipo:

$$f = aRe^{-1} + bRe^{-0.1} \text{ para } 2 < Re < 100. \dots\dots\dots(4)$$

CONCLUSIONES

Es posible mostrar, mediante un modelo matemático, la circulación de aire a través de lechos formados por granos de quinua.

El lecho con variedad de quinua UNALM LM 89 y 0.15m de longitud de lecho se aproxima más al modelo de Shedd

A medida que la velocidad de flujo de aire aumenta, la caída de presión/longitud de lecho aumentó para las dos variedades y 2 longitudes de lecho.

El factor de fricción (f) disminuye con respecto al número de Reynolds modificado. Se ajustó los datos experimentales al modelo de Carman.

El estudio demuestra, mediante la expresión matemática hallada, que podemos realizar la mejor selección de ventiladores o sopladores de aire.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition, Parte III, Edited by Horwitz William and Latimer George, Maryland.

Coulson, J.M. y Richardson J.F. (1978). Chemical Engineering. Vol 2. 3ra Edición. Editorial Elsevier Science & Technology Books. Inglaterra.807 págs.

Escardino A., Ruiz F., Berbero P. (1970). Circulación de aire a través de lechos formados por granos de cereales. A.T.A. Vol 10, Num 4. Pag 528-539.

Gómez L. y Eguiluz A. 2011. Catalogo del banco de germoplasma de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*).Primera Edición. Programa de Cereales y Granos Nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima Perú.

Ibarz A. y Barbosa Canovas G. 2005. Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. Ediciones Mundi Prensa. Madrid España. 243 – 253.

INDECOPI, 2009. NTP 205.062. QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*). Requisitos. 2009-06-04. R.021 – CNB. 1ra Edición.

Norma MIL-STD-650, 1962. Método 204.1 www.matematicasypoesia.com.es/metodos/melweb07.htm visitado 25 Junio 2013.

Tabak S., Askanov B, Rashidop U., Tabak I., Manor G., Shmulevich I. 2004. Airflow during Granular Beds packed with Cottonseeds. Biosystem Engineering 88 (2), 163-173.

Verboven P, Hoang M.L., Baelmans M., Nicola B. M. 2004. Airflow through Beds of Apples and Chicory Roots. Biosystem Engineering 88 (1), 117-125.

Figura 01: Equipo Lecho Poroso



Tabla 01: Factores y Niveles del Experimento.

Factores	Niveles	
Variedad Quinoa	1	2
Longitud lecho (mm)	50	150

Variedad 1: Rosada de Huancayo y

Variedad 2: UNALM LM89

Figura 02: Caída de presión en función a la velocidad de aire para dos variedades de granos de quinua a dos longitudes de lecho

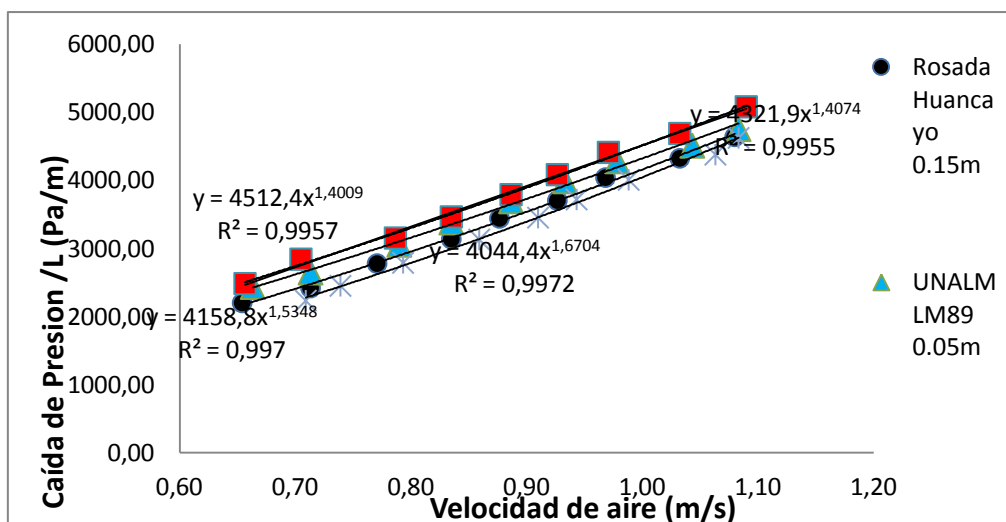
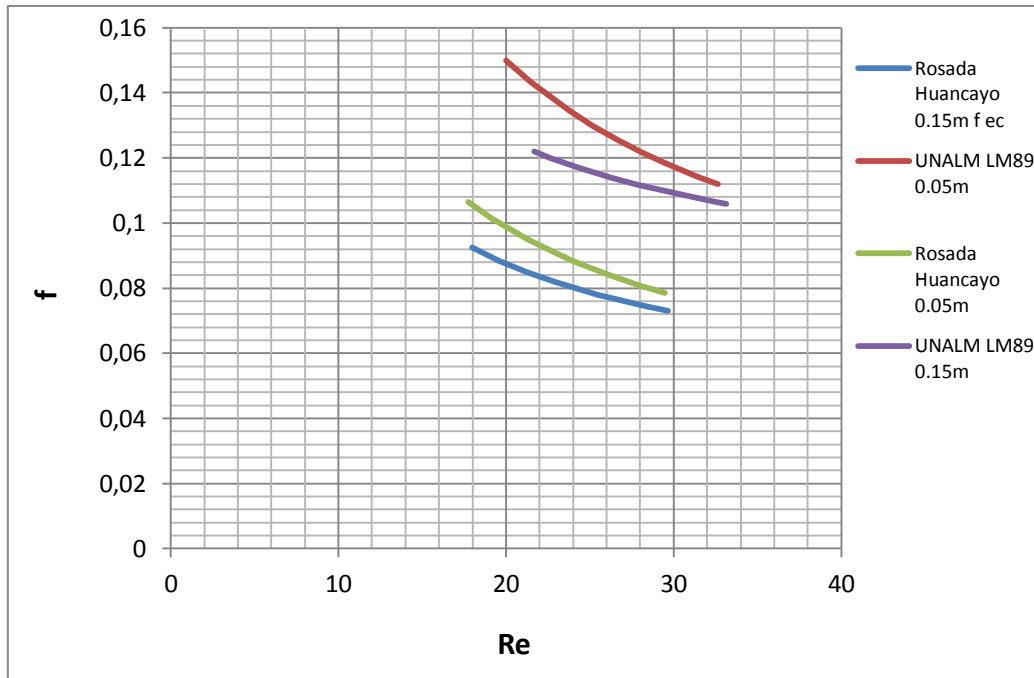


Tabla 02: Modelos ajustados para los cuatro tratamientos

TRATAMIENTO	MODELO AJUSTADO
Rosada de Huancayo con 0.15m longitud lecho	$f = 0.7768Re^{-1} + 0.0657Re^{-0.1}$
UNALM LM 89 0.05m longitud lecho	$f = 1.8213 Re^{-1} + 0.0795 Re^{-0.1}$
Rosada de Huancayo con 0.05m longitud lecho	$f = 1.1565 Re^{-1} + 0.0552 Re^{-0.1}$
UNALM LM 89 0.15m longitud lecho	$f = 0.7808 Re^{-1} + 0.1169 Re^{-0.1}$

Figura 03: Factor de fricción en función al número de Reynolds modificado para dos variedades de granos de quinua a dos longitudes de lecho



EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE SALMÓN AHUMADO OBTENIDO MEDIANTE EL USO DE BOLSAS PERMEABLES AL VAPOR DE AGUA

Mañes, V.; Rizo, A.; Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J.M.

Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (España)

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad conservante del ahumado en pescado se debe al efecto sinérgico de la incorporación de sal, la acción conservante del humo y la deshidratación. Para conseguir una adecuada calidad higiénico-sanitaria es imprescindible el control exhaustivo de las condiciones de procesado y manipulación. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método para la producción de salmón ahumado basado en el uso de bolsas permeables al vapor de agua (Mañes, 2013). Este consiste en un salado-ahumado simultáneo realizado dentro de estas bolsas, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, permitiendo un secado óptimo, al mismo tiempo que la sal penetra en el producto. El salado de las piezas se realiza de forma controlada, dosificando la cantidad de sal mínima necesaria para alcanzar la concentración óptima en este tipo de productos, combinado con el uso de humo líquido. Esta nueva metodología permitió obtener salmón ahumado de similares características a los productos comerciales, por lo que podría substituir a los procesos tradicionales, ofreciendo ventajas como una menor manipulación del pescado, menos residuos de salmuera y tiempo de procesado. No obstante, es necesario el estudio de parámetros de calidad durante el almacenamiento para estimar si el periodo de comercialización es similar al del salmón ahumado tradicional. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad físico-química de salmón ahumado obtenido mediante un nuevo método de salado-ahumado empleando bolsas permeables al vapor de agua, durante su almacenamiento refrigerado.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

La materia prima fue salmón noruego (*Salmo salar*) procedente de piscifactoría (Hallvard Leroy AS, Bergen, Norway). El pescado fue lavado, eviscerado y fileteado obteniendo dos filetes a partir de cada pescado. La sal (NaCl) utilizada en el proceso fue suministrada por Panreac Química, S.A (Barcelona, España). Se empleó humo líquido HARDWOOD AFS 10 (Amcan Ingrédients Ltd., Le Chesnay, Francia).

2.2. Diseño experimental

Los filetes de salmón fueron cortados en porciones de 4 cm, las cuales fueron sometidas a un proceso simultáneo de salado-ahumado en base a estudios previos (Mañes, 2013). Las porciones de pescado se pulverizaron con humo líquido diluido en agua (60% (v/v)) y se salaron de manera controlada, dosificando una cantidad exacta de sal previamente establecida. (8 g sal/100 g salmón fresco), con el fin de obtener valores de a_w , contenido en sal y humedad similares a los del salmón ahumado comercial (Fuentes et al., 2010a). Las porciones de salmón con la sal fueron envasadas a vacío en bolsas permeables al vapor de agua suministradas por TUB-EX ApS (Taars, Denmark). Cabe destacar que se empleó el envasado a vacío solo con el fin de asegurar un buen contacto entre el filete y la bolsa, ya que éste no se mantiene debido a la permeabilidad de la bolsa. El salado-ahumado fue llevado a cabo en una cámara con humedad y temperatura controladas (60% HR, 5 °C) durante 24 h. Finalizado el proceso, los filetes fueron envasados a vacío en bolsas de alta barrera y almacenados en refrigeración durante 40 días. Se caracterizaron la materia prima y las muestras de salmón ahumado recién obtenidas, a través de un análisis de contenido en humedad, grasa y NaCl, pH y a_w . Asimismo se realizaron análisis físico-químicos periódicos. Para cada una de las condiciones ensayadas se utilizaron tres muestras (n=3). Los análisis se realizaron por duplicado en cada muestra.

2.3. Determinaciones analíticas

El contenido de humedad y grasa se determinó siguiendo el procedimiento 950.46 y 991.36 respectivamente (AOAC, 1997). El contenido en cloruro sódico se analizó según el procedimiento descrito por Fuentes et al., (2010b). El pH se midió sobre las porciones de pescado empleando un pH-metro con electrodo de punción. El valor de a_w se determinó mediante un higrómetro de punto de rocío. El contenido en nitrógeno básico volátil total (N-TVB) y nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) fueron analizados según el método descrito por Malle y Tao (1987). El índice de TBA se determinó usando el método descrito por Tarladgis, et al., (1960). Los contenidos en inosina-5'-monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx) fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo el método descrito por Barat et al. (2008). Con las concentraciones de IMP, Ino y Hx se calculó el valor del parámetro K_1 , ecuación (1) donde IMP es inosín 5'-monofosfato; Ino, inosina; Hx, hipoxantina.

$$K_1(\%) = \frac{[Ino] + [Hx]}{[IMP] + [Ino] + [Hx]} \times 100 \quad (1)$$

El color de las muestras se determinó directamente sobre los filetes a partir de las coordenadas colorimétricas del sistema CIEL*a*b*.

2.4. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos fue desarrollado mediante Statgraphics Centurion (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se realizó un ANOVA simple para cada uno de los parámetros analizados para estudiar la existencia de diferencias significativas en el almacenamiento. El procedimiento LSD (least significant difference) se utilizó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de los parámetros físico-químicos de la materia prima y de las muestras recién ahumadas se muestran en la Tabla 1. El proceso de salado-ahumado causó una reducción significativa en el contenido de humedad, un aumento de la concentración de cloruro sódico, así como una disminución en los valores de a_w y pH, comparado con el salmón fresco. Los valores de de estos parámetros en el producto ahumado por el nuevo método fueron similares a los del salmón ahumado comercial (Fuentes et al., 2010a). El proceso de ahumado-salado no condujo a grandes cambios para el resto de parámetros en comparación con el salmón fresco.

La evolución del pH, N-BVT, N-TMA e índice de TBA en el salmón ahumado se muestra en la Figura 1. El pH de las muestras ahumadas fue menor que en el salmón fresco, debido posiblemente al incremento en la fuerza iónica de la solución intracelular que causa la sal al penetrar en los tejidos (Leroi y Joffraud, 2000). El N-BVT es un indicador de deterioro de pescado relacionado con la actividad de bacterias causantes de deterioro y enzimas endógenas (Fernández-Segovia et al., 2012). Los valores de este parámetro aumentaron gradualmente (Figura 1.b), permaneciendo muy por debajo de los límites de aceptabilidad propuestos por Dondero et al. (2004) para pescado ahumado (30-40 mg N/100 g). De igual manera sucedió para los valores de N-TMA, que estuvieron por debajo del límite de rechazo sensorial propuesto por Truelstrup et al. (1995) para el salmón ahumado (10 mg N/100 g pescado). El índice de TBA proporciona información acerca del grado de oxidación de las grasas del producto. No se detectó malonaldehído (MDA) en la materia prima, lo que indica que el salmón fresco no presentaba oxidación. En las muestras recién ahumadas lo valores de TBA fueron muy bajos, inferiores a los de otros estudios (Fuentes et al., 2011). Estos bajos valores podrían ser atribuidos a la baja temperatura (5°C) empleada durante el proceso, ya

que las altas temperaturas usadas en el ahumado tradicional, influyen sobre la formación de productos secundarios de oxidación (Espe et al., 2004). Los valores de TBA aumentaron progresivamente, alcanzando un valor final máximo de 0,71 mg MDA/Kg, por debajo de los valores de aceptabilidad sensorial establecidos por Connell (1995) de entre 1-2 mg MDA/Kg de pescado, por lo que la oxidación en el salmón durante el almacenamiento fue limitada. La evolución de IMP, Ino y Hx, así como del valor K_1 durante el almacenamiento se muestran en la Figura 2. Estos parámetros son bien correlacionados con la frescura de salmón (Fernández-Segovia et al., 2012). La concentración de IMP fue menor que la de inosina en el salmón fresco, lo que demuestra que la degradación del IMP sucedió en parte antes del ahumado. Se observó durante el almacenamiento un descenso en los valores de IMP y un ligero aumento en los valores de Ino y Hx. Los valores de Hx (Figura 2a) permanecieron en todo el estudio por debajo de los propuestos por Truelstrup et al. (1995) como límite de aceptabilidad sensorial en salmón ahumado (5-7 $\mu\text{mol/g}$). El valor K_1 fue alto tanto para la materia prima como para las muestras ahumadas, debido a los bajos valores de IMP.

Es importante destacar que no se observó exudado dentro de las bolsas después del proceso, debido a su evaporación durante el salado-ahumado, lo que indica la efectividad de las bolsas permeables al vapor de agua. Este resultado prueba las dos principales ventajas de este nuevo método: la reducción del tiempo de procesado, ya que el ahumado, salado y secado se llevan a cabo en una sola etapa y a bajas temperaturas (5°C), y la menor producción de residuos de salmuera.

En la Tabla 2 se muestra la evolución de los parámetros de color del salmón ahumado durante el almacenamiento. En general todos los parámetros aumentaron en los últimos días de almacenamiento, pero no fueron apreciados visualmente.

De acuerdo a los resultados, el salmón ahumado obtenido por el nuevo método mostró una adecuada calidad físico-química durante los 40 días de estudio.

4. CONCLUSIONES

El proceso de ahumado-salado causó una reducción significativa en el contenido de humedad, un aumento de la concentración de cloruro sódico así como una disminución en los valores de a_w y pH comparado con el salmón fresco. Estos valores fueron similares a los del salmón ahumado disponible en el mercado actualmente. El bajo nivel de oxidación en el salmón ahumado podría ser atribuido a las bajas temperaturas (5°C) empleadas durante todo el proceso de ahumado. El nuevo proceso estudiado no afectó a los parámetros de N-BVT-,

N-TMA, IMP, Ino, Hx o valor K_1 . Las bolsas permeables al vapor de agua permitieron la evaporación del líquido exudado durante el proceso. Este hecho demuestra que durante el salado-ahumado se produjo el secado del producto a baja temperatura, minimizando la manipulación así como los tiempos de procesado. A lo largo del almacenamiento se observaron cambios de las coordenadas de color, aunque estos cambios no se apreciaron visualmente. Considerando la evolución de N-BVT-, N-TMA, índice de TBA y compuestos de degradación del ATP, puede afirmarse que no hubo deterioro en el salmón ahumado durante los 40 días de almacenamiento. Teniendo en cuenta el periodo habitual de comercialización de este tipo de productos, el salmón ahumado obtenido en este estudio sería adecuado para su comercialización, desde el punto de vista de la calidad físico-química. En otros estudios llevados a cabo en paralelo a este trabajo se demostró que la calidad sensorial y microbiológica del producto obtenido era adecuada. Esta nueva metodología, por tanto, permite obtener salmón ahumado minimizando la manipulación así como reduciendo tiempos de procesado y residuos de salmuera, sin afectar a la calidad del producto.

5. REFERENCIAS

- AOAC, 1997. Official methods of analysis,(16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Barat, J.M., Gil, L., García-Breijo, E., Aristoy, M.C., Toldrá, F., Martínez-Máñez, R., Soto, J. (2008). Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry*, 108(2), 681–688.
- Connell, J.J. (1995). Control of fish quality (4th ed.). London: Fishing News Books Limited.
- Dondero, M., Cisternas, F., Carvajal, L., Simpson, R. (2004). Changes in quality of vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chemistry*, 87(4), 543–550.
- Espe, M., Kiessling, A., Lunestad, B.T., Torrissen, O.J., Rørå, A.M.B. (2004). Quality of cold smoked salmon collected in one French hypermarket during a period of 1 year. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 627–638.
- Fernández-Segovia, I., Fuentes, A., Aliño, M., Masot, R., Alcañiz, M., Barat, J.M. (2012). Detection of frozen-thawed salmon (*Salmo salar*) by a rapid low-cost method. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 210–216.
- Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Barat, J.M., Serra, J.A. (2010a). Physicochemical Characterization of Some Smoked and Marinated Fish Products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(1), 83–103.
- Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Serra, J. A., Barat, J.M. (2010b). Development of a smoked sea bass product with partial sodium replacement. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1426–1433.

Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Barat, J.M., Serra, J.A. (2011). Influence of sodium replacement and packaging on quality and shelf life of smoked sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 917–923.

ISO 4833 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30°C.

ISO 21528-2 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method

Leroi, F., Joffraud, J.J. (2000). Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5 °C storage predicted using factorial design. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1222-1227.

Malle, P., Tao, S.H. (1987). Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50(9), 756–760.

Mañes, V. (2013). Utilización de bolsas permeables al vapor de agua para la obtención de salmón ahumado. Tesis de Master. Universitat Politècnica de València.

Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T., Dugan, L.R.Jr., (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of American Oil Chemists Society*, 37, 44–48.

Truelstrup Hansen, L., Gill, T. A. & Huss, H.H. (1995). Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International* 28(2), 123–130

TABLAS

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del salmón fresco y ahumado. Valores medios \pm DS (n = 3). N-BVT: Nitrógeno básico volátil total; N-TMA: Nitrógeno de trimetilamina; TBA: Ácido tiobarbitúrico; MDA: Malonaldehido; IMP: inosin-5'-monofosfato; Ino: Inosina; Hx: Hipoxantina.

	Salmón fresco	Salmón ahumado
Humedad (g H ₂ O/100 g)	71.38 \pm 0.38	58.94 \pm 1.68
NaCl (g /100 g)	0.20 \pm 0.00	4.89 \pm 0.54
pH	6.42 \pm 0.01	6.19 \pm 0.03
a _w	0.985 \pm 0.004	0.936 \pm 0.009
N-BVT(mg N/100 g)	13.54 \pm 0.23	14.26 \pm 0.27
N-TMA (mg N/100 g)	2.66 \pm 0.71	3.75 \pm 0.58
TBA (mg MDA/Kg)	nd	0.14 \pm 0.02
IMP (μ mol/g)	1.40 \pm 0.21	1.57 \pm 0.88
Ino (μ mol/g)	4.62 \pm 0.47	4.43 \pm 0.41
Hx (μ mol/g)	2.81 \pm 0.19	2.46 \pm 0.31
Valor K ₁ (%)	85.11 \pm 0.48	81.63 \pm 3.3

nd: no detectado

Tabla 2. Evolución de los parámetros de color. L*, a* y b* en las muestras de salmón ahumado almacenadas durante 40 días a 4°C. (Valores medios y DS, n=3). Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas.

t (días)	L*	a*	b*
0	33.76 \pm 1.66 ^a	10.05 \pm 1.21 ^a	10.44 \pm 1.83 ^a
4	35.54 \pm 2.76 ^{ab}	11.00 \pm 0.92 ^{ab}	10.86 \pm 2.40 ^{ab}
7	38.33 \pm 1.13 ^{bc}	11.20 \pm 1.19 ^{ab}	12.17 \pm 1.90 ^{ab}
11	36.70 \pm 2.56 ^{ab}	11.16 \pm 1.72 ^{ab}	13.15 \pm 1.64 ^{bcd}
14	38.35 \pm 2.41 ^{bc}	11.34 \pm 0.95 ^{abc}	12.48 \pm 1.60 ^{ab}
18	37.77 \pm 2.16 ^{bc}	11.60 \pm 1.45 ^{bcd}	12.98 \pm 1.95 ^{bcd}
22	37.61 \pm 1.49 ^{bc}	12.58 \pm 1.76 ^{cd}	12.62 \pm 2.13 ^{abc}
27	37.93 \pm 1.15 ^{bc}	14.34 \pm 0.88 ^e	15.23 \pm 2.36 ^{cd}
32	38.06 \pm 1.97 ^{bc}	12.89 \pm 1.37 ^{cd}	13.11 \pm 1.75 ^{bcd}
40	40.63 \pm 1.57 ^c	12.30 \pm 1.39 ^{bcd}	15.03 \pm 1.58 ^d
α	*	***	*

ns: no significativo; * p<0.05; ***p<0.001

FIGURAS

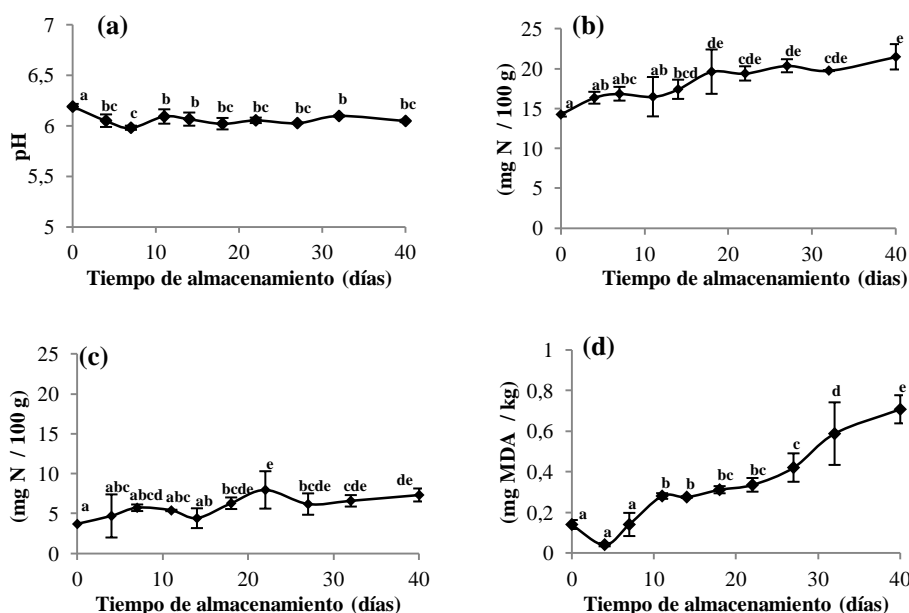


Figura 1. Evolución de los valores de pH (a), N-BVT (b), N-TMA (c) y TBA (d) en muestras de salmón ahumado durante 40 días de almacenamiento a 4 °C. (Valores medios y DS (n=3). Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas. MDA: Malonaldehido.

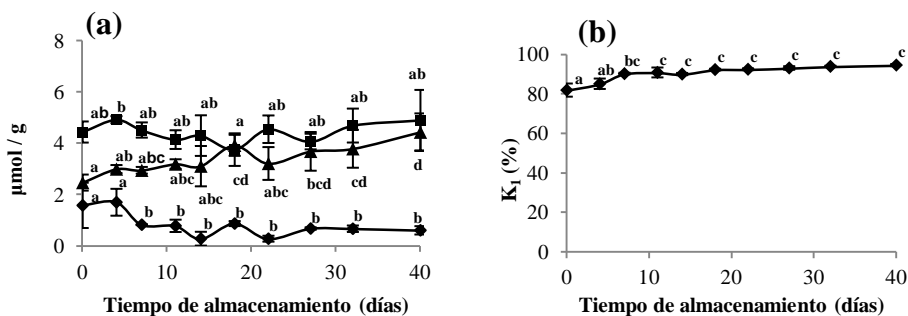


Figura 2. Evolución de inosín-5'-monophosphate (IMP) (◆), inosina (Ino) (■) and hipoxantine (Hx) (▲) (a), y valor K₁ (b) en muestras de salmón ahumado durante 40 días de almacenamiento a 4°C. (Valores medios y DS n=3). Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas.

EFFECTO DE LAS VARIABLES DE SECADO EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE MICROCÁPSULAS DE LICOPENO

M.C. Soto-Caballero^a, Y. Mendoza-Martínez^a, P. Cortés-Sánchez^b, A. Valdez-Fragoso^a, J. Welti-Chanes^a & H. Mújica-Paz^{a*}

^aEscuela de Biotecnología y Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Eugenio Garza Sada 2501. Monterrey, Nuevo León 64849, México.

^bFacultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Madrid, 28049, España.

*h.mujica@itesm.mx

INTRODUCCIÓN

El licopeno es un compuesto carotenoide con propiedades antioxidantes que da el color rojo a vegetales como el tomate. Es un compuesto sensible a la luz, el oxígeno y a la temperatura (Lee & Chen, 2002). La microencapsulación mediante secado por aspersión es uno de los métodos más utilizados para proteger compuestos bioactivos sensibles (Ibrahim-Silva et al., 2013). Este método consiste en atomizar el agente activo en la solución encapsulante y por medio de una corriente de aire caliente evaporar el agua de las gotitas asperjadas. De este modo se forma una película alrededor del compuesto activo y se obtienen las microcápsulas en polvo (Desai, 2005). Las propiedades de las microcápsulas dependen tanto de las condiciones de operación en el proceso de secado (Boza et al., 2004) como de los materiales encapsulantes empleados. Para el licopeno se ha reportado el uso de goma arábica, almidones, maltodextrinas, sacarosa (Matioli and Rodriguez-Amaya, 2002; Nunes & Mercadante, 2007; Rocha et al., 2011; Shu et al., 2006) como agentes encapsulantes individuales o en mezclas y se han evaluado las propiedades de las microcápsulas. Se siguen estudiando nuevos materiales pared para proteger el licopeno y en este trabajo se utilizaron dos mezclas de pectina, goma xantana con y sin sacarosa como agentes encapsulantes y se evaluó el efecto de la temperatura de secado y del flujo de alimentación sobre las propiedades físicas de las microcápsulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mezclas encapsulantes y compuesto activo

Para la encapsulación del licopeno se utilizaron dos mezclas encapsulantes. La mezcla 1 (M1) se preparó con 96.9% de agua, 3% de pectina y 0.1% de goma xantana y la mezcla 2 (M2) con 93.9% de agua, 3% de pectina, 0.1% de goma xantana y 3% de sacarosa. Se utilizó

un extracto de licopeno extraído de tomate (0.05%) (Farbe, México). La pectina (69% de esterificación) (DQM, México), la goma xantana (G1253 SIGMA, EUA) y la sacarosa (DQM, México) fueron grado alimentario.

Proceso de secado y diseño experimental

Se usó un secador por aspersión escala piloto (FT80, Armfield, EUA) para hacer las pruebas de secado en las que se varió la temperatura del aire entre 180 y 210°C y el flujo de alimentación entre 18 y 71 ml/min (Tabla 1). Las corridas experimentales se realizaron de acuerdo a un diseño experimental D-optimal (Desing Expert, 7.1.5) y las variables de respuesta fueron el contenido de humedad, la a_w , el color, la densidad y la solubilidad de microcápsulas de licopeno.

Propiedades físicas

El contenido de humedad se determinó usando un método estándar (AOAC, 1999). La a_w y el parámetro de color a^* se determinaron con un higrómetro (Aqualab, Decagon, EUA) y un colorímetro (CR-300 series, Minolta, EUA), respectivamente. La densidad y solubilidad se determinaron con el método propuesto por Fazaeli et al. (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades físicas

En la Fig. 1 se puede observar que los niveles más bajos de humedad se alcanzaron a una temperatura de secado de 210°C y un flujo de alimentación de 18 ml/min (Fig. 1) tanto con la M1 (2.8%) como con la M2 (4.4%). Al disminuir el flujo de alimentación y aumentar la temperatura el contenido de humedad disminuye. También se observa que con la M2 que contiene sacarosa, se obtienen microcápsulas con mayor contenido de humedad. Esto probablemente por un efecto higroscópico de la sacarosa. El efecto de la temperatura sobre la disminución de la humedad del polvo se puede deber a que el aumento de la temperatura promueve mayores velocidades de evaporación (Fazaeli et al., 2012).

En la Fig. 2 se muestra un claro efecto de las variables de proceso en la a_w de las microcápsulas. Con la M2 se obtuvieron los valores más bajos de actividad de agua ($a_w=0.110$) posiblemente debido al efecto depresor de la sacarosa. En general, los valores de a_w de las microcápsulas obtenidas con M1 y M2 indican la poca disponibilidad del agua libre para reacciones bioquímicas (Quek et al., 2007).

La densidad de las microcápsulas obtenidas a 180, 195 y 210°C y un flujo de 18 ml/min fue de 0.612, 0.598 y 0.502 g/ml, respectivamente. El efecto de la temperatura en la disminución de la densidad puede ser debido a que a temperaturas muy altas, la velocidad de evaporación es muy rápida y provoca que la estructura de los polvos sea porosa disminuyendo así su densidad (Fazaeli et al., 2012). La solubilidad del polvo aumentó al incrementarse la temperatura. La solubilidad de las microcápsulas de licopeno con la M1 fue de 80, 85 y 91% al obtenerlas con una temperatura del aire de 180, 195 y 210°C, respectivamente.

En las gráficas de contorno de la Fig. 3 se muestra que los valores de a^* fueron mayores al secar con flujos de alimentación bajos (18-30 ml/min) tanto con M1 como con M2. Los valores positivos de las gráficas indican la tendencia de a^* al color rojo. El valor más alto de a^* que fue de 5.6 se obtuvo con M1 a flujos bajos y altas temperaturas (Fig. 3).

CONCLUSIONES

La humedad más baja de las microcapsulas se obtuvo con una temperatura de secado de 210°C y un flujo de alimentación de 18 ml/min.

Se obtuvieron polvos estables ya que el rango de a_w de las microcápsulas fue de 0.110 a 0.510.

La densidad de las microcápsulas disminuyó al aumentar la temperatura mientras que la solubilidad aumentó.

El parámetro de color a^* de las microcápsulas de licopeno fue mayor al utilizar la mezcla 1, el flujo de 18 ml/min y la máxima temperatura (210°C).

Estos resultados ayudarán a definir la aplicación de las microcápsulas de licopeno.

BIBLIOGRAFÍA

Lee, M.T. & Chen, B.H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry* 78:425-432.

Desai, K.G. & Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology* 23:1361-1394.

Ibrahim Silva, P., Stringheta, P.C., Teófilo R.F. & Nolasco de Oliveira, I.R. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering* 117:538-544.

Boza, Y., Barbin, D. & Scamparini, A.R.P. (2004). Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. *Process Biochemistry* 39:1275-1284.

- Matioli, G. & Rodriguez-Amaya, D.B. (2003). Microencapsulación do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23:102-105.
- Nunes, I.L. & Mercadante, A.Z. (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50(5):893-900
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering* 76:664-669.
- Rocha, G.A., Fávaro-Trindade, C.S. & Grosso, C.R.F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing* 90(1):37-42
- Kabas, O., Ozmerzi, A. & Akinci, I. (2006). Physical properties of cactus pear (*Opuntia ficus india L.*) grown wild in Turkey. *Journal of Food Engineering* 73:198-202.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Washington, D.C. Association of Official Analytical Chemists.
- Fazaeli, M., Emam, Z., Ashtari, A.K. & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioprod Process* 90:667-675.
- Quek, S.Y., Chok, N.K. & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. *Chemical Engineering and Processing* 46(5): 386-392.

Tabla 1. Condiciones de secado para microencapsular licopeno

Corrida experimental	Temperatura del aire (°C)	Flujo de alimentación (ml/min)	Mezcla encapsulante
1	195	18	1
2	195	44	1
3	210	18	2
4	195	44	2
5	180	71	1
6	210	18	2
7	180	71	1
8	180	18	1
9	210	18	1
10	195	44	1
11	180	18	2
12	202.5	44	2
13	195	18	2
14	210	71	1
15	180	71	1
16	210	71	2
17	210	71	2
18	180	44	2

M1: 96.9% de agua, 3% de pectina y 0.1% de goma xantana

M2: 93.9% de agua, 3% de pectina, 0.1% de goma xantana y 3% de sacarosa

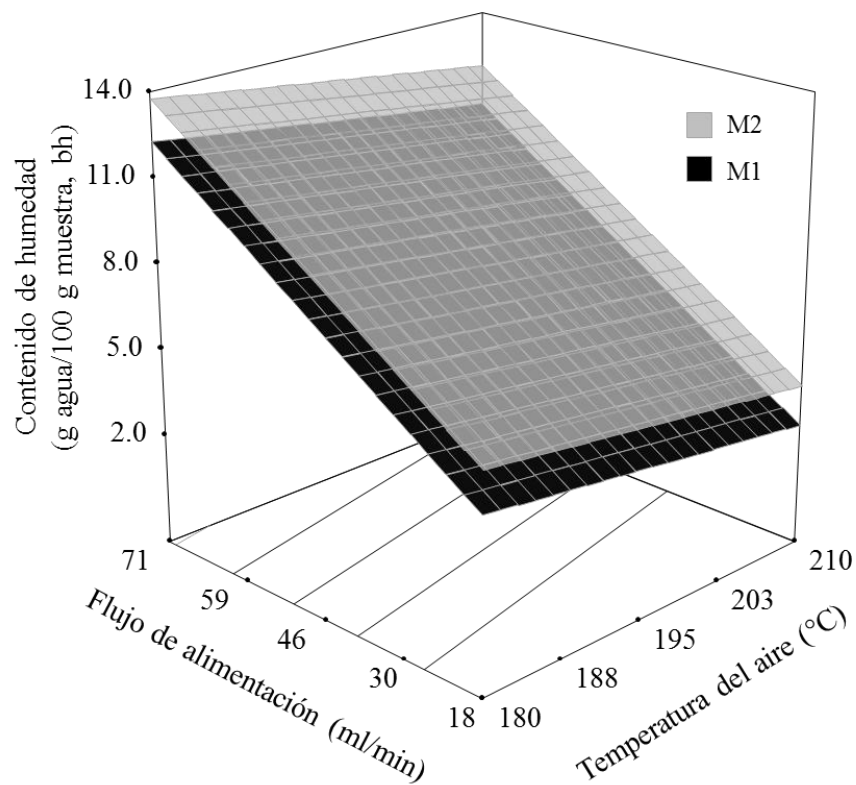


Fig. 1. Efecto de la temperatura del aire y el flujo de alimentación en el contenido de humedad de las microcápsulas de licopeno. Mezclas encapsulantes: M1 (96.9% de agua, 3% de pectina y 0.1% de goma xantana) y M2 (93.9% de agua, 3% de pectina, 0.1% de goma xantana y 3% de sacarosa).

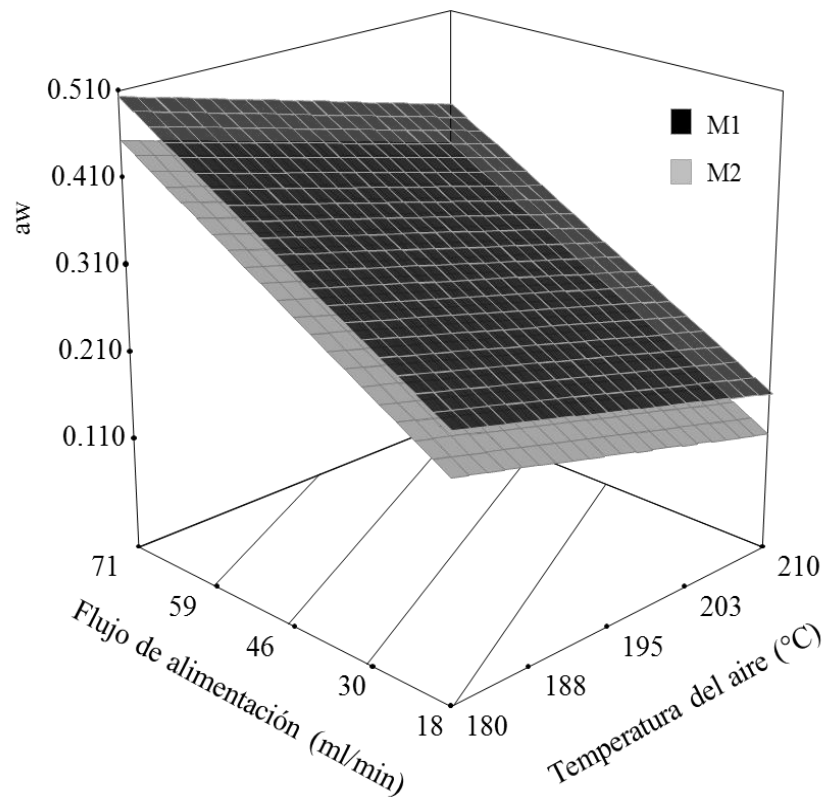


Fig. 2. Efecto de la temperatura del aire y el flujo de alimentación en la actividad de agua de las microcápsulas de licopeno. Mezclas encapsulantes: M1 (96.9% de agua, 3% de pectina y 0.1% de goma xantana) y M2 (93.9% de agua, 3% de pectina, 0.1% de goma xantana y 3% de sacarosa).

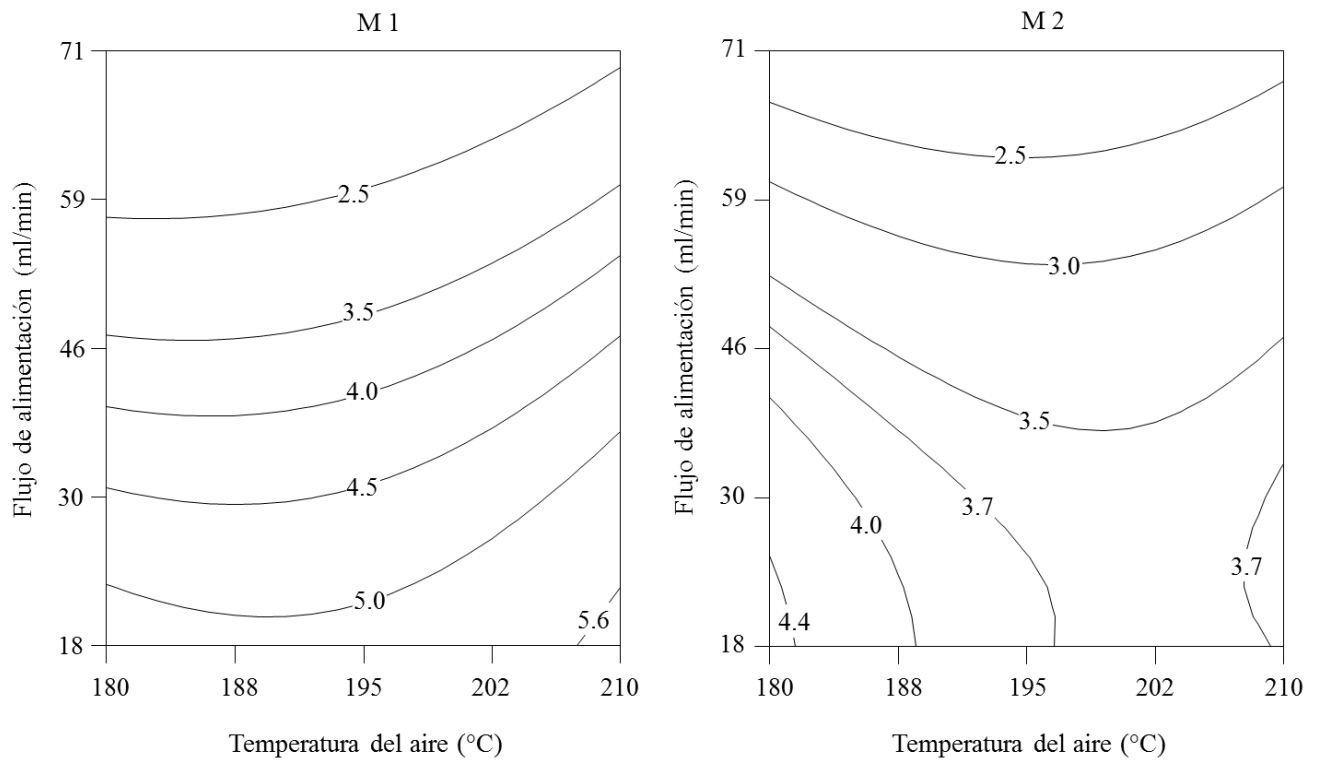


Fig. 3. Efecto de la temperatura del aire y el flujo de alimentación en el parámetro de color a^* de las microcápsulas de licopeno. Mezclas encapsulantes: M1 (96.9% de agua, 3% de pectina y 0.1% de goma xantana) y M2 (93.9% de agua, 3% de pectina, 0.1% de goma xantana y 3% de sacarosa).

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MONTMOTILLONITA SOBRE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS, DE BARRERA Y MECÁNICAS DE PELÍCULAS DE ALMIDÓN Y HARINA DE PLÁTANO (*Musa Paradisiaca L.*)

Martínez-Alarcón, B.A., Núñez-Santiago, M.C.*, González-Soto, R., Bello-Pérez, L.A.

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Km. 6.5 Carr. Yautepec-Jojutla, Calle Ceprobi No. 8., Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. Tel: +52 735 39 42020, Fax: +52 735 39 41896. *mnunez@ipn.mx

INTRODUCCIÓN

El empleo excesivo de polímeros derivados del petróleo usados para elaborar plásticos, genera gran cantidad de residuos sólidos que tardan aproximadamente 500 años en desaparecer del ambiente, por lo que es necesario buscar nuevos materiales que presenten propiedades mecánicas y de barrera similares a la de los plásticos sintéticos. Las macromoléculas empleadas en la elaboración de películas biodegradables son: lípidos, proteínas y polisacáridos. Dentro de éstos últimos, el almidón es el polisacárido más empleado en la elaboración de películas debido a que es renovable, económico, abundante y relativamente fácil de manipular (Lourdin *et al.*, 1995). De ahí que la tendencia actual sea utilizar mezclas de diferentes macromoléculas, ya que se promueve que las ventajas de cada uno mejoren las características de la película final. Un ejemplo de estas mezclas son las harinas, donde los diferentes componentes se encuentran de forma conjunta en el sistema (Tapia-Blácido *et al.*, 2007). Las harinas se obtienen principalmente de cereales, que al ser mezcladas con aditivos pueden mejorar aún más las propiedades funcionales y estructurales de las películas. Hoy en día, se requiere buscar fuentes botánicas de las cuáles se pueda aislar el almidón o bien utilizar a las harinas como un sistema donde se encuentre presente e interactúe con otros componentes de la mezcla.

El empleo de almidones y harinas, como materia prima en la elaboración de películas y recubrimientos, que se biodegraden en periodos de tiempo corto, es una alternativa; sin embargo, el carácter hidrofílico de estas películas les confiere un aspecto quebradizo causado por las altas fuerzas intermoleculares (Krochta y Mulder-Johnston, 1997) y presentan una alta permeabilidad al vapor de agua y a los gases, así como baja resistencia mecánica en relación a materiales plásticos de polímeros sintéticos. Es por esta razón, que se utilizan aditivos como los plastificantes, que sirven para aumentar la flexibilidad de las películas (Yang y Paulson, 2000) y nanoarcillas para conferirle un reforzamiento mecánico. El estudio de las soluciones formadoras de películas es importante debido a que son el paso previo antes de la formación

de recubrimientos y/o películas, ya que su caracterización está orientada a predecir y optimizar las condiciones del proceso y el comportamiento de los materiales en base a sus propiedades funcionales. Así, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la incorporación de montmorillonita de sodio (MMS) en películas obtenidas por casting de almidón (PA) y harina de plátano verde (PH) (*Musa paradisiaca L.*) sobre la viscosidad, permeabilidad al vapor de agua (PVA) y % solubilidad de las películas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales. Se adquirió plátano macho en estado verde en la central de abastos de Cuautla Morelos, México. Tras lavar los frutos se cortaron en rodajas para facilitar su secado y se introdujeron a una solución de ácido cítrico durante 5 minutos pasado este tiempo se les quitó el sobrenadante. Las rodajas se colocaron en charolas para posteriormente introducirlas en el horno a una temperatura de 50°C por 72 horas, posteriormente se pasó por un molino cafetero hasta obtener un polvo fino que se pasó por un tamiz de malla 100 U.S. La obtención del almidón de plátano se realizó a partir de la metodología propuesta por Flores-Gorosquera *et al.*, 2004. La montmorillonita de sodio (MMS) fue un producto de Sigma-Aldrich Corp (St Louis MO).

Elaboración de la solución formadora de películas (SFP). Se pesaron 2 gramos de almidón / harina de plátano y se dispersaron en 60 ml de agua destilada. Paralelamente, se dispersó la MMS en 40 ml de agua destilada y se sometió a agitación constante durante 30 min en una parrilla, posteriormente se sonicó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las dispersiones se mezclaron y se incorporó glicerol (0.8 g). La dispersión obtenida se calentó a una temperatura constante por 10 min a 70°C con agitación vigorosa y la temperatura se incrementó a 85°C durante 15 minutos para ser enfriada a temperatura ambiente. Finalmente se vertieron en cajas petri y se secaron en un horno a 35°C por 24 horas. La concentración final de MMS varió de 0 a 15 % en base al peso seco del almidón.

Medición de la viscosidad. Una vez obtenidas las soluciones a 85 °C con diferentes concentraciones de MMS, se midió la viscosidad a 60 °C en un Reómetro de esfuerzo controlado AR100ex (TA Instruments, USA) a través de un ciclo de barrido de deformación de 0 a 300 s⁻¹ empleando una geometría de cono y plato (60 mm diámetro, 4°, GAP 100 µm). Sólo se reporta el ciclo descendente

Permeabilidad al vapor de agua (pva). Método oficial de la ASTM (1989).

Solubilidad. El porcentaje de solubilidad de las películas fue determinado de acuerdo a la metodología propuesta por García *et al.*, (2004), la cual consistió en cortar piezas de cada película con las dimensiones de 2 cm x 3 cm y almacenarlas en un desecador a una humedad relativa del 0 % (provista por sílica gel) durante 7 días. Después de este tiempo, las muestras fueron pesadas y cada una se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL y se les agregaron 80 mL de agua desionizada. Las muestras se mantuvieron en agitación constante por 1 hora a temperatura ambiente (25 °C). Transcurrido el tiempo de agitación, las piezas de películas se secaron en una estufa a 60 °C durante 2 horas. El porcentaje de materia soluble (% solubilidad) fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ solubilidad} = [(\text{Peso inicial seco} - \text{Peso final seco})/\text{Peso inicial seco}] \times 100.$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el comportamiento reológico de las SFP. En el caso de soluciones elaboradas a partir de almidón de plátano (fig. 1a), la viscosidad fue independiente de la velocidad de deformación. La presencia de la MMS produjo una disminución en la viscosidad, por lo que la SFP de almidón fue la de mayor viscosidad, sin embargo la de 10 y 15 % MMS no presentaron diferencias significativas. En este caso, la concentración de almidón fue relativamente baja lo que permitió que el comportamiento reológico esté determinado principalmente por la fase continua (fase acuosa), de tal manera que la presencia de la MMS redujo la interacción entre los gránulos de almidón hinchados, presentando probablemente una saturación de los sitios activos de los mismos a concentraciones mayores del 10 %.

Por otra parte, todas las SFP de harina de plátano presentaron un comportamiento reofluidificado por cizalla tipo ley de la potencia. La viscosidad incrementó con la concentración de MMS. En las harinas, no solo existen gránulos de almidón hinchados, también hay otros componentes como proteínas, lípidos y fibra cruda (celulosa, hemicelulosa y pectina) insolubles con los que pueden interactuar la MMS tanto en la fase continua como en la fase dispersa, lo cual puede producir una mayor cantidad de puentes de hidrógeno e incrementar el espacio entre las macromoléculas, lo que se ve reflejado en un incremento de la viscosidad.

El Cuadro 1 resume los valores de PVA y % Solubilidad de las películas de almidón (PA) y películas de harina (PH) mostrando el efecto de la concentración de MMS. De

acuerdo con el cuadro, la presencia de la MMS disminuyó la PVA. La presencia de la MMS a bajas concentraciones permite obtener estructuras exfoliadas de la nanoarcilla, lo cual hace que las moléculas de vapor de agua tengan una ruta tortuosa a través de la matriz polimérica (Rodríguez-Marín *et al.*, 2012). La solubilidad no presentó diferencias estadísticas significativas en las películas de almidón pero sí en las películas de harina sin que exista una tendencia lineal entre la concentración de MMS y la solubilidad.

CONCLUSIONES

Como complemento al presente trabajo, se cita que Rodríguez-Marín *et al.*, (2012) mostraron que la presencia de MMS produce un incremento en la Tensión a la Fractura de las películas mejorando en general las propiedades mecánicas de las mismas, como consecuencia de la contribución que realiza la nanoarcilla en la compatibilidad entre los ingredientes de la matriz polimérica, sin embargo, al analizar la reología de las soluciones filmogénicas a partir de almidones de plátano, se observa que cuando se tiene una baja concentración de almidón, la interacción de la MMS con los gránulos pueden interrumpir la interacción entre los mismos. En forma general, la presencia de la MMS mejoró las propiedades de las películas tanto de almidón como de harina de plátano, sin disminuir su solubilidad.

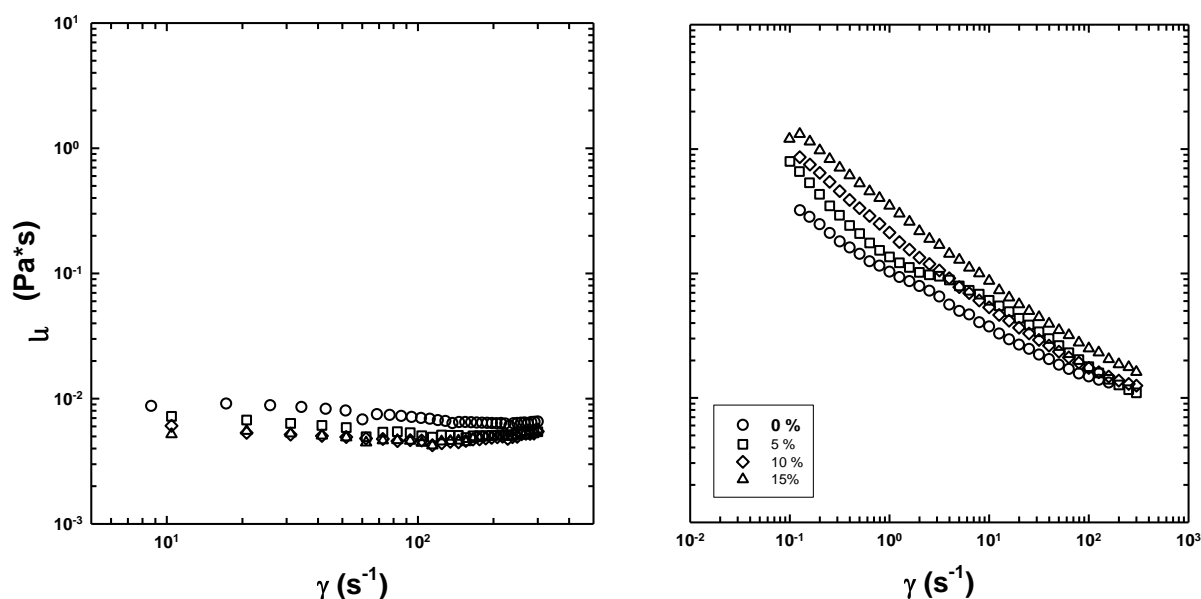


Figura 1. Comportamiento reológico de soluciones formadoras de películas de (a) almidón de plátano (b) harina de plátano a 60 °C.

Cuadro 1. Efecto de la MMS sobre las propiedades de las películas elaboradas a partir de almidón y harina de plátano.

	% MMS	PVA (g/m.s.Pa)	Solubilidad (%)
PA	0	1.36×10^{-10}	42.73 ± 1.8^a
	5	9.05×10^{-11}	42.71 ± 2.5^a
	10	6.01×10^{-11}	40.94 ± 0.9^a
	15	4.93×10^{-11}	42.92 ± 3.6^a
PH	0	2.41×10^{-10}	41.68 ± 2.13^b
	5	7.44×10^{-11}	44.31 ± 1.48^c
	10	5.517×10^{-11}	43.91 ± 2.49^{bc}
	15	2.92×10^{-11}	41.5 ± 1.12^b

BIBLIOGRAFÍA

ASTM E-96-80. 1989. Standard Methods of Test for water vapor transmission of materials in sheet form.

Flores-Gorosquera, E., García-Suárez, F. J., Flores-Huicochea, E., Núñez-Santiago, M. C., González-Soto, R. A y Bello-Pérez, L. A. 2004. Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*. 55: 86-90.

García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N. and Zaritzky N. E. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*. 56:339-345.

Krochta J.M. & De Mulder-Johnston C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*. 51: 61-74

Lourdin, D., Della Valle, G. and Colonna, P. 1995. Influence of amylase content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*. 27: 261-270.

Rodríguez-Marín, M.L., Bello-Pérez, L.A., Yee-Madeira, H., González-Soto, R.A. 2012. Propiedades mecánicas y de barrera de películas elaboradas con harina de arroz y plátano reforzadas con nanopartículas: estudio con superficie de respuesta. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(1), 165-176.

Tapia-Blácido D., Mauri A.N., Menegalli F.C., Sobral P.J.A. & Añón M.C. 2007. Contribution of the Starch, Protein, and Lipid Fractions to the Physical, Thermal, and Structural Properties of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) Flour Films. *Journal of Food Science*. 72: 293-300.

Yang L. & Paulson A.T. 2000. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*. 33: 563-570.

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SOLVENTES EN ETAPAS TEMPRANAS PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES EN CUTÍCULA DE CACAHUATE

Medina–González, S.; Almeida–Trasviña, F.; Ortega–Rivas, E.; Salmerón–Ochoa, I.; Pérez–Vega, S.*

School of Chemical Science, Autonomous University of Chihuahua, Circuit 1,
New University Campus, CP 31125 Chihuahua, Mexico.
sama_1218@hotmail.com

1. RESUMEN

Se investigó el impacto de la selección del solvente en etapas tempranas de un proceso de extracción cuando se lleva de nivel laboratorio a industrial. Se seleccionaron 5 solventes puros (etilen glicol, metanol, etanol, alcohol isopropílico y agua) cuyas propiedades se asemejan a una mezcla de solventes encontrada en la literatura para un proceso similar a nivel laboratorio. Se evaluó la eficiencia en la extracción de antioxidantes provenientes de cutícula de cacahuete. Se definió un diseño factorial (2^3) para asegurar la validez estadística de los resultados así como evaluar las condiciones de extracción (temperatura y tiempo) de cada solvente. Se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para encontrar puntos óptimos del proceso. Se analizaron las variables de respuesta: contenido fenólico (PFT) y capacidad antioxidante (ORAC). Los resultados óptimos de PFT y ORAC concuerdan con lo encontrado en la literatura para algunos solventes. En este estudio el etilen glicol fue el solvente que mejor rendimiento de extracción alcanzó (PFT = 275.4 mg GAE/g y ORAC = 2935 μ M Trolox/g).

Por otro lado se evaluó el proceso por medio de simulación en Aspen Batch Developer, donde se escaló el proceso y se determinó el consumo energético, la eficiencia en el empleo de la materia prima, el tiempo y costo por kilogramo del proceso como parámetros de sustentabilidad del mismo. Los resultados del simulador arrojaron que a pesar de ser el etilen glicol el mejor solvente a nivel laboratorio, en un nivel piloto o industrial el solvente que mayor eficiencia presenta es el metanol con un costo de 80 USD/kg de producto y un tiempo de operación casi 2 veces menor a los demás.

2. INTRODUCCIÓN

Recientemente el aprovechamiento de desperdicios agroindustriales como fuentes de antioxidantes ha ganado terreno en el campo de la investigación. Entre estos desperdicios se encuentra la cutícula del cacahuete, de la que ya se han reportado extracciones fenólicas (Nepote et al., 2005, Ballard et al., 2009). Tanto el contenido de polifenoles (PFT) como la capacidad antioxidante (ORAC) de estos son comúnmente empleados como parámetros para evaluar los efectos de las variables en el proceso de extracción. Se ha investigado el efecto del tamaño de partícula y etapas de extracción (Nepote et al., 2005), concentración de solvente alcohólico en agua junto con temperatura y tiempo (Ballard et al., 2009), método de pelado del cacahuete (Yu et al., 2005), e incluso la variación del contenido fenólico en las diferentes partes del cacahuete (Win et al., 2011).

Sin embargo, las optimizaciones de extracción realizadas en los trabajos antes mencionados sólo son a nivel laboratorio. Es decir, no existe investigación acerca de la implementación de este proceso a nivel industrial. Las etapas tempranas de desarrollo son críticas para el escalamiento de un proceso. La adecuada selección de solventes es de suma importancia pues se relaciona directamente con el proceso de extracción (Perry, 2002). Desafortunadamente, la selección del solvente no es considerada a plenitud durante las etapas tempranas de desarrollo y su desempeño debe ser evaluado desde una perspectiva del sistema con la finalidad de elegir la mejor opción (Perez-Vega et al., 2012). Esto se ve reflejado no sólo en términos de rendimiento sino también en separación, recuperabilidad y cuestiones de HSE (Shetgiri et al., 2002, Jimenez-Gonzales et al., 2011). Además, usar solventes puros a nivel industrial facilita el manejo de estos (Anderson, 2000). Es por esto que se requiere ampliar el análisis de extracción de polifenoles de una escala a nivel laboratorio hasta una perspectiva industrial.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de diferentes solventes puros en la extracción de polifenoles de la cutícula del cacahuete y el análisis del escalamiento del proceso.

3. METODOLOGÍA

3.1 Selección de solventes

Se seleccionaron 5 solventes con ayuda de un software basado en parámetros de solubilidad (Perez-Vega et al., 2011). Los parámetros ideales se tomaron de la literatura (Ballard et al., 2009) y se cargaron al software para obtener un listado de solventes puros con

propiedades similares. Se tomaron los primeros 3 solventes de la lista que tuvieron características semejantes, además de 2 que son considerados de fácil manejo en la industria: agua, etilen glicol (EG), metanol (MeOH), etanol (EtOH) e isopropanol (IPA).

3.2 Diseño experimental

Se eligió un diseño factorial completo 3^2 para evaluar los factores de temperatura y tiempo de extracción cada uno con tres niveles (30, 45, 60 °C y 15, 30, 45 min). Las corridas se hicieron por duplicado. El efecto de los parámetros se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) con un modelo cuadrático para la optimización de las condiciones de extracción.

3.3 Extracción de polifenoles

Las extracciones se realizaron con 10 ml de solvente puro y 0.5 g de muestra. La cutícula de cacahuete fue molida hasta quedar homogénea. Las condiciones de temperatura y tiempo de extracción fueron de acuerdo al diseño experimental previamente establecido, mientras que se mantuvo constante una agitación de 150 rpm de acuerdo con procedimientos reportados (Nepote *et al.*, 2005, Ballard *et al.*, 2009). Los extractos obtenidos se filtraron y se centrifugaron para remover los sólidos suspendidos.

3.4 Determinación de PFT

El contenido fenólico se determinó espectrofotométricamente de acuerdo a la técnica Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) con ligeras modificaciones. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de cutícula (mg GAE/g).

3.5 Determinación de capacidad antioxidante (ensayo ORAC)

Se estimó la capacidad antioxidante de las muestras de acuerdo a la técnica ORAC (Huang *et al.*, 2002). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de cutícula ($\mu\text{mol TE/g}$).

3.6 Análisis de escalamiento

El análisis de escalamiento incluyó el análisis de las propiedades de los solventes y la simulación usando el software Aspen Batch Developer. La simulación del proceso incluyó dos pasos medulares: extracción con solvente y secado por aspersion. Se emplearon métricos de sustentabilidad ya reportados (Jimenez-Gonzales *et al.*, 2011) para evaluar el proceso. El parámetro de la intensidad de la masa del proceso (PMI) permite medir la eficiencia del

solvente empleado en términos de la utilización de su masa. Entre menor sea su valor, más eficiente es el proceso.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PFT

El modelo mostró significancia ($p < 0.05$) para la extracción con todos los solventes. Tanto la temperatura como el tiempo de extracción resultan significantes para la mayoría de los casos. Altos valores de estos factores resultan en los máximos rendimientos en PFT. Sólo en el caso del EG se alcanzó el máximo con un tiempo de 32.87 min. La Figura 1 muestra las gráficas de superficie para esta respuesta.

4.2 ORAC

El modelo no presentó significancia para IPA, MeOH, EtOH y EG, mientras que para el agua sí presentó una significancia ($p < 0.05$). En el caso del agua, MeOH y EG se obtuvieron los máximos de ORAC a las más elevadas temperaturas. Para IPA y EtOH los máximos de ORAC se alcanzaron con temperaturas de 30 °C. EG tuvo la más alta capacidad antioxidante (2935 $\mu\text{mol TE/g}$) seguido de EtOH > MeOH > IPA > agua. Contrario a los resultados de PFT, no todos los puntos óptimos para ORAC fueron con las más altas temperaturas. Sin embargo, largos tiempos de extracción favorecieron los valores de PFT y ORAC.

4.3 Análisis de escalamiento

Análisis de propiedades de los solventes

La Tabla 1 muestra las propiedades de los solventes empleados disponibles en la literatura ([Smallwood, 1993](#), [Wypych, 2000](#)). El costo a granel se determinó con relaciones ya reportadas ([Chen et al., 2001](#)). El agua y EG pueden ser considerados como buenos solventes; los altos puntos de ebullición aseguran que no generarán vapores en el proceso.

La densidad y viscosidad son propiedades que influyen en las unidades de separación y unidades de transferencia (bombas y válvulas). Entre más viscoso sea un solvente, más específico se vuelve el diseño del equipo necesario para manejarlo. Por otro lado, bajas densidades significan bajas cantidades de solvente usado. Esto es de carácter crítico, ya que los solventes a nivel industrial normalmente son vendidos por masa. Además, métricos de sustentabilidad como el PMI son calculados en función de la masa; es decir, solventes con altas densidades pueden presentar altos valores de PMI. El punto de ignición del EG es alto, indicando que el solvente no es explosivo a temperaturas debajo de 116 °C. El calor latente y

la capacidad calorífica específica son importantes para estimar los consumos energéticos en las diferentes operaciones unitarias. En el caso de extracción de polifenoles, la cantidad de energía necesaria en la extracción y separación está fuertemente relacionada con estas propiedades. Es importante resaltar el alto calor latente del agua comparado con los otros solventes. Consecuentemente, si la separación del solvente se realiza por destilación convencional o evaporación, altos consumos de energía son esperados comparados con los demás solventes. Este análisis muestra que solventes como el agua pueden ser una buena opción desde el punto de vista de HSE. Sin embargo, elevadas demandas de energía pueden ser un problema en las operaciones de separación del solvente. Solventes como EG tienen buenas características con respecto a HSE aunque con algunas implicaciones respecto al manejo del mismo. MeOH, IPA y EtOH presentan problemas con los vapores generados en el proceso si no se toman las medidas necesarias.

Simulación de procesos

La simulación de procesos en Aspen Batch Process Developer fue desarrollada para evaluar el comportamiento de cada solvente a nivel industrial. Las siguientes asunciones fueron consideradas:

- Escalamiento de procedimientos a nivel laboratorio considerando los volúmenes y rendimientos obtenidos en la sección experimental.
- Las condiciones de extracción (temperatura, tiempo, gramos de soluto extraídos) fueron basadas en las condiciones óptimas de PFT.
- La extracción y el secado por aspersion son las etapas principales del proceso (con la finalidad de obtener un polvo como producto final).
- 0.2212 g extracto/g cutícula fue considerado como el 100% del soluto a extraer (obtenido con EG, el de mayor rendimiento).
- Fue posible recuperar 70% del solvente para reciclarlo.

El primer análisis se realizó para estimar el consumo de energía necesario para producir 116 kg de extracto seco (Figura 2). La etapa de secado fue la de mayor demanda en todos los casos (agua > EG > MeOH > EtOH > IPA).

El agua es el solvente que más gasto de energía requiere. Esto se explica por su elevado calor latente. Sin embargo, la capacidad calorífica también juega un importante papel, pues el EG es el siguiente de mayor demanda y se debe a su alto punto de ebullición. La reutilización del solvente es clave en un proceso, pues reduce considerablemente los costos en la planta y el proceso se vuelve más sustentable. La Figura 3 muestra una

representación gráfica de costos (cientos de dólares) y tiempo requerido (días) para obtener 100 kg de extracto seco en una simulación con 5 lotes. Se consideró la recuperación del 70% del solvente entre cada lote.

MeOH fue el solvente con los menores costos y tiempo de campaña. EtOH, IPA y agua mostraron costos similares y distintos tiempos de campaña desde 2.2 hasta 3.2 días. EG generó los mayores costos. El solvente con mayor rendimiento en el laboratorio (EG) parece ser la opción más costosa en esta etapa. El métrico de sustentabilidad (PMI) se calculó para cada solvente basado en un proceso de 100 kg de extracto seco producido. Los resultados se muestran en la Figura 4. Debido a que PMI es un métrico directamente afectado por la masa extractada, se espera que los solventes con mayor solubilidad tengan un menor impacto. MeOH tuvo el menor valor, seguido por EG, EtOH, agua y, finalmente, IPA. La solubilidad del solvente es crítica y puede reducir significativamente la cantidad de solvente necesaria, haciendo el proceso más sustentable en términos de utilización de su masa. Análisis más detallados deben ser realizados para mejorar el conocimiento generado hasta este punto. La optimización de la relación sólido/líquido en el proceso de extracción es un parámetro que puede cambiar notablemente la factibilidad de utilizar cada solvente. Más aún, disminuir el volumen de operación reduciría los costos de energía y el PMI.

5.CONCLUSIONES

Del análisis de escalamiento es evidente que solventes con un buen rendimiento a nivel laboratorio y con buenas características HSE puede no ser la mejor opción desde un punto de vista holístico. MeOH parece la mejor opción, pues extrajo una alta cantidad de sólidos y el valor de ORAC fue tan alto como el de EG, tuvo el menor valor de PMI, y es el más económico si se considera el reciclaje del solvente. El recirculado es crítico para hacer el escalamiento económicamente viable; debe considerarse en las etapas tempranas de desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, N., G. (2000). Practical Process Research and Development, Academic Press.
- Ballard, T. S.; Mallikarjunan, P.; Zhou, K. and O'Keefe, S. F. (2009). "Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology." *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 57: 3064-3072.

Chen, H.; Barna, B. A.; Rogers, T. N. and Shonnard, D., R. (2001). "A screening methodology for improved solvent selection using economic and environmental assessments." *Clean Products and Process* 3: 290-302.

Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. (2002). "Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer." *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 50: 1815-1821.

Jimenez-Gonzales, C.; Ponder, C. S.; Broxterman, Q. B. and Manley, J. B. (2011). "Using the Right Green Yardstick: Why Process Mass Intensity Is Used in the Pharmaceutical Industry To Drive More Sustainable Processes." *American Chemical Society*.

Nepote, V.; Grosso, N. and Guzman, C. (2005). "Optimization Of Extraction Of Phenolic Antioxidants From Peanut Skins." *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 85: 33-38.

Perez-Vega, S.; Ortega-Rivas, E.; Salmeron-Ochoa, I. and Sharratt, P. (2012). "A system view of solvent selection in the pharmaceutical industry: towards a sustainable choice." *Journal of Enviroment, Development and Sustainability* 14(4).

Perez-Vega, S.; Peter, S.; Salmeron-Ochoa, I.; Nieva-de la Hidalga, A. and Sharratt, P. (2011). "Analytical hierarchy processes (AHP) for the selection of solvents in early stages of pharmaceutical process development." *Journal Of Process Safety and Environmental Protection* 89: 261-267.

Perry (2002). *Chemical's Engineer's Handbook*, knovel.

Shetgiri, N.; Patil, S. and Kelaskar, R. (2002). "API Scale-up During Research and Development."

Singleton, V. L.; Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. (1999). "Analysis Of Total Phenols And Other Oxidation Substrates And Antioxidants By Means Of Folin-Ciocalteu Reagent " *Journal Of Methods In Enzimology* 299: 152-178.

Smallwood, I. (1993). *Solvent Recovery handbook*, Edward Arnold.

Win, M. M.; Abdul-Hamid, A.; Baharin, B. S.; Anwar, F.; Sabu, M. C. and Pak-Dek, M. S. (2011). "Phenolic Compounds And Antioxidant Activity Of Peanut 's Skin, Hull, Raw Kernel And Roasted Kernel Flour." *Pakistan Journal Of Botany* 43: 1635-1642.

Wypych, G. (2000). *Knovel solvents- A properties data base*, Chem Tec publishing.

Yu, J.; Ahmedna, M. and Goktepe, I. (2005). "Effects Of Processing Methods And Extraction Solvents On Concentration And Antioxidant Activity of Peanut Skin Phenolics." *Journal of Food Chemistry* 90: 199-206.

Tabla 1. Propiedades de los solventes evaluados.

Solvent	Boiling Point (°C)	Freezing point (°C)	Density (g/cm ³)	Viscosity (cP)	Flash Point (°C)	Oral LD50 (mg/Kg)	Bulk Cost (US Dlls/Kg)	Latent heat (KJ/Kg)	Specific heat (KJ/Kg °C)
MeOH	64	-98	0.792	0.6	15	6200	2.4	1101.7	2.55
EtOH	78	-144	0.789	1.08	13	7060	3.3	836.8	2.47
EG	198	-13	1.1135	20	116	4700	4.1	845.2	2.35
IPA	82	-88	0.786	2	11	5045	1.4	664.1	2.55
Water	100	0	1	0.001	-	29820	0.002	2255.4	4.18

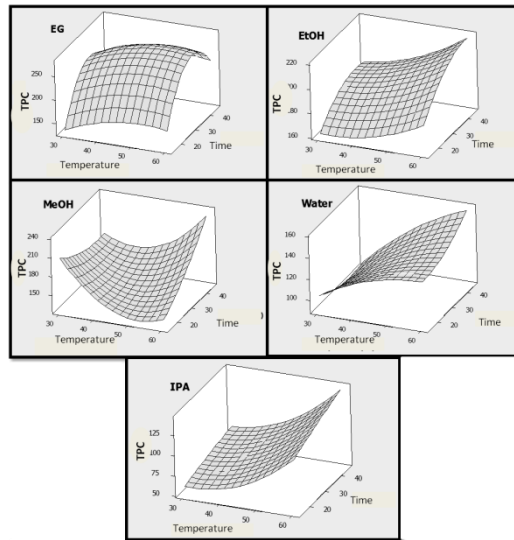


Figura 1. Gráficas de superficie para PFT con cada solvente.

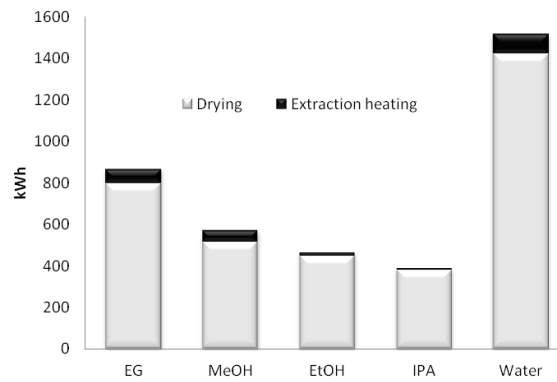


Figura 2. Demandas de energía.

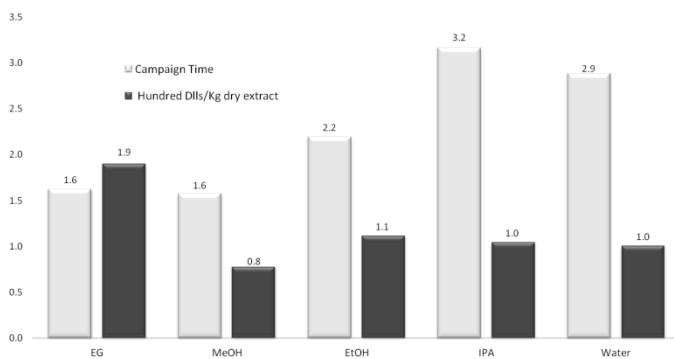


Figura 3. Costos de campaña.

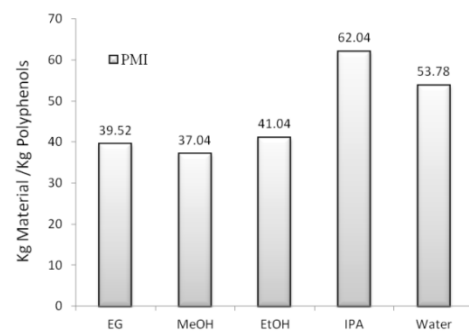


Figura 4. PMI de la campaña.

CAMBIOS QUÍMICOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PLÁTANO MACHO (*Musa AAB*)

E. Juárez-García; R. A. González-Soto; E. Agama-Acevedo; L. A. Bello-Pérez

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN (CEPROBI-IPN), Apartado postal, C.P. 62731, Yautepec, Morelos, México. Tel: +52 735 39 42020, Fax: +52 735 39 41896.

INTRODUCCIÓN

El plátano Macho (*Musa AAB*), en México, es consumido tanto como postre así como en diversos platillos tradicionales, además de que es la segunda variedad de mayor producción en este país (SIAP, 2012). En los últimos años el consumo del plátano se ha diversificado; además de ser consumido en fresco cuando el fruto madura, se han desarrollado alternativas para su aprovechamiento cuando el fruto se encuentra en estado inmaduro, ejemplo de éstas es la producción de harina (Pacheco-Delahaye *et al.*, 2008; Borgues *et al.*, 2009). Algunos de los componentes menores de la harina de plátano en estado inmaduro son los minerales (4 – 958 mg/100 g, b.s.) y los azúcares solubles (0.56 – 1.46 %) (Gibert *et al.*, 2009), por otra parte, entre los componentes mayoritarios, se encuentra el almidón (70-80 % b.s.) (Zhang *et al.*, 2005), el cual presenta una fracción que resiste (85%) la hidrólisis por las enzimas amilolíticas (Carlos-Amaya *et al.*, 2011), por lo que se ha sugerido como ingrediente funcional, ya que al adicionarse a los alimentos, mediante estudios *in vitro*, se ha reportado que mejoran su calidad nutricional además de proporcionar un beneficio a la salud de quien los consume (Pacheco-Delahaye, 2001; Bello-Pérez *et al.*, 2002; Pacheco-Delahaye y Testa, 2005; Ovando-Martínez *et al.*, 2008). Por lo anterior, se ha estudiado ampliamente a este fruto desde el punto de sus propiedades de digestibilidad; sin embargo, no se conocen reportes del plátano de la variedad Macho (*Musa AAB*.) desde el punto de vista de su crecimiento y desarrollo. Este tipo de estudios se han realizado en otras variedades, enfocándose principalmente a su tasa de crecimiento y sus cambios físicos durante el desarrollo, sin profundizar en aspectos químicos. El objetivo de este trabajo fue conocer los cambios en la composición química del plátano Macho (*Musa AAB*) durante su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico:

Se utilizó plátano Macho (*Musa AAB*) cosechado en diferentes semanas del desarrollo del fruto. Se recolectaron muestras en la semana 2, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 del desarrollo del fruto. Los frutos fueron cosechados en Tuxtepec, Oaxaca, México.

Peso del fruto

Como medida del desarrollo se midió el peso total del fruto. Se utilizaron 30 dedos elegidos al azar en todo el racimo.

Almidón total y Almidón Resistente

Se cuantificó el almidón, así como también el almidón resistente presentes en la pulpa, mediante el uso del kit enzimático Megazyme (Megazyme International Ireland Limited 2011).

Contenido de minerales

Se midió el contenido de Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Sodio (Na), mediante el uso de un espectrómetro de emisión atómica con plasma incluido (ICP-AES), según la metodología descrita en Gibert et al. (2009)

Azúcares solubles

El contenido de azúcares solubles de la pulpa (glucosa, fructosa y sacarosa) se determinó mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico acoplada a un Detector de Pulsos Amperométricos (Gibert et al., 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso del fruto

En la **figura 1** se observa el cambio de tamaño del fruto en relación con su desarrollo, el cual presentó un incremento gradual, 50.99 g en la semana 2, hasta 317.28 g en la última semana del desarrollo del fruto (semana 18). Este resultado coincide con la curva de crecimiento típica de los frutos climatéricos (curva tipo sigmoide), en donde se distinguen tres fases: la división celular (Fase I), alargamiento celular (Fase II), y cese del crecimiento (Fase III) (Agustí, 2008). Estas fases corresponden con las edades analizadas en el presente estudio. Las semanas 2 y 3 del desarrollo se ubican en la Fase I, a partir de la semana 6 hasta la 15 corresponden con la Fase II y la semana 18 corresponde a la Fase III.

Almidón total y Almidón Resistente

En el contenido de almidón también se distinguieron las fases del desarrollo, ya que entre la semana 2 y 3 fue en donde se observó el cambio más evidente en la acumulación de

este carbohidrato, mientras que en el resto del desarrollo ocurrió de forma gradual (**Figura 2**). Esto se debe a que, durante la Fase I del desarrollo, el fruto se está diferenciando por lo tanto la actividad metabólica está dirigida a la formación del tejido de almacenamiento, mientras que en la Fase II del desarrollo, la actividad metabólica se dirige a la acumulación de compuestos de reserva, que en el caso de frutos climatéricos como lo es el plátano, se acumula almidón durante su desarrollo. En la Fase III del desarrollo, el metabolismo se encuentra latente. (Agustí, 2008). La fracción del almidón que es resistente a la hidrólisis de las enzimas amilolíticas (AR) presente en la harina de plátano en estado inmaduro se ha reportado hasta un 65 % (Rodríguez-Damián *et al.*, 2012). En este estudio, el AR se incrementó de manera proporcional con respecto de las semanas de desarrollo (desde 10.10 % en la semana 2 hasta 60.69 % en la semana 18); presentando la misma tendencia que la acumulación de almidón (**Figura 2**), estos resultados indican que desde el inicio de del desarrollo, el almidón y su fracción resistente (AR), presentan características interesantes desde el punto de vista de su digestibilidad, ya que un porcentaje importante de el almidón presente en el plátano Macho resiste a la hidrólisis.

Contenido de minerales

En general, las muestras presentaron mayor contenido de minerales en las primeras semanas de desarrollo; sin embargo, este cambio en el contenido de minerales con respecto de las semanas de desarrollo del fruto fue más evidente entre la semana 2 y la semana 3 (**Figura 3**). Cabe señalar, que los minerales presentes en mayor proporción fueron el K seguido del N, siendo el K el que se encontró en mayor proporción del resto de los minerales analizados. Esto podría deberse a que tanto el N como el K pertenecen al grupo de los macronutrientes de las plantas, de manera que el N forma parte de la estructura de las enzimas (proteínas), mientras que el K activa enzimas tales como las sintetasas (Bollina, 2008); por lo anterior, en la Fase I del desarrollo hay una intensa actividad del metabolismo, por lo que el fruto requiere de una mayor concentración de estos dos minerales. Por otro lado, el P, el Ca y el Mg, también son considerados como macronutrientes, a pesar de que la concentración de ellos sea menor que el N y el K, también intervienen en procesos metabólicos, ejemplo de ello es que el P forma parte de la molécula de ATP; el Mg se enlaza con esta molécula y sirve de sustrato para las ATPasa; en el caso del Ca, este puede regular la actividad de algunas enzimas. Así mismo, son componente estructural de las células, ejemplo de ello es que el P y el Ca forman parte de la pared celular. El Na es considerado como elemento beneficioso, ya que normalmente se encuentra en concentraciones bajas (Bollina,

2008), de ahí que en este estudio el Na presentó la concentración menor de los minerales analizados.

Azúcares solubles

En la cuantificación de azúcares solubles se encontró que la sacarosa fue el azúcar con mayor concentración en el inicio del desarrollo, mientras que al final del desarrollo la glucosa y la fructosa presentan mayor concentración (**Figura 4**). Esto se debe a que la sacarosa proveniente de la fotosíntesis se hidroliza para sintetizar celulosa y almidón. Dentro del proceso de desarrollo del fruto, al llegar a la fase estacionaria, los azúcares sencillos son necesarios en el proceso de respiración del fruto, el cual inicia en la fase del desarrollo antes mencionada (Agustí, 2008).

CONCLUSIONES

Se logró distinguir las fases del desarrollo del fruto en la medición del peso.

Se observaron cambios químicos significativos en el fruto (minerales, azúcares solubles, almidón total y almidón resistente) al inicio del desarrollo del fruto, no así en el final del mismo.

Los cambios en las características químicas al inicio del desarrollo sugieren que en dicha etapa es cuando se presenta mayor actividad metabólica.

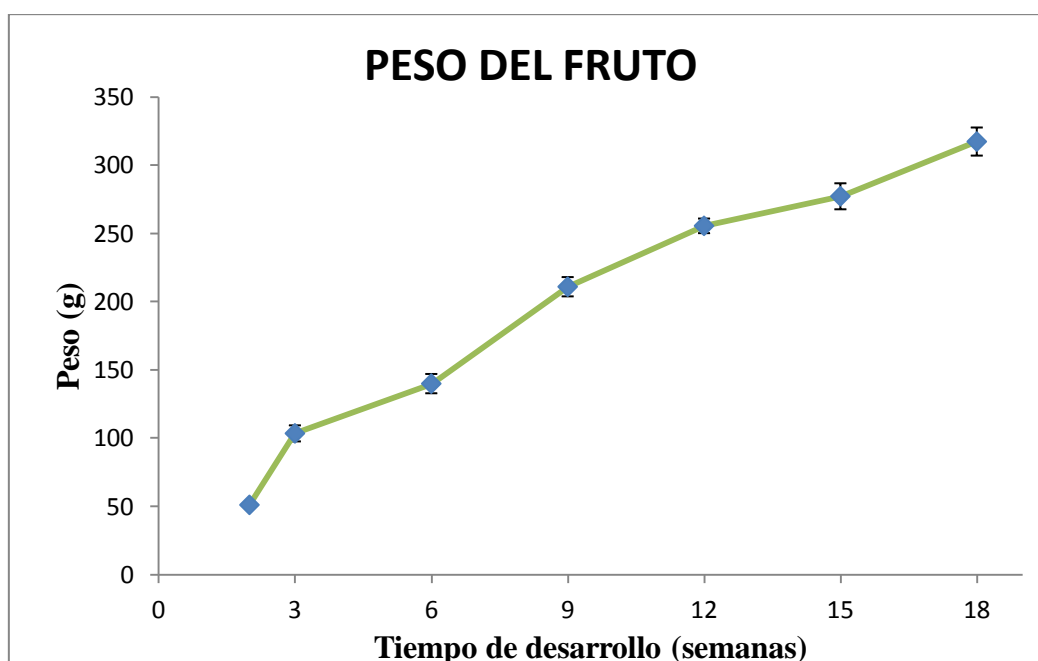


Figura 1. Cambio de peso en el fruto en relación con su desarrollo.

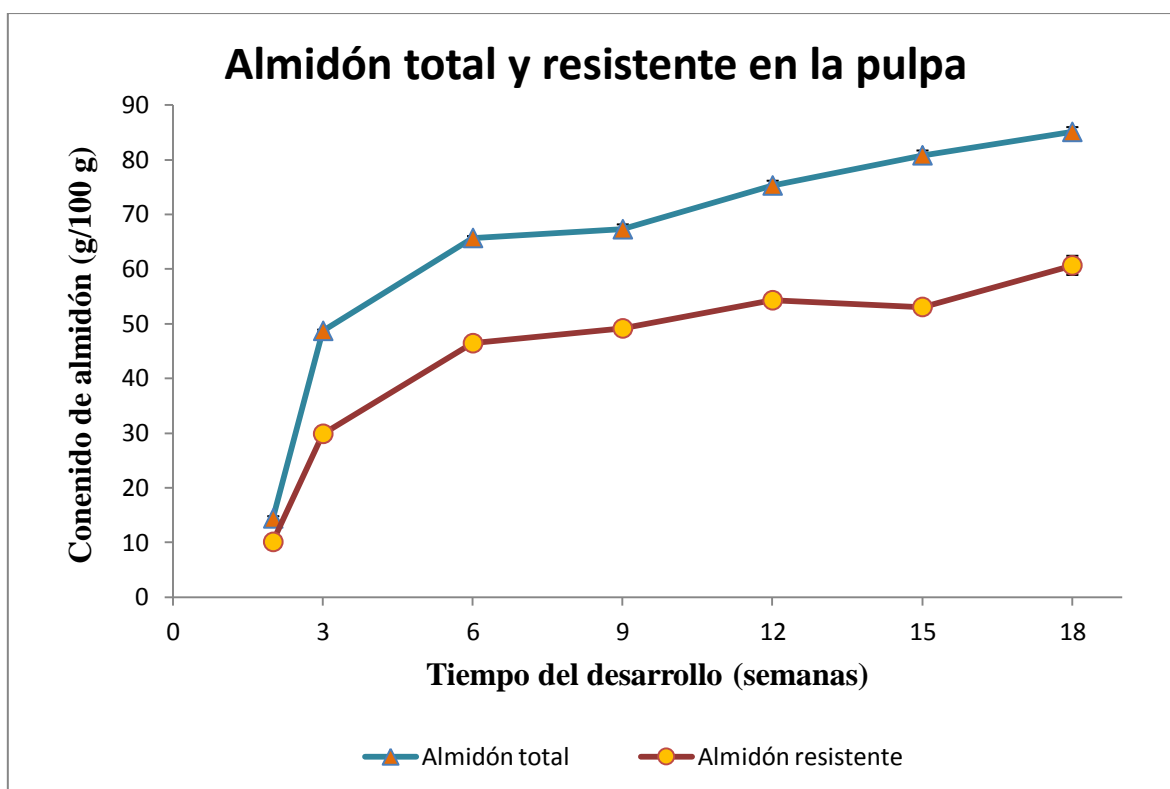


Figura 2. Acumulación de almidón total y almidón resistente en la pulpa del plátano Macho (*Musa AAB*) durante su desarrollo.

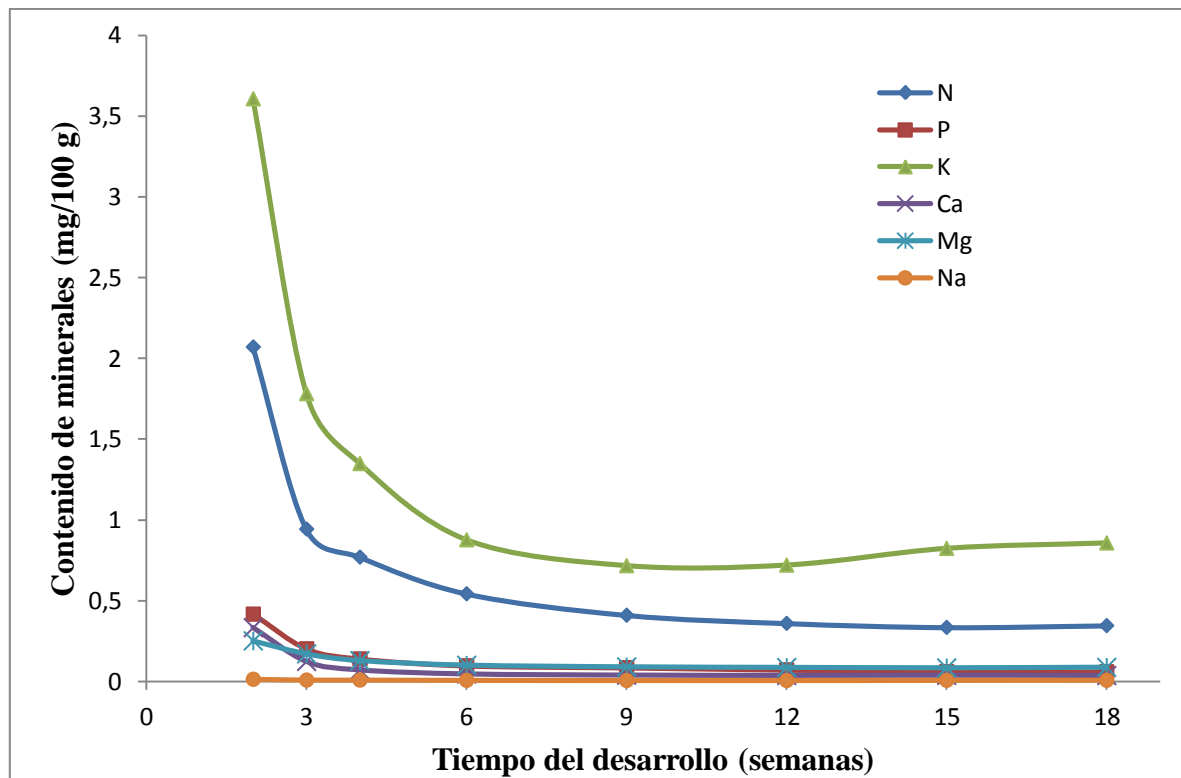


Figura 3. Contenido de minerales en la pulpa del plátano Macho (*Musa AAB*) durante su desarrollo.

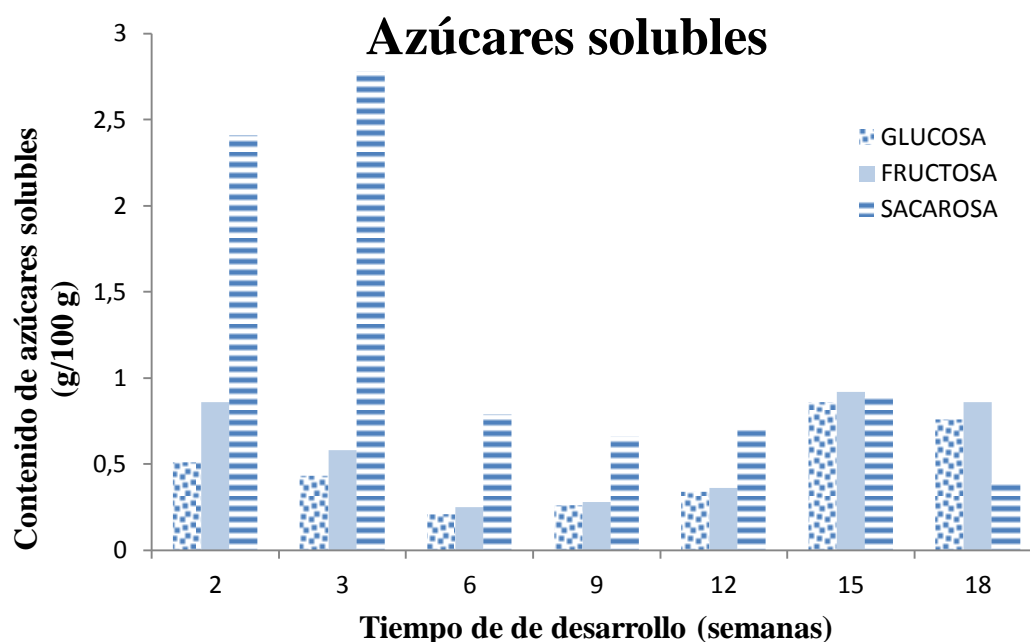


Figura 4. Contenido de azúcares solubles en la pulpa de plátano Macho (*Musa AAB*) durante su desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M. 2008. Crecimiento y maduración del fruto. En Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. Universidad de Barcelona. Edt. McGraw Hill. pp. 419-433.
- Aristazábal, M. y Jaramillo, C. Identificación y descripción de las etapas de crecimiento del plátano Dominico Hartón (*Musa AAB*). 2010. *Agronomía*, 18, 29 – 40.
- Bonilla, I. 2008. Introducción a la nutrición mineral de la plantas. Los elementos minerales. En Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. Universidad de Barcelona. Edt. McGraw Hill. pp. 106 – 110, 118.
- Borgues, A. M., Pereira, J. e Lucena, E. M. P. 2009. Caracterização da farinha de banana verde. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29, 2, 333-339.
- Carlos-Amaya, F., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Yee-Madeira, H. and Bello-Pérez, L. A. 2011. Physicochemical and digestibility properties of double-modified Banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1376–1382.
- Cayón-Salinas, D. G. 2004. Ecofisiología y productividad del plátano (*Musa AAB* Simmonds). XVI Reunión Internacional Acorbat. Oaxaca, México. pp. 172-183
- Gibert, O.; Dufour, D.; Giraldo, A.; Sánchez, T.; Reynes, M.; Pain, J. P.; González, A.; Fernández, A. and Díaz, A. 2009. Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 1. Morphological and compositional characterization of cultivated Colombian Musaceae (*Musa* sp.) in relation to consumer preferences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 7857–7869.
- Ovando-Martínez, M., Sayago-Ayerdi, S., Agama-Acevedo, E., Goni, I. and Bello-Pérez, L. A. 2009. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. *Food Chemistry*, 113, 121–126.

Pacheco-Delahaye, E. 2001. Evaluación nutricional de sopas deshidratadas a base de harina de plátano verde. Digestibilidad in vitro del almidón. *Acta Científica Venezolana*, 52, 283–291.

Pacheco-Delahaye, E. y Testa, G. 2005. Evaluación nutricional, física y sensorial de panes de trigo y plátano verde. *Interciencia*, 30, 5, 300-304.

Pacheco-Delahaye, E., Maldonado, R., Pérez, E. and Schroeder, M. 2008. Production and characterization of unripe plantain (*Musa paradisiaca* L.) flours. *Interciencia*, 33, 4, 290-296.

Rodríguez-Damián, A. R.; De La Rosa-Millán, J.; Agama-Acevedo, E.; Osorio-Díaz, P. and Bello-Pérez, L. A. 2013. Effect of different thermal treatments and storage on starch digestibility and physicochemical characteristics of unripe banana flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 5, 987–998.

SAGARPA, 2012. Cierre de la producción agrícola por cultivo. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350
Consultada el 29 de Agosto de 2013.

Zhang, P.; Whistler, R. L.; BeMiller, J. N. and Hamaker, B. R. 2005. Banana starch: Production, physicochemical properties, and digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 59, 443–458.

CARATERIZAÇÃO DO MEL DA REGIÃO DO ALTO MINHO RELATIVAMENTE AO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E À CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Vale A. P.¹, Pinheiro J.C.C.1, Pires J.¹, Oliveira E.C.¹, Candeias, G.¹, Lopes J.C.¹, Afonso I.M.¹; Brito N.V.¹

¹ Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal
E-mail: anapaula@esa.ipvc.pt

INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural cuja utilização pelo homem remonta aos primórdios da humanidade, primeiro ao nível da medicina tradicional, e depois na dieta humana, como alimento. A produção de mel passou mesmo a ser assumida como uma importante fonte de rendimento para muitas famílias, sobretudo no meio rural. O mel é uma mistura complexa que contém, pelo menos, 181 substâncias. Contudo, a composição qualitativa e quantitativa do mel é um reflexo da fonte floral, sendo a própria cor do mel associada ao tipo de flora predominante e ao potencial antioxidante do mesmo. Para além dos açúcares, o mel possui também uma larga gama de componentes em menores quantidades, muitos dos quais incluem os compostos fenólicos ou polifenóis cujo potencial antioxidante é bem conhecido. Os polifenóis constituem um importante grupo de compostos bioativos das plantas e alguns são ainda compostos do metabolismo secundário das plantas. Entre os polifenóis, os flavonoides e os ácidos fenólicos constituem as classes mais importantes destes compostos, com mais de 5000 compostos descritos (Anklam, 1998). Os méis apresentam uma ampla gama de atividade antioxidante dependendo da vegetação predominante na proximidade dos apiários, e fortes correlações foram obtidas entre a atividade antioxidante e o teor de polifenóis (Aljadi & Kamaruddin, 2004; Al-Mamary et al., 2002). O principal objetivo deste estudo foi caracterizar o mel da região do Alto Minho, situada no norte de Portugal, em relação às suas propriedades bioativas e antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e nove amostras de mel da região do Alto Minho (Portugal) foram divididas em cinco grupos relacionados com a altitude e com a vegetação predominante, designados como "Erica costeira", "Erica montanha", "*Eucalyptus* costeira", "*Eucalyptus* montanha", foi ainda definido um grupo de amostras "não identificadas" por não haver certezas relativamente à sua origem. A determinação de compostos fenólicos totais (TPC) foi realizada pelo método de

Folin Ciocalteu, de acordo com o método de Javanmardi et al. (2003) com ligeiras modificações. O TPC foi calculado usando a curva de calibração obtida com ácido gálico (GA, n = 3) [absorvância a 765 nm = 1,1978 CGA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) - 0,024, $R^2 = 0.9991$] e expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por g de mel (mg GAE g^{-1}). O teor de flavonóides totais (TFC) foi determinado com cloreto de alumínio (AlCl_3), utilizando a quercetina como padrão, de acordo com o método de Zhishen et al. (1999). Todas as amostras foram quantificadas em triplicado e o TFC foi calculado a partir da curva de calibração da quercetina [absorvância a 510 nm = 0.0004 quercetina ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) + 0.0044, $R^2 = 0.9993$]. Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina ($\text{mg quercetina}\cdot\text{g}^{-1}$).

A atividade antioxidante do mel foi quantificada espectrofotometricamente num leitor de microplacas, por monitorização do desaparecimento de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), a 515 nm, de acordo com o método previamente descrito por Brand-Williams et al. (1995) e Fukumoto & Mazza (2000), com ligeiras modificações. A atividade de captação do radical DPPH (%) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: Captação do DPPH (%) = $[1 - (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) / (\text{Abs. controlo})] \times 100$. A % de captação do DPPH foi representada graficamente para obter o IC_{50} , definido como a concentração de mel necessária para promover uma inibição de 50% do DPPH. Os ensaios foram realizados em triplicado e o ácido ascórbico foi utilizado como controlo positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, apresenta-se variável, dependendo da localização geográfica e da vegetação predominante no apiário. Existe uma relação entre o teor em polifenóis totais e a atividade antioxidante das amostras, sendo as amostras de Ericaceae as mais ricas nestes compostos e também as que apresentam o menor valor de IC_{50} para a captação do radical DPPH. Os méis de Ericaceae de montanha são os que apresentam maior teor de TPC ($1798,85 \mu\text{g}\cdot\text{GAE g}^{-1}$), embora não sejam significativamente diferentes dos méis do grupo *Erica* costeira ($1474,0 \mu\text{g}\cdot\text{GAE g}^{-1}$). Relativamente à presença de compostos flavonóides as diferentes amostras não diferem significativamente. As amostras de *Eucalyptus* apresentam teores de TPC menores embora não sejam significativamente diferente das amostras de *Erica* costeira, e são também as que apresentam menor potencial antioxidante, expresso em IC_{50} ($45,42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $43,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). As amostras do grupo das “não identificadas” apresentam características que as aproxima de

méis de Ericacea, não só pelo teor de TPC e TFC mas também pelo potencial antioxidante revelado pelas mesmas.

Quando os ensaios realizados “in vitro” são baseados em reações redox similares, a semelhança química entre ensaios pode resultar em excelentes correlações entre os TPC e a atividade antioxidante como, por exemplo, a avaliada pelo ensaio de DPPH (Huang et al., 2005). O estudo da correlação de Pearson revela uma correlação moderada negativa entre os TPC e a atividade antioxidante (-0,786), contudo quando analisamos esta correlação relativamente aos TFC, obtemos uma correlação forte negativa (-0,807), o que parece indicar que efetivamente os TFC são compostos com intervenção mais ativa na atividade antioxidante dos méis, quando esta é avaliada pela captação do radical DPPH.

CONCLUSÃO

É importante que este tipo de estudos tenha continuidade pois na Região do Alto Minho existem outros tipos de méis, nomeadamente os multiflorais e os de influência de espécies como *Rosmarinus officinalis* L. e até méis com influência de citrinos, e que seriam interessantes comparar com os atuais resultados. Além disso, seria importante analisar o perfil fenólico dos méis do Alto Minho, a fim de correlacionar os compostos fenólicos predominantes com a capacidade antioxidante dos méis.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Mamary M., Al-Meerri A. and Al-Habori M., Antioxidant activities and total phenolics of different types of honeys. *Nutr Res.* 22:1041–1047 (2002).
- Aljadi A.M. & Kamaruddin M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* 85:513–518
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 28, 25–30.
- Anklam, E., (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 63: 4, 549-562.
- Fukumoto, L. R. & Mazza G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Agric. and Food Chem.*, 48, 3597–360.
- Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841–1856.
- Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E., Vivanco J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83 547–550.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999). Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chem.*, 64:555-559.

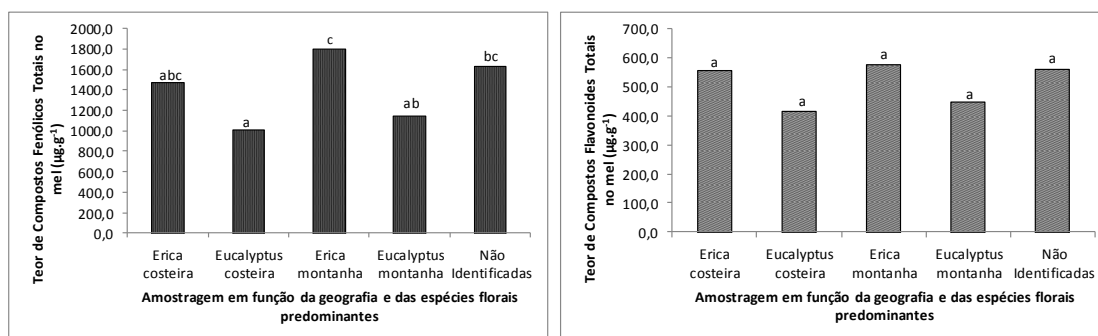


Figura 1 – Caracterização de méis da Região do Alto Minho (Portugal) em termos de teor de Compostos Fenólicos totais, expresso em equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g ac.gálico.g mel}^{-1}$) e de teor de Flavonoides totais expresso em equivalentes de quercitina ($\mu\text{gquercitina.gmel}^{-1}$). Grupos com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

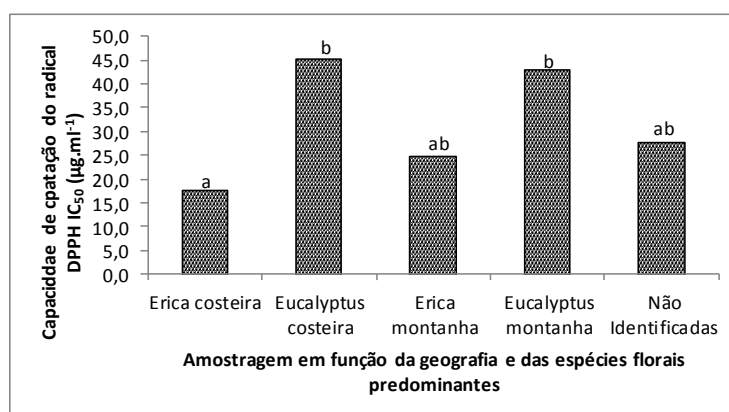


Figura 2 – Capacidade de captação do radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) de méis da Região do Alto Minho (Portugal), expressa na quantidade de mel necessária para reduzir 50% do radical DPPH, após 20min de incubação - IC₅₀ (µg/ml). O valor de IC₅₀ foi obtido por interpolação na análise de regressão linear. Grupos com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE MASAS DE PAN SIN GLUTEN ENRIQUECIDAS CON PROTEÍNAS DE HUEVO Y LECHE

Marina Villanueva¹; Raúl R. Mauro¹; Concha Collar²; Felicidad Ronda¹

¹ Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. Avda. Madrid 57, 34004, Palencia, Spain. fronda@iaf.uva.es

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, IATA. CSIC. Avda. Catedrático Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna. Spain

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca es una intolerancia de larga duración a las proteínas del gluten, con una prevalencia del 1-2 %, que actualmente está en aumento. A fecha de hoy, el único tratamiento efectivo es la retirada completa de gluten de la dieta. Uno de los principales problemas de los pacientes celíacos es la falta de disponibilidad de productos libres de las proteínas que desencadenan la intolerancia con una adecuada calidad sensorial y nutricional (Cabrera-Chavez y Calderon de la Barca, 2010). La fabricación de pan sin gluten elaborado a partir de harina de arroz u otros cereales no alergénicos, tiene considerables dificultades tecnológicas porque el gluten es un componente clave en la fabricación de pan.

El gluten influye en las principales características reológicas de la masa, tales como la elasticidad, extensibilidad, resistencia, la tolerancia de la mezcla y la capacidad de retención de gas (Sivaramakrishnan et al., 2004; Lazaridou et al., 2007). El conocimiento de las propiedades reológicas de las masas de pan sin gluten afecta tanto a su procesado como a la calidad final del pan y resulta imprescindible para el desarrollo de nuevos productos. Por consiguiente, la matriz de gluten debe ser reemplazada por otros componentes estructurales que mimeticen su actuación (Marco y Rosell, 2008).

Con el fin de agradar al consumidor y usando un número limitado de ingredientes se pretenden generar nuevos productos panarios libres de gluten. La incorporación de proteínas a estos productos es utilizada para mejorar cualidades como estabilidad del sabor, textura y almacenamiento, además de conferir propiedades mecánicas deseables.

La adición de ingredientes lácteos y huevo en la fabricación de pan son utilizados ya que sus proteínas se pueden incorporar fácilmente a la masa y proporcionan un mayor valor nutricional y/o funcional (Regina et al., 2013).

El objetivo principal por tanto, es el estudio del comportamiento reológico de masas panarias sin gluten enriquecidas con proteínas de huevo o leche en diferentes dosis,

correlacionándolas con las características físico-químicas (volumen y dureza) de los panes resultantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se elaboraron masas de pan sin gluten en base almidón de arroz enriquecidas con proteínas de huevo (albúmina en polvo) o leche (caseinato cálcico) en dosis del 5 y 10 % en base almidón. Para la realización de los ensayos, se pesaron 250 g de la mezcla almidón-proteína correspondiente y se añadió sal, azúcar, HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), aceite de girasol y agua. Se conectó la amasadora durante 8 minutos y al finalizar, se dejó reposar la masa durante 10 minutos antes de comenzar los ensayos.

Los ensayos reológicos (barrido de esfuerzos, barrido de frecuencias y ensayos de deformación progresiva) se llevaron a cabo en un reómetro con placas paralelas de superficie serrada y 3 mm de separación entre ellas. El exceso de masa se retiró y se aplicó aceite de vaselina para cubrir las superficies expuestas. La temperatura de los ensayos se fijó en 25 °C, y una vez depositada la masa en las placas, se esperó 500 s para permitir su relajación antes de cada ensayo.

Los ensayos de barrido de esfuerzos se realizaron en el rango de 0,1 a 1000 Pa y a una frecuencia de 1 Hz. Estos ensayos permitieron establecer la zona viscoelástica lineal (LVR) mediante la localización de valor del esfuerzo, τ_{max} , que producía el descenso del módulo elástico G' y el aumento de la tangente de pérdida, $\tan \delta$. Los barridos de frecuencias se realizaron por duplicado en el intervalo de 20 a 0,1 Hz a un esfuerzo correspondiente al centro de la región viscoelástica lineal (LVR), a esfuerzos comprendidos entre 2 y 7 Pa. Los módulos viscoso y elástico y la $\tan \delta$ obtenidos en estos ensayos, se ajustaron a ecuaciones potenciales (Ronda et al. 2011).

Los ensayos de deformación o relajación progresiva se realizaron mediante la aplicación de un esfuerzo de cizalla instantáneo sobre la muestra dentro de la zona viscoelástica lineal, que se mantuvo constante durante 150 s durante el periodo inicial para anularse en la zona de recuperación, que se prolongó durante 300 s adicionales. Estos ensayos se realizaron como mínimo por duplicado y se expresaron en términos de capacitancia elástica, J . Los datos experimentales se describieron por el Modelo de Burgers de 4 parámetros en términos de capacitancia mecánica tanto en la fase de deformación como en la fase de recuperación (Ronda et al. 2013).

Se utilizaron los programas Statgraphics Centurion v.6 y STATISTICA v.6 para el ajuste de los ensayos a ecuaciones no lineales, análisis de varianzas y correlaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos oscilatorios

Las propiedades viscoelásticas de las masas panarias a base de almidón de arroz con proteínas de huevo o leche en diferentes dosis se estudiaron mediante pruebas oscilatorias dinámicas.

A partir de los ensayos de barrido de esfuerzos a 1 Hz, se obtuvieron los valores de los esfuerzos máximos en la zona viscoelástica lineal. Los esfuerzos máximos a partir de los cuales las masas experimentaron una destrucción de su estructura oscilaron entre 6 y 79 Pa. Las masas que soportaron menores esfuerzos fueron las de albúmina. En cambio las que soportaron mayores esfuerzos fueron las de caseína, sin haber diferencias significativas entre las masas de diferentes dosis. Esto indica que la estructura generada en la masa por la presencia de albúmina de huevo es más débil que la obtenida con la adición de caseinato cálcio.

Los barridos de frecuencia (Figura 1) revelaron el comportamiento típico de los sólidos viscoelásticos. Se comprobó que el aumento de la dosis hizo aumentar los valores del módulo elástico y viscoso, G' y G'' , para masas con adición de caseína. En cambio, en masas con albúmina ambos módulos disminuyeron al aumentar la dosis. Se observó que los valores de $\tan \delta$ aumentaron al disminuir la dosis de cualquiera de las dos proteínas. Esto es debido a que las proteínas presentes en la masa junto con el resto de ingredientes crean una estructura estabilizada por enlaces entrecruzados que aumenta el carácter elástico de las masas frente al viscoso.

Ensayos de deformación y relajación progresiva

La Figura 2 muestra un gráfico de evolución de la capacitancia mecánica de las masas durante el período de deformación progresiva y el de recuperación. Los ensayos de deformación o relajación progresiva se llevaron a cabo con aplicación de esfuerzos dentro de la región viscoelástica lineal y se mantuvieron durante 150 s, tiempo suficiente para que la masa alcanzase un flujo estacionario. Las curvas obtenidas mostraron un comportamiento viscoelástico típico de masas de pan sin gluten. A partir de estos ensayos y ajustando los resultados al modelo de Burgers, una alta correlación como era de esperar, fue encontrada entre los parámetros de capacitancia elástica en la fase de deformación y los equivalentes en

la fase de recuperación, ya que los ensayos se llevaron a cabo en la LVR. Las masas con proteína tuvieron mayores valores de capacitancia que el control. En masas con albúmina los valores de capacitancia fueron mayores con una mayor dosis de proteína, destacando muy por encima del resto. En masas con caseína, los mayores valores fueron alcanzados con adición del 5 % de proteína. Los valores de viscosidad estacionaria se situaron por debajo de los valores alcanzados por la masa control, siendo mayores los valores para caseína al 10 % y albúmina al 5 %.

Correlaciones

El análisis de las variables reológicas suministra información útil sobre la relación significativa entre las características viscoelásticas de las masas de pan sin gluten. Éstas se correlacionaron con características físico-químicas como el volumen y la dureza de los panes resultantes.

Los módulos elástico y viscoso, indicadores del comportamiento viscoelástico de la masa, resultaron correlacionados entre sí, de manera que cuando uno aumentaba, el otro también lo hacía. La tangente de pérdida no resultó correlacionada con ninguno de los dos módulos. Esto indica que su aumento pudo ser debido indistintamente a un aumento del módulo viscoso o a un descenso del módulo elástico, sin poder establecer una regla fija. Una fuerte correlación fue encontrada entre los parámetros de capacitancia elástica en la fase de deformación y los equivalentes en la fase de recuperación progresiva, ya que se llevaron a cabo en la región viscoelástica lineal.

Se pudieron concluir relaciones significativas entre el módulo elástico G'_1 de las masas y el volumen del pan ($r = -0.51$; $p < 0.05$) y su dureza ($r = 0.72$; $p < 0.001$) y de la viscosidad estacionaria obtenida del ensayo de recuperación progresiva y la dureza del pan ($r = 0.59$; $p < 0.01$).

CONCLUSIÓN

La adición de proteínas animales como albúmina en polvo y caseinato cálcico mostraron comportamientos diferentes en función del tipo de proteína y muy variables en función de la dosis. Los resultados obtenidos fueron variables en función del tipo de proteína y de la dosis utilizada. En masas con albúmina se obtuvieron menores módulos elástico y viscoso que en masas con caseína. Estos valores disminuyeron al aumentar la dosis para el caso de masas con albúmina y aumentaron al aumentar la dosis para masas con caseína. La

presencia de albúmina produjo un aumento en los valores de capacitancia elástica al aumentar la dosis y el efecto fue el contrario para masas con caseína.

Las proteínas utilizadas aportan características reológicas adecuadas para procesar y lograr productos libres de gluten. Trabajos futuros deben comparar las características reológicas y físico-químicas con otras proteínas de diferentes orígenes para completar un estudio de enriquecimiento de masas de pan libres de gluten con proteínas exógenas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2012-35088) y por la Junta de Castilla y León (Proyecto VA252A12-2) para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Cabrera-Chávez, F., Calderón de la Barca, A.M. (2010). Trends in wheat technology and modification of gluten proteins for dietary treatment of coeliac disease patients. *Journal of Cereal Science*, 52, 337-341.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C.G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79, 1033-1047.
- Marco, C., Rosell, C.M. (2008). Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. *Journal of Food Engineering*, 84, 132-139.
- Regina, C., Da Rosa, E., Arocha, M., Cardoso, M., Rosell, C.M., Guerra, AR. (2013). Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. *Food Science and Technology*, 53, 346-354.
- Ronda, F., Oliete, B., Gómez, M., Caballero, P.A., Pando, V. (2011). Rheological study of layer cake batters made with soybean protein isolate and different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 102, 272-277.
- Ronda, F., Pérez-Quirce, S., Angioloni, A., Collar, C. (2013). Impact of viscous dietary fibres on the viscoelastic behaviour of gluten-free formulated rice doughs: A fundamental and empirical rheological approach. *Food Hydrocolloids*, 32, 252-262.
- Sivaramakrishnan, H., Senge, B., Chattopadhyay, P.K. (2004). Rheological properties of rice dough for making rice bread. *Journal of Food Engineering*, 62, 37-45.

FIGURAS

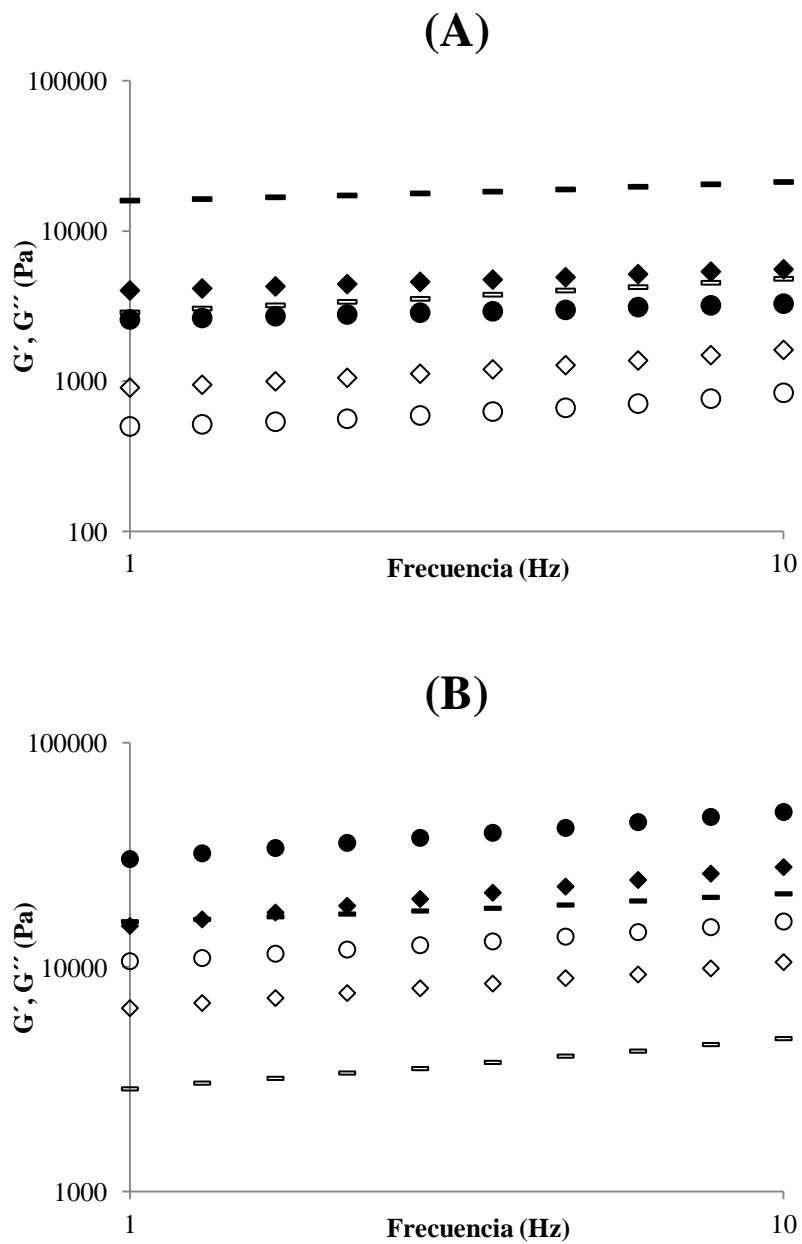


Figura 1. Evolución del módulo elástico (G') y viscoso (G'') frente a la frecuencia, de las masas con proteínas de huevo (A) y caseína (B). ●: dosis 10 %; ◆: dosis 5 %; -: control. Los puntos rellenos representan el módulo elástico y los huecos el módulo viscoso.

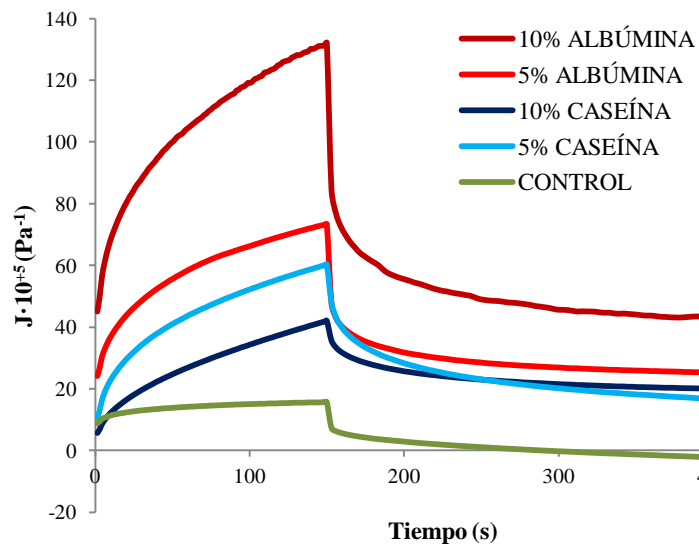


Figura 2. Evolución de la capacitancia elástica (J) frente al tiempo de las masas con albúmina y caseína, con diferentes dosis.

ENRIQUECIMIENTO DE PAN CON BETAGLUCANOS DE AVENA Y CEBADA DE DIFERENTE PESO MOLECULAR

Camino M. Mancebo, Felicidad Ronda, Pedro A. Caballero.

Área de Tecnología de los Alimentos. Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal. E.T.S. Ingenierías Agrarias de Palencia. Universidad de Valladolid.

1. INTRODUCCIÓN.

Los β -glucanos (BG) son un componente importante de la fibra alimenticia soluble, presentes principalmente en los granos de cebada y avena, a los que se atribuye un carácter multifuncional. Los BG tienen un efecto positivo en la reducción de la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, y presentan propiedades hipocolesterolémicas. A pesar de que la incorporación de BG conlleva numerosos beneficios nutricionales, las propiedades físico-químicas de los mismos pueden provocar cambios significativos en el producto final. Su inclusión en las fórmulas empleadas en procesos de panificación, en dosis comprendidas entre el 10 y el 30% (en base harina), está asociada a una elevación en la retención de agua de las masas, la reducción del volumen de pan, un color más oscuro del producto, y efectos no deseados en la textura de la miga (Izydorczyk y Dexter, 2008).

Hasta ahora, el estudio de productos de panadería enriquecidos en BG se ha focalizado en la sustitución total o parcial de harina de trigo refinada por harina de cebada o de avena, siendo escasos los trabajos en los que se ha incorporado un aislado de este componente a la formulación del pan elaborado con harina de trigo. El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la adición de dos concentrados de BG de diferente origen y peso molecular (avena, 1900 kDa; cebada, 125 kDa), sobre las propiedades de las masas destinadas a la elaboración de pan de flama, así como sobre la calidad de los productos obtenidos. Con el objeto de prevenir la inhibición en el desarrollo de la red de gluten se utilizó una harina de fuerza superior a la habitual en este tipo de elaboraciones, incorporándose el agua adaptada a las concentraciones de BG empleadas, según los resultados de los ensayos farinográficos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se empleó una harina comercial panificable (Harinas A.L. Linares S.A (Briviesca, España), caracterizada por una fuerza panadera o energía de deformación (W) de 240 y una relación P/L de 0,86. El β -glucano de cebada (GlucagelTM) fue suministrado por DKSH

(Hamburgo, Alemania) y presentaba una pureza de 76,71 % (base seca) y un peso molecular de 125 kDa. El β -glucano de avena (PromOatTM; Biovelop, Kimstad, Suiza) se caracterizó por un 33 % (b.s.) de pureza y un peso molecular de 1900 kDa. El resto de ingredientes (levadura de panadería seca instantánea, sal y mejorante panario) fueron adquiridos en el mercado local.

2.1. Caracterización de las masas panarias.

Las harina y las masas resultantes fueron caracterizadas mediante análisis con un Farinógrafo 810-105 (Brabender, Germany) siguiendo el método AACC 54-21.01 (AACC, 2009). A través de este ensayo, se determinó la capacidad de absorción de agua y el comportamiento de las masas durante el amasado. Los ensayos se realizaron por duplicado.

2.2. Procedimiento de panificación.

La elaboración del pan se llevó a cabo según una fórmula común en los procesos de panificación empleando 2000 g de harina, 57% (p/p) de agua, 2% (p/p) de levadura seca instantánea, 2% (p/p) de sal, y 0,5% (p/p) de mejorante panario. Todos los porcentajes se refirieron al peso de harina empleada. El contenido de agua de las fórmulas con BG se adaptó según los resultados farinográficos, añadiendo la cantidad adicional de agua establecida para las diferentes dosis de este componente.

Se realizaron 5 elaboraciones diferentes con dos tipos de BG (cebada y avena). Aparte del ensayo control, se emplearon dos concentraciones de BG diferentes: 0,9% (p/p) y 1,8% (p/p) en base harina. Las cantidades de BG comercial empleadas permitieron asegurar que, a través de una ingesta diaria de 250 g de pan, se aportaran 3 y 1,5 g de β -glucano, es decir, la dosis diaria recomendada por la EFSA para la reducción del colesterol en sangre (EFSA, 2011), y una dosis mitad.

La masa se obtuvo mediante la mezcla de los ingredientes en una amasadora de brazos durante 13 minutos. Posteriormente, la masa fue dividida en piezas de 200 g que fueron boleadas manualmente y sometidas a un reposo de 15 minutos. Se empleó una formadora con el fin de obtener piezas homogéneas, procediéndose a continuación a depositar éstas en bandejas. Las barras fueron fermentadas en cámara durante 90 minutos, a una temperatura de 29 °C y 75 % de humedad relativa. Tras realizar una serie de cortes longitudinales en su superficie, fueron horneadas en un horno eléctrico de convección durante 20 minutos a 185 °C, recibiendo una inyección de vapor de 10 s al inicio de esta operación. Las piezas se enfriaron durante una hora antes de proceder a su caracterización.

2.3. Análisis de los parámetros de calidad del pan.

La calidad del pan fue determinada mediante la medida del volumen de las piezas utilizando un analizador de volumen BVM-L 370 (TexVol Instruments, Viken, Sweden). Asimismo, se caracterizó la textura de la miga con un texturómetro TA-XT2i (Stable Microsystems, Surrey, UK), provisto de una sonda cilíndrica de aluminio de 25 mm de diámetro (P25). Las rebanadas centrales de las piezas de pan (2 cm de espesor) fueron sometidas a un análisis de su perfil de textura (TPA) mediante un ensayo de doble compresión (TPA). A partir de la curva correspondiente, se calcularon los parámetros texturales característicos: dureza (gf), cohesividad, elasticidad, resiliencia, gomosidad (gf) y masticabilidad (gf).

Se analizó también el color de la corteza y de la miga con un espectrofotómetro Minolta CN-508i (Minolta, Co. LTD, Tokio, Japón), empleando un iluminante y observador estándar (D65 y 2° respectivamente). Los resultados se expresaron en el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$, obteniéndose posteriormente el tono (h) y la saturación o croma (C^*) como variables derivadas.

Las características del alveolado de la miga se determinaron mediante la adquisición previa de las imágenes de las rebanadas del pan con un escáner HP Scanjet G3110, y el posterior análisis de las mismas con el software WCIF ImageJ. Los parámetros característicos de dicho alveolado fueron el brillo de la miga (nivel de gris medio), la densidad alveolar (alvéolos/cm²) y el porcentaje de área ocupado por los alvéolos.

Por último, se llevó a cabo el análisis sensorial de los panes mediante una prueba de comparación múltiple con la ayuda de un panel semientrenado de catadores. Los atributos analizados fueron la intensidad del olor y el sabor, la dureza y la masticabilidad de la miga, la regularidad del alvéolo, el aspecto visual externo y la crujencia de la corteza.

2.4. Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico Statistica v11 (StatSoft Inc, Tulsa, USA). Tras realizar un ANOVA multifactorial anidado, se empleó un test de Fisher para describir la variabilidad de las medias con un nivel de significación del 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Efecto de la incorporación de BG sobre las propiedades de las masas.

La adición de BG causó un aumento en la absorción de agua de todas las masas analizadas (datos no mostrados). Tales efectos se han atribuido a la alta capacidad de

absorción de agua de estos polisacáridos no amiláceos y su capacidad para competir por el agua con otros constituyentes de la masa. En general, las muestras con β -glucano de avena (en adelante OBG) produjeron un mayor aumento de este parámetro farinográfico que aquellas con β -glucano de cebada (en adelante BBG), intuyéndose una relación directa entre la absorción de las masas y el peso molecular de estos componentes. Resultados similares fueron obtenidos por Rieder y col. (2012) y Skendi y col. (2010).

3.2. Efecto del tratamiento con BG sobre el volumen específico de los panes.

El volumen específico de las piezas de pan disminuyó significativamente ($P < 0,05$) con la adición de BG (Tabla 1). Este efecto fue más acusado cuando se emplearon las dosis más elevadas, siendo especialmente importante tras la adición de OBG. La incorporación de harinas de avena o cebada en la formulación constituye una alternativa empleada para enriquecer el producto en β -glucano, habiéndose apreciado también con esta práctica, un efecto similar sobre este parámetro (Izydorczyk y Dexter, 2008). Como se ha comentado con anterioridad, la capacidad de absorción de agua característica de los BG, podría estar asociada a la disminución de la disponibilidad de agua para el desarrollo de la red de gluten durante el proceso de amasado, con la consiguiente reducción del volumen de las piezas (Holtekjølen y col., 2008).

3.3. Efecto de la adición de BG sobre los parámetros texturales de la miga.

La incorporación de BG dio lugar a un incremento significativo ($P < 0,05$) de la dureza de la miga (Tabla 1). El OBG provocó una mayor influencia sobre esta variable, siendo su efecto directamente proporcional a la dosis empleada. Se sabe que la dureza de la miga está correlacionada con el volumen del pan, por lo que las diferencias detectadas en el volumen específico de las piezas podrían explicar el comportamiento observado en este parámetro textural. Dicha correlación fue también expuesta por Rieder y col. (2012) tras desarrollar procesos de panificación con harina de trigo y una sustitución parcial de la misma por harina de cebada y de avena.

La adición de BG produjo una modificación significativa ($P < 0,05$) de otros parámetros característicos de la textura de la miga, ocasionando un aumento de su elasticidad, su gomosidad y masticabilidad, y disminuyendo paralelamente su cohesividad (datos no mostrados).

3.4. Efecto de la adición de BG sobre el color de la corteza y de la miga.

El color de la corteza y de la miga del pan se vio afectado significativamente ($P < 0,05$) por la incorporación del BG en la formulación (Tabla 2). El análisis de la luminosidad (L^*)

permitió concluir un oscurecimiento de la corteza tras la adición de la dosis más elevada de OBG. Resultados semejantes fueron obtenidos por Skendi y col. (2010), quienes detectaron una disminución de la luminosidad de la corteza como consecuencia de la adición de BG de alto peso molecular y el empleo de las dosis más elevada de los mismos. La luminosidad de la miga aumentó de forma significativa ($P < 0,05$) en todos los casos excepto con el empleo de 0,9% (p/p, en base harina) de BBG. Por otra parte, el croma (C^*) de la corteza y de la miga aumentó significativamente ($P < 0,05$) con la adición de BG, manteniéndose los valores del tono (h) en ambas partes del producto.

3.5. Efecto de los BG sobre las propiedades del alveolado de la miga.

Como se puede observar en la tabla 1, la presencia de OBG produjo una disminución significativa ($P < 0,05$) del porcentaje de área ocupada por los alvéolos, siendo ésta más importante conforme se incrementó la dosis empleada. Éste resultado está en consonancia con los efectos observados en el volumen de los panes y la dureza de la miga, consecuencia del menor desarrollo de las piezas durante la fermentación y posterior horneado. Por otra parte, la densidad alveolar disminuyó en todos los casos tras la adición de BG, no detectándose diferencias significativas ($P < 0,05$) en función de la dosis o del origen de este componente. En cambio, el brillo de la miga disminuyó significativamente ($P < 0,05$) con el incremento de la dosis de BG, siendo el BBG el que ejerció un mayor efecto.

3.6. Modificación de los atributos sensoriales del pan tras la adición de BG.

En función de la evaluación de los catadores, la adición de BG demostró tener un efecto significativo ($P < 0,05$) sobre distintos atributos determinados sensorialmente como la dureza de la miga, la regularidad del alveolado, el aspecto visual externo y la crujencia de la corteza. Como se puede apreciar en la Figura 1, el empleo de OBG ocasionó una modificación importante de los atributos sensoriales del pan, dando lugar a productos caracterizados por una mayor dureza de la miga, mayor intensidad aromática, una menor crujencia de la corteza, y una peor valoración de su aspecto visual externo. Por el contrario, la valoración sensorial de los panes elaborados con BBG fue similar a la obtenida por el control.

4. CONCLUSIONES.

La adición de BG ocasionó una modificación significativa de las propiedades farinográficas de las masas y de los parámetros de calidad del pan. Los efectos fueron mas acusados cuando se emplearon OBG, caracterizados por un mayor peso molecular. Asimismo, la intensidad de las modificaciones observadas fue altamente dependiente de la

dosis empleada. En general, los resultados permitieron concluir la viabilidad tecnológica del enriquecimiento del pan de flama con β -glucanos, especialmente los procedentes de la cebada (BBG). De esta manera, el consumo de pan enriquecido en este componente constituye una alternativa razonable para garantizar una ingesta diaria de BG que permita el mantenimiento de las concentraciones normales de colesterol en la sangre.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2012-35088) y por la Junta de Castilla y León (Proyecto VA252A12-2)

5. BIBLIOGRAFÍA

American Association of Cereal Chemists (2009). Approved methods of the AACC, Methods 54-21.01; The Association, St Paul, MN.

EFSA (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and “digestive function” (ID 850) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 9(6):2207.

Holtekjølen, A.K., Olsen, H.H.R., Færgestad, E.M., Uhlen, A.K., Knutsen, S.H., (2008). Variations in water absorption capacity and baking performance of barley varieties with different polysaccharide content and composition. LWT - Food Science and Technology 41(10), 2085-2091.

Izydorczyk, M., Dexter, J., (2008). Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. Food Research International 41(9), 850-868.

Rieder, A., Holtekjølen, A.K., Sahlstrøm, S., Moldestad, A., (2012). Effect of barley and oat flour types and sourdoughs on dough rheology and bread quality of composite wheat bread. Journal of Cereal Science 55(1), 44-52.

Skendi, A., Biliaderis, C.G., Papageorgiou, M., Izydorczyk, M.S., (2010). Effects of two barley β -glucan isolates on wheat flour dough and bread properties. Food Chemistry 119(3), 1159-1167.

Tabla 1: Efecto de la adición de BG sobre los parámetros de calidad del pan.

Tipo BG	Dosis BG	Volumen específico (ml/g)	Dureza (N)	Área ocupado por alvéolos (%)	Brillo de la miga	Densidad alveolar (alvéolos/cm ²)
Control	0	6,06 ^e	1,3065 ^a	11,404 ^c	199,205 ^d	55,392 ^b
BBG	1	4,84 ^d	1,6610 ^a	11,072 ^{bc}	180,588 ^a	49,118 ^a
BBG	2	3,81 ^b	3,1120 ^c	10,991 ^{bc}	183,781 ^{ab}	50,686 ^a
OBG	1	4,31 ^c	2,3873 ^b	9,498 ^{ab}	191,164 ^c	47,843 ^a
OBG	2	3,15 ^a	4,8750 ^d	9,101 ^a	187,949 ^{bc}	46,569 ^a

Tipo de β -glucano (BG): BBG: cebada; OBG: avena. Dosis: 0 (ausencia), 1 [0,9 % (p/p) en base harina] y 2 [1,8 % (p/p) en base harina].

Medias con la misma letra dentro de cada columna no resultaron significativamente distintas ($P < 0.05$)

Tabla 2: Efecto de la adición de BG sobre los parámetros que definen el color de la corteza y de la miga del pan.

Tipo BG	Dosis BG	Color de la corteza			Color de la miga		
		L*	C*	h	L*	C*	h
Control	0	60,980 ^{bc}	33,115 ^a	66,786 ^{ab}	65,033 ^a	12,485 ^a	86,858 ^{ab}
BBG	1	63,474 ^c	35,616 ^{bc}	69,720 ^b	66,178 ^a	12,212 ^a	87,084 ^b
BBG	2	60,716 ^{bc}	37,129 ^c	66,227 ^a	69,141 ^b	14,913 ^{bc}	85,788 ^a
OBG	1	58,555 ^b	36,633 ^c	64,739 ^a	71,106 ^b	14,201 ^b	86,832 ^{ab}
OBG	2	55,030 ^a	33,893 ^b	66,228 ^a	69,913 ^b	15,737 ^c	86,268 ^{ab}

Tipo de β -glucano (BG): BBG: cebada; OBG: avena. Dosis: 0 (ausencia), 1 [0,9 % (p/p) en base harina] y 2 [1,8 % (p/p) en base harina]. L*: Luminosidad; C*: Saturación; h: Tono.

Medias con la misma letra dentro de cada columna no resultaron significativamente distintas ($P < 0.05$)

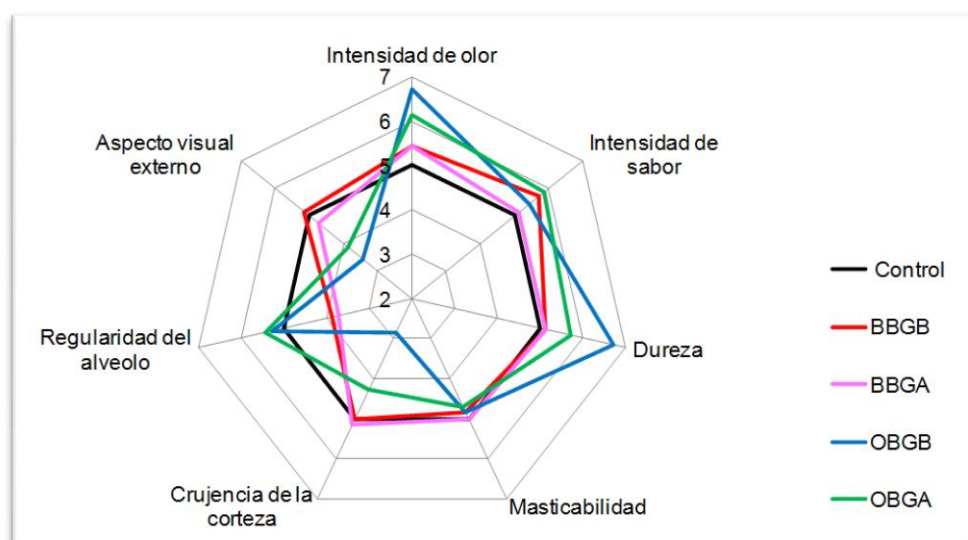


Figura 1. Atributos sensoriales de los panes elaborados con distinto tipo y dosis de β -glucano. BBGA: β -glucano de cebada [0,9% (p/p) en base harina]; BBGB: β -glucano de cebada [1,8% (p/p) en base harina]; OBGA: β -glucano de avena [0,9% (p/p) en base harina]; OBGB: β -glucano de avena [1,8% (p/p) en base harina]

MANDIOCA E INHAME: REDUÇÃO DE PERDAS PÓS-COLHEITA, SEGURANÇA ALIMENTAR DOS SEUS DERIVADOS E VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO – O PROJECTO *GRATITUDE* FP7

Vincenza Ferraro¹, Clara Piccirillo¹, Keith Tomlins², Paula Teixeira¹, L. Sanni,³ A. Obadina³, Kim Anh To ⁴, Kuakoon Piyachomkwan ⁵, Nanam Tay Dziedzoave ⁶, Charles Tortoe ⁷, Manuela E. Pintado¹

¹ CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

² Natural Resources Institute, University of Greenwich, United Kingdom

³ FUNAAB, Nigeria, ⁴ SBFT, Vietnam, ⁵ NSTDA, Thailand, ⁶ FRI, Ghana, ⁷ CSIR, Ghana

RESUMO

As raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e os tubérculos de inhame (*Discorea* spp.) representam um recurso alimentar e uma fonte de energia crucial para as cerca de 2 bilhões de pessoas das regiões tropicais e subtropicais. A produção anual mundial atinge 160 milhões de toneladas para a mandioca e 90 milhões de toneladas para o inhame.

Dados de literatura mostram que as perdas pós-colheita atingem o 30% no caso da mandioca e o 60% no caso do inhame. Estas perdas ocorrem na cadeia alimentar em três maneiras diferentes: armazenamento inadequado, resíduos de processamento e perda de valor económico devido a transformação em produtos de baixo valor acrescentado. O preço da mandioca é reduzido em 85 % em 3 dias após a colheita, e 15-20 % em peso de resíduos são gerados durante o processamento, sendo estes representados pelas cascas. No caso do inhame existem actualmente sérios problemas com o armazenamento; os tubérculos deterioram-se facilmente devido ao elevado teor de água e à flora microbiana endógena.

O projecto *GRATITUDE-FP7 (Gains from Losses of Roots and Tubers Crops)* tem por objectivo reduzir as perdas de processamento de mandioca e inhame através da redução de perdas pós-colheita, através da implementação de novos produtos de valor acrescentado mais elevado, e através da valorização dos resíduos de processamento. Empresas ao nível familiar, e pequenas-medias e grandes empresas de alguns países em via de desenvolvimento, nomeadamente Nigéria e Gana na África e Tailândia e Vietnam na Ásia, serão as beneficiárias das tecnologias implementadas.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) representa a quarta maior fonte de energia e de hidratos de carbono ao nível mundial, a seguir ao arroz, açúcar e milho, e com uma produção anual mundial de cerca de 160 milhões de toneladas (Montagnac, Davis, Tanumihardjo, 2009). A África ocidental, a bacia do Congo, a América meridional tropical e o Sul-Este Asiático são as regiões onde a mandioca é produzida. A planta tem um elevado rendimento por hectare, é capaz de crescer em condições não ideais e pode ser mantido na planta nativa, dentro do solo, por alguns meses depois da maturação. Contudo, uma vez recolhida, a raiz tem que ser processada dentro de 3 dias para evitar perdas devidas ao deterioramento (Ukwuru, Egbonu, 2013).

O inhame (*Discorea* spp.) é umas das culturas principais na África subtropical, na América central e meridional, nas Caraíbas e outras ilhas do Pacífico (Ojoko and Gabriel, 2010). É o produto agrícola mais importantes nas regiões do Oeste africano em termos sociais, económicos e culturais e é a segunda fonte de energia mais consumida a seguir a mandioca. A Nigéria é de facto o primeiro produtor mundial do tubérculo (Foraminifera Market Resesarch, 2012). Existem actualmente muitas perdas pós-colheita devidas principalmente a um armazenamento inadequado, sendo o inhame um produto sazonal. O elevado teor de água, as enzimas e a microflora endógena são as causas do rápido deterioramento (Akangbe et al. 2012).

O deterioramento pós-colheita de mandioca e inhame representa uma perda importante para os produtores, em termos físicos e económicos, e que se reflecte no preço dos tubérculos para as empresas transformadoras. A escassa segurança alimentar dos derivados de mandioca e inhame é outro aspecto crucial e que tem também efeito nos rendimentos económicos das empresas produtoras.

O projecto GRATITUDE-FP7 (*Gains from Losses of Roots and Tubers Crops*) tem por objectivo diminuir as perdas físicas e económicas de mandioca e inhame, e de melhorar a qualidade e a segurança alimentar desde a colheita até o armazenamento dos produtos derivados. Os beneficiários das melhorias aportadas serão empresas familiares, tal como pequenas, medias e grandes empresas de países em via de desenvolvimento na África e na Ásia, nomeadamente Nigéria e Gana, e Tailândia e Vietnam. O projecto terá a duração de 3 anos, concluindo-se no final do ano de 2014.

MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira etapa para a valorização de mandioca e inhame foi a avaliação da segurança alimentar e das boas práticas de fabrico dos seus derivados. Foram avaliadas no total 85 empresas entre os países parceiros: 4 empresas familiares e 4 pequenas-médias empresas no Gana, 60 empresas familiares e 2 pequenas-médias empresas na Nigéria, 1 grande empresa e 1 pequena-média empresa na Tailândia, 12 empresas familiares e 1 pequena-média empresa no Vietnam. Foram avaliados 11 derivados de mandioca, nomeadamente *agbelima*, *gari*, *kokonte*, *lafun*, *fufu*, *chips* e *amido húmido*, produtos tradicionais, e *farinha de elevada qualidade*, *amido*, *tapioca* e *xarope de glucose*, produtos industriais. Relativamente ao inhame, o tubérculo é actualmente transformado apenas em Africa; foram avaliados 10 derivados, nomeadamente *gbodo*, *elubo*, *inhame parboiled*, *kokonte* e *wasawasa*, produtos tradicionais, e *farinha*, *farinha batida*, *fufu*, *inhame pré-cozido* e *chips*, produtos industriais. Foram avaliados no total 12 parâmetros: instalações, armazenamento, fornecedores, controlo de pragas, sistemas de limpezas, instalações para os operadores, fardamento, manutenção de equipamentos, qualidade da água, formação, pré-requisitos e HACCP (*Hazards Analysis and Critical Control Points*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada produto avaliado, seja este derivado de mandioca ou inhame, foram identificados os pré-requisitos, os possíveis perigos e os pontos críticos de controlo ao longo do processamento.

A avaliação permitiu concluir que os principais perigos são representados pelos cianetos (apenas para a mandioca), pelos metais pesados, pesticidas, patogénicos vegetativos, fungos, aflatoxinas e contaminação microbiana. Os derivados são produzidos por meio de uma serie de operações unitárias tal como lavagem, descascamento, maceração e/ou fermentação, raspagem e/ou corte, pressionamento, cozedura e/ou torrefacção, secagem, acondicionamento e armazenamento do produto final. Pré-requisitos terão que ser estabelecidos nas operações unitárias que requerem água e esta terá que ser potável e mantida limpa ao longo do processo. Pontos críticos de controlo deverão ser estabelecidos nas restantes operações.

Entre os quatro países avaliados (Nigéria, Gana, Tailândia e Vietnam) os melhores padrões de higiene e boas práticas de fabrico foram encontrados na Tailândia onde já existem grandes empresas com plano de HACCP implementado. Nos restantes países terão que ser

desenvolvidas medidas correctivas em todos os 12 parâmetros considerados para que se possa chegar a um nível de higiene e segurança alimentar de acordo com as normas do *Codex Alimentarius* universalmente reconhecidas (FAO/WHO, 1996). Limites críticos e planos de HACCP serão desenvolvidos para 2 empresas familiares e 2 pequenas-médias empresas de cada país parceiro, e os operadores serão treinados para que possam manipular os produtos de acordo com as boas praticas de higiene e de fabrico.

CONCLUSÃO

Existe um grande potencial para os derivados de mandioca e inhame, particularmente se se considera que não contêm glúten e poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de alimentos para pessoas intolerantes à proteína. Contudo, para que a distribuição destes produtos seja incrementada e alargada aos países ocidentais é necessário incrementar os padrões de higiene e segurança alimentar de acordo com as normativas existentes. O projecto GRATITUDE-FP7 contribuirá para este objectivo.

BIBLIOGRAFÍA

Akangbe JA, Oloruntoba OO, Ayanda IF, Komolafe SE (2012). An analysis of yam storage strategy to promote food security in asa local government area of Kwara state, Nigeria. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management EJESM* 5(4), 550-558.

FAO/WHO (1996). *Codex Alimentarius. Food Hygiene, Basic Texts*. Codex Alimentarius Commission, 2nd Ed. FAO, Rome, IT.

Foraminifera Market Research (2012). Instant pounded yam flour production in Nigeria. Available on-line at <http://www.foramfera.com/index.php/investment-opportunities-in-nigeria/item/124-instant-pounded-yam-flour-production-in-nigeria-how-viable?>

Montagnac, J.A., Davis, C.R. and Tanumihardjo, S.A. (2009). Processing techniques to reduce toxicity and antinutrients of cassava for use as a staple food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 7-27.

Ojokoh AO, Gabriel RAO (2010). Comparative study on the storage of yam chips (gbodo) and yam flour (elubo). *African Journal of Biotechnology* 9(21), 3175-3177.

Ukwuru MU, Egbonu SE (2013). Recent development in cassava-based products research. *Academia Journal of Food Research* 1(2), 1-13.

EXTRAÇÃO DE COLAGÉNIO, GELATINA E HIDROLISADOS DE COLAGÉNIO A PARTIR DE ESCAMAS DE SARDINHA E CAVALA REJEITADAS AO LONGO DO PROCESSO DE ENLATAMENTO

Vincenza Ferraro, Paula M.L. Castro e Manuela E. Pintado

CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

RESUMO

Ao longo do processo de enlatamento de sardinha e cavala são produzidas significativas quantidades de resíduos, equivalentes a cerca de 45% do peso do peixe, sendo representados por cabeças, vísceras, escamas e espinhas. A recuperação de compostos bioactivos a partir de alguns destes resíduos tem sido estudada, validada e em alguns caso já implementada ao nível industrial. Contudo, apenas alguns trabalhos científicos podem ser encontrados sobre a valorização de escamas.

Este resíduo foi processado para a recuperação de colagénio e seus derivados, nomeadamente gelatina e hidrolisados de colagénio. Colagénio de tipo I, característico dos tecidos animais semi-rígidos, foi extraído das escamas por meio ácido, ao longo de 5 dias e em condições de refrigeração a 4 °C. Um tratamento prévio foi efectuado para a remoção dos pigmentos prateados (guanina) e das proteínas não conectivas.

Os derivados do colagénio foram obtidos por meio de hidrólise térmica no caso da gelatina e hidrólise enzimática no caso dos péptidos de colagénio. Temperaturas entre 70 e 90 °C foram utilizadas para a extracção de gelatina; as protéases pepsina e tripsina foram aplicadas para a hidrólise da proteína nativa, tendo-se efectuado uma tratamento em frio (4 °C por 24 h) e um tratamento com calor (40 °C por 1 h). Os rendimentos de recuperação foram significativos (> 95%) e a hidrólise permitiu atingir pesos moleculares de bioactividade (< 3000 Da).

O colagénio e os seus derivados podem ser utilizados em muitas áreas tal como a biomédica, a cosmética, alimentar, farmacêutica. As escamas de sardinha e cavala podem ser consideradas uma fonte importante e praticamente sem custo para a recuperação destas moléculas bioactivas.

INTRODUÇÃO

A indústria agro-alimentar produz consideráveis montantes de resíduos sólidos bem como elevados volumes de efluentes com implicações significativas no ambiente, e cuja gestão se traduz em encargos ao nível do processo de fabrico, com repercussões directas no preço do produto final ao consumidor. A geração de resíduos por parte da indústria tem vindo a aumentar nas últimas décadas, devido não apenas à satisfação das crescentes necessidades alimentares, mas também à tendência por parte dos consumidores à aquisição de produtos prontos-a-comer. Relativamente ao pescado, foi estimado que só na União Europeia, os resíduos de processamento para fins de alimentação humana são de 5.2 milhões de toneladas por ano. Em Portugal, ca. 173000 toneladas são produzidas em cada ano pelas indústrias transformadoras de peixe, dos quais c. 63% têm origem nos processos de salga e filetagem, c. 31% no enlatamento, c. 2.7% nos processos de preservação e cerca de 3.5% nos processos de secagem e descongelamento. Frente ao elevado impacto ambiental e aos custos de tratamento e deposição dos resíduos gerados, tornou-se imperativo adoptar algumas medidas de minimização e valorização. A minimização dos resíduos na fonte e o encaminhamento de subprodutos para valorização, donde se obtêm novos produtos de valor acrescentado, ou se incrementam outros já existentes, são processos economicamente mais viáveis do que os tratamentos de fim de linha.

Os subprodutos da indústria de processamento de pescado contêm componentes de elevado valor acrescentado, tais como proteínas, óleos, açúcares, vitaminas, corantes ou antioxidantes, viabilizando alternativas de valorização que geram valor e, conseqüentemente, incrementam a competitividade das empresas (Ferraro *et al.*, 2010). Neste cenário, as escamas de sardinha e cavala podem ser consideradas uma fonte importante e praticamente sem custo para a recuperação de moléculas bioactivas como o colagénio e os seus derivados (Nagai e Suzuki, 2000). Estes compostos, recuperados de outras fontes, são já utilizados em muitas áreas tais como a biomédica, a cosmética, alimentar, farmacêutica e técnica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Escamas de sardinha e cavala foram obtidas pela empresa “A Poveira, Ltd.”, situada no concelho de Pova de Varzim, no distrito do Porto, em Portugal. As escamas são geradas antes de um processo rápido de salmoura, onde a pele dos peixes é raspada para eliminar aquele material semi-rígido. Colagénio de tipo I, característico dos tecidos animais semi-rígidos, foi extraído das escamas por meio ácido (Fluka; Porto, Portugal), ao longo de 5 dias e

em condições de refrigeração a 4 °C. Um tratamento prévio foi efectuado para a remoção dos pigmentos prateados (guanina) e das proteínas não conectivas. Os derivados do colagénio foram obtidos por meio de hidrólise térmica no caso da gelatina e hidrólise enzimática no caso dos péptidos de colagénio. Temperaturas entre 70 e 90 °C foram utilizadas para a extracção de gelatina; as protéases pepsina e tripsina (Sigma-Aldrich; Sintra, Portugal) foram aplicadas para a hidrólise da proteína nativa, tendo-se efectuados dois tratamentos diferentes: um tratamento em frio (4 °C por 24 h) e um tratamento com calor (40 °C por 1 h). Diferentes doses de enzimas foram utilizadas: 1:1, 1:3.5 e 1:6.7 colagénio:enzima (em peso). A inactivação ocorreu a 90 °C por 5 min. Electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) com o sistema Protean II, XL Cell (Bio-Rad) foi executada ao fim de determinar os pesos moleculares dos compostos obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As escamas são compostas por c. 46% de matéria seca. As proteínas representam c. 20%, enquanto os restantes 26% é constituído por minerais (hidroxiapatita e fosfatos de cálcio). Por meio do pré-tratamento foram eliminadas c. de 2% de proteínas, sendo estas não conectivas (osteocalcina, ostectina e proteoglicanos). A extracção de colagénio foi alcançada por tratamento ácido, tendo-se efectuados 2 ciclos de extracção, com um rendimento de c. de 47 % a cada ciclo. O colagénio recuperado é representado por colagénio solúvel (23% do total) e por colagénio insolúvel (77%) recuperado da solução ácida por meio de centrifugação. A molécula de colagénio de tipo I recuperado das escamas é constituída por uma hélice de tipo α (100 kDa) e uma de tipo β (200 kDa) tendo-se um peso complexo de 300 kDa (Figura 1, pista B).

Os hidrolisados de colagénio, obtidos a partir da adição de enzimas a solução ácida contendo o colagénio nativo, tiveram diferentes pesos moleculares dependendo da dosagem da enzima e das condições da hidrólise. O tratamento por calor (40 °C por 1 h) juntamente com a dosagem de 1:6.7 colagénio:enzima, permitiu obter péptidos com peso molecular menor (Figura 1), o que é desejável (Ikoma *et al.*, 2003; Zung-Ying *et al.*, 2011).

Relativamente à gelatina, esta foi obtida em forma de solução líquida com um título de c. 16 g/L de proteína. Na Figura 1, linhas C e D, é possível observar que a gelatina é uma mistura de cadeias peptídicas de diferentes pesos moleculares. Esta mistura gelifica entre 7 e 10 °C e pode ser conservada em pó após secagem por atomização.

CONCLUSÃO

O colagénio e seus derivados podem ser recuperados das escamas de sardinha e cavala rejeitadas ao longo do processo de enlatamento. Colegenases de tipo microbiano obtidas em laboratório serão futuramente aplicadas para a hidrólise de colagénio para alcançar um maior grau de hidrólise.

BIBLIOGRAFÍA

Ferraro, V., B. Cruz, I., Ferreira Jorge, R., Malcata, X.F., E. Pintado, M. & Castro M.L., P. (2010) Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products – A Review. *Food Research International* 43, 2221-2233.

Gimenez, B., Turnay, J., Lizarbe, M.A., Monteiro, P., Gómez-Guillen, M.C. (2005). Use of lactic acid for the extraction of fish skin gelatine. *Food Hydrocolloids* 19, 941-950.

Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 32, 199-204.

Nagai, T., Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins. *Food Chemistry* 68, 277-281.

Zung-Ying, L., Da, C., Yi-Chen, S., Ming-Yong, Z. (2011). Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzymes inhibitory peptides from sea cucumber collagen hydrolysates. *Journal of aquatic food product technology* 20(11), 222-232.

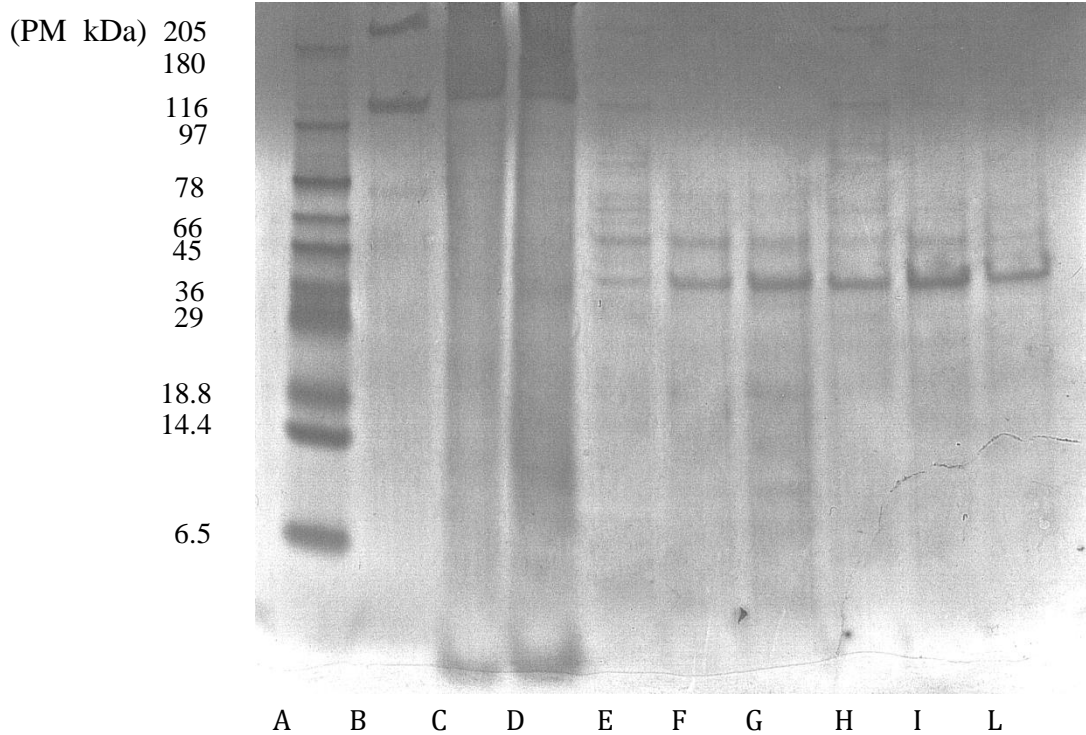


Figura 1. Electroferograma do colagénio, gelatina e hidrolisados de colagénio. Pista A marcador de proteínas; pista B colagénio; pista C gelatina depois a extracção; pista D gelatina depois da refrigeração; pista E hidrolisados de colagénio 40°C e 1 h, 1:1 colagenio:enzima; pista F hidrolisados de colagénio 40°C e 1 h, 1:3.5 colagenio: enzima; pista G hidrolisados de colagénio 40°C e 1 h, 1:6.7 colagenio:enzima; pista H hidrolisados de colagénio 4°C e 24 h, 1:1 colagenio:enzima; pista I hidrolisados de colagénio 4°C e 24 h, 1:3.5 colagenio:enzima; pista L hidrolisados de colagénio 4°C e 24 h, 1:6.7 colagenio:enzima.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-IPERTENSIVA DE MISTURAS DE AMINOACIDOS EXTRAIDAS DA ÁGUA DE SALGA DE BACALHAU (*GADUS MORHUA* L.)

Vincenza Ferraro, Sérgio C. Sousa, Paula M.L. Castro and Manuela E. Pintado

CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

RESUMO

Uma mistura de aminoácidos livres foi extraída de um resíduo agro-alimentar – a água de salga de bacalhau (*Gadus morhua* L.) – e foi avaliada em termos de actividade antioxidante e anti-hipertensiva com vista à sua utilização como ingrediente funcional. A mistura contém 15 g/L de cloreto de sódio (NaCl) e é constituída ao 47 % por creatina, seguida por ácido aspártico e ácido glutâmico, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, taurina, glicina e arginina.

A actividade antioxidante e anti-hipertensiva foram avaliadas para a mistura extraída tal qual da água de salga e que é hipertónica (15 g/L NaCl) com total de 3 g/L de aminoácidos, e para uma mistura isotónica contendo 9 g/L NaCl e 1.8 g/L de aminoácidos, obtida por diluição da hipertónica. ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid), DPPH (2,2'-Dyphenil-1-picryl-hyrazyl), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e o dano oxidativo no ADN (ácido desoxirribonucleico) foram os métodos utilizados para a actividade antioxidante. A actividade anti-hipertensiva foi avaliada através do grau de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).

As misturas de aminoácidos mostraram moderada actividade antioxidante e uma elevada actividade anti-hipertensiva. A extinção de radicais orgânicos peróxidos (ABTS^{•+} e DPPH[•]) foi relevante mesmo que lenta. Os valores de FRAP revelaram uma moderada capacidade de quelar iões de ferro. Não foi observado nenhum efeito pro-oxidante sobre o ADN; a actividade antioxidante não foi significativa, contudo a ruptura da molécula foi reduzida no caso da mistura hipertónica. Ambas as misturas mostraram uma elevada actividade anti-hipertensiva: IC₅₀_{ACE} 11 µg/ml para a mistura hipertónica e 7.4 µg/ml para a isotónica.

INTRODUÇÃO

A produção de bacalhau (*Gadus morhua* L.) salgado continua a ser relevante graças a dois factores: a grande apreciação entre os consumidores e a relativa simplicidade do processo de salga (Ferraro *et al.* 2011). Contudo, por cada tonelada de bacalhau a ser salgado, descabeçado, eviscerado e sem espinha, são gerados cerca de 200 L de água residual com uma concentração de NaCl de 260 g/L e uma carga orgânica de cerca de 10 g/L. Esta efluente é actualmente enviado para estações de tratamento de águas residuais (ETAR), representando um custo para as empresas produtoras e um problema ambiental naqueles casos em que é despejada sem qualquer medida prévia.

No entanto, a água de salga pode ser valorizada através da extracção da carga orgânica, sendo esta constituída por aminoácidos livres de prevalência condicionalmente essenciais (arginina, creatina e taurina – 54 % do total) e essenciais (fenilalanina, triptofano e metionina – 27 % do total) (Ferraro *et al.*, 2013).

O objectivo do estudo foi a caracterização da actividade biológica da mistura de aminoácidos extraídos da água de salga, no que diz respeito á actividade antioxidante e anti-hipertensiva, com vista a utilização como ingrediente funcional. Alguns dos aminoácidos presentes na mistura em questão, e considerados individualmente, têm demonstrado ter uma significativa actividade antioxidante *in-vivo*, desenvolvendo um papel muito importante na homeostase do corpo humano. Todos os aminoácidos essenciais são de facto oxidados ao longo do metabolismo; os aminoácidos que contém enxofre, como cistina, metionina e taurina, têm uma significativa actividade antioxidante devido ao grupo tiol, um modulador *redox* responsável pelo *turnover* das proteínas (Lawler *et al.*, 2002); estes aminoácidos são benéficos em todas as situações em que existe um dano oxidativo tal como isquemia, diabetes, catarata, neurodegeneração e danos causados por radiações (Atmaca, 2004; Meucci, Mele, 1997). Entre os aminoácidos não sulfurosos, a creatina é o maior antioxidante tendo a capacidade de inibir a peroxidação das proteínas das membranas celulares (Lawler *et al.*, 2002). Entre os aminoácidos aromáticos, o triptofano tem o maior poder antioxidante no que diz respeito à remoção de radicais peróxido, e é segundo apenas a cistina no que diz respeito aos aminoácidos alifáticos (Yu *et al.*, 2012). Aminoácidos como arginina, taurina e triptofano têm demonstrado uma significativa actividade anti-hipertensiva em humanos e animais. Estes aminoácidos são de facto capazes de atenuar reacções metabólicas associadas à hipertensão, incluindo a resistência à insulina, dano oxidativo, função renal alterada, aumento de produtos finais de glicosilação avançada, diminuição da disponibilidade de óxido nítrico (NO) e

alterações no sistema renina-angiotensina (Vasdev, Stuckless, 2010). Existe contudo limitada literatura científica sobre o efeito dos aminoácidos na tensão arterial.

MATÉRIAS E MÉTODOS

A água de salga de bacalhau foi obtida pela empresa *Pascoal & Filhos, SA*, Aveiro, Portugal. A mistura de aminoácidos foi obtida da água de salga de bacalhau como descrito por Ferraro *et al.* (2013); tal mistura é hipertónica e com um perfil de aminoácidos descrito na Tabela 1. A mistura isotónica foi obtida por diluição até se atingir uma concentração de NaCl de 9 g/L.

A actividade antioxidante foi avaliada por diferentes métodos: trocas de electrões, por meio de ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid), DPPH (2,2'-Dyphenil-1-picryl-hyrazyl) e FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power); troca de átomos, por meio de hidrogénio por ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Schlesier *et al.*, 2008), e por fim, dano oxidativo no ADN (ácido desoxirribonucleico) (Sigma-Aldrich; Sintra, Portugal) (Guimarães *et al.*, 2007). A actividade anti-hipertensiva foi avaliada através do grau de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Tierney, Croft, Hayes, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As misturas de aminoácidos mostraram moderada actividade antioxidante e uma elevada actividade anti-hipertensiva. A extinção de radicais peróxidos orgânicos, sejam eles catiónicos (ABTS^{•+}) ou neutros (DPPH[•]) foi relevante mesmo que lenta. Uma inibição de 49 e 52 % de ABTS^{•+} pela mistura hipertónica e isotónica respectivamente, foi observada depois de 23 h, no intervalo de estabilidade do ABTS (absorbância até 0.680). Uma inibição de 23 e 18 % DPPH[•] foi observada no caso da mistura hipertónica e isotónica respectivamente, após o mesmo tempo, em correspondência do qual ocorre uma diminuição da absorbância do DPPH de 10 %. Relativamente ao ORAC, a mistura isotónica teve um valor de 480 μmol Equivalentes de Trolox/L, (equivalente, por exemplo, a 1.4 vezes o ORAC do soro sanguíneo humano sem proteínas), enquanto a mistura hipertónica teve um valor de 23 μmol Equivalentes de Trolox/L. No que diz respeito à capacidade de quelar iões de ferro, as misturas tem demonstrado uma baixa actividade; se obtiveram valores similares para as duas misturas, 280 μM Fe²⁺ para a mistura hipertónica e 250 μM Fe²⁺ para a isotónica. Não foi observado nenhum efeito pro-oxidante sobre o ADN; a actividade antioxidante não foi

significativa, contudo a desnaturação da molécula foi reduzida no caso da mistura hipertónica devido ao maior teor de sal e provavelmente à maior concentração de taurina (Anastassopoulou, 2003). Ambas as misturas mostraram uma elevada actividade anti-hipertensiva (Morguerza *et al.* 2006): os valores de IC₅₀_{ACE} foram 11 µg/ml para a mistura hipertónica e 7.4 µg/ml para a isotónica.

CONCLUSÃO

As misturas de aminoácidos extraídos de um resíduo agro-alimentar, nomeadamente a água de salga de bacalhau, demonstram moderada actividade antioxidante e uma elevada actividade anti-hipertensiva *in-vitro*. Os resultados obtidos podem ser considerados significativos tendo também em conta que os aminoácidos têm elevada biodisponibilidade intestinal *in-vitro* (Ferraro *et al.*, 2013a). Estudos *em-vivo* e de testes de citotoxicidade serão futuramente realizados com vista à incorporação das misturas em alimentos funcionais.

BIBLIOGRAFÍA

- Anastassopoulou, J. (2003). Metal-DNA interactions. *Journal of Molecular Structure*, (651-653), 19-26.
- Atmaca, G. (2004). Antioxidant effect of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Medical Journal* 45(5), 776-788.
- Guimarães, C.M., Gião, M.S., Martinez, S.S., Pintado, A.I., Pintado, M.E., Bento, L.S., Malcata, F.X. (2007). Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against oxidative damage. *Food Chemistry and Toxicology* 72(1), 39-43.
- Ferraro V., Cruz B.I., Ferreira Jorge R., Pintado E. M., Castro M.L.P. Solvent extraction of sodium chloride from codfish salting processing wastewater. *Desalination* 287, 42–48 (2011).
- Ferraro, V., B. Cruz, I., Ferreria Jorge, R., E. Pintado, M., Castro M.L., P (2013). Recovery of free amino acids and muscle proteins from codfish (*Gadus murhua* L.) salting wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. Article in press. DOI 10.0002/jctb.4163.
- Ferraro, V., B. Cruz, I., Ferreria Jorge, R., Castro M.L., P, E. Pintado, M., (2013a). In-vitro intestinal absorption of free amino acids extracted from codfish salting (*Gadus murhua* L.) wastewater. *International Journal of Food Science & Technology*. Article in press. DOI 10.1111/ijfs.12269.
- Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W., Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 47-52.
- Meucci, E., Mele, M.C. (1997). Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Amino acids* 12, 373-377.

Morguerza, B., Ramos, M., Sanchez, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A., Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 16, 61-69.

Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R. (2008). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Reseach* 36(2), 177-187.

Tierney, M.S., Croft, A.K., Hayes, M. (2010). A review on antihypertensive and antioxidant activity in microalgae. *Botanica Marina* 53(5), 387-408.

Vasdev, S., Stuckless, J. (2010). Antihypertensive effects of dietary proteins and its mechanism. *International Journal of Angiology* 19(1), 7-20.

Tabela 1. Composição das misturas de aminoácidos

Composição (g/L)	Amostras	
	Mistura hipertónica	Mistura isotónica
Ácido aspártico	0.21	0.13
Ácido glutâmico	0.32	0.18
Arginina	0.05	0.03
Creatina	1.41	0.84
Glicina	0.05	0.03
Lisina	0.25	0.11
Metionina	0.17	0.10
Fenilalanina	0.28	0.17
Taurina	0.16	0.10
Triptofano	0.13	0.08
NaCl	15	9

ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE O POLIFENOL ÁCIDO ROSMARINICO E AS PROTEÍNAS DE LEITE BOVINO

Vincenza Ferraro, Ana Raquel Madureira, Ana Gomes e Manuela E. Pintado

CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

SUMÁRIO

O ácido rosmarinico (AR) é um polifenol com uma significativa actividade biológica, tal como actividade antioxidante e anti-inflamatória, enquanto composto puro, tornando-o interessante para incorporação em matrizes alimentares e desenvolvimento de formulações nutracêuticas. Contudo, os compostos fenólicos interagem facilmente com proteínas formando complexos estáveis, o que pode resultar numa perda da actividade biológica bem como diminuição da sua biodisponibilidade.

O objectivo desta investigação foi a avaliação das interacções entre o AR e as principais proteínas de uma matriz alimentar láctea, nomeadamente o leite bovino. O estudo foi conduzido preparando soluções modelos de AR e cada proteína de leite bovino, seja esta em fase dispersa (caseínas) ou do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lactoferrina). As concentrações utilizadas foram aquelas normalmente encontradas no leite bovino no caso das proteínas, e no extracto aquoso se salva (*Salvia Officinalis*) no caso do AR (0.1 mg/mL), visando a futura incorporação do extracto. Para o estudo das interacções foram utilizados métodos de espectroscopia, cromatografia, análise de tamanho de partícula, espalhamento dinâmico de luz, e calorimetria diferencial de varrimento. As interacções dos sistemas modelos de AR e proteínas de leite foram estudadas ao pH neutro (em água) e a um pH ácido de 4.5 (em tampão acetato) ao longo do tempo de armazenamento à temperaturas de refrigeração (4°C), nomeadamente ao tempo 0, 3 e 24 horas.

Os resultados mostraram a ocorrência de interacções de tipo não-covalente, e que são mais fortes no caso de proteínas dispersas. Foi possível verificar a ocorrência de formação de complexos de diferentes tamanhos dependendo da estrutura primária e secundária da proteína e do pH. As interacções demonstraram ser reversíveis, ou seja de tipo dipolo-dipolo e de interacção hidrofóbica.

INTRODUÇÃO

Os polifenóis são componentes naturais de uma ampla variedade de plantas e são conhecidos como metabólitos secundários, ou seja compostos orgânicos que não estão directamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos mas que a longo prazo podem afectar a sua sobrevivência e algumas funcionalidades (Le Bourvellec, Renard, 2012). O ácido rosmarinico (AR) é um polifenol com uma significativa actividade biológica, tal como a actividade antioxidante e anti-inflamatória, enquanto composto puro. Existe contudo a necessidade de avaliar as referidas propriedades quando o polifenol, ou até um extracto natural rico em AR, é introduzido numa matriz alimentar, por exemplo leite e/ou seu derivados. A formação de complexos estáveis entre o polifenol e os constituintes de uma matriz alimentar, por exemplo proteínas lácteas, pode levar à uma diminuição da capacidade antioxidante e anti-inflamatória pela diminuída quantidade de polifenol livre (Bartolomé, Estrella, Hernández, 2000; Rawel, Kroll, Hohl, 2001).

O AR foi seleccionado entre os vários compostos fenólicos devido à sua presença na família das plantas *Lamiáceas*, cuja utilização é muito difundida e economicamente importante pela sua aplicação na culinária, na cosmética e no campo terapêutico. Rosmarinho, alecrim, salva, menta, orégão, manjeriço, tomilho, hortelã e lavândula são alguns exemplos de plantas *Lamiáceas* que contem ácido rosmarinico em quantidades significativas.

O objectivo deste estudo foi a avaliação as interacções entre o AR e as proteínas de leite bovino com vista ao desenvolvimento de produtos lácteos nutracêuticos.

MATERIAS E METODOS

As proteínas de leite bovino α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lactoferrina, α -s1-caseína, β -caseína e κ -caseína, e o ácido rosmarinico foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal). As concentrações utilizadas foram 1 mg/mL α -lactoalbumina, 3 mg/mL β -lactoglobulina, 0.1 mg/mL lactoferrina, 15 mg/mL α -s1-caseína, 9 mg/mL β -caseína, 3.5 mg/mL κ -caseína, e 0.1 mg/mL AR. O estudo foi conduzido utilizando soluções modelos de AR e cada proteína, a um pH neutro, utilizando água desionizada, e a um pH de 4.5 utilizando um tampão acetato (Sigma-Aldrich).

Diferentes técnicas foram aplicadas para o estudo das interacções: cromatografia, espectroscopia, análise de tamanho de partícula por meio de espalhamento dinâmico de luz

(DLS), e calorimetria diferencial de varrimento (DSC). No âmbito das técnicas cromatográficas foi utilizada a cromatografia líquida de elevada eficiência com detecção no campo ultravioleta/visível por meio do equipamento Beckman&Coulter 168 series HPLC system, Photo Diode Array (PDA 190–600 nm) (Beckman&Coulter; Carnaxide, Portugal). No âmbito das técnicas espectroscópicas, foi utilizado o ensaio colorimétrico por ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Merck; Lisboa, Portugal) e a densidade óptica, por meio do equipamento UV mini 1240 Spectrophotometer (Shimatzu; Carnaxide, Portugal), e o FTIR (Infravermelho por transformada de Fourier) com o equipamento MB3000 (ABB, Carnaxide, Portugal). A análise de tamanho de partícula foi realizada com o equipamento NanoBrok 90Plus Particle Size Analyser (BrookHaven; Carnaxide, Portugal). Ensaios de calorimetria diferencial de varrimento foram efectuados com o equipamento DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH; Parolab, Porto, Portugal).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram a ocorrência de reacções de complexação entre AR e proteínas de leite. A complexação ocorreu por meio de ligações de tipo físico entre os dois compostos, nomeadamente interacções hidrofóbicas e interacções dipolo-dipolo; tais ligações se manifestam a cargo dos aminoácidos hidrofóbicos e/ou polares das proteínas e o AR, por sua vez complexivamente hidrofóbico e com extremidades polares quais os grupos hidroxilo (OH) (Siebert, Troukhanova, Lynn, 1996). Estas interacções foram tanto mais significativas quanto maior for o teor de aminoácidos hidrofóbicos e/ou apolares nas proteínas, e/ou quanto maior a razão entre o ácido rosmarinico e a proteína em questão.

O estudo da actividade antioxidante (ABTS) demonstrou que há uma significativa diminuição de AR livre em solução após a adição da proteína. No caso da mistura de ácido rosmarinico com uma proteína do soro, a β -lactoglobulina por exemplo, há uma diminuição da actividade antioxidante igual a 16 % logo no início e igual ao 21 % após 4 dias. No caso da mistura de ácido rosmarinico com uma proteína em fase dispersa, a β -caseína por exemplo, há uma diminuição da actividade antioxidante de 32 % logo no início, a qual se mantém aproximadamente constante ao longo de 4 dias.

O estudo da densidade óptica também demonstrou a ocorrência de interacções entre AR e proteínas de leite. Os valores de DO para os complexos AR-proteína foram de facto significativamente maiores dos valores de DO para as proteínas e para o AR, mesmo aos 300

nm onde a absorbância do fenol é máxima. O resultado indica portanto que houve formação de complexos de ácido rosmarinico na proteína.

Os resultados da análise do tamanho de partículas (DLS) permitiram igualmente de concluir que há formação de complexos entre o polifenol e as proteínas. Dependendo da estrutura primária da proteína, para o complexo proteína-AR obtiveram-se tamanhos diversos, mas diferentes tanto do tamanho da proteína como do polifenol livre. As interações hidrofóbicas são responsáveis da estrutura secundária, terciária e quaternária de uma proteína, definindo o grau de expansão ou de aglomeração da mesma. Quanto maiores as interações hidrofóbicas tanto maior o grau de aglomeração (von Staszewski *et al.* 2012). No caso da α -lactoalbumina, por exemplo, o tamanho do complexo foi cerca de 3.5 vezes menor do tamanho do AR e cerca de 3 vezes menor do tamanho da proteína. Ao contrário, no caso da β -lactoglobulina, o tamanho do complexo foi 4 vezes maior do tamanho do AR e do tamanho da proteína, indicando interações de tipo dipolo-dipolo.

As conclusões sobre a existência de interações a um pH normal foram confirmadas para um pH de 4.5. Ao pH 4.5 o tamanho dos compostos, seja do polifenol sejam das proteínas, é maior do que ao pH normal; por sua vez o tamanho dos complexos também foi maior (Figura 1).

A existência de ligações de tipo físico entre o polifenol e o AR foi confirmada por meio de HPLC-PDA, FTIR e DSC. As interações são anuladas quando um complexo proteína-polifenol é feito passar por uma coluna cromatográfica de adsorção (interações hidrofóbicas e dipolo-dipolo) por meio de uma fase móvel ácida (pH 2.5), tipicamente usada para a detecção de polifenólicos. O AR, de facto, se dissocia do complexo, tendo mais afinidade pela fase estacionária hidrofóbica. A análise FTIR permitiu chegar ao mesmo resultado. Esta técnica é baseada na absorbância de radiação IR (infravermelha) por parte de ligações covalentes (Kaldas *et al.* 2005) sendo que ligações de tipo físico não podem ser “registadas”. Os espectros FTIR dos complexos polifenol-proteína foram idênticos aos espectros FTIR das proteínas, não tendo sido registada nenhuma ligação de tipo covalente (tipicamente representada por um pico num espectrograma) com o polifenol. A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) também confirmou a ocorrência de ligações de tipo físico. Quando esta técnica é aplicada às proteínas, é possível registar desnaturações originadas pela sua estrutura secundária, a qual é determinada por ligações hidrofóbicas e ligações hidrogénio, onde estas ligações determinam a forma geométrica da proteína (Xiao *et al.* 2011). A entalpia de desnaturação dos complexos foi mais elevada (em valor absoluto) do que a entalpia da desnaturação das proteínas, o que indica a presença de um maior número de

ligações hidrofóbicas quando o polifenol se encontra ligado à proteína (Prigent *et al.* 2003). O calor de desnaturação dos complexos foi maior a pH 4.5, indicando um maior número de ligações entre o polifenol e as proteínas.

CONCLUSÃO

O polifenol ácido rosmarinico interage com as proteínas de leite bovino sejam estas em fase dispersa ou solúveis, e as ligações são de tipo físico e reversíveis. Sendo um sistema modelo, no qual se estudaram os compostos puros, de futuro serão estudados modelos mais complexos constituídos pela mistura das várias proteínas, bem como a própria matriz láctea inteira. Igualmente os extractos ricos em AR, como os extractos de ervas medicinais *Salvia officinalis* poderão ser estudados e comparados com o modelo AR..

BIBLIOGRAFÍA

- Bartolomé, B., Estrella, I., Hernández. M.T. (2000). Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *Journal of Food Science*, 65 (4), 617-621.
- Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J.G., Haslam, E., Davies, A.P., Williamson, M.P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1593-1601.
- Kaldas, M.I., Walle, U.K., Van der Woude, H., McMillan, J.M., Walle, T. (2005). Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4194-4197.
- Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C. (2012). Interaction between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 213-248.
- Prigent, S.V.E., Gruppen, H., Visser, A.J.W.G., van Koningsveld, G.A., de Jong, G.A.H., Voragen, A.G.J. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-O-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic Acid) on the heat of denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5088-5095.
- Rawel, H.M., Kroll, J., Hohl, U.C. (2001). Model studies on reaction of plant phenols with whey proteins. *Food*, 45, 72-81.
- Rawel, H.M., Meidtner, K., Kroll, J. (2005). Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4228-4235.
- Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., Lynn, P. Y. (1996). Nature of polyphenols-proteins interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 80-85.
- von Staszewski, M., Jara, F.L., Ruiz, A.L.T.G., Jagus, R.J., Carvalho, J.E., Pilosof, A.M.R. (2012). Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropéptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. *Journal of Functional Food*, 4, 800-809.

Xiao, J., Mao, F., Yang, F., Zhao, Y., Zhang, C., Yamamoto, K. (2011). Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspect. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 1-9.

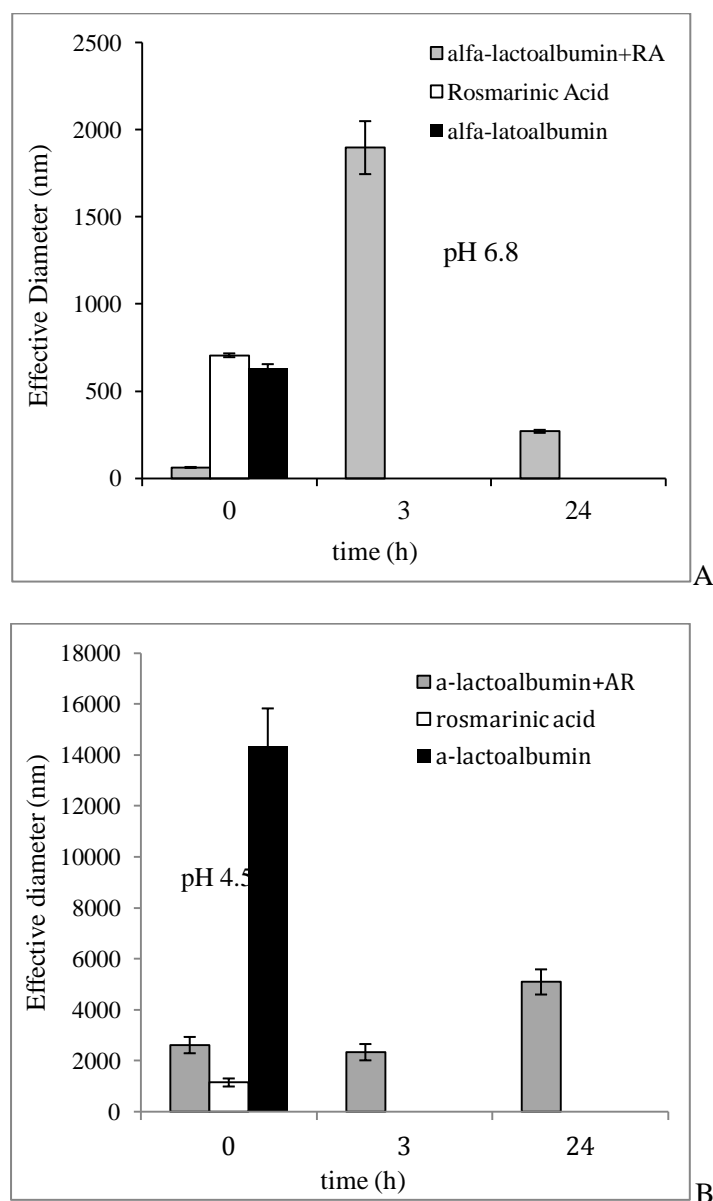


Figura 1. Diâmetro dos complexos de ácido rosmarinico e α -lactoalbumina a pH neutro (A) e a pH ácido (B)

CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Patrícia Érica Fernandes, MS em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

Nélio José de Andrade, DS em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

Maíra Paula da Silveira, Graduanda em Ciência e Tecnologia de Laticínios, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

Daiene Silva da Costa, Graduanda em Ciência e Tecnologia de Laticínios, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

Patrícia Campos Bernardes, DS em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil;

João Paulo Natalino de Sá, MS em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

INTRODUÇÃO

Nanopartículas de prata (AgNPs) têm despertado grande interesse devido à sua aplicação potencial como antimicrobiano alternativo no combate de estirpes resistentes. Além disso, as AgNPs têm sido aplicadas em diversas áreas para prevenir colonização bacteriana em superfícies de prótese, cateteres, filtros de água e na indústria de alimentos em superfícies de aço inoxidável. Compostos à base de prata foram explorados por séculos devido às suas propriedades medicinais e foram utilizados como remédios populares no tratamento de tétano e reumatismo no século XIX e no tratamento de resfriados e gonorreia antes da chegada dos antibióticos no início do século XX (MIRSATTARI et al., 2004).

O desenvolvimento de produtos que contém AgNPs está se expandindo. Atualmente, as AgNPs são encontradas em roupas, embalagens para alimentos, pomadas, curativos, dentre outros itens (LARA et al., 2010).

A atividade antimicrobiana das AgNPs é influenciada pelo tamanho e formato das partículas (MORONES et al., 2005 e PAL et al., 2007). Assim, AgNPs com tamanho reduzido (aproximadamente 5 nm) e sem agregação são preferíveis. Outro fator importante é a estrutura cristalina que as AgNPs apresentam. Estudos mostram que, quanto maior o número de facetas nas partículas, maior a sua reatividade (MORONES et al., 2005).

De acordo com Martínez-Castañón et al (2008), AgNPs menores são mais eficientes devido à maior área superficial por volume, o que permite melhor contato com as células microbianas. Esses autores avaliaram o efeito antimicrobiano de AgNPs de três tamanhos diferentes (7 nm, 29 nm e 89 nm). De acordo com os resultados obtidos, os valores de CMI

(Concentração Mínima Inibitória) para *S. aureus* e *E. coli* aumentaram com o aumento do tamanho das AgNPs, sendo que as de 7 nm apresentaram os melhores efeitos antimicrobianos.

O objetivo foi avaliar a CMI e concentração mínima bactericida (CMB) de AgNPs sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

MATERIAL E MÉTODOS

As AgNPs foram sintetizadas pelo método Turkevich, em que, 100 mL da solução aquosa de AgNO_3 1mM foram aquecidos em um balão de três-pescoço e, após 2 min em ebulição, adicionaram-se 10 mL da solução aquosa de citrato de sódio 36 mM. O aparecimento da cor amarela indicou a formação das AgNPs. O tamanho das AgNPs sintetizadas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Zetasizer, Malvern nanoZS) e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (TECNAI G2-20-FEI, 2006). A CMI foi determinada sobre as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e sobre as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 pela técnica da macrodiluição em tubos de acordo com as normas da CLSI (2003). Foram feitas diluições seriadas de duas vezes em caldo Mueller-Hinton (Himedia®) em que a concentração de AgNPs variou de 50 $\mu\text{g/mL}$ a 0,097 $\mu\text{g/mL}$. Os tubos foram incubados a 37° C por 24 h e a turbidez avaliada visualmente. A menor concentração que inibiu o crescimento microbiano foi considerada a CMI. Os tubos que não apresentaram turbidez foram selecionados para determinação da CMB. Após centrifugação (4000 x g, 5 min, 4 °C) as células foram lavadas em solução salina 0,85 % por duas vezes e ressuspendidas em 0,1 mL da mesma solução. Após homogeneização em vortex todo o volume foi inoculado em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas a 37° C por 24 h e a presença de colônias foi verificada. A menor concentração em que não houve crescimento de colônias foi considerada a CMB. O experimento foi realizado em três repetições.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O diâmetro médio das AgNPs por DLS foi de 3,4 nm, este resultado foi semelhante ao encontrado por MET, em que, o diâmetro das nanopartículas variou entre 2 a 6 nm (Figura 1).

Figura 1. Fotomicrografia de nanopartículas de prata obtida por microscopia eletrônica de transmissão.

A CMI e a CMB das NPT foram de 6,25 µg/mL e de 25 µg/mL, respectivamente, para *E. coli* e *P. aeruginosa* (Tabela 1). Para *S. aureus* e *E. faecalis* a CMI foi de 50 µg/mL, entretanto, não foi verificado efeito bactericida sobre estas bactérias, nas concentrações estudadas.

Tabela 1: Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de nanopartículas de prata sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Bactérias	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	50	.*
<i>E. faecalis</i>	50	-
<i>E. coli</i>	6,25	25
<i>P. aeruginosa</i>	6,25	25

*Não foi observado efeito bactericida na maior concentração testada (50 µg/mL)

Fayaz et al. (2009) também encontraram menores valores da CMI para bactérias gram-negativas: 30 µg/mL, 35 µg/mL, 80 µg/mL e 65 µg/mL para *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *S. aureus* e *Micrococcus luteus*, respectivamente. A CMI sobre *P. aeruginosa* foi de 2 µg/mL em estudo realizado por KORA et al (2011), esse valor está próximo ao encontrado neste trabalho.

Tem sido relatado que as AgNPs apresentam maior efeito bactericida sobre bactérias gram-negativas do que sobre bactérias gram-positivas, em razão da diferença estrutural da parede celular dessas bactérias. Bactérias gram-negativas apresentam uma fina camada de peptídeoglicano (~7-8nm) entre a membrana citoplasmática e a membrana externa. Já as bactérias gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptídeoglicano (~ 20-80nm) que confere rigidez à célula e dificulta a penetração das nanopartículas (SHRIVASTAVA et al 2007).

Entretanto, os fatores que afetam a atividade bactericida das AgNPs sobre células bacterianas ainda não foram completamente elucidados.

CONCLUSÃO

O efeito antimicrobiano das AgNPs foi mais pronunciado sobre as bactérias gram-negativas do que sobre as gram-positivas avaliadas nessa pesquisa. Essa informação é importante uma vez que estirpes de *E. coli* estão associadas a diversos surtos de origem

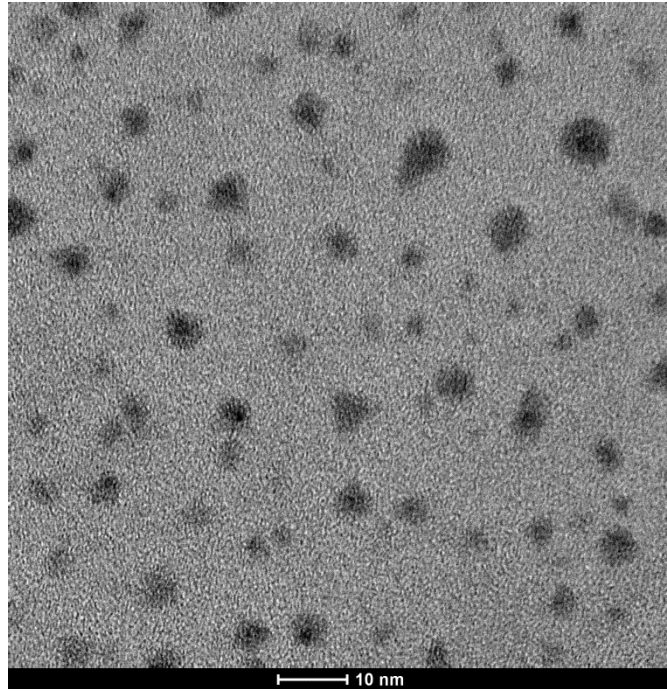
alimentar. Além disso, *E. coli* está entre os micro-organismos mais frequentemente isolados no ambiente hospitalar, sendo um dos principais causadores de infecções urinárias, septicemias e meningites bacterianas em neonatais. Já *P. aeruginosa*, apesar de não causar doenças em indivíduos saudáveis, é patógeno oportunista em humanos imunocomprometidos e apresenta elevada resistência a múltiplos antibióticos. Além disso, produzem toxinas, enzimas extracelulares, exopolissacarídeos e formam biofilmes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o CNPq e a Fapemig pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS

- Fayaz, A. M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P. T.; Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 2009.
- Kora, A.J.; Arunachalam. J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.27, p.1209-16, 2011.
- Lara, H.H.; Ayala-Nunez, N.V.; Ixtapan-Turrent, L.; Rodriguez-Padilla, C: Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, v.8, 2010.
- Martínez-Castañón, G. A.; Niño-Martínez, N; Martínez-Gutierrez, F; Martínez-Mendoza, J. R; Facundo Ruiz. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticles Research*, v. 10, p. 1343-48, 2008.
- Mirsattari, S. M.; Hammond, R. R.; Sharpe, M. D.; Leung, F.; Young, G. B. Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver. *Neurology*, v. 62, p. 1408 - 10, 2004.
- Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Rami Rez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, p. 2346–53, 2005.
- Pal, S.; Tak, Y.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1712–20, 2007.
- Shrivastava, S.; Bera, T; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 18, p. 1-9, 2007.



CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PELÍCULAS COMESTIBLES OBTENIDAS A PARTIR DE CÁSCARA DE MANGO

Argüelles-Piña J.A.¹, Olvera-Maldonado G.¹, Gómez-López E.¹, Martín-Belloso, O.², Welti-Chanes J.¹, Valdez-Fragoso A.¹, Mújica-Paz H^{1*}.

¹Escuela de Biotecnología y Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada Sur 2501, Col. Tecnológico, Monterrey N.L., CP 64849, México

* h.mujica@itesm.mx

²Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida, Rovira Roure 191, Lleida 25198, España.

INTRODUCCIÓN

El procesamiento industrial del mango genera como principales desechos el hueso y la cáscara, la cual representa 15-20% de la fruta (Beerh et al., 1976). La cáscara de mango contiene vitaminas C y E, fibra dietética, carotenoides y compuestos fenólicos (Ajila et al., 2007). Se ha reportado que los compuestos fenólicos ayudan a prevenir enfermedades como cáncer y del corazón (Serafini et al., 1998; Cao y Cao, 1999). Además, como antioxidantes naturales, pueden retrasar la degradación oxidativa de lípidos y así conservar la calidad de ciertos alimentos (Kähkönen et al., 1999). La cáscara de mango contiene también pectina que puede utilizarse para la formación de películas y recubrimientos comestibles (Berardini et al., 2005; Moalemiyan et al., 2012).

En este estudio se determinó el efecto de las condiciones de elaboración de películas comestibles obtenidas a partir de cáscara de mango en la capacidad antioxidante y el contenido de fenólicos totales de las películas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se emplearon cáscaras de mango variedad Ataulfo obtenidos en un mercado local en Monterrey, N. L., México. Las cáscaras se escaldaron con microondas (1 s / 2 g de cáscara con 1 KW) (MS1149CS, LG, China), después se dejaron enfriar a temperatura.

Preparación de las películas

De las cáscaras de mango se extrajo la pectina, se determinaron los sólidos de los extractos y formaron las películas de acuerdo al procedimiento descrito por Argüelles, et al. (2013).

Determinación de fenólicos totales

Los fenólicos totales de las películas se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) adaptado a un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, EUA). Se analizaron diluciones de las películas en agua. A cada pozo se añadieron 40 µl de dilución de película, 80 µl de agua y 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.4 M. Se incubó 6 min a temperatura ambiente y se añadieron 30 µl de carbonato de sodio (DEQ, Monterrey, N. L., México) 0.2g/l. Se incubó durante 2 h y se midió la absorbancia a 765 nm. Las mediciones de las muestras se compararon contra una curva estándar de ácido gálico (CTR Scientific, Monterrey, N.L., México) y el contenido de fenólicos totales se reportó como equivalentes de ácido gálico (EAG).

Determinación de capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC) (Huang et al., 2002) con un lector de microplatos acoplado a inyector para manejo de reactivos (Synergy HT, BioTek, EUA). Se disolvieron las películas en solución tampón de fosfatos a pH 7.4 y se hicieron diluciones subsecuentes. Se añadieron a cada pozo 25 µl de muestra y 150 µl de solución de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1 µM. Las mezclas se incubaron durante 30 min y después se añadieron 25 µl de solución de AAPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 153mM. Se midió fluorescencia cada 2 min durante 1 h con longitud de onda de emisión de 485 ± 10 nm y longitud de onda de excitación de 528 ± 10 nm. Las mediciones y adición de reactivos se llevaron a cabo a 37°C. Se calculó el área bajo la curva de las lecturas y, utilizando una curva estándar de Trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se calcularon equivalentes de Trolox (ET) en las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenólicos totales en películas

La Tabla 1 muestra el contenido de fenólicos de las películas producidas. Se obtuvieron contenidos de fenólicos totales en el rango de 77.34-162.8 mg EAG /g (bs). Las películas obtenidas a partir de cáscaras sin pulpa tuvieron aproximadamente 1.6 veces más concentración de fenólicos que las películas obtenidas a partir de cáscaras con pulpa. Masibo y He, (2008) publicaron que la cáscara de mango posee una mayor concentración de fenólicos que la pulpa, lo cual explica la diferencia observada en las películas. Las películas con 15% de glicerol tuvieron menor contenido de fenólicos que aquellas con 5% de glicerol,

lo que se puede atribuir al efecto diluyente del glicerol en los compuestos fenólicos en las películas. Finalmente, la temperatura de secado no tuvo efecto significativo ($p>0.05$) en el contenido de fenólicos de las películas. La temperatura moderada (40 °C) utilizada para disminuir el tiempo de secado no provocó degradación de los compuestos fenólicos de las películas.

Capacidad antioxidante de las películas

La Tabla 2 muestra los valores ORAC de las películas estudiadas. La capacidad antioxidante de las películas fue mayor en las que contenían más fenólicos totales. La capacidad antioxidante de las películas fue de 335 a 841 $\mu\text{mol ET/g}$ (bs). Las películas provenientes de cáscara sin pulpa tuvieron aproximadamente 1.8 veces más capacidad antioxidante que aquellas películas provenientes de cáscara con pulpa. Las películas con 15% de glicerol tuvieron menor capacidad antioxidante que aquellas con 5%. El glicerol diluyó los compuestos antioxidantes en las películas. No se encontró efecto significativo ($p>0.05$) de la temperatura de secado en la capacidad antioxidante de las películas.

CONCLUSIONES

Las películas obtenidas a partir de cáscara de mango conservaron compuestos activos propios de la cáscara. La capacidad antioxidante de las películas fue mayor a mayor concentración de fenólicos totales. La ausencia o presencia de pulpa en la extracción fue el factor con mayor influencia en concentración de compuestos activos en las películas. Las películas obtenidas a partir de cáscaras sin pulpa presentaron una mayor concentración de antioxidantes que aquellas obtenidas a partir de extracción con pulpa. La temperatura de secado no afectó significativamente a la concentración de los compuestos analizados, pero la temperatura de 40 °C disminuyó considerablemente el tiempo de obtención de las películas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajila, C., Bhat, S., & Prasada Rao, U. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102, 1006–1011.
- Argüelles-Piña JA, V.-F. A.-M.-C.-P. (2014). Películas biodegradables obtenidas a partir de pectina de cáscara de mango. *Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos*. Valencia.
- Beerh, O., Raghuramaiah, B., Krishnamurthy, G., & Giridhar, N. (1976). Utilization of mango waste: recovery of juice from waste pulp and peel. *Journal of Food Science and Technology*, 13(23), 138-141.

- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol o- and xanthone c-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1563–1570.
- Cao, Y., & Cao, R. (1999). Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, 398(6726), 381.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962.
- Masibo, M., & He, Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 309-319.
- Moalemiyan, M., Ramaswamy, H. S., & Maftoonazad, N. (2012). Pectin-based edible coating for shelf-life extension of Ataulfo mango. *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 572–600.
- Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 1003-1007.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Tabla 1. Contenido de fenólicos totales de películas de pectina de cáscara de mango (mg de equivalentes de ácido gálico por gramo, base seca)

Tratamiento	Contenido de fenólicos
P0G5T40	161.6 ± 6.4
P0G5Tamb	162.8 ± 6.3
P0G15T40	136.0 ± 4.1
P0G15Tamb	145.2 ± 5.6
P1G5T40	104.9 ± 5.9
P1G5Tamb	106.6 ± 3.4
P1G15T40	91.4 ± 3.4
P1G15Tamb	77.3 ± 2.4

P0 - extracción sin pulpa; P1 - extracción con pulpa; G5 - 5% de glicerol en película seca; G15 - 15% de glicerol en película seca; T40 - secado a 40°C; Tamb - secado a temperatura ambiente

Tabla 2. Valores ORAC de películas de pectina de cáscara de mango (µmol de equivalentes de Trolox por gramo, base seca)

Tratamiento	ORAC
P0G5T40	837 ± 24
P0G5Tamb	841 ± 29
P0G15T40	744 ± 30
P0G15Tamb	738 ± 25
P1G5T40	516 ± 28
P1G5Tamb	494 ± 16
P1G15T40	447 ± 15
P1G15Tamb	335 ± 14

P0 - extracción sin pulpa; P1 - extracción con pulpa; G5 - 5% de glicerol en película seca; G15 - 15% de glicerol en película seca; T40 - secado a 40°C; Tamb - secado a temperatura ambiente

PELÍCULAS BIODEGRADABLES OBTENIDAS A PARTIR DE PECTINA DE CÁSCARA DE MANGO

Argüelles-Piña J.A.¹, Olvera-Maldonado G.¹, Martin-Belloso, O.², Welti-Chanes J.¹, Valdez-Fragoso A.¹, Mújica-Paz H^{1*}.

Escuela de Biotecnología y Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada Sur 2501, Col. Tecnológico, Monterrey N.L., CP 64849, México

* h.mujica@itesm.mx

²Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida, Rovira Roure 191, Lleida 25198, España.

INTRODUCCIÓN

La cáscara es uno de los principales desechos del procesamiento industrial del mango y representa 15-20% de la fruta (Beerh et al., 1976) y es una fuente de pectina, la cual puede utilizarse para la formación de películas y recubrimientos comestibles (Berardini et al., 2005; Moalemiyan et al., 2012). La pectina está conformada principalmente por residuos de ácido galacturónico (AGal) parcialmente esterificados con metanol. El porcentaje de residuos de AGal esterificados del total de residuos de AGal, conocido como grado de esterificación (GE), tiene una gran influencia en el comportamiento reológico de la pectina. La pectina puede obtenerse por extracción ácida de materiales vegetales. La fuente de pectina, así como las condiciones de extracción y tratamientos subsecuentes, determinan las características de la pectina, incluyendo su GE (BeMiller, 2008).

En este estudio se desarrolló un proceso para la obtención de películas comestibles a partir de cáscara de mango con y sin pulpa. Asimismo, se caracterizó la pectina obtenida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se emplearon cáscaras de mango variedad Ataulfo obtenido en un mercado local en Monterrey, N. L., México. Las cáscaras se trataron con microondas (1 s / 2 g de cáscara con 1 KW) (MS1149CS, LG, China), después se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron a -15°C.

Extracción de pectina

La extracción de pectina se llevó a cabo en cáscaras molidas (con o sin pulpa) en una relación cáscara:agua destilada de 1:4 y 1:6, en los casos de cáscaras con pulpa y sin pulpa,

respectivamente. Las suspensiones se ajustaron a pH 2 (Orion 3 Star, ThermoScientific, Singapur) con ácido clorhídrico (DEQ, Monterrey, N. L., México) y se calentaron y agitaron en planchas de agitación magnética (Cimarec ThermoScientific, China) durante 2.5 h, hasta alcanzar 80°C. Después se centrifugaron las suspensiones a 3000 g durante 1 h (Allegra X-12, Beckman Coulter, EUA) y se recuperó el sobrenadante.

Preparación de mezclas filmógenas y formación de películas

Para añadir cantidades de glicerol como plastificante, fue necesario conocer la masa de sólidos totales de los extractos. Se secaron muestras de extractos durante 6 h a 100 °C en cápsulas de aluminio con arena, pesándolas antes y después del secado, y se calcularon los porcentajes de sólidos totales en las muestras.

Se añadió glicerol a los extractos para obtener una concentración en las películas de 5 o 15% (bs). Posteriormente, se vertieron 10 ml de cada mezcla filmógena en cajas Petri. Las mezclas se secaron a temperatura ambiente durante 5 días o a 40 °C durante 16 h.

Purificación de pectina y determinación del rendimiento de extracción

La pectina en los extractos se precipitó añadiéndole dos volúmenes de etanol (DEQ, Monterrey, N. L., México). El precipitado se filtró con papel Whatman No. 1 y se lavó con etanol 80% (p/p) acidificado y a pH natural. La pectina lavada se secó a 40°C durante 16 horas y a 70°C, -85 KPa, durante 10 h. El rendimiento se calculó como el porcentaje de pectina de la masa seca de las cáscaras.

Determinación del grado de esterificación de pectina

El grado de esterificación (GE) se determinó por medio de titulaciones, de acuerdo al método reportado por Bocek et al. (2001). Se disolvieron muestras de pectina purificada y se titularon con hidróxido de sodio 0.1N (DEQ, Monterrey, N. L., México) hasta pH de 8.2. Después se añadió hidróxido de sodio en exceso y se dejó desesterificar la pectina durante 2 h. Enseguida se añadió la misma cantidad de ácido clorhídrico (DEQ, Monterrey, N. L., México) para neutralizar el hidróxido de sodio añadido en exceso. Finalmente se volvió a titular con hidróxido de sodio hasta pH de 8.2. Con los volúmenes de las dos titulaciones se calcularon las cantidades de ácido galacturónico no esterificado (1ª titulación) y esterificado (2ª titulación).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de extracción

Los rendimientos de extracción de pectina se muestran en la Tabla 1. El rendimiento no fue estadísticamente diferente en las extracciones hechas en cáscaras con o sin pulpa ($p > 0.05$). Se extrajo 10.66 ± 0.83 % de pectina, en base a la materia seca de la cáscara. Berardini et al. (2005) obtuvieron porcentajes de extracción de 12.2-21.2 % de 14 variedades de mango. El rendimiento y las características de la pectina dependen fuertemente de factores como la fuente de pectina y el método de extracción utilizados (BeMiller, 2008), lo que explica las diferencias en los resultados. Un pH menor a 2 podría dar un mayor rendimiento, como se ha reportado para cáscara de mango Totapuri (Sudhakar y Maini, 2000).

Caracterización de la pectina

El grado de esterificación y contenido de ácido galacturónico de la pectina extraída se muestran en la Tabla 1. La pectina proveniente de cáscaras con o sin pulpa tuvo el mismo grado de esterificación, que fue de 78.1 ± 0.5 %. El contenido total de ácido galacturónico fue, sin embargo, ligeramente distinto en los dos casos. La pectina de la extracción con pulpa tuvo 60.5 ± 0.7 % de ácido galacturónico en base a la masa de pectina, mientras que la pectina de las cáscaras sin pulpa tuvo 63.9 ± 1.8 %.

El grado de esterificación fue similar al 76.48 % obtenido por Sudhakar y Maini (1999), de la extracción optimizada de pectina de cáscara de mango. Estos valores son mayores a 56.3-65.6%, obtenidos por Berardini et al. (2005).

Formación de películas

Las películas obtenidas fueron transparentes, flexibles y de color amarillo. Tomando en consideración el glicerol añadido, así como los contenidos de sólidos y de pectina de los extractos, la pectina constituyó 25.9 y 23.1 % de las películas con 5 y 15 % de glicerol, respectivamente.

CONCLUSIONES

El proceso desarrollado permitió obtener películas biodegradables de pectina de alto metoxilo de cáscara de mango. Con extracciones de cáscaras con y sin pulpa se obtienen rendimientos y grados de esterificación de pectina similares.

BIBLIOGRAFÍA

- Beerh, O., Raghuramaiah, B., Krishnamurthy, G., & Giridhar, N. (1976). Utilization of mango waste: recovery of juice from waste pulp and peel. *Journal of Food Science and Technology*, 13(23), 138-141.
- BeMiller, J. N. (2008). 6.4 Gums and related polysaccharides. En B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, & J. Thiem, *Glycoscience* (págs. 1513-1533). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol o- and xanthone c-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1563–1570.
- Bochek, A., Zabivalova, N., & Petropavlovskii, G. (2001). Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 74(5), 796-799.
- Moalemiyan, M., Ramaswamy, H. S., & Maftoonazad, N. (2012). Pectin-based edible coating for shelf-life extension of Ataulfo mango. *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 572–600.
- Sudhakar, D., & Maini, S. (2000). Isolation and characterization of mango peel pectins. *Journal of Food Processing Preservation*, 24, 209-227.

Tabla 1. Rendimiento de extracción de pectina y características de la pectina extraída de cáscara de mango

	Cáscara con pulpa	Cáscara sin pulpa	Promedio*
Rendimiento de extracción (% masa seca de cáscara)	10.87 ± 0.95	10.39 ± 0.69	10.66 ± 0.83
Contenido de pectina en sólidos solubles totales (% de sólidos totales)	26.5 ± 2.1	28.1 ± 2.8	27.2 ± 2.24
Grado de esterificación (%)	78.2 ± 0.4	78.1 ± 0.6	78.1 ± 0.5
Contenido de ácido galacturónico (% de masa de pectina)	60.5 ± 0.7	63.9 ± 1.8	

*El promedio de los valores correspondientes a cáscara con y sin pulpa se incluye cuando no hay diferencia significativa entre dichas variantes ($p > 0.05$).

ESTUDO DA CINÉTICA DE SECAGEM EM RESÍDUO DE AMORA-PRETA

Mazalli, A.¹; Madrona, G. S.²; Branco, I. G.¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Av. Dom Antônio 2100, 19806-900 Assis, São Paulo, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Pequenas frutas vêm despertando a atenção de pesquisadores, produtores e consumidores por apresentarem, além de nutrientes básicos, fibras, micronutrientes essenciais, como minerais e vitaminas, e diversos compostos secundários de natureza fenólica (HIRSCH *et al.*, 2012).

A amora-preta (*Rubus* spp.) é uma fruta de elevado valor nutritivo, destacando-se carboidratos, minerais (cálcio e potássio) e vitamina C. Além disso, a fruta é excelente fonte de compostos fenólicos, principalmente antocianinas e ácido elágico (ANTUNES *et al.*, 2002).

O processo de obtenção de polpa ou suco pelas indústrias gera como produto secundário resíduos, compostos em sua maior parte por sementes e cascas. Estes, por muitas vezes, são descartados de qualquer maneira pelas indústrias processadoras (SOUZA *et al.*, 2011). Visando minimizar o acúmulo de resíduos industriais, o descarte incorreto e principalmente a preocupação econômica e ambiental, vêm surgindo à necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para a industrialização destas sobras.

Sendo assim, a secagem de resíduos é uma alternativa que merece destaque, visando a obtenção de farinha rica em fibras e outros compostos interessantes, para futura incorporação nos mais diversos alimentos, pães, bolos, barras de cereais, em substituição parcial à farinha de trigo (ABUD *et al.*, 1994; ABUD e NARIAN, 2009; MATIAS *et al.*, 2005; Ayala-Zavala *et al.*, 2011).

A secagem é a operação unitária mais empregada na conservação de alimentos. Ela tem como objetivo reduzir o teor de água do produto, possibilitando o aumento de sua vida-de-prateleira (redução da atividade de água). Além disso, a redução do volume do produto facilita seu transporte e armazenamento (RIBAS *et al.*, 2000). De acordo com FERREIRA & PENA (2010), o processo de secagem é um fenômeno complexo que envolve simultaneamente a transferência de calor e massa, podendo abranger ainda a transferência de

quantidade de movimento. As informações contidas nas curvas de secagem são de fundamental importância para o desenvolvimento de processos e para o dimensionamento de equipamentos. A partir delas, pode-se estimar o tempo de secagem de certa quantidade de produtos e, com o tempo necessário para a produção, estima-se o gasto energético que refletirá no custo de processamento e influenciará no preço final do produto.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de secagem de resíduo industrial (*Rubus spp.*) e artesanal (*Rubus sellowii*) de amora-preta, visando à obtenção de uma farinha contendo casca, semente e resquícios de polpa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Assis/SP/ Brasil.

2.1. Matéria-Prima

Os frutos maduros da amora-preta (*Rubus sellowii*), coletados na região de Assis/SP em novembro de 2012, foram selecionados, higienizados em água clorada (50 ppm de cloro ativo), processados em despulpadeira industrial (marca BRAESI, modelo DES-60) com peneira de 0,2 mm onde a polpa e o resíduo foram fracionados, acondicionados em sacos plásticos de polietileno de alta densidade e armazenados em freezer a -10 °C.

O resíduo Industrial de amora-preta (*Rubus spp*) foi cedido pela empresa Ricaeli Alimentos situada em Cabreúva/SP, vindo acondicionado em embalagens de polietileno de alta densidade. O resíduo foi armazenado em freezer a -10 °C até posterior utilização.

Antes da secagem, os resíduos, tanto o industrial como o artesanal, foram descongelados e triturados, separadamente, para homogeneizar as amostras.

2.2. Métodos

As cinéticas de secagem foram realizadas para os dois tipos de resíduos, o industrial (*Rubus spp.*) e o artesanal (*Rubus sellowii*).

A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar (Marca Nova Ética, Modelo 420-1D), nas temperaturas de 60 e 70 °C. Os resíduos foram dispostos em placas de silicone, formando uma camada de 12 x 13 cm e, aproximadamente, 0,5 cm de espessura. Foram realizadas pesagens periódicas a cada 15 minutos, durante a primeira hora do ensaio, e a cada 20 minutos até peso constante. Todas as cinéticas foram realizadas em triplicata.

2.3. Modelagem Matemática

O comportamento cinético das curvas de secagem foi simulado aplicando-se os modelos matemáticos de Page (eq. 1), Lewis (eq. 2) e Handerson-Pabis (eq. 3).

$$\frac{X - X_e}{X_o - X_e} = \exp[-k \cdot t^n] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\frac{X - X_e}{X_o - X_e} = \exp[-k \cdot t] \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\frac{X - X_e}{X_o - X_e} = \alpha \cdot \exp[-k \cdot t] \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde Y é a razão da umidade adimensional; x, x_o, x_e são os teores de umidade no tempo t, inicial e de equilíbrio, respectivamente; k e n são constantes da equação; t é o tempo (min);

A difusividade efetiva foi calculada utilizando a equação da 2ª Lei de Fick para placa plana (Eq. 4), com auxílio do *software Statistica 5.0*. Foi utilizado a equação para 5 termos e o método para estimação dos valores foi o Quasi-Newton, como descrito em Park *et al*, 2007.

$$Y = \frac{8}{\pi^2} \exp\left[-\frac{\pi^2}{4L^2} Def \cdot t\right] \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde Y é a umidade adimensional, L é a metade da espessura (m), Def a difusividade efetiva (m²/s) e t o tempo (s).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Cinética de Secagem

Os adimensionais (X-X_e)/(X_o-X_e) foram calculados utilizando os conteúdos de umidade em base seca. Em seguida, foi feito o ajuste da curva de cinética de secagem aos modelos matemáticos de Page (Eq. 1), Lewis (Eq. 2), e Handerson-Pabis (Eq. 3).

Os ajustes dos modelos matemáticos de Lewis, Page e Henderson & Pabis foram realizados utilizando o programa Origin 6.0 e dessa forma, foram determinados as constantes k e n, bem como os coeficientes de correlação e o erro médio relativo (%) para cada modelo matemático nas temperaturas de 60 e 70 °C (Tabela 1 e 2). Verifica-se que os modelos

utilizados ajustaram satisfatoriamente os dados experimentais, apresentando valores de R^2 superiores a 0,99 e valores de erro médio relativo inferiores a 2%, podendo ser utilizados na estimativa das curvas de secagem de resíduos de amora-preta. O ajuste com modelo de Lewis foi ligeiramente melhor, apresentando elevado coeficiente de correlação e erro médio relativo inferior a 1%.

As Figuras 1 e 2 mostram os ajustes das curvas das cinéticas de secagem, para os dois resíduos e diferentes temperaturas, utilizando o modelo de Lewis. Pode-se observar que o modelo empírico em questão ajustou bem tanto os dados experimentais do resíduo industrial como artesanal. O aumento da temperatura resultou no aumento da taxa de secagem, e consequentemente, no tempo de secagem.

ANDRADE et al. (2013) relataram que o modelo de Lewis obteve os melhores ajustes aos dados experimentais na cinética de secagem na temperatura de 70°C, cujo R^2 foi superior a 0,9998, podendo ser utilizado na estimativa das curvas de secagem das sementes de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata mast.*).

3.2. Difusividade Efetiva

Na Tabela 3 são apresentados os valores de difusividade efetiva, onde verifica-se que a difusividade efetiva do resíduo artesanal aumenta com o aumento da temperatura de secagem, pois em maiores temperaturas a remoção de água é mais rápida (SANTOS *et al.*, 2010). O mesmo foi observado por GIRALDO- ZUÑINGA et al. (2006), JAYA e DAS (2004). No entanto, para o resíduo industrial, o aumento de temperatura praticamente não teve efeito sobre a difusividade efetiva.

4. CONCLUSÃO

Todos os modelos empíricos estudados, Page, Lewis e Henderson & Pabis foram eficazes na determinação da cinética de secagem de resíduo de amora. Porém, o ajuste com o modelo de Lewis foi ligeiramente superior quando comparado aos outros modelos, podendo ser utilizado na estimativa do tempo de secagem dos resíduos de amora-preta (*Rubus spp.* ou *Rubus sellowii*), visando obtenção de uma farinha nutritiva.

O aumento de temperatura acarretou na redução do tempo de secagem, independente do resíduo, e no aumento da difusividade efetiva para o resíduo artesanal.

FIGURAS

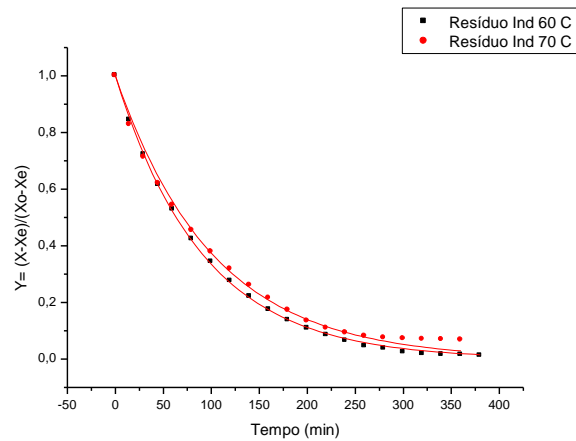


Figura 1. Ajuste do modelo de Lewis para secagem do resíduo industrial (*Rubus spp.*) nas temperaturas de 60 e 70 °C.

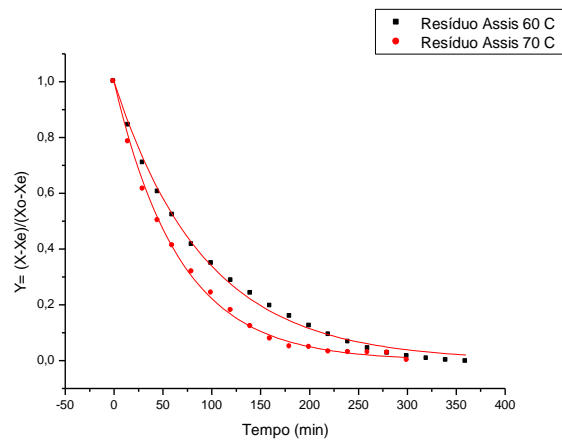


Figura 2. Ajuste do Modelo de Lewis para secagem do resíduo artesanal (*Rubus sellowii*) nas temperaturas de 60 e 70 °C.

TABELAS

Tabela 1. Constantes empíricas e análise estatística para os modelos cinéticos nas diferentes temperaturas de secagem do resíduo industrial.

Resíduo Industrial					
Parâmetros	T (°C)	K	n	R²	E (%)
	60	0,01096	-	0,99935	0,008
Lewis	70	0,00984	-	0,99565	0,170
	60	0,00967	1,02668	0,99954	1,085
Page	70	0,01456	0,91796	0,99801	2,006
	60	1,00336	0,01099	0,99936	0,567
Henderson-Pabis	70	0,96944	0,00951	0,99692	1,125

Tabela 2 . Constantes empíricas e análise estatística para os modelos cinéticos nas diferentes temperaturas de secagem do resíduo artesanal.

Resíduo Artesanal					
Parâmetros	T (C)	K	n	R²	E (%)
	60	0,01083	-	0,99707	0,016
Lewis	70	0,01503	-	0,99827	0,020
	60	0,01081	1,00054	0,99707	2,698
Page	70	0,01686	0,97381	0,99845	2,232
	60	0,99381	0,01076	0,99711	1,203
Handerson-Pabis	70	0,98825	0,01484	0,99843	0,997

Tabela 3- Valores de Difusividade Efetiva, nas temperaturas de 60 e 70°C, para os dois resíduos.

Temperatura (°C)	Resíduo	Def (m ² /s x 10 ⁻⁸)	R ²
60°C	Industrial	1,54	0,98931
	Artesanal	1,52	0,98970
70°C	Industrial	1,36	0,99340
	Artesanal	2,10	0,99305

5. BIBLIOGRAFÍA

Abud, A. K. S.; Santos, M. N.; Silva, R. P. Obtenção da Farinha da Semente da Jaca: Estudo de sua Viabilidade em Substituição à Farinha de Trigo. In: Congresso Brasileiro De Fruticultura, 13, 1994, Salvador. Jaboticabal: SBF. v.3, p. 1069 -1069.

Abud, A. K. S. E Narain, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. Brazilian Journal Food Technology, v.12, n.4, p.257-265, 2009.

Andrade, J. K. S.; Silva, G. F. Da; Barreto, L. C. De O.; Santos, J. A. B. dos. Estudo da cinética de secagem, extração, caracterização e estabilidade térmica do óleo das sementes de maracujá do mato (*passiflora cincinnata* mast.). In: Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica – ANAIS SIMTEC, Vol. 1/n. 1/ p. 496-504, 2013.

Antunes, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. Ciência Rural. Santa Maria, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

Ayala-Zavala, J. F.; Vega-Vega, V.; Rosas-Domínguez, C.; Palafox-Carlos, H.; Villa-Rodríguez, J. A.; Siddiqui, M. W.; Dávila-Aviña, J. E.; González-Aguilar, G. A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. Food Research International, v. 44, p. 1866-1874, 2011.

Ferreira, M. De F. P.; Pena, R. da S. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.15-28, 2010.

Giraldo-Zuñinga, A. D.; Areválo Pinedo, A.; Rodrigues, R. M.; Lima, C. S. S.; Feitosa, A. C. Kinetic drying experimental data and mathematical model for jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) slices. Ciencia y Tecnologia Alimentaria, v. 5, n. 2, p. 89-92, 2006.

Hirsch, G. E.; Facco, E. M. P.; Rodrigues, D. B. Physicochemical characterization of blackberry from the Southern Region of Brazil. Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.5, p.942-947, mai, 2012.

Giraldo-Zuñinga, A. D.; Areválo Pinedo, A.; Rodrigues, R. M.; Lima, C. S. S.; Feitosa, A. C. Kinetic drying experimental data and mathematical model for jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) slices. Ciencia y Tecnologia Alimentaria, v. 5, n. 2, p. 89-92, 2006.

Matias, M. F. O.; Oliveira, E. L.; Margalhães, M. M. A.; Gertrudes, E. Use of fibers obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 8, Special number, p.143-150, 2005.

Park, K.J.; Antonio, G. C.; Oliveira, R. A.; Park, K. J. B.; Conceitos de processo e equipamentos de secagem. 121 f. 2007. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/projpesq.html>. Acesso em: 01 set. 2013.

Ribas, A.I.; Cánovas, G.V.B.; Garza, S.G.; Añó, V.G. Métodos experimentales en la ingeniería alimentaria. Zaragoza (España): Acribia, 2000. 292 p.

Santos, C.T.; Bonomo, R.F.; Chaves, M.A.; Fontan, R.C.I.; Bonomo, P. Cinética e modelagem da secagem de carambola (*Averrhoa carambola* L.) em secador de bandeja. *Acta Scientiarum. Technology*. v. 32, n. 3, p. 309-313, 2010.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DEL BAGAZO DE UVAS TINTAS PORTUGUESAS EN UN MEDIO DE GRADO ALIMENTICIO

Hernan H. Tournour^{1,2}, Marcela A. Segundo³, Luís M. Magalhães³, Jorge Queiroz², Luís M. Cunha^{2,*}.

¹ Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Univ. Porto, Porto, Portugal.

² REQUIMTE/DGAOT Faculdade de Ciências, Univ. Porto, Porto, Portugal.

³ REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Univ. Porto, Porto, Portugal.

* Autor correspondiente: lmcunha@fc.up.pt

INTRODUCCIÓN

La uva es uno de los cultivos más explotados mundialmente siendo el vino, uvas de mesa, jugos y pasas de uvas, los principales productos. Entre 80-85 % del total de la producción es destinado a la elaboración de vino (Yang et al., 2009). Se calcula que por cada 6 litros de vino, 1 kg de bagazo (cabos y hollejo) es generado como desecho (Rockenbach et al., 2011). Portugal históricamente ha participado como un importante productor de uvas y de vino de excelente calidad, encontrándose actualmente dentro de los 20 primeros países en el ranking de los mayores productores mundiales (FAOSTAT, 2011). La uva es reconocida como una importante fuente de compuestos polifenólicos desde que fue abierta la discusión con la renombrada “Paradoja Francesa” (Renaud and de Lorgeril, 1992). Desde entonces, gran número de estudios han sido publicados dando énfasis a las propiedades benéficas para la salud: propiedades antiinflamatorias (Terra et al., 2007); actividad de captación de radicales libres; terapias contra ciertos tipos de cáncer (Nandakumar et al., 2008, Yang et al., 2009). Así como también, se reconocen propiedades antimicrobianas (Jayaprakasha et al., 2003), y aplicaciones a nivel industrial relacionadas con la eliminación o reducción de la peroxidación de las grasas y aceites (Rubilar et al., 2007, Ahn et al., 2007, Mielnik et al., 2006, Brannan and Mah, 2007).

Una vez finalizadas las operaciones tradicionales de elaboración de vino, una importante cantidad de este tipo de sustancias bioactivas permanecen en el bagazo (Lapornik et al., 2005, Makris et al., 2007). El conocimiento de la composición de las variedades de uvas nativas es importante desde el punto de vista de una posible explotación en la extracción de compuestos bioactivos. Actualmente, la información disponible respecto de los compuestos polifenólicos en variedades de uvas portuguesas es limitada, con algunos trabajos publicados en relación a la composición y actividad antioxidante de uvas portuguesas (Jordão and Correia, 2012, Jordao et al., 2012a, Jordão et al., 1998, Paixao et al., 2007), enteras o

partes de la uva (Cosme et al., 2009, Dopico-García et al., 2008, Mateus et al., 2002), y principalmente relacionadas con el vino (Jordao et al., 2010, Jordao et al., 2012b, Canas et al., 2008). Siendo que los extractos obtenidos a partir del bagazo de uva portuguesa presentan una amplia gama de usos en áreas farmacéuticas, la información relativa a sus propiedades antioxidantes con el fin de ser aplicado en la industria de los alimentos, es aun más escaza. Este conocimiento, contribuye a una mayor interpretación de la aptitud y destino potencial de los residuos de la vitivinificación en Portugal. Así, los objetivos del presente trabajo fueron: (1) determinar el contenido total de polifenoles, (2) evaluar la capacidad antioxidante (*in vitro*) del bagazo de uva a través de tres ensayos de antioxidantes (ORAC, DPPH, ICA), en un medio alcohólico compatible con la industria de los alimentos, y (3) seleccionar dentro de las variedades estudiadas, aquella más apropiada para el desarrollo de un antioxidante natural para alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), sal de sodio de ácido 3 - (2-piridil) -5,6-difenil-1,2,4-triazina-4,4-difulfonic (ferrozina) y 2,2-azobis dihidrocloruro de 2-metilpropionamida (AAPH) fueron adquiridos de Aldrich (Milwaukee, WI). Reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) y sal sódica de fluoresceína fueron compradas en Sigma (St. Louis, MO), mientras que el cloruro de hierro (II) tetrahidrato, ácido gálico y ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8 tetramethylchromane-2-carboxílico (Trolox) fueron adquiridos de Fluka (Buchs, Switzerland). Agua Milli-Q (resistividad > 18 M Ω cm) y etanol absoluto para análisis fueron usados en la preparación de todas las soluciones.

Preparación de extractos de bagazo de uvas tintas

Tres cultivares de uvas (*Vitis vinifera* L.) tintas autóctonas, vendimia 2012, de la región del *Douro*: “*Touriga Nacional*” (TNac), “*Touriga Franca*” (TF), “*Tinta Roriz*” (TR) y una mezcla (Mix) de cada una de ellas, fueron empleadas. Pepitas, piel y una pequeña cantidad de cabos (bagazo) fueron obtenidos luego de la última etapa de fermentación, embalados dentro de bolsas oscuras de polietileno, congeladas (-18°C) y transportadas inmediatamente al laboratorio. Las muestras fueron descongeladas (0°C) a temperatura ambiente y los cabos fueron removidos manualmente. Porciones de cada variedad (500 g) fueron colocadas en una bandeja, dispuestas en una fina capa y secadas en un horno a una temperatura de 55°C. Finalmente, el material seco (5% humedad final) fue almacenado a -

18°C en bolsas oscuras de polietileno. Al día siguiente, para la reducción de tamaño fue empleado un molino para granos lográndose un tamaño medio de partícula de 2-3 mm. Todo el procedimiento fue realizado protegiendo el material de la luz. Una vez finalizada la molienda, el material fue envasado al vacío en bolsas barrera al oxígeno; cubierto con hoja de aluminio, y reservado hasta el momento de la extracción. Para ello, fue escogida una extracción convencional con solvente en base a la metodología publicada por Shirahigue y colaboradores (Shirahigue et al., 2010) con algunas modificaciones. Brevemente, el material molido fue descongelado y colocado (20 g) en un matraz (en duplicado) junto con 100 mL de una mezcla de 80% (v/v, etanol/agua), y puesto en agitación orbital a 300 rpm por 48hs a temperatura ambiente y protegida de la luz. Posteriormente, el líquido fue filtrado a través de membrana Millipore HVPH (45 µm) bajo vacío. El líquido resultante fue colocado en un balón de color ámbar, el volumen fue ajustado a 100 ml con solvente de extracción, y concentrado en un evaporador rotativo bajo vacío (Rotavapor, Büchi, USA) a 65°C con entrada de una corriente de nitrógeno. El material seco fue pesado y disuelto en 50 ml de agua del sistema Milli-Q. Finalmente las muestras fueron congeladas a -80°C en recipientes color ámbar.

Contenido total de polifenoles (CTP) y Capacidad antioxidante

El CTP fue medido en base a metodología previamente descrita (Magalhães et al., 2010, Singleton et al., 1999) y los resultados expresados en mg de equivalentes del ácido gálico (EAG) por gramo de extracto seco. El ensayo de DPPH• fue realizado en base a procedimientos ya descritos (Brand-Williams et al., 1995, Magalhães et al., 2012), y los resultados expresados en mmol de equivalentes de Trolox (ET) por gramo de extracto seco. El ensayo de la capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC) fue llevado a cabo de acuerdo al procedimiento previamente reportado (Huang et al., 2002, Wang et al., 2009) y los resultados fueron expresados como mmol de ET por gramos de extracto seco. Para la medida de la habilidad quelante del ion ferroso (ICA), fue empleado el procedimiento descrito por Wang y colaboradores (Wang et al., 2009). Los resultados fueron expresados como % de inhibición por gramo de extracto seco. Todos los ensayos de antioxidantes fueron realizados en formato de microplaca (Synergy HT, Bio-Tek Instruments) utilizándose espectrofotometría o fluorimetría como sistema de detección. El lector de microplaca fue controlado a través del software Gen5 (Bio-Tek Instruments). Todas las muestras fueron analizadas en cuadruplicado (triplicado en el caso del ensayo de ORAC).

Análisis estadístico:

Todos los resultados fueron reportados en valores promedio \pm desviación estándar (D.E.) (CTP $n=8$; DPPH $n=8$; ICA $n=16$; ORAC $n=30$). Se utilizó Análisis de la Varianza (ANOVA) a un factor para identificar diferencias entre las cuatro muestras. Cuando aplicable, se ha empleado el test de Tuckey de comparación múltiple, de manera de identificar cuál de las variedades en estudio difiere significativamente de las demás con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$). Se ha empleado el software IBM SPSS Statistics para Windows v.21.0 para el tratamiento de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CTP y los valores para los ensayos de antioxidantes se encuentran en Tabla N°1. Todas las muestras presentaron ser significativamente diferentes ($p = 0.05$) en términos del CTP, variando entre 1171 y 2790 mg AGE / L. Información respecto del CTP de extractos de bagazo de las variedades en estudio no fue encontrada, sin embargo, Negro y colaboradores (Negro et al., 2003) han publicado resultados semejantes, 1.40 g AGE / L para el CTP, habiendo trabajado con extractos de la variedad “*Negro amaro*” bajo condiciones de extracción comparable. Cabe destacar que durante el proceso convencional de elaboración de vino (maceración), debido al contacto físico entre el mosto y las pepitas-pieles y por causa de los fenómenos de transferencia de masa que tienen lugar, una vez que la maceración finaliza, el bagazo resultante queda con un contenido de compuestos polifenólicos menor en comparación con el material de partida (Xu et al., 2010). Expresando los resultados en términos de mg AGE por 100 g bagazo fresco, luego, nuestros resultados están en concordancia con los valores previamente reportados (Yang et al., 2009). El valor resultante para el CTP en el vino es una consecuencia de diferentes factores, como ser: estación del año, variedad de uva, condiciones climáticas (Yang et al., 2009, Di Majo et al., 2008). Cuando extractos son obtenidos a partir de matrices provenientes de tejidos vegetales complejos, los sistemas químicos resultantes son típicamente heterogéneos. Por esta razón, para una correcta evaluación de la capacidad antioxidante de este tipo de extractos, es recomendable el uso de más de un ensayo para garantizar una apropiada determinación de la capacidad antioxidante en alimentos (De Nisco et al., 2013). Los valores para el ensayo de DPPH variaron entre 9.03 mM ET (4.40 mmol ET / 100 g bs) y 22.96 mM ET (11.41 mmol ET / 100 g bs). Entre las muestras en estudio, los valores del ensayo de DPPH para TF (22.96 ± 1.58 mM ET) fueron 2.5 veces mayores en promedio comparados con los valores para TR (9.03 ± 0.32 mM ET).

Cristino y colaboradores (Cristino et al., 2013) han recientemente publicado resultados semejante para la capacidad antioxidante total para vinos tintos elaborados en dos regiones con Denominación de Origen Portuguesas. Por otro lado, Rockenbach y colaboradores (Rockenbach et al., 2011) han trabajado con extractos del bagazo (piel o pepitas) de diferentes variedades de uvas tintas brasileras extraídas con metanol/agua/ácido acético (80:20:5 v/v/v), sin embargo estamos en condiciones de decir que nuestros resultados son comparables incluso habiendo trabajado en diferentes condiciones y con un solvente extractor más seguro y compatible con los alimentos. En relación a la habilidad quelante, todas las muestras evaluadas presentaron una importante afinidad hacia iones metálicos, medida a través del ensayo de ICA, variando entre 23.6 %Inh / g/L y 12.9 %Inh / g/L. En este caso, la muestra Mix presentó los valores más elevados (23.6 ± 1.40 %Inh / g/L), interfiriendo con mayor éxito en la formación del complejo Fe (II)-ferrozina a través de su poderoso efecto quelante. Los valores para el ensayo de ORAC oscilaron entre 899 $\mu\text{mol ET}$ por g extracto y 1558 $\mu\text{mol ET}$ por g extracto. Los valores más elevados fueron para TNac, indicando en este caso, una tendencia de comportamiento químico diferente en comparación de los ensayo de antioxidantes anteriores. Por otro lado y contrariamente a lo esperado, la muestra Mix presentó los valores más bajos para el ensayo de ORAC. Es importante destacar que al momento de realizar comparaciones, la gran mayoría de las publicaciones presentan estudios llevados a cabo con partes aisladas de la uva y no uva completa o bagazo completo. Nuestros resultados fueron menores en comparación a los publicados por Hogan y colaboradores (Hogan et al., 2010). El origen de estas diferencias puede ser debido a: variedades empleadas en la fabricación de los extractos, localización geográfica, así como también a las condiciones de preparación de los extractos. Luego, para seleccionar la variedad de uva portuguesa (dentro de las estudiadas) con mayor potencial para el desarrollo de extractos con implicancias en alimentos, expresando los resultados por g de extracto obtenido, la muestra TNac pareciera ser la más apropiada debido a su más alto CTP (142 ± 1.06 mg EAG por g extracto), y a que de los tres métodos de antioxidantes utilizados, en dos de ellos ha exhibido los valores más elevados (DPPH: 1.12 ± 0.04 mmol ET por g extracto; ORAC: 1617 ± 226 $\mu\text{mol ET}$ por g extracto).

Correlaciones:

Basados en los resultados expresados en base a los gramos de extracto obtenido, una fuerte correlación fue obtenida entre CTP y los valores de DPPH ($R=0.944$, $\rho<0.01$). Correlaciones semejantes han sido previamente reportadas (Xu et al., 2010, Katalinić et al.,

2004, Lapornik et al., 2005) y para las variedades en estudio (Jordao et al., 2012b). Una correlación satisfactoria fue determinada también entre CTP y los valores de ORAC ($R=0.632$, $\rho<0.01$), y consecuentemente buena correlación fue obtenida entre los valores de DPPH y ORAC ($R=0.557$, $\rho<0.05$). Por lo contrario, la correlación entre CTP (o DPPH) e ICA no fue significativa, tampoco entre ICA y ORAC.

CONCLUSIONES

Para concluir, los resultados presentados en este trabajo muestran que los extractos etanólicos obtenidos a partir del bagazo de ciertas variedades de uvas tintas portuguesas exhibieron importantes propiedades antioxidantes y comparables con otros trabajos publicados, incluso cuando son empleadas mezclas de solventes menos compatibles o recomendables para su uso en alimentos. Luego, los residuos generados durante la vitivinificación en Portugal representan una fuente potencial de compuesto polifenólicos. La información aquí mostrada tienden a enfatizar la utilidad que poseen las variedades de uva locales en cuanto al desarrollo de aditivos o ingredientes alimentarios de gran beneficio, al mismo tiempo, ampliar el abanico de opciones reconociendo una alternativa más segura y más saludable para el consumidor.

Tabla N°1

Contenido total de polifenoles (CTP) y actividad antioxidante determinada por ensayos de DPPH, ICA y ORAC

Variedad de uva	CTP ^{†,§}	DPPH ^{†,§}		ICA ^{†,§}	ORAC ^{†,§}	
	(mg AGE /L)	(mmol ET / L extracto)	(mmol ET / 100g bagazo seco)	(%inhib. / (g / L extracto))	(μ mol ET / g extracto)	(μ mol ET / g bagazo seco)
Tinta Roriz	1171 ^d ± 68	9 ^d ± 0.32	4.40 ^d ± 0.15	13 ^c ± 0.7	1222 ^b ± 46	46 ^c ± 1.70
Touriga Franca	2790 ^a ± 133	23 ^a ± 1.6	11.40 ^a ± 0.8	20 ^b ± 1.6	1341 ^b ± 113	88 ^a ± 9.7
Touriga Nacional	2170 ^c ± 144	17 ^c ± 1.6	8.50 ^c ± 0.8	20 ^b ± 2.6	1558 ^a ± 265	60 ^b ± 13.6
Mix	2504 ^b ± 122	21 ^b ± 1.1	10.40 ^b ± 0.6	24 ^a ± 1.4	899 ^c ± 68	55 ^b ± 6.1

[†]: Valores expresados como promedios ± D.E. ($n = 4$) y [‡]: ($n = 3$).

[§]: Tratamiento estadístico MANOVA, letras diferentes dentro de cada columna indica diferencias estadísticas (test post-hoc Tukey) un grado de confianza $\rho \leq 0.05$.

BIBLIOGRAFÍA

- ahn, J., Grün, I. U. & Mustapha, A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24, 7-14.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Brannan, R. G. & Mah, E. 2007. Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxyxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science*, 77, 540-546.
- Canas, S., Casanova, V. & Pedro Belchior, A. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 626-633.
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M. & Laureano, O. 2009. Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112, 197-204.
- Cristino, R., Costa, E., Cosme, F. & Jordao, A. M. 2013. General phenolic characterisation, individual anthocyanin and antioxidant capacity of matured red wines from two Portuguese Appellations of Origins. *J Sci Food Agric*, 93, 2486-93.
- De Nisco, M., Manfra, M., Bolognese, A., Sofo, A., Scopa, A., Tenore, G. C., Pagano, F., Milite, C. & Russo, M. T. 2013. Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (cv. Aglianico). *Food Chemistry*, 140, 623-629.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L. & Giammanco, M. 2008. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111, 45-49.
- Dopico-García, M. S., Figue, A., Guerra, L., Afonso, J. M., Pereira, O., Valentão, P., Andrade, P. B. & Seabra, R. M. 2008. Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds? *Talanta*, 75, 1190-1202.
- FAOSTAT. 2011. *FAO statistical database*. [Online]. Available: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.
- Hogan, S., Canning, C., Sun, S., Sun, X. X. & Zhou, K. Q. 2010. Effects of Grape Pomace Antioxidant Extract on Oxidative Stress and Inflammation in Diet Induced Obese Mice. *J Agric Food Chem*, 58, 11250-11256.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. & Prior, R. L. 2002. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J Agric Food Chem*, 50, 4437-4444.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T. & Sakariah, K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 117-122.
- Jordão, A. M. & Correia, A. C. 2012. Relationship Between Antioxidant Capacity, Proanthocyanidin and Anthocyanin Content During Grape Maturation of Touriga Nacional and Tinta Roriz Grape Varieties. *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 33, 214.

- Jordao, A. M., Correia, A. C. & Goncalves, F. J. 2012a. Evolution of antioxidant capacity in seeds and skins during grape maturation and their association with proanthocyanidin and anthocyanin content. *Vitis*, 51, 137-139.
- Jordao, A. M., Goncalves, F. J., Correia, A. C., Cantao, J., Rivero-Perez, M. D. & Sanjose, M. L. G. 2010. Proanthocyanidin content, antioxidant capacity and scavenger activity of Portuguese sparkling wines (Bairrada Appellation of Origin). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2144-2152.
- Jordão, A. M., Ricardo, M. & Laureano, O. 1998. Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L.), Castelao Frances and Touriga Francesa. *Vitis*, 37, 93-94.
- Jordao, A. M., Simoes, S., Correia, A. C. & Goncalves, F. J. 2012b. Antioxidant activity evolution during Portuguese red wine vinification and their relation with the proanthocyanidin and anthocyanidin composition. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 298-309.
- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I. & Boban, M. 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86, 593-600.
- Lapornik, B., Prošek, M. & Golc Wondra, A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Magalhães, L. M., Barreiros, L., Maia, M. A., Reis, S. & Segundo, M. A. 2012. Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta*, 97, 473-483.
- Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83, 441-447.
- Makris, D. P., Boskou, G. & Andrikopoulos, N. K. 2007. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125-132.
- Mateus, N., Machado, J. M. & De Freitas, V. 2002. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1689-1695.
- Mielnik, M. B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D. & Skrede, G. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 191-198.
- Nandakumar, V., Singh, T. & Katiyar, S. K. 2008. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer letters*, 269, 378-387.
- Negro, C., Tommasi, L. & Miceli, A. 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87, 41-44.
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J. C. & Camara, J. S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214.
- Renaud, S. & De Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523-1526.

- Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Gonçalves, A. E. D. S. S., Genovese, M. I. & Fett, R. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44, 897-901.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Shene, C., Sineiro, J. & Nuñez, M. J. 2007. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *J Agric Food Chem*, 55, 10101-10109.
- Shirahigue, L. D., Plata-Oviedo, M., De Alencar, S. M., D'arce, M. A. B. R., De Souza Vieira, T. M. F., Oldoni, T. L. C. & Contreras-Castillo, C. J. 2010. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 863-870.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods In Enzymology*, 299, 152-178.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J.-M., Arola, L., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G. & Salvadó, J. 2007. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 55, 4357-4365.
- Wang, T., Jónsdóttir, R. & Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116, 240-248.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. & Lu, J. 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119, 1557-1565.
- Yang, J., Martinson, T. E. & Liu, R. H. 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.

ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y TEMPERATURA MODERADA PARA LA CONSERVACIÓN DE TRITURADO DE NARANJA: EFECTO SOBRE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES

Zamantha Escobedo-Avellaneda*, Aurora Valdez-Fragoso, Hugo Mujica-Paz, Viridiana Tejada-Ortigoza y Jorge Welti-Chanes*

Centro de Biotecnología FEMSA, Escuela de Biotecnología y Alimentos, Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Col. Tecnológico, 64849, Monterrey, Nuevo León, México. * zamantha.avellaneda@itesm.mx, jwelti@itesm.mx

INTRODUCCION

La naranja (*Citrus sinensis* L.) es fuente de compuestos funcionales como los fenólicos y en especial de flavonoides de gran valor debido a su exclusividad en los cítricos como las flavanonas y las flavonas que han mostrado propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras (Tripoli et al., 2007). Se ha demostrado que subproductos de desecho como la cáscara contienen una mayor cantidad de estos compuestos que el jugo, por lo que su aprovechamiento en la elaboración de alimentos funcionales es importante (Escobedo-Avellaneda et al., 2013). El triturado de naranja es un producto obtenido moliendo la cáscara con el jugo y es usado para mejorar el color de bebidas refrescantes. Debido a su aporte en estos compuestos, podría usarse como una base para la formulación de alimentos funcionales.

Además de proveer nutraceuticos, el uso de la cáscara en la formulación del triturado también incrementa la actividad enzimática y microbiana disminuyendo su vida útil por lo que es importante la aplicación de algún método de conservación para garantizar su estabilidad durante el almacenamiento. Aunque la pasteurización y la esterilización permiten obtener alimentos microbiológicamente seguros, causan cambios desfavorables por lo que el uso de nuevas tecnologías de conservación que garanticen la inocuidad y la estabilidad de los compuestos de los alimentos es de interés. La aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) para la conservación de alimentos funcionales resulta muy atractiva ya que permite obtener alimentos microbiológica y enzimáticamente estables de gran calidad. El uso de APH además presenta la posibilidad de aumentar la concentración de nutraceuticos debido a una mejor extracción causada por ruptura de las estructuras celulares donde se almacenan dichos compuestos (Corrales et al., 2009; de Ancos et al., 2002; Ferrari et al., 2010; Hsu et al., 2008; Hyun-Sun et al., 2011; Keenan et al., 2011; Qiu et al., 2006; Sánchez-Moreno et al., 2005; Varma et al., 2010). En este trabajo se determinó el efecto de las APH a diferentes niveles de

presión, temperatura y tiempo sobre la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides de triturado de naranja. De la misma manera se analizó el efecto del tiempo requerido de elevación de presión (CUT).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, ácido gálico, hesperidina (HE), naringina y tangeretina, se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); el HCl, fosfato monobásico y dibásico de potasio, y agua HPLC, en Fermont-Productos Químicos Monterrey (Monterrey, Nuevo León, Mexico); el ácido fórmico HPLC en Fisher Scientific (Monterrey, NL, México); el metanol, NaOH 0.1 N y la fenolftaleína en Desarrollo de Especialidades Químicas (San Nicolás de los Garza, NL, Mexico); el Na₂CO₃ en CTR Scientific (Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V., Monterrey, NL, Mexico); el metanol HPLC en J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA); la nobiletina en Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY).

Preparación del triturado de naranja

Naranjas Valencia de madurez comercial fueron adquiridas en Monterrey, Nuevo León, México en marzo del 2012. Las naranjas fueron lavadas, secadas y pesadas para enseguida extraer el jugo (Turmix rudo, TURMIX, Ocoyoacac, Estado de México, México). El bagazo fue separado manualmente de la cáscara, y el flavedo removido con un cuchillo. Porcentajes definidos de cada componente de la naranja (72, 16 y 12% p/p de jugo, flavedo y albedo, respectivamente), fueron molidos (Oster, BRLY-Z00-013, México) hasta obtener una pasta homogénea.

Análisis fisicoquímicos

El contenido de humedad fue determinado de acuerdo al método 934. de la AOAC (1990), y la actividad de agua (a_w) con un equipo AquaLab 4TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA) a 25°C. La acidez total (AT) se obtuvo siguiendo el método 942.15 de la AOAC (1998). El pH y los sólidos solubles totales (SST) se midieron con un potenciómetro (Orion 3 star, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y un refractómetro (modelo 01148, Atago, Inc., Bellevue, WA, USA), respectivamente.

Tratamiento con altas presiones hidrostáticas

Seis bolsas de polietileno de 12x5 cm conteniendo 50 g de triturado fueron selladas al vacío, y tratadas en un equipo de APH (Avure2L, Columbus, Ohio, USA) a diferentes presiones (350-550 MPa), temperaturas (41 ± 2 - 68 ± 3 °C una vez alcanzada la presión) y tiempos (1-10 min) de acuerdo a un diseño central compuesto usando agua como fluido presurizante. El efecto del CUT también fue evaluado y los tratamientos se realizaron por duplicado. Como control se usó una muestra sin tratamiento.

Compuestos fenólicos y flavonoides

Los compuestos fenólicos se analizaron como totales (FT) y libres (FL) con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, mientras que el perfil de flavonoides se analizó mediante HPLC en fase reversa en un equipo Agilent (1200 series, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA, USA) de acuerdo a los métodos descritos en Escobedo-Avellaneda et al. (2013).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de superficie de respuesta para evaluar el efecto de las variables estudiadas usando un nivel de confianza de 0.95. Para determinar diferencias específicas entre los tratamientos aplicados y la muestra control se aplicó ANOVA con prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El triturado de naranja presentó un contenido de humedad del $81.5\pm 0.2\%$, pH de 3.88 ± 0.01 , contenido de sólidos solubles de 13.2 ± 0.0 °Bx, y a_w de 0.987 ± 0.003 . Considerando únicamente aspectos microbiológicos, el bajo pH del producto permite su procesamiento a temperatura ambiente (Serment-Moreno et al., 2011), sin embargo estudios realizados por Tejada-Ortigoza (2012) demostraron que la inactivación de pectinmetilesterasa (PME) requiere del uso de temperatura moderada.

Efecto en el contenido de compuestos fenólicos

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de FT y FL de los productos procesados a diferentes presiones, tiempos y temperaturas. El contenido de FT y FL del producto sin tratamiento fue de 311.0 ± 20.7 y 212.3 ± 23.0 mg GA/100 g, respectivamente, mientras que la concentración de FT en las muestras tratadas se encontró en un rango de 290.0 ± 6.0 a 308.6 ± 5.0 mg AG/100 g, y la de FL osciló de 195.9 ± 9.9 a 212.4 ± 8.6 mg AG/100 g. La relación FT/FL varió un poco presentado valores en el rango de 65.3 a 73.2% de FL respecto al total. El análisis estadístico realizado mostró que la temperatura ($p=0.001$ para FT y $p=0$ para FL) de tratamiento afectó la concentración de ambos tipos de compuestos

fenólicos sin influencia significativa de la presión ($p=0.107$ y 0.078) ni del tiempo ($p=0.563$ y 0.506). El término cuadrático de presión ($p=0.001$) también resultó importante. El modelo de superficies de respuestas no pudo usarse para predecir el contenido de estos compuestos debido a los valores tan bajos de R^2 ajustada obtenidos que fueron de 0.08 para FT y de 0.04 para FL. La prueba de Tukey mostró que las muestras tratadas a $350 \text{ MPa}/41\pm 2^\circ\text{C}/10 \text{ min}$, $450 \text{ MPa}/56\pm 2^\circ\text{C}/1, 5.5$ y 10 min , $350 \text{ MPa}/68\pm 3^\circ\text{C}/10 \text{ min}$, $450 \text{ MPa}/68\pm 3^\circ\text{C}/5.5 \text{ min}$ y $550 \text{ MPa}/68\pm 3^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ tuvieron disminuciones significativas de FT de $4.2, 6.6, 4.4, 6.7, 3.5, 3.5, 5.5$ y 4.5% respecto al control, mientras que las procesadas a $450 \text{ MPa}/56\pm 2/1 \text{ min}$, $550 \text{ MPa}/56\pm 2/5.5 \text{ min}$ y $550 \text{ MPa}/68\pm 3^\circ\text{C}/10 \text{ min}$ disminuyeron el contenido de FL en $4.8, 7.7$ y 4.8% respectivamente. No se observó un efecto importante del CUT (Tabla 2).

Efecto en el perfil y contenido de flavonoides

El triturado de naranja procesado durante los diferentes tiempos de tratamiento y durante el CUT, presentó un perfil de flavonoides similar al producto sin procesar, en donde de los 9 flavonoides cuantificados, se identificaron dos flavanonas glicosiladas (hesperidina y didimina) y tres flavonas polimetoxiladas (sinensetina, auranetina, nobiletina) (Escobedo-Avellaneda et al., 2013), indicando que los procesos aplicados no originaron la formación o completa degradación de algún compuesto en particular. Todos los flavonoides mencionados han sido reportados previamente para naranja (Kawaii et al., 1999; Li et al., 2006; Manthey & Grohmann, 1996; Xu et al., 2008). La muestra sin procesar mostró un contenido de flavonoides totales de $439.3\pm 22.56 \text{ mg HE}/100 \text{ g}$ del cual el $71.8\pm 0.76\%$ correspondió a hesperidina. Comparados con el control, los tratamientos aplicados no causaron un cambio importante en el contenido de flavonoides totales (Tablas 3 y 4), con excepción de la muestra tratada durante el CUT a $350 \text{ MPa}/68\pm 3^\circ\text{C}$ que presentó un incremento de 9% tal y como lo mostró el análisis estadístico aplicado.

CONCLUSIONES

En general los tratamientos aplicados no alteraron de manera importante la concentración de fenólicos ni el perfil de flavonoides por lo que la APH es una tecnología adecuada para el procesamiento del producto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo otorgado del Tecnológico de Monterrey (CAT-200 y CDB081) y de CONACYT-SEP (Proyecto de investigación 101700 y programa de becas doctorales).

REFERENCIAS

AOAC (1990). Official method 934.06. Moisture in dried fruits. In Official methods of analysis, vol. 2, Food composition, additives, natural contaminants (15th ed) (p. 912). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC (1990) Official method 942.15. Acidity (titratable) of fruit products. Glass electrode method. In Official methods of analysis, vol. 2, Food composition, additives, natural contaminants (15th ed) (p. 918). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Corrales M., Fernández-García A., Butz P. & Tauscher B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415-421.

de Ancos B., Sgroppo S., Plaza L. & Cano M.P. (2002). Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 790-796.

Escobedo-Avellaneda Z., Gutiérrez-Urbe J., Valdez-Fragoso A., Torres J. & Welti-Chanes J. (2013). Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *Journal of Functional Foods*. Submitted

Ferrari G., Maresca P. & Ciccarone R. (2010) The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100 (2), 245-253.

Hsu K.C., Tan F.J. & Chi H.Y. (2008) Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of pressurized tomato juice during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 367-375.

Hyun-Sun L., Lee H., Yu H.J., Ju D.W., Kim Y., Kim C.T., Kim C.J., Cho Y.J., Kim N., Choi S.Y. & Suh H.J. (2011). A comparison between high hydrostatic pressure extraction and heat extraction of ginsenosides from ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1466-1473.

Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E. Ogawa, K., & Yano, M. (1999). Quantification of flavonoid constituents in Citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3565-3571.

Keenan D.F., Brunton N., Gormley R. & Butler F. (2011). Effects of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(2), 601-607.

Li, S., Lo, C.Y., & Ho, C.T. (2006). Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4176-4185.

Manthey, J.A. & Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 811-814.

Qiu W., Jiang H., Wang H. & Gao Y. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. *Food Chemistry*, 97, 516-523.

Sanchez-Moreno C., Plaza L., Elez Martinez P., de Ancos B., Martin Belloso O. & Cano M.P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and

antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403-4409.

Serment-Moreno, V., Escobedo-Avellaneda, Z., & Welti-Chanes, J. (2011). High hydrostatic pressure (HHP) microbial kinetics in orange comminuted. ICEF 11 International Congress on Engineering and Food. May 22-26 2011, Athens, Greece.

Tejada-Ortigoza. V. (2012). Inactivación de PME y POD en disgregado de naranja por medio de la combinación de altas presiones hidrostáticas y temperatura. Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Escuela de Biotecnología y Alimentos. Tesis de Maestría.

Tripoli E., La Guadia M., Giammanco S, Di Majo D. & Diammanco M. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104, 466-479.

Varma S., Karwe M.V. & Lee T.C. (2010). Effect of high hydrostatic pressure processing on lycopene isomers. *International Journal of Food Engineering*, 6(5), 1-20.

Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106, 545–551.

Tabla 1. Efecto de diferentes condiciones de presión, temperatura y tiempo sobre el contenido de fenólicos totales y libres de triturado de naranja.

P (MPa)	T (°C)	t (min)	Fenólicos (mg AG/100 g)	
			Totales	Libres
Control			311.0±20.7	212.3±23.0
350	41±2	1	303.5±13.7	206.0±9.2
350		10	298.0±8.5	203.9±12.7
450		5.5	303.2±19.2	212.0±6.9
550		1	302.1±5.2	209.8±6.3
550		10	301.4±10.4	206.3±9.0
350	56±2	5.5	302.1±10.7	207.0±4.5
450		1	290.4±6.1	202.0±6.0
450		5.5	300.1±9.0	205.4±10.3
450		10	290.0±6.0	212.2±9.1
550		5.5	300.0±13.6	195.9±9.9
350	68±3	1	300.9±7.9	204.9±6.9
350		10	300.1±5.4	206.0±4.9
450		5.5	293.7±6.0	207.9±3.2
550		1	297.0±9.0	209.1±5.1
550		10	300.6±6.8	202.0±6.5

Tabla 2. Efecto del tiempo requerido para elevar la presión (CUT) sobre el contenido de fenólicos totales y libres de triturado de naranja.

P (MPa)	T (°C)	t (s)	Fenólicos (mg AG/100 g)	
			Totales	Libres
Control			311.0±20.7	212.3±23.0
350	41±2	48.5±1.7	305.9±5.5	228.2±7.3
450		64.0±2.3	317.8±7.6	230.3±5.0
550		67.5±5.2	312.8±11.1	201.2±17.3
350	56±2	49.0±3.5	308.5±11.4	215.6±17.2
450		63.0±0.0	299.9±26.8	202.6±13.9
550		68.0±1.2	311.9±5.2	220.8±6.2
350	68±3	52.0±4.6	300.0±5.1	203.3±10.2
450		58.5±0.6	303.2±9.4	209.1±10.8
550		75.5±0.6	304.5±10.0	215.0±8.8

Tabla 3. Efecto de diferentes niveles de presión, temperatura y tiempo sobre el perfil y contenido de flavonoides de triturado de naranja. (MPa/min)

Pico	41±2°C						56±2°C						68±3°C					
	Control	350/1	350/10	450/5.5	550/1	550/10	350/5.5	450/1	450/5.5	450/10	550/5.5	350/1	350/10	450/5.5	550/1	550/10		
1	3.7±0.1	3.7±0.1	3.8±0.1	3.8±0.2	3.8±0.2	3.8±0.1	3.9±0.2	3.8±0.1	3.8±0.1	3.9±0.1	3.9±0.3	3.9±0.2	3.8±0.3	3.9±0.3	3.9±0.1	3.9±0.2		
2	1.8±0.1	1.8±0.1	1.8±0.2	1.8±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1	1.9±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1	1.9±0.1	1.9±0.2	1.9±0.1	1.9±0.2	1.9±0.2	1.9±0.1	1.9±0.1		
3	2.0±0.1	1.9±0.1	2.0±0.2	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.0±0.1	2.1±0.1	2.1±0.2	2.1±0.1	2.1±0.1	2.0±0.2	2.1±0.0	2.1±0.1		
4	6.7±0.1	6.8±0.1	6.8±0.1	6.8±0.1	6.9±0.1	6.7±0.2	6.9±0.2	6.8±0.1	6.8±0.1	6.9±0.1	6.8±0.2	6.8±0.1	6.8±0.2	6.9±0.2	6.9±0.1	6.9±0.2		
5	71.8 ±0.8	71.5 ±0.7	71.0 ±0.8	71.6 ±1.2	71.4 ±1.0	71.4 ±0.5	70.7 ±1.1	70.6 ±0.7	71.3 ±0.5	70.4 ±0.8	70.6 ±1.6	70.5 ±1.2	71.1 ±1.6	70.8 ±1.6	70.6 ±0.7	70.4 ±1.2		
6	4.4±0.1	4.5±0.0	4.4±0.1	4.5±0.0	4.5±0.1	4.5±0.2	4.4±0.0	4.4±0.1	4.4±0.1	4.5±0.0	4.4±0.1	4.4±0.1	4.4±0.1	4.5±0.1	4.5±0.0	4.5±0.1		
7	2.7±0.1	2.7±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1	2.8±0.2	2.7±0.1	2.8±0.2	2.9±0.1	2.7±0.1	2.9±0.1	2.8±0.3	2.9±0.3	2.8±0.3	2.9±0.2	2.8±0.1	2.9±0.2		
8	4.9±0.2	5.0±0.2	5.2±0.2	4.8±0.6	4.7±0.4	5.1±0.2	5.2±0.3	5.3±0.1	5.0±0.2	5.3±0.2	5.2±0.4	5.2±0.3	5.0±0.4	5.0±0.6	5.2±0.2	5.2±0.4		
9	2.0±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1	2.1±0.1	2.1±0.2	2.1±0.1	2.1±0.1	2.3±0.0	2.1±0.1	2.2±0.1	2.2±0.2	2.2±0.1	2.1±0.2	2.2±0.2	2.2±0.1	2.2±0.2		
FIT	439.3 ±22.6	430.5 ±18.1	415.7 ±13.9	420.9 ±23.9	426.7 ±22.0	427.7 ±20.1	400.1 ±30.9	416.1 ±19.8	420.3 ±11.1	397.9 ±21.3	406.7 ±36.7	402.5 ±24.9	418.5 ±37.4	415.9 ±29.8	409.4 ±10.3	400.2 ±28.4		

Tabla 4. Efecto del tiempo requerido para elevar la presión (CUT) sobre el perfil y contenido de flavonoides de triturado de naranja. (MPa/s)

Pico	41±2 °C				56±2°C				68±3°C		
	Control	350/48.5±1.7	450/64.0±2.3	550/67.5±5.2	350/49.0±3.5	450/63.0±0.0	550/68.0±1.2	350/52.0±4.6	450/58.5±0.6	550/75.5±0.6	
1	3.7±0.1	3.6±0.1	3.7±0.2	3.7±0.1	3.8±0.1	3.8±0.2	3.8±0.1	4.0±0.2	3.9±0.2	3.8±0.1	
2	1.8±0.1	1.7±0.1	1.8±0.1	1.8±0.1	1.8±0.0	1.8±0.1	1.8±0.0	1.9±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1	
3	2.0±0.1	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.0±0.1	
4	6.7±0.1	6.6±0.1	6.7±0.1	6.8±0.1	6.8±0.1	6.7±0.2	6.8±0.1	6.9±0.2	6.8±0.1	6.8±0.1	
5	71.8±0.8	72.1±0.6	71.8±1.1	71.6±0.4	71.1±0.3	71.3±0.9	71.3±0.6	70.2±1.2	70.7±0.6	70.9±1.0	
6	4.4±0.1	4.5±0.0	4.4±0.1	4.5±0.1	4.4±0.0	4.4±0.0	4.4±0.1	4.5±0.0	4.5±0.1	4.4±0.0	
7	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.2	2.7±0.1	2.8±0.0	2.8±0.2	2.8±0.1	2.9±0.2	2.9±0.1	2.8±0.2	
8	4.9±0.2	4.9±0.1	4.9±0.3	5.0±0.1	5.1±0.1	5.1±0.3	5.0±0.3	5.3±0.3	5.1±0.3	5.2±0.3	
9	2.0±0.1	2.0±0.1	2.0±0.1	2.1±0.1	2.1±0.0	2.1±0.1	2.1±0.1	2.2±0.2	2.2±0.1	2.2±0.2	
FIT	439.3±22.6	445.8±17.3	437.0±27.5	429.2±17.2	422.1±10.5	432.2±21.9	416.7±16.0	399.4±23.2	406.5±22.9	416.5±18.6	

Picos: 1-4, 9 = No identificados; 5=hesperidina; 6=didimina; 7=sinensetina; 8=nobiletina. FIT, Flavonoides totales en mg HE/100 g en base húmeda; el contenido de flavonoides individuales esta expresado como un porcentaje del contenido total.

ADAPTAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM

Tatiane Corrêa de Oliveira¹, Thiago Ferreira dos Santos² e Edna Maria Morais Oliveira¹

¹Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro - Brasil

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil

I. INTRODUÇÃO

O azeite de oliva ocupa uma posição de destaque no cenário da indústria agro-alimentícia por ser um produto de alto valor econômico (Agrimonti *et al.*, 2011). Seu consumo sofreu grande aumento pois, além de possuir um sabor diferenciado e muito apreciado, apresenta em sua composição componentes químicos chamados de fitoesteróis capazes de controlar os níveis sanguíneos de colesterol e ainda apresentam atividade anticarcinogênica (Menendez, 2008; Visioli & Galli, 2000).

Nos últimos anos os consumidores, de uma forma geral, tem demonstrado um maior interesse em relação à procedência e qualidade dos produtos que compram, especialmente em relação aos do gênero alimentício. As informações que devem estar nos rótulos são essenciais para o consumidor escolher um determinado alimento ou preferir uma determinada marca em relação à outra. Essa escolha normalmente reflete o estilo de vida do consumidor (vegetarianismo ou preferência por produtos orgânicos, por exemplo), práticas religiosas (ausência de carne de porco para judeus e muçulmanos) além de restrições alimentares provocadas por problemas de saúde (celíacos, intolerantes a lactose) e, por esse motivo, é extremamente importante que a rotulagem seja feita de maneira correta e honesta. Dessa forma, a autenticidade dos alimentos assumiu maior importância de forma a garantir que consumidores possam fazer escolhas de forma mais consciente em relação aos alimentos que estão consumindo (Woolfe & Primrose, 2004).

Diferentes técnicas são usadas para a avaliação da autenticidade de óleos vegetais, tais como: espectrometria de massas de reação de transferência de prótons (PTR-MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia do infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fase gasosa (CG) e, mais recentemente, a técnica de PCR em tempo real (He *et al.*, 2012).

Os métodos baseados no DNA são cada vez mais utilizados, visto que essa molécula apresenta estabilidade muito maior quando comparada a outras, como por exemplo, proteínas, além de não depender das condições ambientais, como é o caso dos métodos que se baseiam

na composição química dos óleos. Porém, a obtenção de DNA a partir desse tipo de amostra não é tão simples e, por isso, é a “etapa crítica” do processo já que a molécula de DNA se apresenta em pequenas quantidades e degradada.

O objetivo desse trabalho foi, a partir de um método já selecionado em estudo anterior (CTAB-hexano-clorofórmio) após sua comparação com outros três (NucleoSpin Food kit (Macherey-Nagel), DNeasy *mericon* Food kit (Qiagen), DNAExtractor (Eurofins)), criar outra opção mais rápida e eficiente em relação ao rendimento da etapa de extração.

II.MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento alternativo foi uma adaptação do método CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez *et al.*, 2010) ao kit comercial DNeasy Plant mini kit (Qiagen). O protocolo criado para esse novo método encontra-se em anexo (Anexo 1).

Os extratos de DNA obtidos através dessa metodologia foram submetidos a reação de PCR-RAPD com o objetivo de avaliar a qualidade do DNA obtido a partir do novo método de extração e se deu em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem*. Os reagentes foram tampão PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), MgCl₂ 3,5 mM, desoxinucleotídeos (dNTPs) 0,4 mM, oligonucleotídeos iniciadores (OPW 15) 0,2 µM, *Taq DNA polimerase recombinante* 0,15 U/µL (Invitrogen Life Technologies). O volume final da reação foi de 50 µL, sendo 47 µL de mix e 3,0 µL de DNA molde. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 37 °C por 30 segundos, polimerização a 72 °C por 1 minuto, extensão final a 72 °C por 5 minutos e resfriamento a 4 °C.

Através da técnica de eletroforese em gel de agarose foi possível analisar os resultados da reação de PCR-RAPD em relação à amplificabilidade do DNA obtido através do novo método de extração.

Em gel de agarose 2,0% (p/v) com brometo de etídio (protocolo de preparo do gel em anexo) foram aplicados os produtos da PCR-RAPD misturados ao azul de bromofenol (tampão corante). A corrida eletroforética foi realizada nas seguintes condições: 150 V, 150 mA, durante 180 minutos em aparelho *APELEX MAXIGEL ECO 2*, a visualização do gel foi realizada através do transiluminador modelo ECX-20M sob luz UV e fotodocumentação através do sistema de documentação digital (Vilber Lourmat) acoplado ao transiluminador.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gel de agarose com os produtos de PCR-RAPD de amostras de óleo de soja e de azeite de oliva extra-virgem a partir de moléculas de DNA extraídas através dos métodos CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez *et al.*, 2010) e CTAB-hexano-clorofórmio + DNeasy Plant (Giménez *et al.*, 2010 + Qiagen) é mostrado na Figura 1 (Anexo 2).

IV. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos podemos concluir que o método de extração de DNA CTAB-hexano-clorofórmio + DNeasy Plant (Giménez *et al.*, 2010 + Qiagen) apresentou melhor resultado quando comparado ao CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez *et al.*, 2010), pois foi através dele que se obteve um extrato de DNA amplificável e, conseqüentemente, de qualidade suficiente para ser submetido a análise de PCR em tempo real tanto para a amostra de óleo de soja quanto para a de azeite de oliva extra-virgem. Além disso, o novo método proposto apresenta ainda a vantagem de ser mais rápido (duração total de 3-4 horas) em relação ao anterior que apresenta uma etapa overnight.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Agrimonti, C., Vietina, M., Pafundo, S., & Marmiroli, N. (2011). The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 237–244. doi:10.1016/j.tifs.2011.02.002
- Giménez, M., Pistón, F., Martín, A., & Atienza, S. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food chemistry*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609006414>
- He, J., Xu, W., Shang, Y., Zhu, P., Mei, X., Tian, W., & Huang, K. (2012). Development and optimization of an efficient method to detect the authenticity of edible oils. *Food Control*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003805>
- Menendez, J. (2008). Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International ...*, 433–439. doi:10.3892/ijmm
- Visioli, F., & Galli, C. (2000). Olive oil: more than just oleic acid. *The American journal of clinical nutrition*, 72(3), 853. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966910>
- Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *TRENDS in Biotechnology*, 22(5), 222–6. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.010

Anexo 1

Extração através do método CTAB-hexano-clorofórmio + DNeasy Plant mini kit (Giménez *et al.*, 2010 + Qiagen)

1. Pipetar 500 µL de óleo em 8 tubos de 2 mL. Adicionar 250 µL de tampão de lise CTAB (2% CTAB, NaCl 1,4 M, DTT 50 µM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0), 250 µL de hexano e agitar em vortex;
2. Incubar por 30 minutos/60 °C em banho-maria, agitando os tubos em vortex a cada 10 minutos;
3. Adicionar 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) gelado e centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C;
4. Transferir 1 mL da fase superior para outro tubo e adicionar 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v);
5. Centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C e transferir a fase aquosa de cada um dos 8 tubos para um único tubo (tubo novo) anotando o volume de cada uma;
6. Dividir o volume total em dois tubos (tubos novos) e adicionar a cada uma delas 1,5 volumes de solução AW1 e homogeneizar pipetando;
7. Aplicar 650 µL dessa mistura na coluna, centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm e descartar o filtrado. Repetir esse procedimento até que toda a mistura tenha sido aplicada na coluna;
8. Adicionar 500 µL de AW2 na coluna, centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm e descartar o filtrado;
9. Adicionar 500 µL de AW2 na coluna novamente, centrifugar por 2 minutos a 13500 rpm e descartar o filtrado;
10. Transferir a coluna para um tubo de 2 mL (novo) e aplicar 25 µL de AE (previamente aquecido a 65 °C) na coluna, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 14500 rpm para eluir o DNA. Repetir essa etapa mais uma vez.

Anexo 2

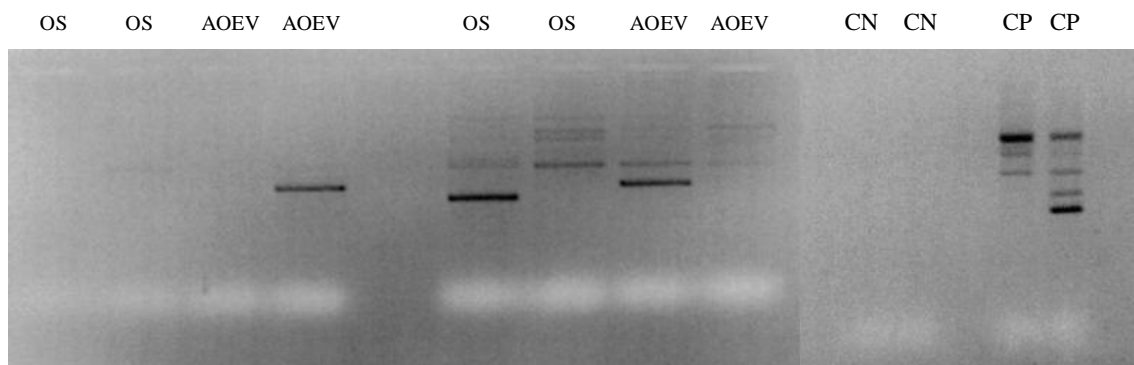


Figura 1. Gel de agarose 2,0% (condições da corrida eletroforética: 150 mV/150 A). OS = óleo de soja, AOEV = azeite de oliva extra-virgem, CN = controle negativo da reação (água milliQ) e CP = soja. Extrações de DNA através dos métodos CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez *et al.*, 2010) e CTAB-hexano-clorofórmio + DNeasy Plant (Giménez *et al.*, 2010 + Qiagen - adaptado).

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CHOURIÇA DE SANGUE TRADICIONAL DO “FUMEIRO DE MELGAÇO”

Afonso, I.M.¹, Lopes J.C.¹, Marinho, C.², Oliveira E.C.¹, Candeias, G.¹, Brito N.V.¹, Vale A.P.¹

¹FSQ - Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

E-mail: iafonso@esa.ipvvc.pt

INTRODUÇÃO

As chouriças de sangue são produtos cárneos muito tradicionais que podem ser encontrados em toda a Europa, com uma composição um pouco diferente, como a *Morcilla de Burgos* (Santos et al., 2003), Cavourmas da Grécia (Arvanitoyannis et al., 2000) e vários produtos portugueses como o *Chouriço Mouro* e a *Morcela*. Este tipo de produtos, embora muito populares, não foi estudado em detalhe. Em Portugal, existem vários tipos de chouriço de sangue, tendo inclusive designações diferentes consoante as regiões de origem, podendo apresentar composições bem diferenciadas em função dos ingredientes utilizados e dos processos como a secagem e/ou fumagem.

Tradicionalmente, o “Fumeiro de Melgaço” é produzido com carne de porco Bísaro (*Sus Celticus*), uma raça suína autóctone do Norte de Portugal e Galiza.

“Chouriça de sangue de Melgaço” é uma chouriça de carne curada pelo fumo, produzida com aparas de carne sangrada, gordura e sangue de raça Bísara ou cruzada, que inclui alho, cebola, sal, vinho e especiarias como pimentão doce e pimenta. Este produto distancia-se do chouriço de cebola que normalmente não é submetido a um processo de secagem.

De um modo geral, as características destes tipos de produtos que não são bem conhecidas e não estão disponíveis dados sobre a chouriça de sangue de Melgaço.

Hoje em dia, a Comissão Europeia está mais envolvida na proteção da qualidade elevada de alimentos tradicionais de regiões ou áreas específicas como forma para promover as áreas rurais, mais deprimidas, e apoiar a população local.

Os produtores de “Fumeiro de Melgaço” solicitaram o registo de Indicação Geográfica Protegida (IGP) (Aviso n.º13959/2010).

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química da chouriça de sangue do “Fumeiro de Melgaço” de modo a obter informação sobre a variabilidade de

características que o produto pode exibir devido ao efeito de escalas de fabrico (produção caseira e industrial).

Palavras-chave chouriça de sangue, *Sus Celticus*, caracterização físico-química, produto tradicional

MATERIAL E MÉTODOS

As propriedades físico-químicas deste produto tradicional foram analisadas, em amostras provenientes de 3 produtores diferenciados pela escala de produção: caseiro (capacidade produtiva inferior a 3000 kg/ano) e tradicional com classificação industrial (capacidade produtiva superior a 3000 kg/ano e potência instalada inferior a 25 kVA -Tipo4).

Na preparação da amostra para as análises físico-químicas, cada amostra (Figura 1) foi picada e homogeneizada mecanicamente para minimizar a heterogeneidade do produto, e posteriormente foi acondicionada sob vácuo e conservada a -80°C até à altura de efectuar as análises.



Figura 1- Aspecto das chouriças inteiras (a) e aspecto ao corte (b). (Fonte: Melgaço Rural (2010))

A caracterização físico-química (FQ) foi realizada tendo em consideração os seguintes parâmetros: pH, humidade, proteína (Kjedahl $\text{Nx}6,25$), gordura (total), cinzas, sal de acordo com as respetivas Normas Portuguesas.

Para a análise estatística, recorreu-se ao programa IBM SPSS 20.0 for Windows, realizando-se uma análise estatística descritiva, análise de variância univariada com um nível de significância de 5% e comparação de médias pelo teste de Bonferroni. Foram calculados, ainda, indicadores de tendência central e indicadores de dispersão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à análise da composição da Chouriça de sangue de Melgaço encontram-se no Quadro 1, atendendo ao tipo de fabrico (caseiro e tradicional com classificação industrial).

Da análise do Quadro 1 é possível constatar que as chouriças de sangue obtidas pelo fabrico caseiro apresentam um valor de pH significativamente mais baixo do que as chouriças tradicionais com fabrico industrial. A qualidade da carne, a composição da chouriça com vinho e presença de cebola e o processo de maturação, afectam a degradação de açúcares podendo resultar em chouriças caseiras menos fermentadas, não corroborando estas observações, sendo contrária às verificadas em *chorizo de cebolla* por Salgado et al. (2006), ao comparar chouriças caseiras com industriais. Esta aparente contradição poderá ser justificada com o fato de o produtor tradicional com classificação industrial, ter um baixo nível de industrialização na sua unidade, sendo um processo ainda muito artesanal, pelo que se se aproxima de uma produção caseira.

Quadro 1 – Média e desvio padrão da composição química em função do efeito tipo de fabrico da chouriça de sangue.

	pH	Humidade	Proteína	Mát. Gorda	Cloretos
Caseiro	4.93±0,21 ^a	29.53±9.72 ^a	21.52±2.40 ^b	38.77±11.57 ^a	1.86±0.54 ^a
Tradicional	5,41±0,15 ^b	23.85±0.24 ^a	17.29±2.02 ^a	52.29±1.06 ^b	2,21±0,05 ^a

Médias na mesma linha com letras diferentes (a- c) são significativamente diferentes (p <0,05)

No que respeita os teores de humidade, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de fabrico, exibindo valores de humidade abaixo dos observados no *chorizo de cebolla*, com 32.2% (Salgado et al., 2005) e muito inferiores aos da *morcilla de Burgos*, com 62.21% (Santos et al., 2003).

Ao nível dos teores de proteína e de gordura, foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de fabrico, verificando-se teores de proteína superiores no fabrico caseiro e teores de gordura mais baixos, mas com uma grande dispersão de valores, evidenciando a grande variabilidade do produto do tipo caseiro. Os teores de proteína e de gordura são em média bastante superiores aos reportados para a *morcilla de Burgos*, 13.09 e 28.65%, respectivamente (Santos et al., 2003) e para a *morcilla de León*, com 5.23 e 14.24%,

respectivamente (Silva et al., 2013). As diferenças observadas estão intimamente relacionadas com os ingredientes utilizados no fabrico das chouriças de sangue.

No que diz respeito ao teor de sal, não foram observadas diferenças significativas entre os tipos de fabrico, constatando-se estes teores são bastante inferiores aos reportados no *chorizo de cebolla* (aprox 2.5-3%) e na mesma ordem de grande aos reportados para a *morcilla de Burgos* (aprox. 1.3%).

Para avaliar o grau de influência do produtor, foi efectuada uma análise de variância e posterior comparação das média com o teste de Bonferroni, obtendo-se os resultados que constam no Quadro 2.

Quadro 2 – Média e desvio padrão da composição química da chouriça de sangue em função do produtor.

	pH	Humidade	Proteína	Mát. Gorda	Cloretos
Caseiro1	4.81±0,14 ^a	36.06±2.25 ^c	22.77±1.57 ^a	31.14±3.51 ^a	1.50±0.16 ^a
Caseiro 2	5.17±0,16 ^b	16.47±1.74 ^a	19.03±1.74 ^b	54.03±2.95 ^b	2.57±0.6 ^b
Tradicional	5,41±0,15 ^c	23.85±0.24 ^b	17.29±2.02 ^b	52.29±1.06 ^b	2,21±0,05 ^b

Médias na mesma linha com letras diferentes (a- c) são significativamente diferentes (p <0,05)

Da análise do Quadro 2 é possível constatar que existem diferenças significativas entre os produtos em todos os parâmetros analisados, evidenciado a grande variabilidade das amostras analisadas. Contudo, é possível verificar que as amostras do tipo industrial apresentaram teores de proteína, gordura e cloretos que não variavam significativamente das amostras do produtor 2 do tipo caseiro, confirmando as observações anteriormente apresentadas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu averiguar que, em geral, a “Chouriça de sangue de Melgaço” exhibe um baixo conteúdo em sal e uma humidade ligeiramente elevada que pode limitar o tempo de prateleira do produto. As chouriças caseiras apresentaram teores de gordura significativamente inferiores e valores de proteína e pH mais elevados, que influenciarão positivamente a qualidade do produto. A variabilidade do produto é esperada, contudo, devem ser asseguradas as origens artesanais e a qualidade do produto e sua autenticidade.

BIBLIOGRAFÍA

Arvanitoyannis, I. S., Bloukas, J. G., Pappa, I., & Psomiadou, E. (2000). Multivariate data analysis of cavourmas—A Greek cooked meat product. *Meat Science*, 54, 71–75.

Salgado, A., Garcia Fontán, M. C., Franco, I. , Lopez, M. & Carballo, J. , 2005. Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry* 92, 413–424.

Salgado, A., Garcia Fontán, M. C., Franco, I., Lopez, M. & Carballo, J. , 2006. Effect of the type of manufacture (homemade or industrial) on the biochemical characteristics of Chorizo de cebolla (a Spanish traditional sausage). *Food Control* 17, 213–221.

Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I. & Rovira, J. (2003). Physicochemical and sensory characterisation of Morcilla de Burgos, a traditional Spanish blood sausage. *Meat Science*, 65:893–898.

Silva , F.A.P., Amaral, D.S., Guerra, I.C.D., Dalmás, P.S., Arcanjo, N.M.O., Bezerra, T.K.A., Beltrão Filho, E.M., Moreira, R.T., Madruga, M.S. (2013). The chemical and sensory qualities of smoked blood sausage made with the edible by-products of goat slaughter. *Meat Science*, 94, 34-38.

CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL DA ESPECIALIDADE GASTRONÓMICA “ARROZ DE SARRABULHO DE PONTE DE LIMA”

G. Candeias¹, **A.P. Vale**¹, **I.M. Afonso**¹, **E.C.Oliveira**¹, **J.C. Lopes**¹, **J. Pereira**², **N.V. Brito**¹

¹ Food Safety and Quality, Escola Superior Agrária,
Instituto Politécnico de Viana do Castelo

² Escola Superior Agrária de Bragança,
Instituto Politécnico de Bragança
PORTUGAL
mariagabrielacandeias@gmail.com

INTRODUÇÃO

É hoje amplamente reconhecido o potencial que os produtos agroalimentares tradicionais têm no desenvolvimento económico e social das regiões de onde são originários, pois possuem especificidades, atributos, particularidades e uma tipicidade nos quais a economia local se pode apoiar. O Arroz de Sarrabulho de Ponte de Lima (ASPL) é um prato da gastronomia tradicional de Ponte de Lima, no norte de Portugal, e que tendo surgido no âmbito familiar, associado à tradição da criação e matança do porco, passou no início do século XX a ser servido pela restauração local. Mais tarde, passou também a ter lugar nos mercados e feiras locais, nas romarias e festas cíclicas, missas novas, noivados, casamentos e nascimentos.

Atualmente, o Arroz de Sarrabulho de Ponte de Lima, é um prato que inclui distintos componentes, e, comercialmente, na maioria das situações, o prato é apresentado com o arroz com carne desfiada e sangue, e os restantes elementos servidos simultaneamente mas em travessa separada, alguns dos quais de presença obrigatória, como as belouras, a chouriça de verde, a tripa branca e os rojões, e outros de presença facultativa, como as vísceras de porco e o sangue cozido e frito.



Figura 1 – Arroz de Sarrabulho de Ponte de Lima com os distintos componentes.

O estudo efetuado teve como objetivo contribuir para a caracterização físico-química e sensorial do Arroz de Sarrabulho de Ponte de Lima, como forma de promover e assegurar a sua autenticidade e genuinidade, servindo de base ao processo de certificação como Especialidade Tradicional Garantida. Para tal, recolheu-se informação dispersa, testemunhos orais e finalmente, foi feita a recolha de amostras em diversos restaurantes, para a realização de análises físico químicas e sensoriais dos diferentes componentes. No presente artigo, apresentam-se dados resultantes da análise sensorial realizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Dada a complexidade do prato ASPL, os seus componentes foram agrupados da seguinte forma:

Componente 1- Arroz – que compreende arroz com carne de vaca, porco e galinha desfiadas e sangue de porco liquefeito;

Componente 2 - Enchidos e Beloura, que compreende a Beloura (preparado de sangue de porco, farinha de trigo, farinha de milho, e farinha de centeio); a Chouriça de verde (chouriça de sangue e gordura de porco); e a Tripa branca (tripa de porco cheia com farinha de milho);

Componente 3 – Rojões, constituídos por carne de porco cozinhada em gordura.

Algumas amostras recolhidas compreendiam ainda vísceras de porco (fígado, bucho, língua e coração de porco), contudo, dado o seu carácter facultativo não foram inseridos na análise sensorial.

A metodologia aplicada na caracterização dos atributos sensoriais do ASPL foi a Análise Descritiva Quantitativa (Prova Descritiva e Hedónica), sendo presentes ao painel 4 amostras comerciais do produto, recolhidas imediatamente após a sua confeção.

Foram realizadas 3 sessões de provas, com intervalo aproximado de 15 dias. O grupo de provadores selecionado foi dividido em 2 painéis, um para a análise sensorial do arroz e outro para os enchidos e as belouras. Posteriormente foi organizado um outro painel para a análise sensorial dos rojões.

Foram presentes em cada sessão 4 amostras comerciais do produto, recolhidas imediatamente após a sua confeção. De modo a avaliar os atributos dos produtos (aparência, aroma, textura e sabor), foram quantificadas as intensidades relativas sobre uma escala estruturada de 7 pontos, bem como a aceitabilidade geral e de cada atributo do produto, permitindo assim determinar o perfil sensorial do Arroz de Sarrabulho de Ponte de Lima, segundo os atributos descritos nos quadros seguintes.

Quadro 1 – Atributos sensoriais do componente Arroz

ARROZ			
Aspeto	Aroma	Textura	Sabor
Intensidade da cor	Intensidade	Textura da calda	Intensidade
Homogeneidade	Vinagre	Dureza do arroz	Salgado
Empapado/solto	Limão	Aderência	Picante
Presença coágulos sangue	Cominhos	Firmeza das carnes	Ácido
	Cravinho	Textura das carnes	Vinagre
	Louro		Limão
	Noz-moscada		Cominhos
	Metálico		Cravinho
	Sangue cozido		Louro
			Noz-moscada
			Pimenta
			Metálico
			Sangue cozido

Quadro 2 – Atributos sensoriais do componente Beloura

BELOURA				
Aspeto	Aroma	Textura (tato)	Textura (boca)	Sabor
Cor superfície	Intensidade	Compressibilidade	Resistência à mordida	Intensidade
Cor massa	Alho	Elasticidade	Crocância	Picante
Homogeneidade massa	Loureiro		Aderência	Salgado
Ligação massa	Cominhos		Arenosidade	Alho
Presença manchas	Metálico			Loureiro
	Tostado			Cominhos
	Fritura (óleo)			Metálico
	Ranço			

Quadro 3 – Atributos sensoriais do componente Chouriça de verde

CHOURIÇA DE VERDE			
Aspeto	Aroma	Textura	Sabor
Cor da massa	Intensidade	Suculência	Intensidade
Homogeneidade da massa	Alho	Firmeza	Picante
Presença cebola	Cominhos Loureiro Metálico Fumo	Aderência	Salgado Adocicado Alho Loureiro Cominhos Salsa Sangue cozido Fumo Raço Metálico

Quadro 4 – Atributos sensoriais do componente Tripa enfarinhada

TRIPA ENFARINHADA			
Aspeto	Aroma	Textura	Sabor
Cor da superfície	Intensidade	Resistência à mordida	Intensidade
Cor da massa	Tripa	Elasticidade	Picante
Homogeneidade da massa	Alho Loureiro Limão Fritura (óleo) Tostado Raço	Arenosidade	Salgado Alho Loureiro Cominhos Metálico Sabor a tripa

Quadro 5 – Atributos sensoriais do componente Rojões

ROJÕES				
Aspeto	Aroma	Textura (tato)	Textura (boca)	Sabor
Intensidade	Intensidade	Suculencia	Resistência à mordida	Intensidade
Homogeneidade	Vinho	Firmeza	Crocância	Picante
Ligação da carne	Alho Loureiro Vinha de alhos Tostado		Aderência Arenosidade	Salgado Alho Loureiro Cominhos Metálico

RESULTADOS

Arroz: O arroz de sarrabulho, apresenta-se como um arroz malandro não empapado, com bastante calda de cor castanha escura, sem coágulos e onde sobressai a presença de carne desfiada. O aroma é perfumado, com notas de cominhos, louro e limão. O sabor é intenso, ligeiramente ácido, sendo a presença de cominhos, cravinho e louro pronunciada (Figura 1 e Figura 2).

Beloura: as rodela de beloura, apresentam a massa homogénea e de cor castanha uniforme, com aroma e sabor moderado a louro e alho (Figura 3).

Chouriça de verde: a chouriça de verde apresenta massa moderadamente homogénea onde se denota a presença de cebola. No aroma distingue-se a presença de cominhos, alho e loureiro, cuja presença também se faz sentir no sabor, ligeiramente adocicado.

Tripa branca: a tripa branca apresenta cor clara homogénea. O aroma denota a presença de alho e loureiro, sendo indesejável a presença de aroma a tripa; o sabor, levemente picante, associa ainda o alho, loureiro e cominhos, sendo indesejável o sabor a tripa.

Rojões: os rojões apresentam cor dourada homogénea, refletindo quer no aroma quer no sabor, a vinha de alhos em que foram temperados.

CONCLUSÕES

Foram observadas variações nos atributos sensoriais dos componentes das amostras em estudo, provenientes dos 4 distintos produtores, nomeadamente ao nível da textura, aroma e sabor. Estas diferenças foram atribuídas à receita utilizada por cada produtor, tendo o estudo conduzido à determinação do perfil sensorial do ASPL, servindo de base para a elaboração da receita de referência no processo de certificação do ASPL como Especialidade Tradicional Garantida.

Os elementos principais que definem o carácter específico deste produto são numerosos e intimamente ligados com a forma de preparação e confeção muito própria, herdada de um passado comum com fortes laços familiares. Atualmente, a habilidade, experiência e gosto, aliados ao esmero e dedicação de cada cozinheira(o), permitem difundir o Arroz de Sarrabulho de Ponte de Lima, mantendo a originalidade e autenticidade dos seus vários componentes.

Palavras-chave: Gastronomia tradicional; Perfil sensorial; Certificação; Especialidade Tradicional Garantida.

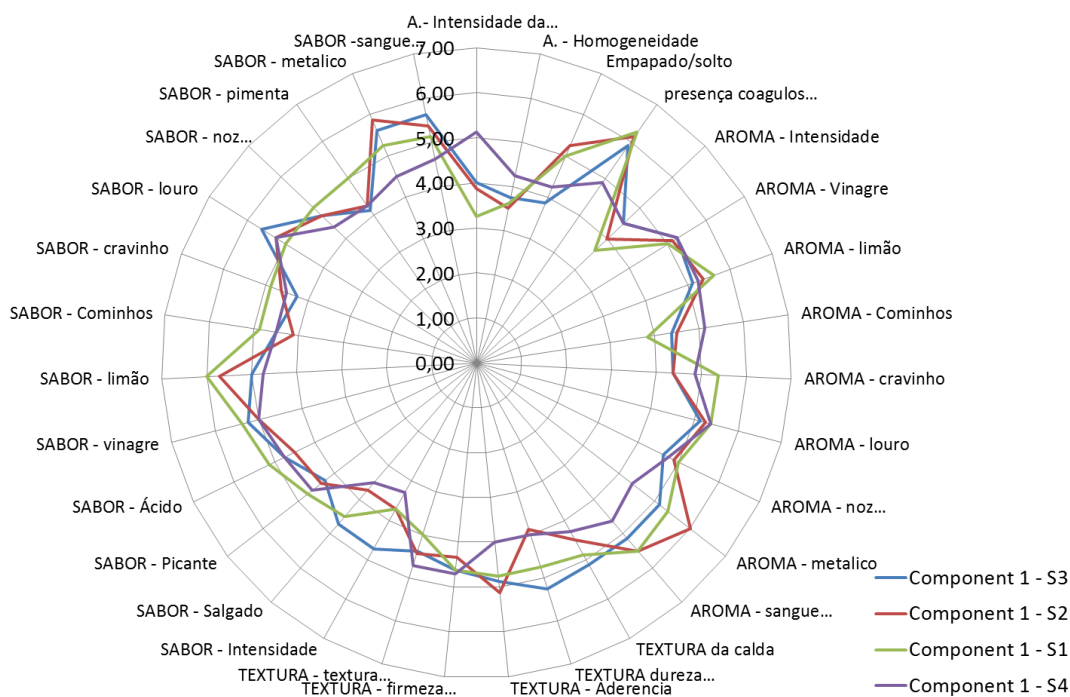


Figura 2- Perfil sensorial do componente arroz, para 4 produtores diferentes.

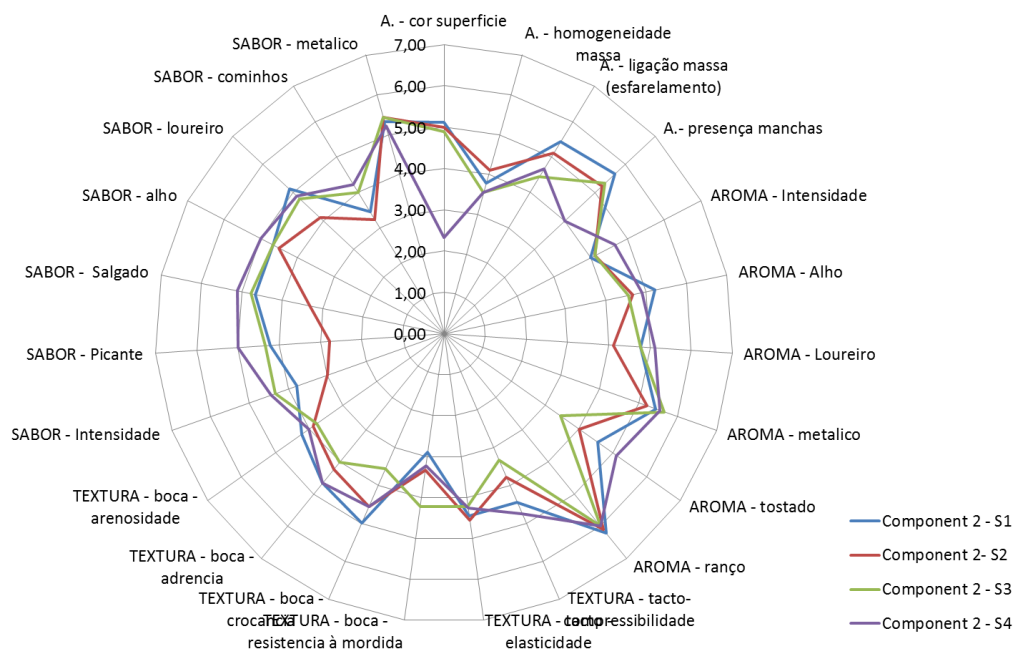


Figura 3- Perfil sensorial do componente beloura, para 4 produtores diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

Vieira e Brito, A.N.; Vale, A.P.; Oliveira, E.; Candeias, G.; 2011. *Sarrabulho à Moda de Ponte de Lima: A Gastronomia da tradição*. Ed. Camara Municipal Ponte de Lima.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS HIDROCOLÓIDES NO MELHORAMENTO DAS PROPRIEDADES ORGANÓLETICAS E NUTRICIONAIS DO *RISSOL*

Ana Patricia Sousa¹, M. Rui Alves^{1,2}, M. Vaz Velho¹, Rita Pinheiro^{1,3}

¹Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Viana do Castelo, Portugal.

²Requimte, Laboratório Associado para a Química Verde, Porto

³IBB— Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal

As novas tendências de mercado, assim como as autoridades de saúde recomendam a redução da proporção de gordura na dieta alimentar. Com este trabalho pretendeu-se desenvolver um sistema de panagem (solução de cobertura) capaz de suprimir a necessidade de fritura ou pré-fritura de um *risso* tradicional (produto salgado panado tradicionalmente frito), substituindo-o pelo processo de cozedura em forno. Pretendeu-se obter uma alternativa saudável, sem incorporação de gordura no produto final (absorção de óleo do processo de fritura), mantendo as mesmas características do *risso* tradicional. Experimentalmente avaliaram-se os efeitos de diferentes hidrocolóides incorporados isoladamente nas soluções de cobertura: carboxilcelulose (CMC), hidroxilpropilcelulose (HPMC), metilcelulose (MC), e as gomas xantana (XA), karaya (KA) e alfarroba (AL), nas concentrações de 0.5% e 1.5%, e também as sinergias estabelecidas entre pares de gomas na concentração final de 1%. Relativamente à textura, verificou-se que, independentemente do tipo de hidrocolóide usado, a concentração de 0,5% apresentou maior dureza e elasticidade do que a concentração de 1,5%. O parâmetro L*, da cor, apresentou diferenças significativas para as diferentes formulações estudadas. Os resultados obtidos para o teor de humidade permitiram concluir que, com as formulações de 1.5% de hidrocolóide, o aumento de retenção de água não foi significativo ($p > 0.05$ em testes de Tukey). Os *risso*s foram avaliados através da análise sensorial, recorrendo a um painel de 14 provadores, usando uma lista com 14 atributos. Os resultados foram analisados através de análises de componentes principais com *biplots* preditivos. Foi possível confirmar os resultados anteriores através das correlações verificadas, e também tornar claro que as formulações com 1,5% de hidrocolóide apresentavam mais fissuras e grumos e um aspeto geral globalmente pior. Concluiu-se que a utilização de uma formulação com 0.5% de hidrocolóide adicionado ao sistema de panagem oferece boas perspectivas para a produção de um produto de forno sem necessidade de fritura.

INTRODUÇÃO

A preferência dos consumidores por produtos com baixo teor de gordura continua a aumentar, existindo uma pressão significativa sobre a indústria para reduzir a gordura em alimentos fritos (Xue e Ngadi, 2007). O elevado consumo de lipídios tem sido relacionado com a obesidade e outros problemas de saúde, como as doenças de foro cardíaco (Chalupa e Sanderson, 1993; Garcia *et al*, 2002). Alguns ingredientes, entre os quais se destacam alguns polissacarídeos, mais ou menos modificados, têm-se mostrado eficazes na redução da quantidade de óleo absorvido (Mellema, 2003; Fiszman, 2003). Manipular a solução de revestimento de alguns alimentos pode ser uma boa alternativa para diminuir a absorção de gordura durante o processo de fritura, promovendo, em simultâneo, a retenção de água no seu interior (Mellema, 2003; Singthong e Thongkaew, 2009). A utilização de hidrocolóides em revestimentos de cobertura, com a formação de uma película fina e invisível, não tem como única finalidade a redução da absorção de óleo, pois contribui também para o melhoramento da viscosidade, adesividade, resistência mecânica da crosta e *pick-up* de controlo. Ajuda ainda no controlo e estabilidade dos processos de congelação/descongelação e mantém crocância dos alimentos panados fritos (Fiszman, 2003; Varela e Fiszman, 2011). Existem vários fatores a considerar ao escolher hidrocolóides para uma formulação de panagem, a qual varia de acordo com a aplicação pretendida. Muitas gomas são altamente hidrofílicas, obrigando ao ajustamento do rácio sólidos/água da formulação, para que a eficiência do hidrocolóide não seja afetada devido à competição pela água disponível (Meyers, 1990). Entre os hidrocolóides, os polímeros hidrofílicos (e.g., alginatos, carragenatos, carboximetilceluloses, pectinas, goma xantana) são amplamente utilizados como formadores de película, porque preservam a textura, o sabor, e o tempo de prateleira dos alimentos. Entre a ampla variedade de gomas utilizadas como barreiras de gordura, as mais estudadas têm sido os ésteres de celulose, MC e HPMC (Varela e Fiszman, 2011), que exibem propriedades únicas de gelificação térmica reversível (Garcia *et al*, 2002; Xue e Ngadi, 2009; Varela e Fiszman, 2011). Quando se adiciona MC ou HPMC à solução de cobertura, esta gelifica imediatamente quando o produto entra em contacto com o óleo quente. Esta propriedade, juntamente com a sua elevada capacidade de retenção de água, permite que estas gomas protejam os alimentos da perda de água a partir do substrato e, por conseguinte, evitam a entrada de óleo durante o processo de fritura (Meyers, 1990). Um fator que tem sido associado à eficácia de barreira é a concentração de MC na solução de cobertura. Sanz *et al* (2004a) verificaram que o aumento na concentração de MC de 1% para 2%, conduz a uma menor

absorção de óleo e uma maior redução da humidade na crosta de anéis de lulas revestidas, quer na pré-fritura, quer na fritura final subsequente ao congelamento. O mesmo autor, constatou que outro fator que tem sido relacionado com a eficiência de barreira é a temperatura da solução no momento da aplicação do revestimento. Uma recente aplicação de MC é o seu uso num novo processo de fabrico industrial de alimentos congelados, que usa as suas propriedades termogelificantes para eliminar a fase de pré-fritura (Sanz *et al*, 2004b; Fiszman *et al*, 2009). A CMC é um outro hidrocolóide, derivado da celulose, que tem sido muito estudado. No entanto, tem sido relatado como sendo menos eficiente do que a MC e a HPMC (Varela e Fiszman, 2011).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos hidrocolóides no revestimento de produtos tradicionalmente fritos, como é o caso do *rissol*, evitando o processo de pré-fritura e fritura. Em simultâneo, pretendeu-se obter um produto com propriedades sensoriais e de textura semelhantes ao produto tradicional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Planeamento Experimental

Neste trabalho utilizaram-se matérias-primas (carne de um mesmo lote) fornecidas por uma empresa local. Após processado, o *rissol* foi submetido ao processo de revestimento, no qual foram utilizadas soluções com diferentes hidrocolóides (XA, AL, KA, CMC, HPMC e MC, nas concentrações 0,5% e 1,5% (w/w). As soluções foram preparadas através da diluição do hidrocolóide em água destilada, agitando com a ajuda de uma espátula, deixando repousar 24h antes da sua utilização. O efeito sinérgico entre pares de hidrocolóides, numa concentração final de 1%, foi também estudado: MC+KA, MC+AL, MC+XA, CMC+KA, CMC+AL, CMC+XA. Para finalizar o processo de panagem, depois de mergulhado na solução, o *rissol*, recebia uma cobertura de pão ralado. Os *rissóis* foram posteriormente processados no forno com convecção forçada a 200°C até o centro térmico atingir 85°C.

Métodos analíticos

A textura das amostras foi analisada através de um teste TPA (*texture profile analysis*) utilizando um texturómetro (TA.XT2i Express Enhance) equipado com sonda cilíndrica (P/4). As medições foram efetuadas em vários pontos centrais da amostra, a uma velocidade de 5mm/s. Foram realizadas 5 réplicas para cada amostra (T=20°C). Para a determinação da cor utilizou-se o colorímetro (Minolta CR-300) e o sistema CIEL*a*b*. Foram realizadas 6 réplicas para cada amostra, em vários pontos (T=20°C). A determinação do teor de humidade

foi efetuada segundo a NP 1614:2002. Foram realizadas 6 réplicas para cada amostra. Na prova de análise sensorial realizada para a caracterização das amostras, com um painel de 14 provadores treinados, as amostras foram avaliadas quanto ao aspeto geral, cheiro, textura apreciada com talheres e textura na mastigação, com uma escala de 9 pontos ancorada nas extremidades com 1 – pouco/ausente e 9 – muito/ intenso. Na análise estatística recorreu-se à análise de variância (ANOVA), com testes de comparação múltipla de Tukey, e à análise de componentes principais com *biplots* preditivos (Alves, 2012). Todas as análises foram efetuadas com o programa R Project for Statistical Computing (www.r-project.org).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Relativamente à textura, verifica-se que, independentemente do tipo de hidrocolóide utilizado, a concentração de 0,5% apresenta maior dureza do que a concentração de 1,5%. Através da análise da Figura 1, verifica-se que as formulações apresentam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$), quer na dureza, quer na elasticidade. Confirma-se uma tendência para uma maior dureza com menor concentração de hidrocolóide na solução de cobertura, uma vez que as amostras com 0,5% são semelhantes entre si (à exceção da 0,5% CMC). O mesmo comportamento foi observado com as amostras 1,5%. Verifica-se ainda que a goma XA apresenta valores muito semelhantes para a dureza. Lazaridou *et al.* (2007) constatarem, num estudo de reologia em pão sem glúten, que a goma XA, nas concentrações de 1 e 2%, potencia o efeito de dureza e elasticidade do pão. Para Guarda *et al.* (2004), os resultados indicaram que uma concentração de apenas 0,1% (w/w) de hidrocolóide aumenta a dureza no miolo do pão, mantendo-se esse efeito constante para concentrações mais elevadas. Os resultados obtidos para a elasticidade (Figura 2) indicaram que, na generalidade, a elasticidade é maior para a concentração de hidrocolóide de 0,5%, os valores mais elevados registaram-se nas concentrações de 0,5% (CMC e AL). As sinergias entre os pares de hidrocolóides (Figura 1, direita), quer nos valores de dureza, quer nos valores de elasticidade (Figura 2, direita), não revelaram alguma tendência, embora existam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Relativamente à cor (Tabela 1 e 2), verifica-se que existem diferenças significativas, nos valores de L^* , para as amostras ($p < 0,05$). De uma forma geral, amostras com 0,5% CMC e 0,5% AL apresentaram uma cor mais clara e 0,5% HPMC e 1,5% KA apresentaram uma cor mais escura. Relativamente aos resultados de L^* para as sinergias dos pares de hidrocolóides, verifica-se que, embora existam diferenças entre as amostras, elas revelaram-se menos significativa que as anteriores. De acordo com Varela e

Fiszman (2011), o aspeto final do produto panado depende inteiramente das suas características exteriores, e, neste caso, verifica-se que o hidrocolóide não influencia a cor do produto, uma vez que a cor é muito influenciada pelo *pão ralado*. Em relação ao teor de humidade, verifica-se que os valores variaram entre 38,57(\pm 2,56)% e 47,22(\pm 1,83)% (Tabela 1 e Tabela 2), para as gomas 1,5%XA e 1,5%CMC, respetivamente, embora não existam diferenças significativas entre as amostras no nível $p=0,05$. Estes resultados vão ao encontro dos resultados obtidos por Chen *et al* (2009), que concluíram que o teor de humidade em crostas de *nuggets* com 1% de CMC e 1% de HPMC era superior quando comparado com 1% de proteína de trigo entre outras proteínas e 5% amilose ou amido modificado, em condições de fritura e micro-ondas. Relativamente à análise sensorial, tal como se vê na figura 3, as componentes principais 1 e 2 explicam 54% da informação total, refletindo variações observadas entre as diferentes amostras, nos atributos T1d, mc, at, cc e af. Podemos então afirmar que os provadores privilegiaram o aspeto (aspeto característico, fissuras, textura característica) e a mastigação (crocância e dureza na 1ª dentada). O aspeto da textura característica correlaciona-se positivamente com o cheiro característico e negativamente com as fissuras. Podemos observar que a CMC origina um aspeto geral mais característico, com valores entre 6 – 6,5 ao passo que, por exemplo, as gomas XA e KA originam uma cor menos característica (para as 2 concentrações). Rissóis com MC, CMC+AL, CMC+XA e CMC apresentaram uma menor dureza na 1ª dentada e menos crocância; A utilização de HPMC demonstrou o mesmo comportamento mas menos extremo. Os rissóis com MC+XA e AL1 apresentaram um aspeto menos característico, uma maior dureza, e maior crocância, ao passo que com AL2 são idênticos aos com AL1, mas com aspeto mais característico

CONCLUSÕES

Muitos estudos têm sido feitos para reduzir o teor de gordura em produtos fritos. Desenvolver um sistema de panagem capaz de suprimir a necessidade de fritura ou pré-fritura de um *rissol* tradicional, substituindo pelo processo de cozedura em forno, pode ser uma alternativa, com o objetivo de obter um produto aceitável pelo consumidor e nutricionalmente mais adequado. De uma forma geral, a utilização de uma formulação com 0.5% de hidrocolóide adicionado ao sistema de panagem oferece melhores perspetivas para a produção de um produto de forno sem necessidade de fritura, uma vez que as formulações com 1,5% apresentam um aspeto visualmente pior (fissuras e grumos).

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, M. Rui. (2012). Evaluation of the predictive power of biplot axes to automate the construction and layout of biplots based on the accuracy of direct readings from common outputs of multivariate analyses: 1.application of principal component analysis. *J. Chemometrics*, 26, 180-190.
- Chalupa, W. F., e Sanderson, G. R. (1993). Process for preparing low-fat fried food. US patent 5,372-829.
- Chen, S.-D., Chen, H.-H., Chao, Y.-C., & Lin, R.-S. (2009). Effect of batter formula on qualities of deep-fat and microwave fried fish nuggets. *Journal of Food Engineering*, 95,359-364.
- Fiszman, S. M., et al. (2009). Method of preparing a frozen, battered food product. U.S. Patent 7,531,200B2. Assignee: Alimentaria Adín SA.
- Fiszman, S.M. e Salvador A. (2003). Recent developments in coating batters. *Trends in Food Science e Technology*, 14, 399–407
- 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.
- Guarda, A., Rosell, C.M., Benedito, C., Galotto, M. J. (2004). Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. *Food Hydrocolloids*, 18, 241-247.
- Lazaridou, A., Duta D., Papageorgiou M., Belc, N., Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79, 1033–1047.
- Mellema, M. (2003). Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends in Food Science e Technology*, 14, 364-373.
- Meyers, M. A. (1990). Functionality of hydrocolloids in batter coating systems. In K. Kulp, & R. Loewe (Eds.), *Batters and breadings in food processing* (pp. 117-141). St. Paul, MN: Am. Assoc. Cereal Chem.
- Sanz, T., Salvador, A., e Fiszman, S. M. (2004b). Innovative method for preparing a frozen, battered food without a pre-frying step. *Food Hydrocolloids*,18, 227-231.
- Sanz, T., Salvador, A., e Fiszman, S. M. (2004a). Effect of concentration and temperature on properties of methylcellulose-added batters. Application to battered, fried seafood. *Food Hydrocolloids*, 18, 127-131.
- Singthong, J., e Thongkaew, C. (2009). Using hydrocolloids to decrease absorption in banana chips. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1199-1203
- Varela, P. e Fiszman, S.M. (2011). Hydrocolloids in fried foods. A review. *Food Hydrocolloids*, 1801-1812
- Xue, Jun e Ngadi, Michael (2007). Thermal properties of batter systems formulated by combinations of different flours. *LWT – Food Science and Technology*, 1459 – 1465.
- Xue, Jun e Ngadi, Michael (2009). Effects of methylcellulose, xanthan gum and carboxymethylcellulose on thermal properties of batter systems formulate with different flour combinations. *Food Hydrocolloids*, 23, 286-295

TABELAS E FIGURAS

Tabela 3 - Efeito dos hidrocolóides no parâmetro L^* da cor, e na humidade (%), em concentrações (0,5% e 1,5%). Valores médios \pm desvio padrão de 6 réplicas para a cor e 3 réplicas para a humidade; Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Formulação	Cor	Humidade (%)
	L^*	
0,5% AL	61,15 (\pm 3,01) _{a,b,f}	42,35 (\pm 3,76)
0,5% CMC	62,85 (\pm 1,15) _{a,g}	43,85 (\pm 2,08)
0,5% HPMC	54,92 (\pm 0,85) _{cd}	42,84 (\pm 5,46)
0,5% KA	57,62 (\pm 1,60) _{b,d,f}	41,98 (\pm 2,40)
0,5% XA	58,41 (\pm 3,54) _{a,b,c,d,f}	45,99 (\pm 3,05)
1,5% AL	58,33 (\pm 2,30) _{b,c,d,f}	45,30 (\pm 1,80)
1,5% CMC	58,58 (\pm 2,06) _{a,b,c,d,f}	47,22 (\pm 1,83)
1,5% HPMC	55,65 (\pm 0,95) _{de}	45,21 (\pm 0,96)
1,5% KA	54,29 (\pm 3,29) _d	38,57 (\pm 2,56)
1,5% XA	59,66 (\pm 2,74) _{e,f,g}	44,45 (\pm 2,82)

Tabela 4 - Efeito dos hidrocolóides no parâmetro L^* da cor, e na humidade (%), em diferentes pares de hidrocolóides (à exceção de 0,5%MC). Valores médios \pm desvio padrão de 6 réplicas para a cor e 3 réplicas para a humidade; Valores com a mesma letra não são

Formulação	Cor	Humidade (%)
	L^*	
0,5% MC	60,86 (\pm 1,46) _a	48,68 (\pm 1,60)
0,5% MC + 0,5% KA	59,97 (\pm 0,73) _{a,c}	44,01 (\pm 2,39)
0,5% MC + 0,5% AL	55,77 (\pm 1,64) _b	46,11 (\pm 1,00)
0,5% MC + 0,5% XA	57,66 (\pm 2,76) _{b,c}	44,72 (\pm 2,73)
0,5% CMC + 0,5% KA	61,18 (\pm 1,85) _a	43,26 (\pm 2,90)
0,5% CMC + 0,5% AL	59,26 (\pm 0,73) _{a,c}	49,53 (\pm 2,02)
0,5% CMC + 0,5% XA	59,48 (\pm 1,14) _{a,c}	44,72 (\pm 2,73)

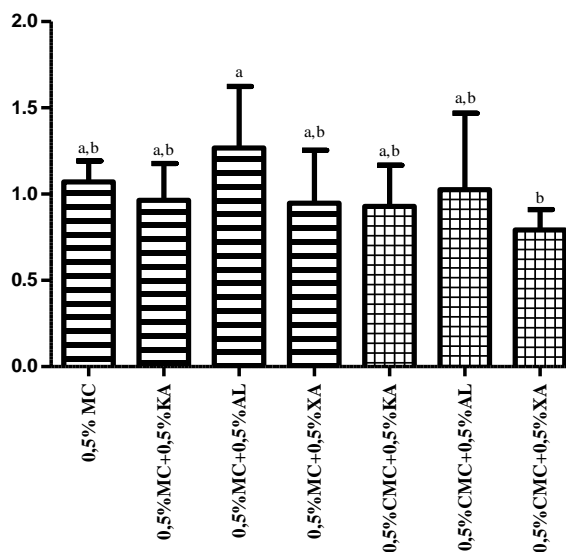
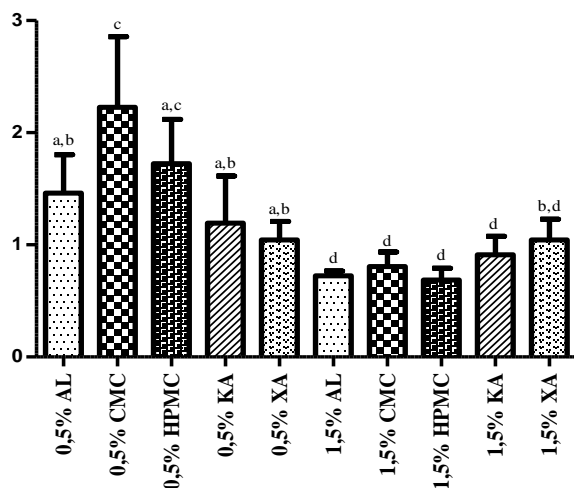


Figura 7 - Efeito dos hidrocolóides na dureza (N) do rissol, em concentrações (0,5% e 1,5%) (à esquerda), e em diferentes pares de hidrocolóides (à exceção de 0,5%MC) (à direita). Valores médios \pm desvio padrão de 5 réplicas para cada amostra; valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

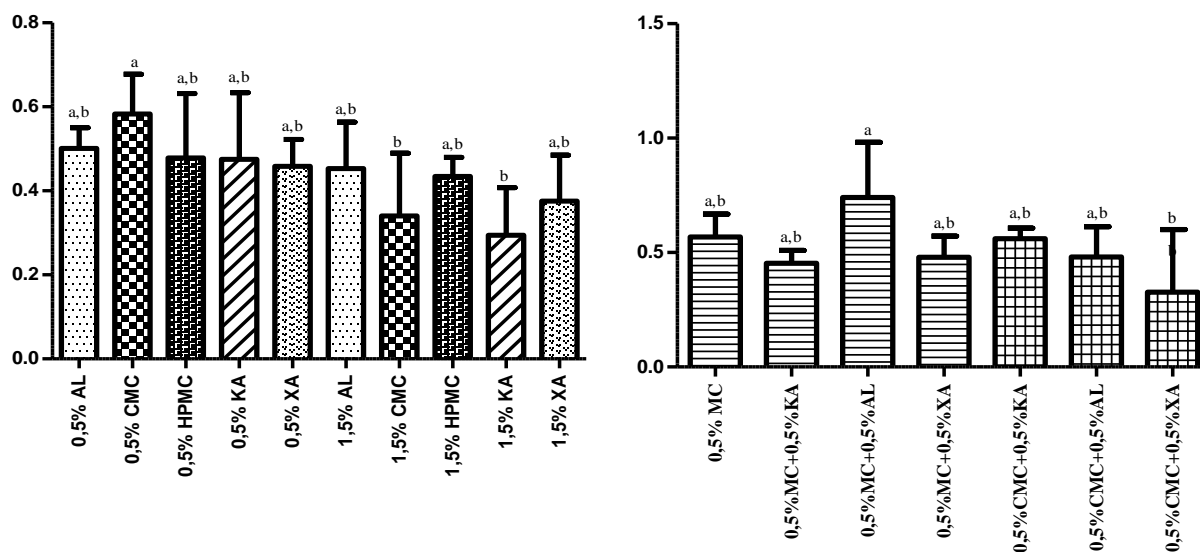


Figura 8 - Efeito dos hidrocolóides na elasticidade do rissol, em concentrações (0,5% e 1,5%) (à esquerda), e em diferentes pares de hidrocolóides (à exceção de 0,5%MC) (à direita). Valores médios \pm desvio padrão de 5 réplicas.

PC1 vs PC2 { 32.8% + 21.2% total info }

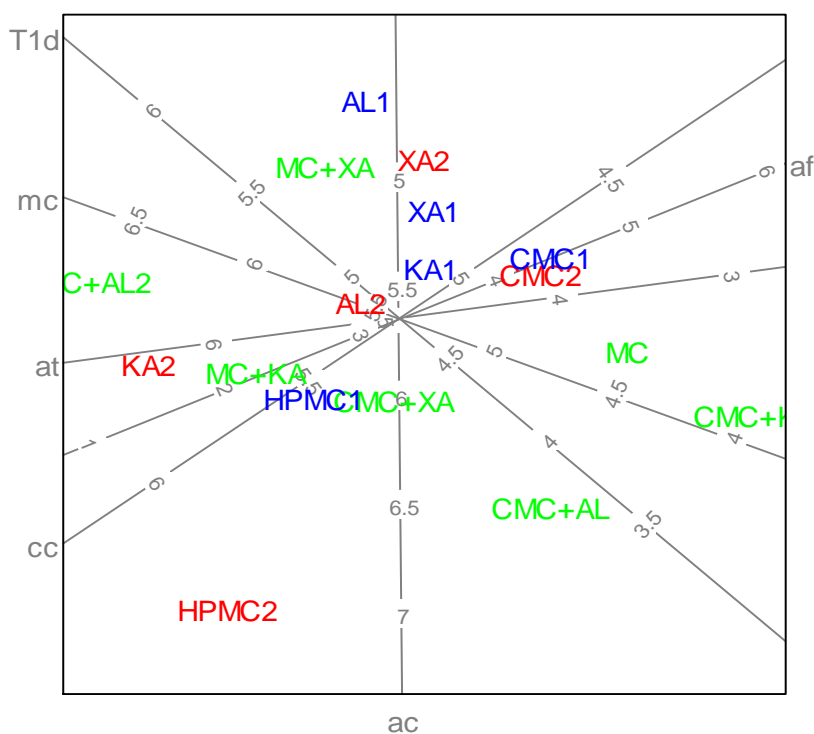


Figura 9 – Análise PCA dos atributos analisados em análise sensorial. AL1, CMC1, HPMC1, XA1 correspondem às concentrações 0,5%. AL2, CMC2, HPMC2, correspondem às concentrações 1,5%. As restantes correspondem às diferentes duplas de hidrocolóides. Componentes principais: T1d – textura da 1ª dentada; mc – mastigação (crocância); at – aspeto (textura característica); cc – cor caraterística; af – aspeto (fissuras)

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BOLO DO TACHO DE PAREDES DE COURA

Lopes J.C.¹, Vale A.P.¹, Serra, E.¹, Oliveira E.C.¹, Candeias, G.¹, Brito N.V.¹, Afonso I.M.¹

¹ Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal
E-mail: juliocesar@esa.ipvc.pt

INTRODUÇÃO

Para o conceito de “produto tradicional”, diferentes interpretações podem ser apresentadas consoante o autor. Para Bernard (1996), um produto é tradicional quando persiste ao longo do tempo, num determinado lugar, mantendo de forma particular em maior ou menor grau as características que o definem como sendo a aparência, a textura ou o sabor.

Neste contexto, os produtos tradicionais representam um grupo que pertence a um espaço definido e são parte de uma cultura que envolve a cooperação entre indivíduos num dado território. Assim, podemos entender como um produto tradicional pode estar associado a uma dada região, bem como ao conjunto de tradições que garantam sua continuidade ao longo do tempo (Jordana, 2000).

A valorização dos produtos tradicionais, fundamentada na preservação dos recursos e do património genético local, constitui um importante vetor nas políticas de sustentabilidade direcionadas principalmente para as áreas rurais.

O “Bolo do tacho de Paredes de Coura” é um bolo de carne produzida na região de Paredes de Coura, no Norte de Portugal. Consiste numa mistura de farinhas de milho (tradicionalmente de variedades regionais), trigo e centeio, fermento e sal, dependendo da receita pode conter gordura vegetal (óleo e/ou azeite) e/ou margarina e ainda carne de porco (tradicionalmente toucinho ou rojões, partida em pequenos bocados). Após mistura dos ingredientes, e após incorporação da carne, a massa é frita de ambos os lados, sendo consumido quente. Tradicionalmente, o bolo do tacho era confeccionado para aproveitar algumas carnes e a massa de broa de milho. De modo a preservar a receita e o modo tradicional de confeção desta iguaria local, será submetido à União Europeia o pedido de registo como Especialidade Tradicional Garantida (ETG).

Neste contexto, é objetivo do presente trabalho proceder à caracterização físico-química do “Bolo do Tacho” como parte integrante do processo de elaboração do Caderno de Especificações como Especialidade Tradicional Garantida (ETG).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras provenientes de 5 produtores (pequenos produtores locais, com capacidade de produção inferior a 3000 kg/ano). Foi realizada a caracterização físico-química tendo sido determinados os teores em humidade, proteína (N Kjeldahl x 6,25), gordura, cinzas, fibras, amido e açúcares totais, de acordo com as normas portuguesas.

O valor calórico foi estimado de acordo com os fatores de conversão apresentados no Quadro 1. Foi considerada a relação de 4,2 kJ / kcal.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o pacote informático SPSS 15[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas variações significativas nos parâmetros físico-químicos entre produtores, para os teores de proteína, gordura, humidade, fibras e amido (Quadro 2.). As diferenças observadas entre produtores poderão ser atribuídas às diferenças nas receitas (proporção entre os diferentes tipos de farinhas, p.ex.) utilizadas na preparação da massa, bem como na quantidade e diferentes tipos de carnes utilizadas (rojões vs toucinho) que podem influenciar de forma acentuada o teor em gordura e proteína.

As diferenças na composição química resultam assim em grandes variações no valor calórico entre amostras (de $237 \pm 1,3$ a $390 \pm 4,0$ kcal).

As amostras analisadas apresentaram um pH ligeiramente ácido (6,0), o que pode influenciar negativamente os atributos sensoriais, esta acidez poderá estar relacionado com processo de levedação da massa prolongado, pois em algumas amostras foi percebido um aroma a fermentado.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam claramente a necessidade de se elaborar uma receita de referência para o “Bolo do tacho” de forma a reduzir o grau de variabilidade. Embora alguma variabilidade seja esperada devido às origens artesanais do produto, deve ser garantida alguma consistência como garantia de qualidade e de autenticidade dos mesmos, nomeadamente num produto onde se pretende obter uma ETG.

BIBLIOGRAFÍA

Bernat, E. (1996). Los “nuevos consumidores” o las nuevas relaciones entre campo y ciudad através de los “productos de la tierra”. *Agricultura y Sociedad*, 80-81, pp. 83-116.

Instituto Português da Qualidade. 1990. Norma Portuguesa 3441. Lisboa.

Instituto Português da Qualidade. 2002. Norma Portuguesa 1612. Lisboa.

Instituto Português da Qualidade. 2002. Norma Portuguesa 1614. Lisboa.

Instituto Português da Qualidade. 2002. Norma Portuguesa 1615. Lisboa.

Jordana, J. (2000). Traditional foods: challenges facing the European food industry. *Food Research International*, Vol. 33, pp. 147-152, Elsevier.

Lopes, A., S/D. *Rotulagem Nutricional*. Plataforma Contra a Obesidade, Direção Geral da Saúde, Lisboa.

Official Methods of Analysis (1996), 16th Ed., AOAC INTERNACIONAL, Garthersburg, M.D.

Quadro 1. Fatores de conversão para estimativa do valor energético.

Nutriente	Valor energético (Kcal/g)
Hidratos de carbono	4
Proteína	4
Gordura	9
Fibra alimentar	2

Fonte: Lopes, S/D.

Quadro 2. Valorização nutricional do Bolo do Tacho de Paredes de Coura (em 100 g do produto).

Nutriente	Produtor				
	1	2	3	4	5
Valor Energético (kcal)	390 ^d ±4,0	237 ^a ±1,3	322 ^c ±1,1	259 ^b ±1,2	262 ^b ±1,4
Gordura	25,15 ^d ±0,41	8,53 ^b ±0,25	13,17 ^c ±0,19	8,26 ^b ±0,13	7,43 ^a ±0,21
Proteína	10,19 ^c ±0,21	6,72 ^a ±0,13	8,51 ^b ±0,29	8,05 ^b ±0,15	6,97 ^a ±0,16
Hid. de Carbono dos quais	30,13 ^a ±0,42	33,30 ^b ±0,38	41,84 ^d ±1,27	37,44 ^c ±0,13	41,81 ^d ±0,28
Amido	28,58 ^a ±0,51	28,13 ^a ±0,45	37,24 ^c ±1,29	32,44 ^b ±0,17	35,40 ^c ±0,56
Açúcares	1,55 ^a ±0,09	5,17 ^c ±0,11	4,60 ^b ±1,00	4,99 ^{bc} ±0,06	6,41 ^d ±0,29
Fibra	1,15±0,17	---	0,88±0,76	1,26±0,07	---
Cinzas	1,70 ^c ±0,01	1,61 ^b ±0,01	2,73 ^d ±0,01	2,94 ^e ±0,01	1,31 ^a ±0,01

Letras diferentes numa mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05).

ESTUDIO DE ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE PECTINA-ACEITE DE MAÍZ CON UN PIGMENTO NATURAL

García-Ignacio, H.M., Michicotl-Meneses, M.M*., Garrido-Torres, Y*., Sánchez-Minutti L+, Calderón-Hernández, T**., Tlecuitl-Beristain S+ y García-Barrientos, R+**

*Ingeniería; **Maestría; + Doctor

Lab. Procesos Biotecnológicos, Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tepeyanco, C.P. 90180 Tlaxcala, México

INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria ha revolucionado de acuerdo a la demanda del consumidor por alimentos más naturales que sean libres de compuestos químicos que actúan como conservadores además de reducir la cantidad de envases producidos como deshecho una vez que han efectuado su objetivo con el alimento lo que resulta de alto impacto al medio ambiente. El proceso de conservación y envasado de los alimentos es una prioridad para mantener al máximo las propiedades organolépticas y para prolongar la vida útil de anaquel de los mismos, una alternativa para llevar a cabo este propósito es el desarrollo de películas comestibles.

Una película comestible se define como un material de envasado, que es una capa delgada de material comestible que se coloca sobre o entre los alimentos, teniendo como función la protección y conservación de los mismos (Pérez-Espitia y col., 2013). Las películas comestibles pueden ser aplicadas por diferentes técnicas como la inmersión, spray o casting. Las películas pueden ser elaboradas a partir de diferentes moléculas como polisacáridos, (almidones, alginatos, pectinas, quitina, quitosano y carragenanos), proteínas, (caseína, colágeno, zeína), y lípidos (aceites, ceras, resinas, ácidos grasos) y combinación de éstas. Para la plastificar la película es necesario adicionar un plastificante, el cual es una sustancia estable no volátil y con un alto punto de ebullición, la cual cuando es adicionado a otro material cambia sus propiedades físicas y/o mecánicas de este material (Rodríguez-Turienzo, 2011).

Se han realizado diferentes estudios con el uso de combinación de moléculas, entre ellas los polisacáridos. La pectina es un polisacárido natural, no tóxico y aniónico extraído de las paredes celulares de la mayoría de las plantas. La pectina está constituida esencialmente por uniones de residuos de ácido α (1-4) D- galacturónico en forma lineal parcialmente esterificados con metanol (Ghaffari y col., 2007). Las pectinas tienen la propiedad de formar geles, tienen un pH ácido y se clasifican como pectinas de alto metoxilo y bajo metoxilo de

acuerdo al porcentaje de grupos carboxilo esterificado. Las películas se han estudiado en estado nativo es decir sin la aplicación de algún colorante que pueda proporcionar una apariencia deseable para el alimento o evitar daños provocados por la luz, por lo que la aplicación de un pigmento natural sería de gran ayuda para solucionar estos problemas.

El ácido carmínico puro es el pigmento líder a nivel mundial, seguido por los carotenoides y el color caramelo; se obtiene de la hembra de la cochinilla *Dactyloscoccus*, un insecto del orden Homóptera originaria del Perú, México, Centroamérica y Chile, es amarillo pálido aún pH 4, forma tonos rojo brillante con complejos con metales, como aluminio o calcio-aluminio; según el pH y los metales empleados, se logra la amplia gama de colores del ácido carmínico (Badui y col., 2013). La combinación de las moléculas para formar las películas puede ser en forma de emulsiones. Las emulsiones pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo a la distribución de la fase oleosa y acuosa. Se ha observado que las películas realizadas de esta forma pueden contribuir a mejorar sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar algunas propiedades fisicoquímicas de películas comestibles a partir de diferentes concentraciones de pectina, aceite de maíz, pigmento natural y plastificante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de películas.

Se prepararon las emulsiones de formación de película de pectina-aceite de maíz-pigmento a las siguientes proporciones 1% de pectina (P); aceite de maíz (M) 1 y 3%, y se agregó el pigmento natural (C) (0.004 y 0.002%) y por último el plastificante (G) (1 y 0.5%), las emulsiones de película se prepararon por disolución de pectina (P) 1% en agua MilliQ (1.5% w/v), con agitación usando un agitador magnético (200 rpm a temperatura ambiente), se agregó aceite de maíz (M) 1 y 3% y se añadió dos diferentes concentraciones de plastificante (G) 1 y 0.5%. Se emulsionó con mezclador Molinex (a 1000 rpm/3 min.) y se añadió el pigmento en dos concentraciones (0.002 y 0.004%) se mezcló nuevamente (a 1000 rpm/3min.). Un volumen de 20 mL de emulsión de película se colocaron de forma uniforme en caja Petri 8.5 cm de diámetro. Las películas se secaron en un horno de convección (Heratherm modelo OMS60 Thermo SCIENTIFIC 31-250°C) a 50°C durante 12 h.

Determinación de pH.

Se midió el pH de las emulsiones preparadas con un Potenciómetro (HANNA H12211 diseñado para pH, potencial de óxido y reducción y temperatura mediante un electrodo).

Determinación de color.

La evaluación del color se realizó instrumentalmente utilizando un Espectro UV-VIS Cary 300 (Modelo Cary 300/ UM1003M318 AGILENT TECHNOLOGIES), se empleó como estándar agua MILIQ, se colocó 1µL de muestra en cubetas de plástico, las muestras se leyeron por triplicado a un ángulo de 10 grados. Los valores obtenidos de L*, a* y b* se transforman a coordenadas polares empleando las ecuaciones (1 y 2), para obtener los valores de cromaticidad y tonalidad.

Microscopía óptica.

La estructura de las emulsiones se evaluó por microscopía óptica, observando el tamaño del glóbulo formado. Se utilizó un microscopio (NOVEL OPTICS Digital Biological Microscope Modelo: L-1100-B). Se tomó una gota con una pipeta Pasteur y se colocó en un portaobjetos, se colocó en el microscopio y se observó en magnificaciones de 40x. Se tomaron fotografías digitales (Software ScopeImage 9.0). Se realizó la medición del diámetro del glóbulo de aceite formado.

Espesor de la película.

El espesor de la película se midió con un vernier calibrador digital (Mitutoyo modelo CD-6"CX", Digital omm 6in). Se tomaron 8 mediciones en diferentes puntos de la película desde el centro hacia afuera en todo su diámetro, estas medidas fueron evaluadas estadísticamente.

Rugosidad de película.

Se determinó la rugosidad de las películas instrumentalmente con un rugosímetro (Mitutoyo SG-301/0.75, con aguja de medición con gráfica de control XR en µin). Se colocaron las películas en una superficie plana, la aguja de medición del rugosímetro se colocó encima de la película en diferentes puntos y se realizó la lectura, se hicieron 5 lecturas por cada medición en las diferentes concentraciones de películas elaboradas.

Microscopía óptica de películas.

La estructura de las películas elaboradas a diferentes concentraciones, se evaluaron microscópicamente. Se utilizó un microscopio (NOVEL OPTICS Digital Biological

Microscope Modelo: L-1100-B) se hicieron cortes de 10x10 mm², se colocó la muestra en un portaobjetos, se colocó en el microscopio y se observó a magnificaciones 40x.

Determinación de color en películas.

Se determinó el color de las películas elaboradas a diferentes concentraciones por el método de píxeles computarizado, se captó la coloración de cada película en diferentes puntos en toda su área con mezcla aditiva de colores con las coordenadas rojo (R), verde (G) y azul (B) y en sistema CIE obteniendo valores de L*, a* y b*, transformando a coordenadas polares con las ecuaciones (1 y 2) para obtener los valores de tonalidad y cromaticidad.

El tratamiento de los datos tuvo un diseño estadístico, el cual comprendió la comparación de medias de las variables de respuesta (prueba de t de Student).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de pH

En la medición del pH de las emulsiones se obtuvo un pH ácido alrededor de 3.46 +/- 0.1 denotando que las emulsiones permanecieron en el rango de pH propio de la pectina el análisis estadístico no mostro diferencias significativas (P<0.005).

Determinación de color.

La determinación de las variables L*, C* y H* (Tabla 1) nos permitió determinar la ubicación de los parámetros de color en las coordenadas CIE Lab, obteniendo un color rosa.

Tabla 1. Resultados de cromaticidad y tonalidad.

Muestra	Características de Películas			Parámetros de Color		
	% P	% G	% C	Luminosidad (L*)	Cromaticidad (C*)	Tonalidad (H*)
1	1	0.5	0.002	85.43	14.66	15.79
2	1	0.5	0.004	78.70	10.75	22.73
3	1	1	0.002	84.12	14.07	13.02
4	1	1	0.004	76.84	12.14	24.23

Los resultados estadísticos de comparación de las medias no mostraron diferencias significativas (P>0.001) en los parámetros de luminosidad, color y tonalidad entre las muestras con la misma concentración de colorante (0.002 y 0.004) y diferente concentración plastificante y de aceite, sin embargo entre la comparación de la concentración de colorantes mostraron diferencia significativa (P<0.001)

Microscopía óptica

El diámetro de partícula evaluado en las emulsiones fue homogéneo en todas las concentraciones en un orden de $0.2 \mu\text{m}$ esta evaluación fue realizada inmediatamente después de elaborar las emulsiones, éstas se dejaron en reposo 72 horas para evaluar posteriormente el diámetro de partícula y observar cambios en la emulsión. Después de las 72 horas el diámetro del glóbulo cambió a un orden de $2.028 \mu\text{m}$ y la emulsión presento un cremado en la parte superior de la emulsión, hubo coalescencia lo cual es proporcional al diámetro del glóbulo que se determinó. Se pudo notar que hay mayor estabilidad en películas con concentraciones de 0.5 y 1% plastificante (G) con 1% aceite de maíz (M) ($P < 0.001$), en cuanto al colorante la diferencia no es significativa ($P > 0.001$). En la Figura 1 se muestra una comparación de la microscopía a los dos diferentes tiempos.



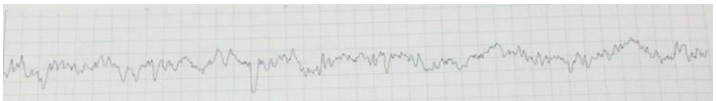
Figura 1. Comparación del diámetro de partícula formado a diferentes tiempos (1: $t=0$, 2: 72 horas).

Espesor de la película.

La medición del espesor no mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) para las diferentes concentraciones de reactivos utilizados para elaborar las películas, los resultados marcaron una medición alrededor de 0.11 mm (Figura 2.).

Rugosidad de la película

Este parámetro mostro diversos modelos de rugosidad en un plano XR, donde se pudo analizar instrumentalmente por ambos lados de la película, el extremo superior carece de

uniforme, 1)  planicidad
en cuanto a su
 lado inferior muestra una planicidad uniforme casi línea, este parámetro se observa en todas las películas elaboradas en sus diferentes concentraciones, (Figura 3).

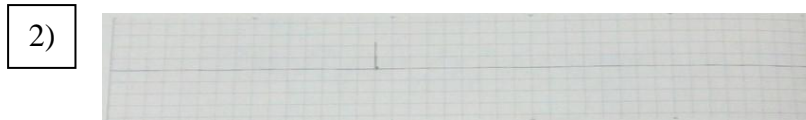


Figura 3. Gráficos de rugosidad

1) Rugosidad de lado superior de película (sin planicidad) , 2) Rugosidad de lado inferior de la película (presenta planicidad casi uniforme).
Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre la determinación del espesor dependiendo del lado que fuera determinado.

Microscopía óptica de películas

La determinación óptica de las películas 1% P, 0.5% G, 1% M, nos mostró una estructura uniforme en las diferentes concentraciones de color empleado, se puede ver que la película b) es más homogénea que a) y c) (Figura 4). Las fotografías nos muestran que no hay una planicidad uniforme o lineal lo que corrobora la evaluación instrumental de la rugosidad.

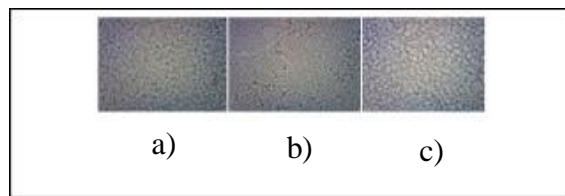


Figura 4. Microfotografías de película 1% P, 0.5% G, 1% M, 40x
a) 0%, b) 0.002% y c) 0.004% a 40x.

La figura 5 nos presenta la microscopía de películas 1% P, 1% G, 1% M, se muestran estructuras uniformes.

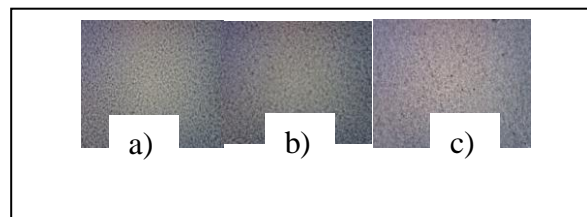


Figura 5. Fotografías de microscopía de película 1% P, 1% G, 1% M, a 40x
a) 0%, b) 0.002% y c) 0.004%

En la figura 6 se observa de forma más específica la estructura de las películas, aquí se observó que se presentan bordes y hendiduras en la estructura lo cual es comparado con los gráficos de rugosidad.



Figura 6. Microscopía de la estructura de películas elaboradas en diferentes concentraciones.

Determinación de color en películas.

El método píxeles computarizado utilizado, permitió evaluar el color de las películas, por medio de las coordenadas L^* , a^* y b^* las cuales fueron transformadas a coordenadas polares para determinar el matiz, la tonalidad y cromaticidad.

CONCLUSIONES

Las propiedades físicas y mecánicas evaluadas en este trabajo describen el comportamiento de la película que puede presentar al ser aplicado en algún alimento o la elaboración de un recubrimiento, según sea el caso. Al mismo tiempo todos los resultados nos llevan a la búsqueda de la mejora del desarrollo para poder obtener películas más estables y específicas dado la exigencia de la industria alimentaria para la conservación de los alimentos.

REFERENCIAS

- Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., y Vicente, A. A. (2011). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27(2012), 175 – 184.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Delporte, B., y Voyley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180(2000), 47-55.
- Gou, X., Zhao, W., Pang, X., Liao, X., Hu, X., y Wu, J. (2013). Emulsion stabilizing properties of pectins extracted by high hydrostatic pressure, high-speed shearing homogenization and traditional thermal methods: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 1-9.
- Guerrero-Legarreta I.; López-Hernández E.; Armenta-López R.; y García-Barrientos R.; 2013, Pigmentos, en el libro *Química de alimentos* Ed. Badui-Dergal S. Editorial Pearson, pp 379-417.

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., y Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82(2010), 585-593.

Peressini, D., Bravin, B., Lapasani, R., Rizzotti, C., y Sensidoni, A. (2002). Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59(2003), 25-32.

Rodríguez-Turiénzo, L. (2011). Evaluación de recubrimientos comestibles proteicos aplicados al salmón del Atlántico (*Salmo salar*) congelado: estudio de diferentes formulaciones y tratamientos tecnológicos. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo (2011).

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM SOBRE BIOCÓMPOSTOS DAS MACROALGAS

Campos, J. A.; Branco, I. G.; Branco, C. C. Z.

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Av. Dom Antônio 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

As reações oxidativas e o processo respiratório, comuns ao metabolismo de todos os organismos vivos, fazem com que espécies reativas do oxigênio sejam formadas. O excesso dessas espécies reativas podem causar danos no organismo ao iniciar uma oxidação molecular, levando a morte celular. Além de criar um estresse oxidativo que resulta no aparecimento de inúmeras doenças, como câncer, doenças cardíacas, diabetes, mal de Alzheimer, doença de Parkinson, acelera também o envelhecimento (Chew et al., 2008; Silva et al., 2010). Sendo assim, há uma necessidade de antioxidantes para proteção contra esses radicais. Nosso organismo possui um sistema antioxidante composto por enzimas e componentes hidro e lipossolúveis mas, para resistência ao estresse oxidativo, uma fonte exógena de antioxidantes é essencial (Silva et al., 2010). Plantas e algas podem ser complementares à dieta, uma vez que estas utilizam em seu metabolismo secundário, algumas estratégias de defesa para lidar com o estresse sofrido em suas células. Compostos com atividade antioxidante são algumas delas.

Sabe-se que uma dieta composta por alimentos de origem natural tem grande efetividade na prevenção de muitas doenças causadas pelo estresse oxidativo, mostrando que muitos produtos de origem natural tem uma considerável importância à saúde humana. A riqueza em elementos essenciais e a busca por uma vida mais saudável, têm chamado grande atenção dos pesquisadores e consumidores para este tipo de produto.

Nos últimos anos, estudos com algas tem aumentado consideravelmente, não só em função de sua importância biológica (por suprir a quantidade de oxigênio dos mares, uma vez que é produtor primário), mas também em função do interesse das indústrias farmacêuticas (na encapsulação de medicamentos com ágar e carragena extraídos desses seres, por exemplo), de biocombustíveis, químicas, cosméticas e também alimentícias. Algas são tradicionalmente utilizadas na dieta de alguns povos, como os japoneses, e suas propriedades nutricionais são bem conhecidas. Fazem parte de sua composição alguns nutrientes como, vitaminas e minerais, aminoácidos, fibras (Andrade et al., 2013), uma grande quantidade de compostos funcionais como, ácidos graxos polinsaturados (Cohen & Vonshak, 1991),

proteínas, carotenoides (como beta caroteno) e outros pigmentos antioxidantes. Tecidos comestíveis de plantas tem uma ampla variedade de carotenoides, embora este seja biossintetizado principalmente por algas do oceano (Silva et al., 2010). Porém ainda não se tem total conhecimento das propriedades nutricionais, apesar de alguns países, como a França, autorizarem o consumo de algumas algas, dentre elas o gênero *Ulva* (Yaich et al., 2011).

Dentre as espécies algais, encontram-se a *Ulva lactuca* e *Chaetomorpha antennina*, que são macroalgas verdes, marinhas, com distribuição mundial e de rápido crescimento e dispersão em condições favoráveis. *Ulva lactuca* é capaz de estocar grande quantidade de nutrientes, permanecendo assim viva mesmo na ausência de luz, baixas temperaturas e estresse ambiental (Costa, 2006). Apresenta atividade antioxidante (Zhang et al., 2010), sendo esta importante para evitar o envelhecimento dos tecidos, inibindo a oxidação das células. *Chaetomorpha antennina* pertence a um gênero com potencial para alimentação, e pode ser encontrada no litoral brasileiro (Raymundo et al., 2004).

O uso de algas como alimento funcional, tem vantagem por estes serem organismos de fácil e rápido crescimento e cultivo, além de se poder controlar a produção de determinados compostos bioativos, ao manipular as condições de cultivo (Tierney et al., 2010).

Estudos avaliando biocompostos de algas já vêm sendo explorados (Yuan et al., 2005; Quirós et al., 2010; Tierney et al., 2010; Lopez et al., 2011; Silva et al., 2010; Chew et al., 2008). Porém, durante o processamento e armazenamento da biomassa, há perda considerável de muitos compostos funcionais (Herrero et al., 2005). Assim, neste trabalho buscou-se avaliar a influência da secagem sobre os biocompostos algais (compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante) de duas espécies algais (*Ulva lactuca* e *Chaetomorpha antennina*), secas e *in natura*.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Biologia e Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Assis, São Paulo, Brasil.

Nos estudos foram utilizadas duas espécies de algas marinhas *Ulva lactuca* e *Chaetomorpha antennina*, ocorrentes no litoral brasileiro, e coletadas no mês de agosto de 2012, na cidade de Ubatuba - São Paulo- Brasil.

O lote do material, de cada espécie, foi dividido e, em uma das partes, foi realizada a secagem, enquanto que o restante foi congelado *in natura*.

2.1.Processamento

Primeiramente, foi feita a triagem das algas em água corrente, separando-as de quaisquer organismos exógenos. Após, estas foram sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio por 30 minutos e centrifugadas em centrífuga doméstica por 5 minutos. Parte do material foi submetido a secagem, o restante acondicionado em sacos de polietileno de alta densidade e armazenados à -18°C.

2.2.Secagem das algas

A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar à 35°C por 24 horas. Após, o material foi triturado em nitrogênio líquido, acondicionado em embalagens de vidro âmbar, protegidos da luz, e armazenados a -18°C.

2.3.Obtenção do extrato algal

O procedimento foi realizado para ambas as espécies algais secas e *in natura*.

Para obtenção do extrato algal utilizou-se como solução extratora etanol/água (80:20). O extrato foi submetido à agitação mecânica, filtrado e armazenado em freezer, em balão protegido de luz. Após, o extrato foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi separado e armazenado à -18°C, até a realização das análises posteriores.

2.4.Caracterização das algas

Foram realizadas as seguintes análises, para ambas as espécies algais, tanto *in natura* como seca.

2.4.1.Umidade

A determinação da umidade da amostra *in natura* foi realizada em estufa à 105°C até peso constante (AOAC, 1996).

2.4.2.Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados através de ensaios calorimétricos, segundo Singleton e Rossi (1965), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A absorbância da cor azul foi medida a 725 nm. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por 100 g de alga.

2.4.3. Carotenoides totais

Foram determinados utilizando-se o método que se baseia na extração de carotenoides por acetona, armazenagem em éter de petróleo e leitura em espectrofotômetro a 450 nm, como descrito por SÁ (2001). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de amostra.

2.4.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada segundo Rufino et al. (2007). O radical ABTS (Sigma-Aldrich) foi preparado com a solução de persulfato de potássio (Sigma-Aldrich). Foi transferido 30 μL da amostra (foram preparadas 5 diluições diferentes do extrato, em triplicata) ou padrão Trolox (100-2000 μM ; marca Sigma-Aldrich) para tubos de ensaio e misturado com 3,0 mL da solução do radical ABTS. A absorbância foi realizada a 734 nm. Resultados foram expressos em μM de atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) por g de alga. A análise foi realizada em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Umidade

Na Tabela 1 são apresentados os teores de umidade para ambas as espécies algais *in natura*. Verifica-se que a macroalga *Ulva lactuca* apresenta menor teor de água nos tecidos quando comparada à *C. antennina*.

Levando em conta a elevada quantidade de água presente nesses organismos, ao serem estocados secos, pode-se prolongar o tempo de armazenamento, pois sem a água, o risco de deterioração oxidativa dos compostos diminui, preservando assim alguns de seus biocompostos na matéria seca (Rocha et al., 2007).

3.2. Fenóis totais

Os resultados de fenóis totais presentes nas duas espécies algais, com e sem tratamento de secagem, estão apresentados na Tabela 2.

Verifica-se elevados teores de fenóis totais para a alga *C. antennina*, independente se a mesma encontrava-se na forma *in natura* ou seca. Já para a alga *Ulva lactuca*, pode-se verificar que a amostra seca apresentou teor de fenóis muito maior quando comparada a *in natura*, que apresenta justamente maior teor de água.

Segundo Lopez et al. (2011), em uma mesma alga, a quantidade de fenóis totais pode variar de 123,2 a 328,7 mg GAE/100g de massa seca, dependendo do solvente e do tipo de alga (verde, parda ou vermelha). Algas pardas apresentam teores mais elevados de compostos

fenólicos do que as verdes e as vermelhas. A quantificação de compostos fenólicos pode depender do método de extração (em função do solvente metanol, etanol, acetona ou água), tendo como mais recomendados as misturas aquosas com metanol, acetona e etanol (Devi et al., 2011).

Chew et al. (2008) encontraram para a alga verde *Caulerpa racemosa*, 144 mg GAE/100g. Comparando esse resultado com o presente estudo, verifica-se que as algas verdes aqui estudadas apresentam elevados teores de compostos fenólicos, principalmente após passarem pelo processo de secagem.

Algumas macroalgas possuem elevado teor de óleos (Martins et al., 2012). Os fenóis atuam inibindo a autoxidação destes óleos, preservando-os. Assim, altos teores de fenóis também podem ser explicados por tal fato.

3.3. Carotenoides totais

Os resultados obtidos para carotenoides totais podem ser observados na Tabela 3, onde verifica-se elevados teores do biocomposto, independente do tratamento e da alga estudada.

Raymundo et al. (2004), estudando Chlorophytas, encontraram valores médios de carotenoides entre 72,27 e 129,04 mg/kg. Comparando esses resultados com os obtidos no presente trabalho, para ambas as Chlorophytas aqui estudadas, verifica-se que estas se apresentam como fonte potencial de carotenoide, principalmente *C. antennina*.

A diferença nos valores obtidos entre as espécies, pode ser justificado também pela distribuição dos organismos no costão rochoso. A intensidade de luz que atinge ambos os organismos difere, uma vez que as espécies habitam altitudes distintas, recebendo diferentes intensidades de raios solares. Assim são produzidos mais ou menos pigmentos fotossintetizantes, consequentemente biocompostos com atividade antioxidante.

Fazendo uma comparação com frutas, por exemplo o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), característico do cerrado brasileiro, que é considerado fonte de carotenoides totais, apresentando 286,65 µg/g na polpa *in natura* (Oliveira et al., 2006), verifica-se valores próximos para as duas algas estudadas na forma *in natura*.

A variação no teor deste biocomposto é dependente da variabilidade genética, armazenamento, coleta e processamento da biomassa. Segundo Golçaves et al. (2010), em frutas do cerrado o teor de carotenoide pode variar após passar por processo de secagem, e o congelamento por longo período de tempo também pode degradar tal composto.

3.4. Atividade antioxidante

As algas necessitam ter bons mecanismos para lidar com o estresse oxidativo, pois vivem em meios muito instáveis devido à mudança de marés, sendo boas fontes de compostos antioxidantes (Rocha et al. 2007).

Na Tabela 4 são apresentados os resultados de atividade antioxidante e verifica-se que a alga *C. antennina* seca apresentou o maior valor dentre as estudadas. As diferenças encontradas podem ser, conforme literatura, devido ao local de coleta, às diferenças entre os filos (algas pardas, vermelhas e verdes), além de diferenças entre os métodos e solventes utilizados na extração.

As bruscas variações na salinidade, pH, luz, quantidade de O₂ e CO₂, sais dissolvidos no meio, entre outras, causadas pela diária transição na zona entre marés, faz com que as algas sejam submetidas a intensas e rápidas mudanças no meio, levando estes organismos a uma situação de estresse. Isso pode explicar os altos teores de compostos com atividade antioxidante presente nesses seres para sua própria proteção.

Estudos sobre a atividade antioxidante em extratos algais ainda são escassos (Silva et al., 2010; Rocha et al., 2007; Al-Amoudi et al., 2009). Porém, Raymundo et al. (2004) encontraram antioxidantes com efeitos distintos para algas pertencentes ao mesmo gênero. Sugeriram que tal fato pudesse ser explicado por diferenças na composição química, solubilidade dos compostos nos solventes ou relação dessa atividade antioxidante com outros compostos antioxidantes como carotenoides, fenóis e clorofila. Apesar das algas deste estudo serem Chlorophytas (algas verdes), as Phaeophytas (algas pardas) são o filo com mais altos índices de atividade antioxidante (Rocha et al., 2007; Al-Amoudi et al., 2009).

As algas poderão ter seu potencial antioxidante aplicado na indústria alimentícia e farmacêutica, assim que houverem mais estudos para identificar, isolar e caracterizar os químicos específicos responsáveis por esses altos valores (Devi et al., 2011).

4. CONCLUSÃO

Os maiores valores dos biocompostos (compostos fenólicos, carotenoides totais, atividade antioxidante) foram verificados para a alga desidratada.

As espécies estudadas apresentaram elevados teores de biocompostos. A alga *Ulva lactuca in natura* e *C. antennina* em pó apresentaram, respectivamente, os menores e maiores teores de fenóis totais, carotenoides totais e atividade antioxidante, mostrando ser esta última

uma fonte potencial desses elementos.

O estudo com algas é promissor, embora ainda seja pouco explorado, principalmente pelos brasileiros, na vasta costa do país.

Tabela 1. Porcentagem de umidade nas espécies estudadas

Amostra	%
<i>Ulva lactuca</i>	88,77%
<i>C. antennina</i>	92,01%

Tabela 2. Teor de fenóis totais em *Ulva lactuca* e *C. antennina* secas e in natura

Amostra	Fenóis totais (mg GAE/100g)	Desvio Padrão
<i>Ulva lactuca</i> seca	450	± 11,06
<i>Ulva lactuca</i> in natura	153,0	± 11,88
<i>C. antennina</i> seca	482,84	± 30,05
<i>C. antennina</i> natura	446,45	± 12,03

Tabela 3. Carotenoides totais em *Ulva lactuca* e *C. antennina* secas e in natura

Amostra	Carotenoides totais (µg/g)	Desvio Padrão
<i>Ulva lactuca</i> seca	494,46	± 5,95
<i>Ulva lactuca</i> in natura	272,85	± 8,58
<i>C. antennina</i> seca	756,87	± 4,49
<i>C. antennina</i> in natura	317,46	± 3,79

Tabela 4. Atividade antioxidante em ambas as Chlorophytas estudadas

Amostra	Atividade antioxidante (µM trolox/g)	Desvio Padrão
<i>Ulva lactuca</i> seca	19,96	± 0,02
<i>Ulva lactuca</i> in natura	16,76	± 0,016
<i>C. antennina</i> seca	33,93	± 0,01
<i>C. antennina</i> in natura	22,06	± 0,016

6. BIBLIOGRAFÍA

Al-Amoudi, A. O.; Mutawie, H. H.; Patel, A. V.; Blunden, G. Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah corniche algae, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, vol.16, p. 23–29, 2009.

Andrade, P. B.; Barbosa, M.; Matos, R. P.; Lopes, G.; Vinholes, J.; Mouga, T.; Valentão, P. Valuable compounds in macroalgae extracts. Food Chemistry, vol. 138, p. 1819-1828, 2013.

Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods Of Analysis Of Aoac international. Gaithersburg: AOAC international, vol. 16, p. 1141, 1996.

- Costa, V. M. F. Utilização da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus na redução de nutrientes (NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₄⁻²) provenientes da carcinicultura (Análise Laboratorial e de Campo). 62 f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Biotecnologia Aquática) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
- Devi, G. K.; Manivannan, K.; Thirumaran, G.; Rajathi, F. A. A.; Anantharaman, P. *In vitro* antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol.-, p. 205-211, 2011.
- Oliveira, M. N. S.; Gusmão, E.; Lopes, P. S. N.; Simões, M. O. M.; Ribeiro, L. M.; Dias, B. A. S. Estágio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 28, n. 3, 2006.
- Quirós, A. R.; Lage-Yusty, M. A.; Lopez-Hernandez, J. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption, vol. 121, p. 634-638, 2010.
- Raymundo, M. S.; Horta, P.; Fett, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.
- Rocha, F. D.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A.C.; Teixeira, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.
- Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Perez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico 128. Fortaleza, 2007.
- Sá, M. C. Carotenóides em alimentos preparados para consumo: Comparação de análise direta e cálculo pelos dados de retenção. 121 f. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- Silva, M. L. C.; Costa, R. S.; Santana, A. S.; Koblitz, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, p. 144-158, 1965.
- Tierney, M. S.; Croft, A. K.; Hayes, M. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Botanica Marina*, vol. 53, p. 387-408, 2010.
- Yaich, H.; Garna, H.; Besbes, S.; Paquot, M.; Blecker, C.; Attia, H. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, vol.128, p. 895-901, 2011.
- Yuan, Y. U.; Bone, D. E.; Carrington, M. F. Antioxidant activity of dulce (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*. *Food Chemistry*, vol. 91, p. 485-494, 2005.

SECAGEM DE RESÍDUOS DE UVA

Rocha¹, L. C.; Haminiuk², C. I.; Moraes³, I. C. F.; Branco¹, I. G.

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Av. Dom Antônio 2100, 19806-900 Assis, São Paulo, Brasil.

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), BR 369, Km 0,5, 87301-006, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

³Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte 225, 13635-900, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

A uva é uma fruta grandemente utilizada em indústrias de sucos e produtoras de vinho. Em 2012, a produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 830,92 milhões de quilos, o que representa 57,07% da produção nacional (Mello, 2013).

A produção de uvas constitui-se em atividade consolidada, com importância socioeconômica, principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, os quais respondem por 97% da produção nacional de vinhos (Santos *et al.*, 2010). Um dos problemas resultantes, no entanto, da produção de vinhos é a geração de uma grande quantidade de resíduos. Os resíduos gerados por indústrias são na maior parte das vezes descartados, e, portanto, além do desperdício, pode muitas vezes causar danos ambientais.

Uma alternativa para o aproveitamento desse resíduo é a elaboração de farinha de uva, já que os resíduos gerados pelas vinícolas possuem grande quantidade de compostos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2012), que são benéficos à saúde.

A secagem é apontada como um dos procedimentos mais importantes para a diminuição da atividade de água, sendo considerado o processo industrial mais utilizado na preservação de alimentos por ser de custo mais baixo e operação mais simples (Alexandre *et al.*, 2009). O estudo da cinética de secagem é de fundamental importância para a modelagem matemática, a qual tem sido muito usada em análise dos processos de transferência de calor e de massa, durante a secagem. (Faria *et al.*, 2012).

A modelagem de processos de secagem é fundamental para a seleção e otimização dos mesmos. O modelo de Page (equação 1) tem sido amplamente usado para simular as curvas de secagem de diferentes produtos como pêras (Park *et al.*, 2002), mamão (El-Aouar *et al.*, 2003), kiwi (Simal *et al.*, 2005), tomate (Argandoña *et al.*, 2011) entre outros.

$$\frac{X_t - X_\infty}{X_0 - X_\infty} = \exp(-kt^n) \quad \text{Equação 1}$$

onde X_t é o conteúdo de umidade média (base seca) para um tempo t , X_0 e X_∞ são a umidade inicial e no equilíbrio, respectivamente. K e n são as constantes do modelo e t , o tempo de secagem (s).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a cinética de secagem de resíduos de uva para posterior obtenção da farinha, nas temperaturas de 60, 70 e 80°C.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As uvas utilizadas no trabalho foram adquiridas no comércio local de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. Primeiramente, as uvas foram sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio por 15 minutos. Após, foram prensadas e o resíduo (cascas e sementes) foi separado da polpa, sendo congelado para posterior utilização.

Na realização da cinética de secagem, os resíduos foram dispersos em uma bandeja de silicone e levados à estufa com circulação de ar, nas temperaturas de 60, 70 e 80° C. As pesagens foram feitas a cada 10 minutos, até peso constante. As cinéticas, para cada temperatura, foram realizadas em triplicata.

O resíduo da uva seco, com umidade final de 5%, foi triturado para obtenção da farinha, e o pó obtido foi acondicionado em embalagens hermeticamente fechadas.

2.1. Modelos matemáticos

Para o ajuste nos modelos foi determinada a razão de umidade adimensional (Y), equação 2, com base nos valores de umidade em base seca.

$$Y = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: X - teor de umidade no tempo t ; X_0 - teor de umidade inicial e X_e - teor de umidade no equilíbrio.

O comportamento cinético de secagem foi simulado aplicando-se os quatro modelos matemáticos mostrados na Tabela 1.

O ajuste dos modelos matemáticos foi avaliado através dos valores do coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio estimado (SE), calculado conforme equação 3, utilizando o programa computacional *Origin 6.0*.

$$SE = \sqrt{\frac{\sum(Y - Y_0)^2}{GLR}}$$

Equação 3

Onde: Y-valores de umidade obtidos experimentalmente; Y_0 – valores preditos do modelo e GLR – graus de liberdade do resíduo.

A difusividade efetiva foi calculada através da equação da 2ª Lei de Fick para placa plana (equação 4), com auxílio do *software Statistica 8.0*. Foi utilizada a equação para 5 termos e o método para estimação dos valores foi o Quasi-Newton.

$$Y = \frac{8}{\pi^2} \exp\left[-\frac{\pi^2}{4L^2} Def \cdot t\right]$$

Equação 4

Onde: Y- umidade adimensional; L – metade da espessura (m); Def – difusividade efetiva em m^2/s e t – tempo (s).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética de secagem

A Figura 1 apresenta a curva de secagem para as temperaturas de 60, 70 e 80°C. Como observado, o tempo de secagem é menor conforme maior for a temperatura utilizada.

O tempo de secagem para que se alcançasse peso constante foi por volta de 3, 4 e 6 horas para as temperaturas de 80, 70 e 60°C, respectivamente.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores dos parâmetros dos 4 modelos matemáticos, os coeficientes de determinação (R^2) e o erro médio estimado (SE) para as três temperaturas estudadas.

Em todos os casos os valores de R^2 foram acima de 0.97, o que indica um bom ajuste dos modelos. O modelo de Page modificado foi o modelo que melhor se ajustou aos dados, tendo apresentado valores de R^2 superiores a 0.9972 e os mais baixos valores de erro, variando de 0.005401 a 0.012924. Já o modelo de Lewis foi o que apresentou o pior ajuste, com valores mais baixos de R^2 e maiores valores de erro, para as três temperaturas.

Outros trabalhos também obtiveram bons resultados com o modelo de Page modificado. Segundo Waughon e Pena (2008), o modelo de Page modificado foi considerado um dos melhores modelos no ajuste das curvas de secagem da fibra residual do abacaxi, apresentando valores médios de R^2 de 0.9997.

O modelo de Page modificado foi o melhor modelo para descrever a cinética de secagem de bagaço de uva fermentado (Ferreira, 2012) e de bagaço de laranja (Fiorentin *et al*, 2012).

Na Figura 2 está apresentado o gráfico com ajuste do modelo de Page modificado nas temperaturas de 60, 70 e 80°C. Pelo gráfico percebe-se o bom ajuste do modelo nas três temperaturas.

3.2. Difusividade efetiva

Na Tabela 3 estão apresentados os dados de difusividade efetiva, para as diferentes temperaturas estudadas, onde se observa que quanto maior a temperatura, maiores são os valores de difusividade efetiva.

Outros trabalhos também mostraram um aumento da difusividade efetiva com a elevação da temperatura (Alves *et al*, 2009; Fiorentin *et al*, 2012; Martinazzo *et al*, 2007). Segundo Celma *et al*. (2009), os valores de difusividade efetiva obtidos na secagem de bagaço de uva variaram de $11.013 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ a $26.05 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ para a faixa de temperatura de 100°C a 160°C.

4. CONCLUSÃO

A cinética de secagem de resíduos de uvas é grandemente influenciada pela temperatura.

O modelo de Page modificado foi o que mostrou melhor ajuste dos dados, enquanto o modelo de Lewis foi o que apresentou o pior ajuste, nas três temperaturas.

TABELAS

Tabela 1- Modelos matemáticos usados no ajuste das curvas de secagem

Modelo	Equação
Page	$Y = \exp(-k.t^n)$
Page modificado	$Y = \exp(-(k.t)^n)$
Lewis	$Y = \exp(-k.t)$
Henderson-Pabis	$Y = a.\exp(-k.t)$

Y-razão da umidade adimensional; a, n, k – constantes do modelo e t – tempo (min).

Tabela 2- Parâmetros dos modelos matemáticos nas temperaturas de 60, 70 e 80°C.

Modelo	Temperatura	k	n	R²	SE
Page	60°C	0.03504	0.79989	0.997230	0.012924
	70°C	0.03070	0.91636	0.998450	0.011264
	80°C	0.03117	1.05010	0.999650	0.005401
	Temperatura	k	R²	SE	
Lewis	60°C	0.01417	0.97953	0.034616	
	70°C	0.02181	0.99657	0.016357	
	80°C	0.03720	0.99921	0.007835	
	Temperatura	a	k	R²	SE
Hend. & Pabis	60°C	0.90879	0.01277	0.988550	0.026252
	70°C	0.96865	0.02110	0.997580	0.014067
	80°C	1.00915	0.03752	0.999290	0.007651
	Temperatura	k	n	R²	SE
Page modificado	60°C	0.01515	0.80017	0.997230	0.012924
	70°C	0.02233	0.91731	0.998450	0.011263
	80°C	0.03678	1.05014	0.999650	0.005401

Tabela 3- Valores de Difusividade Efetiva nas temperaturas de 60, 70 e 80°C

Temperatura (°C)	<i>D_{ef}</i> (m²/s)	R²
60°C	1,92 x 10 ⁻⁹	0.9960
70°C	2,99 x 10 ⁻⁹	0.9930
80°C	5,20 x 10 ⁻⁹	0.9863

FIGURAS

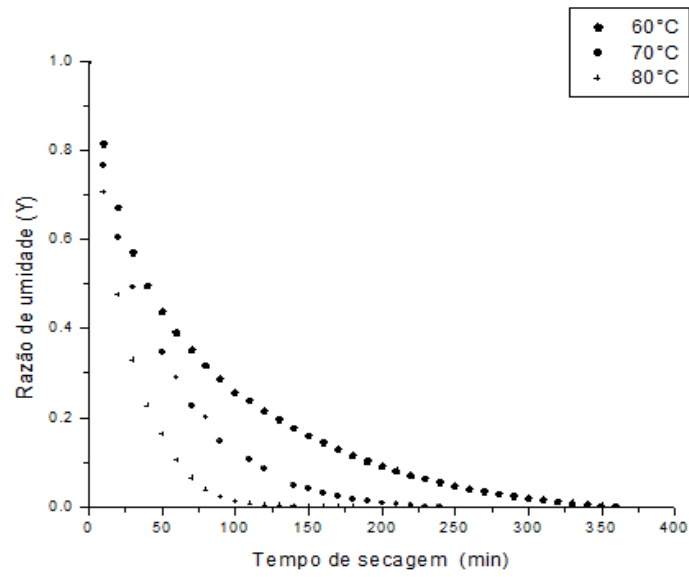


Figura 1- Curva de secagem de resíduos de uva para as temperaturas de 60, 70 e 80°C.

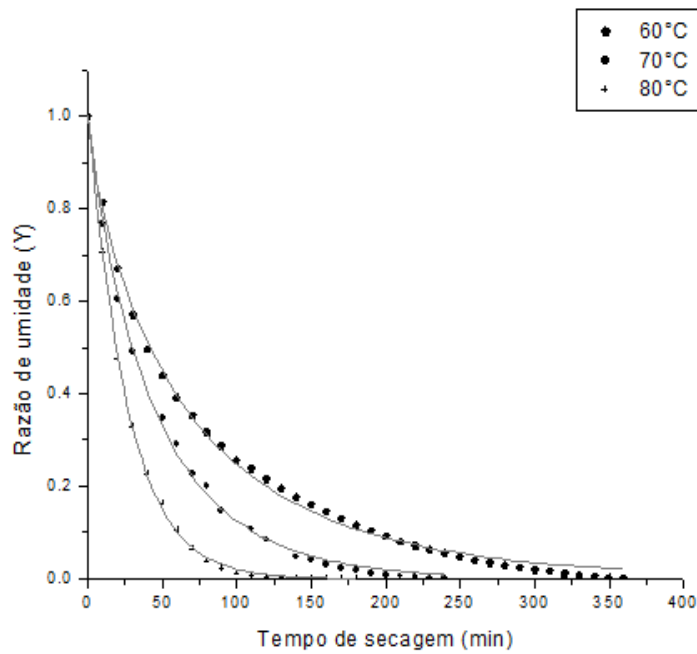


Figura 2- Ajuste do modelo de Page modificado nas temperaturas de 60, 70 e 80°C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, H.V.; Gomes, J.P.; Neto, A.L.B.; Silva, F.L.H.; Almeida, F.A.C. Cinética de secagem de abacaxi cv pérola em fatias. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.11, n.2, p.123-128, 2009.
- Alexandre, H.V.; Figueiredo, R.M.F.; Queiroz, A.J.M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 7, n. 1, 2007.
- Alves, A.P.; Silva, F.S.; Porto, A.G.; Silva, R.B. Caracterização da secagem do alho (*Allium sativum*) em camada delgada. 2ª Jornada Científica da UNEMAT. Barra do Bugres MT, 2009.
- Argandoña, E. J. S.; Branco, I. G.; Bittencourt, T. U.; Munhoz, C. L. Influência da geometria e da temperatura na cinética de secagem de tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.31, p. 308-321, 2011.
- Celma, A.R.; López-Rodríguez, F.; Blázquez, F.C. Experimental modelling of infrared drying of industrial grape by-products. *Food and Bioproducts Processing*. v. 87, p. 247–253, 2009.
- El-Aouar, A.A.; Azoubel, P.M.; Murr, F.E.X. Drying kinetics of fresh and osmotically pre-treated papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Food Engineering*: v.59, p.85-91, 2003.
- Faria, R.Q.; Teixeira, I.R.; Devilla, I.A.; Ascheri, D.P.R.; Resende, O. Cinética de secagem de sementes de crambe. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande v.16 n.5, 2012.
- Ferreira, L.D.; Pirozi, M.R.; Ramos, A.M.; Pereira, J.M. Modelagem matemática da secagem em camada delgada de bagaço de uva fermentado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.47, n.6, p.855-862, jun. 2012.
- Florentin, L.D.; Menon, B.T.; Alves, J.A.; Barros, S.T.D; Pereira, N.C.; Lima, O.C.M.; Modenes, A.N. Análise da secagem do bagaço de laranja em camada fina utilizando modelos semi-teóricos e empíricos. *Engvista*, v. 14, n. 1. p. 22-33, abril 2012.
- Martinazzo, A.P.; Corrêa, P.C.; Resende, O.; Melo, E.C. Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.11, n.3, p. 301-306, Campina Grande, 2007.
- Mello, L.M.R. *Viticultura brasileira: panorama 2012*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. Disponível em : < www.uvibra.com.br/pdf/Panorama%202012%20-%20Vitivinicultura%20Brasileira.pdf> Acesso em set. de 2013.
- Moreira, T. B.; Rocha, E. M. F. F.; Afonso, M. R. A.; Costa, J. M. C. Comportamento das isotermas de adsorção do pó da polpa de manga liofilizada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, n.10, p.1093–1098, 2013.
- Park, K.J.; Bin, A.; Brod, F. P. R. Drying of pear d’Anjou with and without osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, v. 56, p. 97-103, 2002.
- Santos, E.H.B.; Azevêdo, L.C.; Batista, F.P.R.; Lima, M.S.; Azoubel, P.M. Secagem e caracterização físico-química da uva isabel (*Vitis labrusca*). CONNEPI, 2010.
- Simal, S. Femeneia, A., Garau, M.C. Rosselló, C. Use of exponential, Page’s and diffusional models to simulate the drying kinetics of kiwi fruit. *Journal of Food Engineering*, v. 43, p. 109-114, 2005.
- Waughon, T.G.; Pena, R.S. Modelagem da secagem em camada delgada da fibra residual do abacaxi. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. Curitiba v. 26, n. 2, p. 297-306, jul./dez. 2008.

ISOTERMAS DE SORÇÃO E MODELAGEM MATEMÁTICA DE PÓ DE POLPA DE UVAIA OBTIDA POR FOAM MAT DRYING

Ivanise Guilherme Branco¹, Thatyana Tammy Kikuchi¹, Eliana Janet Sanjinez Argandoña²

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Av. Dom Antônio 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

²Universidade Federal de Dourados (UFGD), R. João Rosa Góes, 1761, 79825-070, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores produções agrícola do mundo, principalmente para a exportação. No ano de 2008, o Brasil ocupou a terceira posição dos maiores produtores de frutas do mundo, superando 43 milhões de toneladas, o que corresponde a 5% da produção mundial (Abanorte, 2010). A produção frutífera brasileira incluem tanto frutas tropicais, quanto subtropicais e temperadas, sendo que as maiores produções em volume são as de laranja, banana e abacaxi (Ibraf 2009).

Embora tais frutas mereçam destaque em pesquisa, é importante a realização de estudos para frutas poucos explorada, que podem apresentar grande valor nutricional, como a uvaia, que está presente principalmente no cerrado do estado de São Paulo.

Hexachlamys edulis (O. Berg), é conhecido popularmente como uvaia-do-mato e uvaia-do-cerrado, ocorrendo em cerradão e na floresta semideidual (Durigan et al., 2004). Apresentam frutos do tipo baga, possuindo coloração alaranjada ou amarela e formato piriforme, redondo ou oval.

Atualmente, pesquisas envolvendo biocompostos que são benéficos à saúde humana têm sido bastante realizadas, principalmente àquelas que envolvem a propriedade antioxidante. No caso das frutas, uma substância biologicamente ativa bastante encontrada são os pigmentos. Na literatura existem poucos desses estudos feitos com a uvaia, onde há uma caracterização física, química e atividade antioxidante, exemplo disso é o realizado por Rufino et al. 2010, onde são feitas as quantificações de vitamina C, antocianinas totais, flavonoides amarelos, carotenoides totais, clorofila e teor de umidade. Outros estudos envolvendo a uvaia informam que esta pode ser utilizada no controle de hipertensão, redução do colesterol e ácido úrico, emagrecimento e também como adstringente e digestivo (Schmeda-Hirschmann *et. al.*, 1987); Em Maiochi, 2009 a fruta é descrita como grande portadora de substâncias bioativas, possuindo alto conteúdo de ácido ascórbico, aroma suave

e sabor agradável (Maiochi, 2009). Porém, o grande problema desse fruto é que o fato de ser altamente perecível, além de ressecar com muita facilidade, o que torna muito difícil de encontrá-la em supermercados. Dessa forma, há grande necessidade de se encontrar processamentos que possam manter essas substâncias bioativas, ou ainda, onde a perda dessas substâncias sejam a menor possível, além de tentar promover alternativas para que ocorra uma maior vida útil da polpa da fruta.

Uma forma de conservar por mais tempo os alimentos, que é muito utilizada na indústria alimentícia é a desidratação. Geralmente, a degradação do alimento se dá em sua grande maioria devido à presença de microrganismos, que crescem pela presença de água livre dentro desses alimentos. Levando isso em consideração, a desidratação nada mais é que a remoção de água por evaporação, total ou parcial do alimento. Outras operações unitárias de remoção de água também podem ser utilizadas para conservação de alimentos como, por exemplo, a centrifugação e concentração por membranas. Pela remoção da água, conseqüentemente, o alimento apresentará um menor peso e volume, facilitando o transporte e armazenamento do produto. Embora seja uma metodologia muito vantajosa, a desidratação tem como desvantagem a perda de alguns compostos de interesse ao longo do processo.

As isotermas de sorção mostram a relação de atividade da água e a umidade de equilíbrio de uma amostra a certa temperatura. Dessa forma, as isotermas de sorção podem ser uma grande ferramenta de análise da vida útil do alimento, pois quanto maior a atividade da água, maior a velocidade de degradação do alimento. Além disso, através de um ajuste de modelagem matemática, pode se prever o tempo de secagem de determinado produto (PENA *et al.*, 2000).

As modelagens matemáticas para ajuste de isotermas mais comuns são GAB, Oswin, Peleg, BET e Halsey.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram conduzidas nos Laboratórios de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista, Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Assis/SP. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.1. Matéria-prima

Frutos de uvaia foram coletados em setembro de 2011 na UNESP, Campus de Assis, selecionados conforme estado de maturação (favorável ao consumo), sanitizados em água clorada (50 ppm de cloro ativo) e os caroços retirados manualmente da fruta. A polpa, obtida

em liquidificador doméstico, foi peneirada, acondicionada em sacos de polietileno de alta densidade e armazenada em congelador doméstico até posterior utilização. Como agentes espumantes, foi utilizado: albumina pura comercial (Marca Cami). Estes agentes espumantes foram incorporados à polpa de fruta de modo a formar uma espuma com características adequadas à secagem rápida.

2.2 Formulação e desidratação por foam mat drying

A polpa de uvaia foi descongelada, pesada e a esta foi adicionada 7% de albumina. Em seguida, a mistura de polpa e aditivos foi submetida à agitação constante, durante 10 minutos. A espuma foi distribuídas em placa de silicone, formando uma camada de 14 x 17 cm e, aproximadamente, 3 mm de espessura. A desidratação em camada de espuma (*foam-mat*) foi conduzida em estufa com circulação e renovação de ar (Marca Nova Ética, Modelo 420-1D) a 60° C. O tempo total de secagem foi determinado por meio das cinéticas de secagem, obtidas em estudos anteriores, para obtenção de um produto com umidade final de 5%. O produto desidratado foi retirado da estufa, triturado, homogeneizado e empregado na determinação das isotermas de sorção.

2.3. Determinação das isotermas de sorção

Para a avaliação das isotermas de sorção, as amostras (aproximadamente 1 grama do pó), em triplicata, foram distribuídas em pesa-filtros que foram colocadas em potes hermeticamente fechados contendo soluções de sais. As isotermas foram obtidas nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, uma vez que são temperaturas próximas ao do ambiente brasileiro, sendo de grande importância para o ponto de vista comercial e de produção (Alexandre et al, 2007). Foi realizada a técnica gravimétrica mediante o método estático com registro descontínuo da variação de peso. Foram utilizados sais selecionados (Tabela 1) que promovem ambientes com diferentes umidades relativas em seu interior.

Os cálculos das umidades de equilíbrio em base seca foram realizados da seguinte forma:

$$X_{eq} = \frac{m_{eq} - m_s}{m_s}$$

Onde: X_{eq} = umidade de equilíbrio (base seca); m_{eq} = massa da amostra quando atingido o equilíbrio (g) e m_s = massa seca da amostra (g);

2.3.1. Ajustes dos modelos das isotermas

A determinação dos parâmetros dos modelos das isotermas foi realizada utilizando o método de regressão não linear Quasi-Newton do programa Statistica 7.0. Para a determinação das isotermas de sorção foram utilizados alguns modelos propostos na literatura como BET, GAB, Halsey, Oswin, Peleg e Langmuir. Os melhores ajustes são os que apresentam maior R^2 (próximo à unidade) e menor E (próximo a 10%).

3. RESULTADOS

Na Tabela 3 estão relacionados os valores médios de umidade de equilíbrio (base seca) do pó obtido através da formulação de 7% de albumina desidratada a 60°C com a atividade de água dos sais utilizados.

As isotermas de sorção foram ajustadas aos modelos apresentados na Tabela 2. São apresentados na Tabela 4 os valores dos parâmetros calculados para os ajustes dos modelos matemáticos, além do coeficiente de determinação (R^2) e do erro relativo médio (E).

Para todas as temperaturas o modelo de Halsey foi o de pior ajuste, o R^2 não foi encontrado e o erro médio obteve valores altíssimos. Para a temperatura de 20°C, o melhor ajuste foi o de Peleg, obtendo valores de 0,92 de R^2 e erro médio de 8%, enquanto que o mesmo modelo para a temperatura de 30°C obteve 0,2591 e 32,53 respectivamente. Dessa forma, para a temperatura de 30°C, os melhores ajustes encontrados foram o de BET e GAB com um coeficiente de correlação de 0,8418 e erro médio de 14,42%. Para a temperatura de 40°C o modelo de BET foi o de melhor ajuste também, fornecendo o R^2 de 0,9545, porém um alto valor de erro médio, 21,20%.

Como critério da escolha do melhor ajuste aos modelos matemáticos foram considerados os valores de R^2 e E(%). Portanto, para as isotermas de sorção de pó de uvaia, os melhores modelos matemáticos foram o Peleg e BET.

Park, Yado e Brod (2000) também verificaram, para a pêra *in natura*, que o melhor ajuste foi o de Peleg, enquanto que para pêra desidratada, os modelos de Henderson, Peleg, Oswin e GAB foram os que mostraram melhores resultados (Park et al, 2001). Para o pó de pitanga, o modelo de Peleg também foi o de melhor ajuste (Alexandre et al, 2007). Estudo feito com tâmaras obtiveram melhores ajustes aos modelos de GAB e BET (Prado et al, 1999). Para cubos de mamão desidratados foi determinado que o melhor ajuste para as isotermas de sorção foi o modelo de Oswin (Jain et al, 2010)

4. CONCLUSÕES

Os modelos de Peleg e BET apresentaram os melhores ajustes aos dados experimentais para isotermas de pó de uvaia com 5% de umidade, elaborado com 7% de albumina e desidratado a 60°C.

TABELAS

Tabela 1. Atividade de água para soluções saturadas dos sais nas temperaturas de 20, 30 e 40°C (Greenspan, 1976).

Sal	20°C	30°C	40°C
LiCl	0,1131	0,1128	0,1121
CH ₃ COOK	0,2311	0,2161	0,2161
MgCl ₂	0,3307	0,3244	0,316
K ₂ CO ₃	0,4316	0,4317	0,4317
NaBr	0,5914	0,5603	0,5317
Ki	0,699	0,6789	0,6609
NaCl	0,7547	0,7509	0,7468
KCl	0,8511	0,8362	0,8232

Tabela 2. Modelos matemáticas para ajuste de isotermas de adsorção de umidade (Park et al, 2001)

MODELO	EQUAÇÃO
BET	$X_e = \frac{(X_m \cdot C \cdot a_w) \cdot (1 - (n+1) \cdot a_w^n + n \cdot a_w^{n+1})}{(1 - a_w) \cdot (1 + (C-1)a_w + C \cdot a_w^{n+1})}$
GAB	$X_e = \frac{X_m \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)}$
Halsey	$a_w = \exp \left[\frac{-A}{X_e^B} \right]$
Oswin	$X_e = A \cdot \left[\frac{a_w}{1 - a_w} \right]^B$
Peleg	$X_e = K_1 \cdot a_w^{n_1} + K_2 \cdot a_w^{n_2}$
Langmuir	$\frac{X_e}{X_m} = \frac{C \cdot a_w}{1 + C \cdot a_w}$

Onde: X_e = conteúdo de umidade de equilíbrio; X_m = conteúdo de umidade da monocamada molecular; a_w = atividade da água; A, B, C, K, n, K_1 , K_2 , n_1 e n_2 = constantes da equação.

Tabela 3. Umidade média de equilíbrio para o polpa de uvaia com 7% albumina desidratada em 60°C em função da temperatura e da atividade de água.

20°C		30°C		40 °C	
a_w	x_{eq}	a_w	x_{eq}	a_w	x_{eq}
0,1131	0,09967	0,1128	0,1106	0,1121	0,04231
0,2311	0,14586	0,2161	0,17231	0,2161	0,2484
0,3307	0,13758	0,3244	0,26804	0,316	0,22748
0,4316	0,16909	0,4317	0,36281	0,4317	0,40484
0,5914	0,24724	0,5603	0,18878	0,5317	0,40256
0,699	0,2261	0,6789	0,22904	0,6609	0,41043
0,7547	0,21605	0,7509	0,13244	0,7468	0,34407
0,8511	-	0,8362	-	0,8232	-

Tabela 4. Valores dos parâmetros dos modelos de isotermas do pó de uvaia com 5% de umidade.

Modelo	Parâmetros	Temperatura		
		20°C	30°C	40°C
BET	x_m	0,5482	2810,233	0,0183
	C	1,1117	0,0004	481,0910
	n	1,0716	2,2603	0,0005
	R²	0,8870	0,8418	0,9545
	E(%)	14,03	14,42	21,20
GAB	x_m	7536,247	2810,233	2728,127
	C	0,0233	0,0004	3,6845
	K	0,0020	2,2603	0,00006
	R²	0,5134	0,8418	0,7254
	E(%)	25,12	14,42	30,72
LAGMUIR	x_m	3,0782	13,4658	1,4483
	C	3,1395	3,8872	2,0534
	R²	0,9143	0,3863	0,8806
	E(%)	10,48	30,16	42,04
OSWIN	A	0,1838	0,2120	0,3193
	B	0,2426	0,0446	0,2924
	R²	0,9004	0,1370	0,7650
	E(%)	8,95	34,67	59,06
PELEG	k_1	0,1331	0,1203	0,2559
	n_1	0,4618	0,1447	0,5916
	k_2	0,1331	0,1203	0,2560
	n_2	0,4618	0,1447	0,5916
	R²	0,9248	0,2591	0,8464
	E(%)	8,05	32,53	46,45

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANORTE (Associação Central dos Fruticultores do Norte de Minas on line. Disponível em: <http://www.abanorte.com.br/noticias/noticias-principal/brasil-e-o-terceiro-maior-produtor-de-frutas-do-mundo>. Acesso em: 17 abr. de 2012.

Alexandre, H.V.; Figueirêdo, R.M.F.; Queiroz, A.J.M.; *Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó*. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, v. 7, n.1, p. 11-20, 2007.

IBRAF (Instituto Brasileiro de Frutas). Produção Brasileira de Frutas 2009. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Produ%C3%A7%C3%A3o%20Brasileira%20de%20Frutas%202009%20-%20Final.pdf>. Acesso em 19 abr. de 2012.

Jain, S.K.; Verma, R.C.; Sharma, G.P.; Jain, H.K.; Studies on moisture sorption isotherms for osmotically dehydrated papaya cubes and verification of selected models. Journal of Food Science and Technology, v. 47, p. 343-346, 2010

Maiochi, G. M. Apremavi (Associação de Preservação do Meio Ambiente e da Vida. Disponível em: <http://www.apremavi.org.br/noticias/apremavi/549/uvaia-super-dose-de-vitamina-c>. Acesso em: 20/10/2009.

Park, K.J.; Antonio, G. C.; Oliveira, R. A.; Park, K. J. B. Conceitos de processo e equipamentos de secagem. 121 f. 2007. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/projpesq.html>. Acesso em: 18 dez. 2012.

Park, K.J.; Bin, A.; Brod, F.P.R.; *Obtenção das isotermas de sorção e modelagem matemática para pêra bartlett (Pyrus sp.) com e sem desidratação osmótica*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.21, n.1, pg. 73-77, 2001.

Park, K.J.; Oliveira, R.A.; Chiorato, M.; Park, K.J.B.; Ito, A.P.; Ardito, T.H.; Fabbro, I.M.D.; Hubinger, M.D. Manual para tratar dados de secagem utilizando Statistica, Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, 2004. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/tratddssecag.pdf>

Park, K.J., Yado, M.K.M., Brod, F.P.R. Isotermas de dessecamento para a pêra bartlett (Pyrus sp.). Engenharia Rural. Piracicaba: ESALQ/USP, 2000.

Pena, R. S. *et al.* Aplicação de modelos matemáticos bi e tri-paramétricos na predição de isotermas de adsorção de umidade de guaraná (*Paullinia cupuna*) em pó. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v.20, n.1, p.8-11, 2000.

Prado, M.E.T.; Alonso, L.F.T.; Sales, A.F.; Park, K.J.; Isotermas de sorção de tâmaras: determinação experimental e avaliação de modelos matemáticos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19 n.1, Campinas, 1999.

Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E.B. & Arias, A.R. *Preliminary pharmacological studies on Eugenia uniflora leaves: xanthine oxidase inhibitory activity*. Journal of Ethnopharmacology, 21, p.183-186, 1987..

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE SEMILLAS DE QUINOA (*Chenopodium quinoa* Willd.) CULTIVADAS EN TRES ZONAS GEOGRÁFICAS DE CHILE

Miranda, M.^{1,2}; Vega-Gálvez, A.^{1,3}; López, J.^{1,2}; Navarro, R.²; Martínez, E.A.³

¹Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de La Serena, Chile.

²Doctorado en Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile, Chile.

³Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA) La Serena, Chile.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día existen varios reportes sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de planta, con un alto potencial de aplicación en la industria alimentaria y médica (Zeng y col., 2011). Especies y hierbas han sido añadidas a los alimentos desde la antigüedad, no sólo como agentes de sabor, sino también como medicina popular y/o conservantes de alimentos (Keskin y col., 2011). Los compuestos antimicrobianos presentes en los alimentos pueden extender la vida útil de éstos sin transformarlos mediante la reducción de la tasa de crecimiento o viabilidad microbiana. Una gran variedad de estudios se han desarrollado, evaluando las potenciales aplicaciones de los agentes antimicrobianos naturales en la conservación de alimentos (Zeng y col., 2011; Keskin y col., 2011; Borchardt y col., 2009). Las semillas de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) son conocidas desde hace siete mil años y son originarias de América del Sur, de los países actualmente conocidos como Perú, Bolivia, Chile, Ecuador, Colombia y Argentina. Este cultivo posee un gran potencial para las demandas agronómicas, ya que puede adaptarse para producir altos rendimientos de grano en condiciones adversas o estrés (Gely y Santalla, 2007). En Chile, la quínoa se encuentra distribuida a lo largo de todo Chile, revelando su biodiversidad y capacidad de adaptación a distintos medios ambientes. El objetivo de este estudio fue evaluar a seis diferentes cultivares de semillas de quínoa, cultivadas en tres zonas geográficas de Chile, como posibles nuevas fuentes de actividad antimicrobiana y antioxidante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Origen de las semillas de quínoa y preparación de las muestras.

Las semillas de quínoa fueron cosechadas en las tres zonas de producción ancestrales de Chile (Figura 1) (Norte-Altiplano (N) a 19° S, Centro (C) del país en 34° S y del sur (S) de

Chile a los 39° S). Se eligieron un total de 6 cultivares de quínoa (época de cosecha 2010). Los dos cultivares del Norte fueron Ancovinto y Cancosa (alrededor de 19° S). Las dos variedades del Centro fueron Cáhuil y Faro (alrededor de 34° S) y las dos variedades del Sur fueron Regalona (variedad oficial, SAG) y Villarrica (alrededor de 39° S). Las muestras se analizaron sin un tratamiento de descascarillado, de modo que sólo se inspeccionaron visualmente para descartar las partículas contaminantes o impurezas. Determinaciones analíticas se llevaron a cabo en las semillas de quínoa molidas utilizando un molinillo (MC0360, UFESA, Zhejiang, China).

2.2 Actividad antimicrobiana

Extractos de semillas fueron testeados para determinar la actividad antimicrobiana frente a dos microorganismos, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Gram positiva) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa), utilizando la técnica de difusión en disco (Comai y col., 2007; Borchardt y col., 2009). Todas las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Instituto Chileno de Salud Pública (Instituto de Salud Pública de Chile, ISP).

2.2.1 Preparación de extractos

Diez gramos quínoa molida finamente, de cada uno de los cultivares se mezclaron con 50 ml de etanol absoluto (99,0%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las mezclas se dejaron en oscuridad, a temperatura ambiente durante 24 h con agitador orbital (BOECO OS-20, Hamburgo, Alemania) a 200 rpm, previa a la filtración (Whatman n° 1) y centrifugación (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania) a 5000 rpm, durante 10 min a 5° C. Los extractos claros fueron filtrados por una unidad de filtro Millex-GV (0,22 m, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) seguido de una concentración a presión reducida a 40° C (Büchi , modelo RE-121 , Flawil, Suiza). Los extractos de quínoa secos se disolvieron en 15 ml de agua destilada estéril a una concentración final de aproximadamente 30,0 mg de extracto/ml y fueron refrigeraron hasta el ensayo antimicrobiano.

2.2.2 Procedimiento de ensayo antibacteriano

Todas las bacterias ensayadas se cultivaron durante la noche a 37 ° C en un caldo Muller-Hinton (MHB, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y fueron usadas como inóculo. La turbidimetría de la suspensión se ajustó a 0,5 (10^8 ufc/ml) por el estándar de turbidez de McFarland (Khoobchandani y col., 2010). En primer lugar, un total de 0,1 ml de suspensión bacteriana fue vertido en cada placa que contenía agar Muller-Hinton (MHA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los discos de papel de filtro estéril (6 mm de diámetro) se saturaron

por 60µl de diferentes extractos de cada uno de los cultivares y luego se colocaron en las placas inoculadas, las cuales fueron incubadas a 37° C durante 24 h y la zona de inhibición alrededor de cada disco se midió en mm. Este experimento se llevó a cabo por duplicado. Como control positivo, se utilizó un disco que contenía amoxicilina 100 mg/ml. Un disco impregnado con etanol absoluto se incluyó también para poner a prueba si tenían un efecto inhibidor sobre las bacterias de ensayo (Borchardt y col., 2009; Khoobchandani y col., 2010).

2.3 Determinación de la actividad antioxidante

Actividad antioxidante de las muestras se determinó utilizando el método 2,2,-difencil-2-picrilo-hidracilo (DPPH) con algunas modificaciones (Turkmen y col., 2005) . Diferentes diluciones de los extractos se prepararon por triplicado. Una alícuota de 2 ml de 0.15 mM del radical DPPH en etanol se añadió a un tubo de ensayo con 1 ml de extracto de quínoa. La reacción fue mezclada en un vortex por 30 s y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. La absorbancia se midió a 517 nm , utilizando un espectrofotómetro (Spectronic ® 20 GenesysTM , Illinois, EE.UU.). Etanol al 80% (v/v) se utilizó para calibrar el espectrofotómetro. Una muestra control se preparó sin la adición del extracto. Todos los disolventes y reactivos fueron adquiridos en Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO , EE.UU.) . Todos los análisis se realizaron por triplicado y la actividad antioxidante total (AAT) se expresó como el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH y se determinó por la ecuación (1):

$$\% AAT = \left(1 - \left(\frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde, $Abs_{muestra}$ fue la absorbancia con la muestra y $Abs_{control}$ fue la absorbancia sin muestra. IC_{50} , que es la concentración requerida para obtener una capacidad antioxidante del 50%, se emplea típicamente para expresar la actividad antioxidante y para comparar la capacidad antioxidante de diferentes muestras. IC_{50} se determina a partir de un gráfico de la capacidad antioxidante (%) frente a la concentración de extracto (µg/ ml de muestra).

2.4 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como promedio±desviación estándar (DS). El análisis de los datos se realizó utilizando Statgraphics Plus 5 (Statistical Graphics Corp., Herndon, Virginia, EE.UU.). Las pruebas de significancia se realizaron utilizando el test de Fisher (LSD); se tomaron como diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. El Test de Rango Múltiple (TRM) incluido en el programa estadístico se utilizó para probar la existencia de grupos homogéneos dentro de cada uno de los parámetros analizados. El

software estadístico Excel se utilizó para comparar el nivel de actividad antioxidante (IC_{50}) y la actividad antimicrobiana (zonas de inhibición en mm). Una regresión lineal fue generada con su respectivo R^2 (Figura 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos para las pruebas antimicrobianas realizadas a los extractos etanólicos de los seis diferentes cultivares de semillas de quínoa se presentan en la Tabla 1. Los resultados mostraron que todos los extractos de quínoa mostraron un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo activos para ambos microorganismos gram-positivos y gram-negativos en los ensayos antimicrobianos. La zona de inhibición varió desde 8,26 a 14,70 mm y 8,63 a 15,01 mm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Zonas de inhibición similares para *E. coli* y *S. aureus* fueron reportados por Borchardt y col. (2009): 7-20 mm (*S. aureus*) y 7-14 mm (*E. coli*) trabajando con extractos de semillas y plantas que se encuentran en la cuenca del río Mississippi; Mahomoodally y col. (2010): 3-15 mm (*E. coli*) y 4-17 mm (*S. aureus*) trabajando con extractos acuosos y metanólicos de plantas endémicas de las islas Mauricio y Keskin y col. (2011): 7-12 mm (*S. aureus*) y 7-14 mm (*E. coli*) trabajando con extracto de diferentes especies. Diferencia en la actividad antimicrobiana de los extractos de quinua en estudio pueden explicarse en parte por las variaciones de los agentes bioactivos del extracto, la sensibilidad de las cepas y los procedimientos antimicrobianos adoptados en el test. Los cultivares que mostraron la zona de inhibición más alta fueron los de la zona Norte (Ancovinto y Cansosa) con un % de inhibición >60% para *E. coli* y >50% para *S. aureus*. El cultivar Cancosa mostro la mayor actividad antimicrobiana frente a las dos cepas estudiadas. Las bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) fueron más sensibles a la acción antimicrobiana de la quínoa que las bacterias Gram-negativas (*E. coli*) como puede observarse en la Tabla 1.

3.2 Actividad antioxidante

Hemos tratado de evaluar la relación entre las actividades antioxidantes y antimicrobianas de semillas de quínoa, debido a que los antioxidantes son conocidos por presentar actividad antimicrobiana (Zeng y col., 2011; Borchardt y col., 2009; Mahomoodally y col., 2010). Los niveles de antioxidantes oscilaron entre 3568,89-566,79 $\mu\text{g/ml}$. Faro (566,79 $\mu\text{g/ml}$) y Cáhuil (652,94 $\mu\text{g/ml}$) tuvieron los mayores niveles de actividad antioxidante (Tabla 1). Nsimba y col. (2008) trabajando con diferentes ecotipos de quínoa reportaron valores de IC_{50} entre 100-15.800 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 2 compara el nivel de

antioxidante (IC₅₀) versus la actividad antimicrobiana (zonas de inhibiciones) de los seis extractos de quínoa frente a los dos microorganismos ensayados. La actividad antioxidante, con un R² de 0,20, explicó sólo el 20% de la variación en la actividad antimicrobiana (figura 2). Los coeficientes de correlación entre el nivel de antioxidantes y la actividad antimicrobiana de microorganismos fueron: *S. aureus* (0,16) y *E. coli* (0,25). Un comportamiento similar ha sido reportado por Borchardt y col. (2009).

4. CONCLUSIONES

Es interesante que existan diferencias en los efectos antibacterianos de los grupos de semillas estudiados, debido a las diferencias fitoquímicos y sitios de cultivo de los cultivares. Los cultivares con altos valores de antioxidantes no se pueden identificar como ecotipos con una actividad antimicrobiana efectiva debido a que los dos parámetros no están altamente correlacionados. De acuerdo con nuestros resultados, se identificaron cultivares de semillas de quínoa como fuentes potenciales de actividad antioxidante y antimicrobiana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto FONDECYT 1100638 por el apoyo financiero de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Zeng WC, Jia LR, Zhang Y, Cen JQ, Chen X., Gao H, Feng S, & Huang Y-N. Antibrowning and antimicrobial activities of the water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*. *Journal of Food Science*. 2011;76(2): C318-C123
- Keskin D, Toroglu S. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different species. *Journal of Environmental Biology*, 2011;32:251-256.
- Gely MC, Santalla E. Moisture diffusivity in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds: Effect of air temperature and initial moisture content of seeds. *Journal of Food Engineering*. 2007;78:1029 -1033.
- Comai S, Bertazzo A, Bailoni L, Zancato M, Coata CVL, Allegri G. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. *Food Chemistry*, 2007;100:1350-1355.
- Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NJ, Biesboer DD, Bey RF. Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3(10):707-718.
- Khoobchandani M, Ojeswi BK, Ganesh N, Srivastava MM, Gabbanini S, Matera R, Iori R, Valgimigli L. Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed

oil: Comparison with various aerial and root plant extracts. Food Chemistry. 2010;120:217–224.

Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. Food Chemistry. 2005;93:713-718.

Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. Screening for alternative antibiotics: An investigation into the antimicrobial activities of medicinal food plants of Mauritius. Journal of Food Science. 2010;75(3):M173-M177.

Nsimba RY, Kikuzaki H, Konishi Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. Food Chemistry. 2008;106:760-766.



Figura 1. Cultivos de quínoa distribuidos en tres zonas geográficas de Chile (N: Norte, C: Centro, S: Sur).

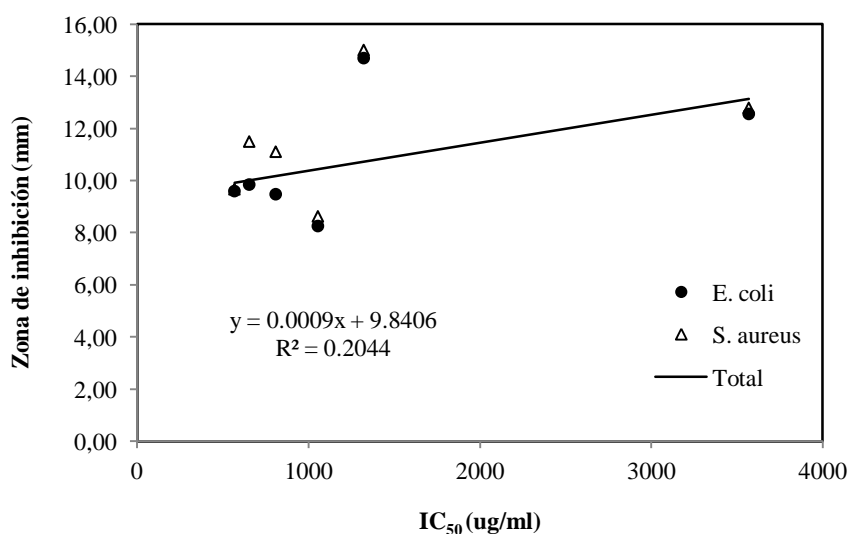


Figura 2. Correlación entre actividad antioxidante (IC50) versus actividad antimicrobiana (zona de inhibición) de los seis cultivares de quínoa.

Tabla 1. Actividad antioxidante y actividad del radical libre DPPH (IC₅₀) de los seis cultivares de quínoa

Cultivares	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		Concentración-IC ₅₀ (ug/ml)
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Ancovinto	12.56 ± 0.62 ^b	12.79 ± 0.51 ^b	3568.89 ± 204.46 ^a
Cancosa	14.70 ± 0.12 ^c	15.01 ± 0.64 ^c	1321.32 ± 98.86 ^b
Cáhuil	9.85 ± 0.45 ^d	11.50 ± 0.73 ^{bd}	652.94 ± 85.00 ^c
Faro	9.60 ± 0.77 ^d	9.67 ± 0.91 ^{ef}	566.79 ± 104.92 ^c
Regalona	8.26 ± 0.32 ^e	8.63 ± 0.87 ^f	1053.82 ± 75.34 ^d
Villarrica	9.48 ± 0.54 ^d	11.11 ± 0.84 ^{de}	807.68 ± 211.64 ^e
Control*	20.47 ± 0.21 ^a	28.04 ± 1.19 ^a	

Valores expresados como promedio±desviación estándar. Diferentes letras en las columnas denotan diferencias significativas entre los cultivares (p<0,05). *Antibiótico de referencia Amoxicilina (100 µg/ml).

EFFECTO DE LA COCCIÓN EN LA ACTIVIDAD QUELANTE DE MOLÉCULAS DE NATURALEZA PROTEICA DE CARNE DE CERDO Y PESCADO

García-Ignacio, H.M., Soledad-Cote, M*., Santiago-Martínez, F*., Ruíz-Flores, A*., González-De Jesús L*., García-Davila, J**., Grandes-Blanco, I. A.** Castro-Corona A. + y García-Barrientos, R.+**

*Ingeniería ; **Maestría; + Doctor

Lab. Procesos Biotecnológicos, Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tepeyanco, C.P. 90180 Tlaxcala, México

INTRODUCCIÓN.

Las proteínas alimentarias se investigan no solo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos funcionales, los cuales se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora (Mulero y col. 2011), que ejercen determinadas actividades biológicas; tales como actividad antimicrobiana, antihipertensiva y antioxidante. Siendo esta última la más estudiada por los beneficios para neutralizar los radicales libres a los que estamos expuestos diariamente, evitando la oxidación celular. La actividad antioxidante engloba distintas técnicas para su evaluación como lo es la evaluación del efecto quelante, basado en capturar metales en el organismo y formar un quelato para su posterior erradicación en el organismo. (Carbó y Marco. 2006). Los quelantes, se utilizan como aditivos alimentarios, incluyendo el ácido cítrico de origen natural y sales de calcio de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA (Wu y col., 2011).

Sin embargo, se sabe que solo una parte de alimentos consumidos por los seres humanos y más aún los distintos tipos de carne nos aporta nutrientes que, aunque minoritario y poco conocidos, contribuyen de forma notable a los diferentes procesos biológicos y/o bioquímicos del organismo (Toldrá, 2010). Muchos son los alimentos que han sido evaluados en actividad biológica, tales como a la leche y el huevo sin embargo los provenientes de origen animal son muy pocos los reportes (Anusha y col., 2011).

Existen varios compuestos que están presentes de forma natural en la carne que tienen un gran interés por su capacidad de modular diversos aspectos fisiológicos y también pueden ejercer un efecto durante el procesado de la carne. Son diversos los factores que pueden afectar el contenido y actividad de compuestos bioactivos en la carne, como la especie animal, la raza, la alimentación y el tratamiento (Toldrá, 2010).

Estos nutrientes (péptidos bioactivos) han sido escasamente investigados en la carne y productos cárnicos, lo cual explica que sea poco conocido a pesar de las importantes funciones fisiológicas que ejercen.

Hoy en día, la mayoría de la carne y productos a base de carne se cocinan antes de ser consumidos. La cocción tiene un efecto importante sobre las propiedades nutricionales del producto de carne y, al mismo tiempo en su posible toxicidad (Kondjoyan y col 2013).

El propósito de la cocción es hacer la carne apetecible, digerible y microbiológicamente segura. La carne pasa por muchos cambios durante la cocción, tanto físicas como químicas, incluyendo la pérdida de peso, las modificaciones de la capacidad de retención de agua, la textura, las fibras musculares de contracción, el color y el desarrollo del aroma, que dependen en gran medida de desnaturalización de las proteínas y el agua pérdida. Las características de calidad de los productos cárnicos cocidos también dependen de la composición y las características de los músculos, el método de calentamiento, así como la evolución en el tiempo / temperatura durante la cocción (Mora y col 2011; Kondjoyana y col., 2013).

El agua desempeña un papel clave en la definición de las propiedades de la carne fresca y cocida, así como en el desarrollo del proceso de cocción y es, por lo tanto, muy importante para caracterizar el estado de agua en la carne y su dependencia en el proceso de cocción (Mora y col 2011).

El presente trabajo pretende contribuir a la rama de la industria cárnica, con el objetivo de realizar un estudio sobre el efecto de la cocción sobre la carne de cerdo y pescado en la actividad quelante de moléculas de naturaleza proteica de miosistemas de cerdo y pescado.

MATERIALES Y METODOS.

Preparación y Obtención de la muestra.

Se obtuvieron cortes de *Longissimus dorsi* de cerdo y músculos dorsales de pescado (*Oreochromis sp*) de un lugar cercano al área de trabajo (Latitud 19.2322, Longitud -28.252500) no se obtuvieron registros de sexo, edad, alimentación y condiciones de sacrificio. Se empacó al vacío y se almacenó a 4°C hasta su manipulación por separado.

Tratamiento Térmico.

Se tomaron muestras de los cortes de *Longissimus dorsi* de cerdo y músculos dorsales de pescado (*Oreochromis sp*) y fueron sometidos a cocción a una temperatura interna de 80 °C.

Extracción de proteínas miofibrilares.

Se pesaron 10 g de carne y 10 g de hielo, posteriormente se adicionaron 10 ml de agua MilliQ, lo cual fue homogenizado con una batidora manual Modelo 2609 Oster, el homogenizado fue agitado durante 10 min a 4°C, enseguida la mezcla paso por un filtro de 9 mm para la separación de proteínas conectivas. Se agregaron 100 ml de agua MilliQ fría al filtrado y se mantuvo en agitación durante 15 min a 4°C (Se realizaron 2 lavados para asegurar la extracción de proteínas miofibrilares). La mezcla obtenida después de los lavados fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 min a 4°C en una centrifuga universal refrigerada modelo Z-326-K Marca HERMLE (2013). El sobrenadante fue retirado y almacenado para análisis posteriores, se recuperó el precipitado (proteínas miofibrilares) siendo esto el punto de enfoque de nuestra investigación. Finalmente se adicionó buffer de fosfatos 20 mM pH 7 a las proteínas miofibrilares.

Cuantificación de la Concentración de Proteínas.

Se determinó la concentración de proteína miofibrilar por el método de Biuret, basado en la formación cobre-proteína (complejo colorido) en condiciones alcalinas, fue cuantificado a 540 nm en un espectrofotómetro Marca VARIAN Modelo CARY 300-Bio 2012. Los resultados fueron analizados mediante una curva patrón de una proteína conocida.

Obtención de péptidos.

Se preparó una concentración de proteína miofibrilar de 10 mg/ml en buffer de fosfatos 20 mM pH 7 y fue centrifugada a 4000 rpm durante 20 min a 4°C (centrifuga universal refrigerada modelo Z-326-K Marca HERMLE 2012) en filtros Millipore de 10 KDa. El filtrado (péptidos <10 KDa) fue almacenado a 4°C. Se cuantificó el contenido de naturaleza proteica por el método de Bradford.

Determinación de efecto quelante.

A 1 ml de muestra se adicionó 1 ml de Sulfato Ferroso 0.125 M, se dejó reaccionar 5 min a temperatura ambiente y se agregó 1 mL de Ferrosina 0.315 M, nuevamente se dejó en reposo durante 10 min y posteriormente se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Marca VARIAN Modelo CARY 300-Bio 2012. Se utilizó como estándar EDTA 0.1M para el análisis de los resultados.

Electroforesis SDS-PAGE.

SDS- PAGE se llevó a cabo de acuerdo con Laemmli, (1970) con un equipo de electroforesis MiniProtean Tetra Cell BIORAD. El porcentaje del gel de corrida 12% y gel de carga fue al 4%. Cabe mencionar que se realizó una identificación de proteínas miofibrilares utilizando buffer muestra con mercaptoetanol, se diluyó la muestra 1:2 y se mantuvo a 95°C durante 4 min. Por otra parte se identificaron proteínas miofibrilares con buffer muestra sin mercaptoetanol, las condiciones del proceso fueron de 120V.

Se realizó una comparación de medias t de Student para observar el comportamiento de las muestras de ambas especies, durante el tratamiento térmico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La actividad quelante puede observarse en las tablas 1 y 2, en lo que se muestra que cada uno de los sistemas cárnicos presenta actividad quelante a pesar de la poca concentración de proteína y péptidos presentes. Sin embargo el tratamiento realizado a la carne en ambos sistemas (cocción a 80°C) muestra que al existir presencia de una alta temperatura en la carne, las proteínas presentes y péptidos pierden propiedades funcionales, siendo estadísticamente diferentes ($P < 0.001$).

Por otra parte los péptidos < 10 kDa provenientes de las proteínas miofibrilares de ambos sistemas cárnicos presentan mayor actividad quelante con respecto a dichas proteínas ($P < 0.001$), favoreciendo así el termino de péptidos bioactivos, aunque en nuestro caso es importante señalar que no podemos llamarles como tal, debido a que no se realizó la subsecuente identificación. Se puede observar que la carne de pescado en nuestro caso *Oreochromis sp* presentó una mayor actividad quelante tanto en proteínas miofibrilares y péptidos con respecto a la carne de cerdo (*Longissimus dorsi*) con una $P < 0.001$.

Cabe mencionar que dicho análisis confirma el beneficio que brinda el consumo de carne, siendo esta una fuente principal en la alimentación humana.

Finalmente se observa que a pesar de ser analizadas proteínas miofibrilares en ambos sistemas cárnicos no presentan la misma actividad quelante ($P < 0.001$), al igual que en el caso de los péptidos < 10 kDa. Debido a esto se deduce que el origen de las proteínas es un factor importante para la presencias de actividad funcional.

Tabla 1. Actividad Quelante presente en Proteínas Miofibrilares

Sistema Cárnico	Tratamiento	[Proteína](mg/ml)	Actividad Quelante (%)
Cerdo	Cocción	0.1	53.73903509
	Crudo	0.1	80.76754386
Pescado	Cocción	0.1	3.491761724
	Crudo	0.1	61.55201342

Tabla 2 Actividad Quelante de moléculas < 10 kDa de Proteínas Miofibrilares

Sistema Cárnico	Tratamiento	[Péptidos](µg/ml)	Actividad Quelante (%)
Pescado	Cocción	0.01	46.23849422
	Crudo	0.01	74.46067091
Cerdo	Cocción	0.01	25.2518797
	Crudo	0.01	48.44102351

De acuerdo al análisis electroforético que se realizó con presencia de mercaptoetanol, se observaron diferencia en los perfiles electroforéticos, uno de ellos es el peso molecular total de cada muestra con una $P < 0.001$, es decir en proteínas miofibrilares de cerdo crudo, proteínas miofibrilares de cerdo cocido, proteínas miofibrilares de pescado crudo y proteínas miofibrilares de pescado cocido se presentó un peso molecular total de 712.17, 720.02, 559.11 y 582.86 kDa respectivamente. La presencia de bandas de entre 14.4 y 31 kDa permaneció en los dos sistemas cárnicos con y sin tratamiento, sin embargo las bandas menores a 14.4 en los sistemas sin tratamiento no aparecen en los que se les realizó tratamiento de cocción.

Por otra parte, los densitogramas muestran que la concentración presente de bandas de entre 14.4 y 31 kDa en cada una de las muestras es mayor en las muestras sin tratamiento de cocción ($P < 0.001$), es decir al someter la carne a cocción existe una disminución o desaparición de algunas proteínas presentes en la carne cruda.

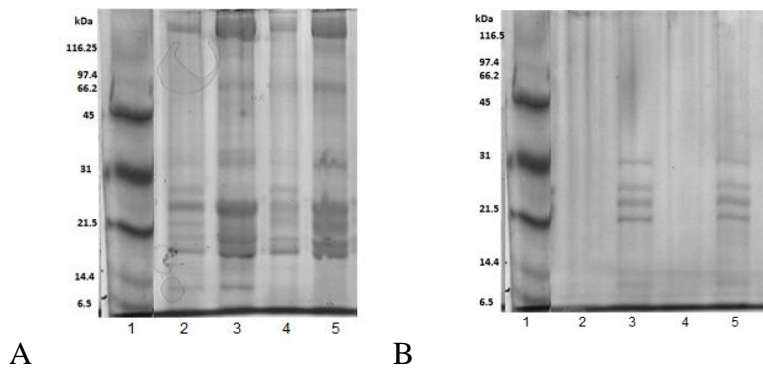


Figura 1. SDS-PAGE de Proteínas Miofibrilares A) Sin MC; B) Con MC
1) Marcador, 2) Cerdo Cocido, 3) Cerdo Crudo, 4) Pescado Cocido, 5) Pescado Crudo.

Los densitogramas de las proteínas miofibrilares sin mercaptoetanol de los dos sistemas cárnicos con y sin tratamiento se muestran en la Figura 2.

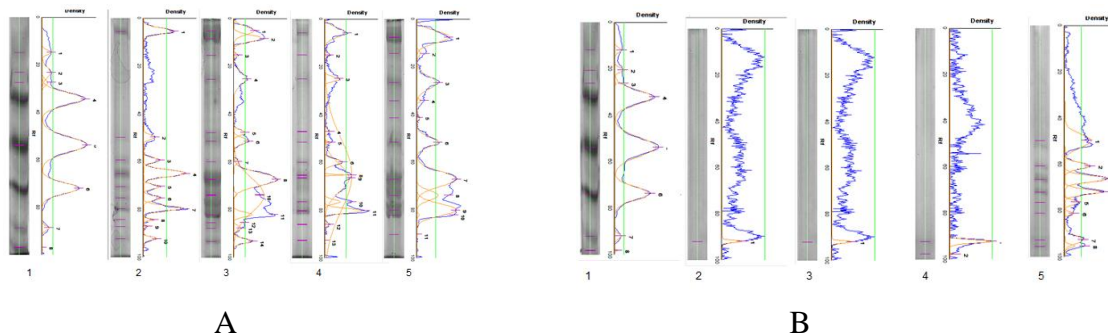


Figura 2. Densitogramas de Proteínas Miofibrilares A) Sin MC; B) Con MC
1) Marcador, 2) Cerdo Cocido, 3) Cerdo Crudo, 4) Pescado Cocido, 5) Pescado Crudo

En base al SDS-PAGE realizado con mercaptoetanol se observa que existió una desnaturalización de proteínas en cada una de las muestras y más aún en los sistemas que se realizó tratamiento de cocción, observando así una mayor presencia de cadenas peptídicas entre 21.5 y 31 kDa, además de presencia de bandas menores a 14.4 kDa en los sistemas cárnicos sin tratamiento y con una $P < 0.001$.

Siendo también el mercaptoetanol el factor que disminuyó la concentración de proteínas, al ser comparado con SDS-PAGE sin mercaptoetanol, mostrando un peso molecular de proteínas miofibrilares de cerdo crudo, proteínas miofibrilares de cerdo cocido, proteínas de pescado crudo y proteínas miofibrilares de pescado cocido de 163.33, 21.91, 166.21 y 14.04 kDa respectivamente ($P < 0.001$).

La intensidad que presentan ambos densitogramas (con y sin mercaptoetanol) muestran la presencia de bandas menores a 14.4 kDa, lo cual sustenta la presencia de péptidos menores a 10 kDa que fueron analizados en este estudio.

De lo anterior podemos decir que los resultados mostraron tener diferencias significativas $P(<0.001)$ entre las muestras y entre las especies con tratamiento y sin tratamiento, los análisis de los electroforetogramas mostraron diferencias significativas en los pesos moleculares entre los tratamientos. La actividad quelante mostró ser mayor en moléculas menores a 10 kDa que en cadenas polipeptídicas mayores a 10 kDa tanto en cerdo como en pescado, sin embargo en el cerdo fue menor que en el pescado

CONCLUSIÓN.

Los resultados mostraron que los péptidos de pescado presentaron mayor actividad quelante que en el cerdo, lo cual contribuye a la información en el estudio de miosistemas de origen acuático y terrestre, y que a pesar del tratamiento térmico las pequeñas unidades de naturaleza proteica presentan aun actividad quelante, lo cual podría explicar que pueden tener una actividad biológica y bioquímica dentro del cuerpo humano después del cocimiento y del consumo, cabe señalar que es importante realizar estudios biológicos para corroborar esta sugerencia.

REFERENCIAS.

- Anusha G.P. Samaranayaka, C.Y., y Li-Chan E. (2011) Food-derived peptidic antioxidants: A review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. *Journal of functional foods*. 3; 229-259.
- Chalamaiaha, M., Dinesh D., Kumar, Hemalatha R. y Jyothirmayi T. 2012 Fish protein hydrolysates: Proximate Composition, Amino Acid Composition, Antioxidant Activities and Applications: A review. *Food Chemistry*.. Vol. 135; 3020–3038.
- Hasapido, I.N. y Savvaidis (2011). The Effects of Modified Atmosphere Packaging, EDTA and Oregano Oil on the Quality of Chicken Liver Meat *Food Research International* 44 ;2751-2756.
- Kondjoyana, A., Kohler, A., Realini, C.E., Portanguena, S., Kowalski, R., Clerjona, S., Gatellier, P., Chevolleau, S., Bonny J.M. y Debrauwer, L. (2013). Towards Models for the Prediction of Beef meat Quality During Cooking. *Meat Science*. In Press, Accepted Manuscript.
- Mora B. Curti E., Vittadini, E., y Barbanti, D. (2011) Effect of Different Air/Steam Convection Cooking Methods on Turkey Breast Meat: Physical Characterization, Water Status and Sensory Properties. *Meat Science* 88; 489–497.
- Toldrá F. (2010) Compuestos bioactivos de la carne de cerdo. *Alim. Nutri. Salud*. 17(1): 9-17.
- Wu, P., Zhou, J., Wang, X., Dai, Y., Dang, Z., Zhu, N., Li, P. y Wu, J. (2011); Adsorption of Cu-EDTA Complexes from Aqueous Solutions by Polymeric Fe/Zr Pillared Montmorillonite: Behaviors and Mechanisms. *Desalination* 277, (288-295).

ENVASADO DE CEREZAS EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS CON BIOPOLÍMEROS COMO MATERIAL DE ENVASE**M. J. Pons¹, L. F. Vega^{1,2}, L. Olivares² y S. Guri^{1,2}**¹MatGas 2000 A.I.E. 080193 Bellaterra. (Barcelona).²Carburos Metálicos – Grupo Air Products. C/Aragón 300. 08009 (Barcelona).**RESUMEN**

Los materiales más utilizados a lo largo de los últimos años para envasar productos alimentarios han sido, principalmente, derivados del petróleo como el tereftalato de polietileno (PET), policloruro de vinilo (PVC), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y la poliamida (PA) ya que, sus propiedades mecánicas así como su bajo coste de producción los hacen muy rentables. Sin embargo, los residuos de estos materiales, resultan ser muy contaminantes para el medio ambiente. Actualmente, el envasado de alimentos en Atmósferas Modificadas (AMs) es un método muy utilizado ya que, conserva las características físico-químicas y microbiológicas de los alimentos a lo largo del periodo de almacenamiento. El objetivo de este estudio ha sido comparar un material de envasado biodegradable con uno tradicional, para el envasado de cerezas frescas en AMs. La cerezas fueron envasadas en AMs con la mezcla de gases 5% CO₂ / 5% O₂ / 90% N₂ o con aire, utilizando dos films semipermeables. Uno de los films era de material tradicional, concretamente, de polipropileno orientado (OPP) y, el otro era un film biodegradable de poliéster, derivado del ácido poliláctico (PLA). Después de ser envasadas, las cerezas se conservaron en refrigeración durante 12 días. Al final del periodo de conservación, se evaluaron los parámetros físico-químicos de la fruta. Los resultados mostraron que el envasado de las cerezas en AMs con la mezcla de gases 5% CO₂ / 5% O₂ / 90% N₂ utilizando el film biodegradable, en general, mantiene de forma correcta las características físico-químicas de las mismas a lo largo del periodo de conservación de la fruta. Por lo tanto, el uso de material biodegradable para el envasado de cerezas en AMs puede ser una alternativa viable al uso de materiales tradicionales y, de esta manera, evitar el impacto que representan los materiales plásticos tradicionales sobre el medio ambiente.

Palabras clave: Atmósferas modificadas, biopolímeros, envasado, cerezas.

INTRODUCCIÓN

España es uno de los principales productores de cerezas (*Prunus avium* L.) en Europa ya que, las condiciones climatológicas de varias de sus regiones son óptimas para la producción de esta fruta (Remón *et al.*; 2003). El comercio de frutas es, en general, un negocio estacional, que depende principalmente de los periodos de recolección y de la vida útil de la fruta en el periodo de postcosecha. Una técnica para alargar la vida útil de las frutas es el envasado en atmósferas modificadas (AMs), el cual se basa en extraer el aire del interior del envase que contiene el producto alimentario, e introducir una mezcla de gases idónea que protegerá al alimento durante el periodo de almacenamiento.

El envasado de cerezas en atmósfera modificada conserva sus propiedades originales durante un periodo de tiempo mayor que si éstas no estuvieran envasadas con esta tecnología (Meheriuk *et al.*; 1997, Remón *et al.*, 2000, Kappel *et al.*, 2002).

Los films más utilizados en el envasado en AMs son los derivados del petróleo crudo. Entre éstos se encuentran el tereftalato de polietileno (PET), el policloruro de vinilo (PVC), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS) y la poliamida (PA), las propiedades mecánicas de los cuales, así como su bajo coste de producción, los hacen muy rentables. Sin embargo, su uso está siendo restringido debido a que éstos no son totalmente reciclables ni biodegradables. Este hecho implica que los residuos de estos films pueden tener un alto impacto a nivel medioambiental. Además, los envases fabricados con estos materiales suelen estar contaminados por restos del producto que contienen (alimentos u otras sustancias biológicas), hecho que convierte su reciclaje en un proceso impracticable (Siracusa *et al.*, 2008). Para substituir a los plásticos derivados del petróleo, se han desarrollado los biopolímeros, los cuales son materiales biodegradables y compostables. Los biopolímeros pueden dividirse en tres grupos: poliésteres, polímeros derivados del almidón, y otros biopolímeros (Siracusa *et al.*, 2008). Dentro del grupo de los poliésteres, encontramos los derivados de ácido poliláctico (PLA).

Diversos autores han llevado a cabo estudios en los que se demuestra que los films biodegradables mantienen las características originales de frutas y hortalizas, igual o mejor que los films tradicionales (Koide y Shi, 2007; Del Nobile *et al.*, 2009, Makino y Hirata, 1997, Giacalone, 2013).

El objetivo de este estudio ha sido determinar si el biopolímero PLA mantiene las características físico-químicas originales de cerezas envasadas en AMs de la misma manera que un film tradicional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las cerezas utilizadas en el ensayo eran de la variedad “Sweet heart”, las cuales se recogieron el día anterior al envasado en una plantación situada en Tivissa (Tarragona).

Diseño experimental

Las cerezas se envasaron con una máquina vertical *Per-Pack* modelo 100-A. Para el envasado se utilizaron 2 tipos de film. Uno de ellos era un film tradicional de polipropileno (*Amtor*) y el otro era de material biodegradable, concretamente del grupo de los poliésteres, derivado del ácido poli-láctico (PLA) (*Amtor*). Ambos films eran semipermeables a los gases. Las propiedades del film tradicional eran: 40 μm de grosor, 1100 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$ de tasa de transmisión al oxígeno y 5 $\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ de tasa de transmisión al vapor de agua, y las del film PLA: 40 μm de grosor, 860 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$ de tasa de transmisión al oxígeno y 273 $\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ de tasa de transmisión al vapor de agua. Las muestras fueron envasadas en aire o con la mezcla de gases 5% O_2 / 5% CO_2 / 90 % N_2 . La mezcla de gases alimentarios (S.E. Carburos Metálicos-Grupo Air Products, España) fue preparada previamente con un mezclador de gases WITT KM 100-3M/MEM.

Para cada mezcla de gases y film, se prepararon 3 repeticiones, cada una de las cuales consistió en una bolsa con 25 cerezas en su interior. Una vez envasadas, las cerezas se conservaron a temperatura de refrigeración (4°C) durante 12 días. Los muestreos se realizaron los días 0, 2, 5, 7, 9 y 12 del período de conservación.

Análisis físico-químicos

La mezcla de gases en el interior del envase se midió a partir de una muestra gaseosa de la atmósfera del interior del envase tomada con jeringa a través del film y analizada con un analizador de gases (Witt OXYBABY 6.0).

La pérdida de peso, se determinó por diferencia entre el peso inicial y el peso final del producto, después de los distintos períodos de almacenamiento. Se empleó una balanza Gram Precisión Serie MS, con precisión 0.1g.

El pH se evaluó mediante un pH-metro Crison Basic 20+, con electrodo de penetración Crison 52-31.

La firmeza de las cerezas se determinó con un penetrómetro que mide la resistencia que el producto ofrece a la penetración.

El contenido de sólidos solubles de la fruta se analizó con un refractómetro Shibuya Optical co. mod. 137 y los resultados se expresaron como Grados Brix,

El color superficial de las cerezas se determinó con un colorímetro Minolta CR-400. Los parámetros medidos fueron a^* y b^* (a^* : equilibrio entre el verde y el rojo y b^* : el equilibrio entre el amarillo y el azul). A partir de los parámetros a^* y b^* , se calculó el parámetro croma o saturación $((a^{*2}+b^{*2})^{1/2})$, el cual describe el matiz del color.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución del porcentaje de O₂ y CO₂

Se observó que, a lo largo de los primeros días del estudio, la concentración de O₂ y la de CO₂ fueron disminuyendo y aumentando, respectivamente hasta llegar a un equilibrio entre los días 5 y 7, en todos los tratamientos, independientemente del film utilizado y de la atmósfera con la cual se envasaron las cerezas (Fig. 1A y 1B). Esto fue debido a la respiración aeróbica de la fruta. Sin embargo, en las cerezas envasadas con el film tradicional y con la mezcla inicial de gases 5% O₂ / 5% CO₂ / 90 % N₂ en su interior, se observó una disminución más lenta de la concentración del O₂, a lo largo del periodo de conservación, con respecto a las muestras envasadas con aire. Esto podría haber sido debido a que la concentración más baja de O₂ de la mezcla 5% O₂ / 5% CO₂ / 90 % N₂, con respecto a la del aire, habría reducido la tasa respiratoria de las cerezas, lo que implica una ralentización de su metabolismo (Fig. 1A). Todo ello hizo que las cerezas no consumieran tanto O₂ ni desprendieran tanto CO₂ como las envasadas en aire (Fig. 1B).

Al comparar los resultados obtenidos con los dos films en los tratamientos con aire, se observó que la evolución de los gases era distinta. En las muestras de cerezas envasadas con el film de PLA, la concentración de O₂ se mantuvo más elevada que la de las cerezas envasadas con el film tradicional. Esto podría explicarse por la más alta deshidratación que se habría producido en las cerezas envasadas con el material de PLA, lo cual habría producido una reducción de la tasa respiratoria de las mismas. Esta deshidratación podría estar relacionada con la tasa de transmisión al vapor de agua que es más elevada en el film PLA que en el film tradicional (Conte *et al*, 2009). Cuando se compararon los resultados obtenidos de los dos films con la mezcla de gases 5% O₂ / 5% CO₂ / 90 % N₂, también se observó una evolución diferente (Fig. 1A y 1B). Esto podría explicarse por las diferentes transmisiones al O₂ de los dos films, ya que la del film PLA es de 860 cm³/m²/día y la del film tradicional es de 1100 cm³/m²/día. Por ello, durante el tiempo de conservación de las cerezas, el volumen de O₂ transmitido habría sido más bajo a través del film PLA que a través del film tradicional.

Pérdida de peso

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de las muestras envasadas con el mismo film ($P < 0.05$) (Fig. 2). Sin embargo, se observó una mayor pérdida de peso de las cerezas envasadas con el film de PLA, que con el tradicional. En las cerezas envasadas con el film tradicional se produjo una pérdida de peso final alrededor de un 0.2%, con respecto al peso inicial, mientras que en las cerezas envasadas con el film biodegradable esta pérdida fue de un 3%, aproximadamente. Esto podría explicarse por la transmisión al vapor de agua de los films. Mientras que en el film tradicional esta transmisión es de $5 \text{ g/m}^2/\text{día}$, en el film de PLA ésta es de $273 \text{ g/m}^2/\text{día}$. Conte *et al* (2009) en su estudio, también observaron una mayor pérdida de peso de las cerezas envasadas en aire con un film con una transmisión al vapor de agua de $118.19 \text{ g/m}^2/\text{día}$, que en un film con una transmisión al vapor de agua menor, concretamente de $0.6 \text{ g/m}^2/\text{día}$.

Acidez

A lo largo de los 12 días que duró el ensayo, el pH de las cerezas prácticamente no varió. Al inicio del ensayo el pH era de 4.25 y al final del periodo de conservación fue de alrededor de 4 en todos los tratamientos (resultados no mostrados). Esto nos indica que ni el material de envase ni la mezcla de gases utilizada afectó la acidez de la fruta.

Firmeza

En el momento de la recolección, es cuando la firmeza de la cereza se encuentra en su punto ideal. Es por ello, que a lo largo del tiempo de conservación, es interesante que esta firmeza no varíe hasta que la cereza llegue al consumidor. Cabe decir, que en las cerezas la pérdida de firmeza durante la maduración no es tan evidente como en otras frutas. En el presente trabajo, no se observaron variaciones significativas de este parámetro a lo largo de los 12 días que duró el ensayo, independientemente del tratamiento y del material de envase (resultados no mostrados). Remón *et al.* (2000) tampoco observaron diferencias significativas del parámetro firmeza, entre el inicio y el final del ensayo, de cerezas envasadas en AMs con dos mezclas de gases con porcentajes de O_2 del 3 % y del 8%.

Grados Brix

Al igual que el parámetro firmeza, el contenido de azúcares de las cerezas se encuentra en su punto ideal cuando éstas son recolectadas. Por ello, es muy importante mantener este parámetro a lo largo del periodo de conservación antes de que la fruta sea consumida. La cereza es una fruta que no acumula almidón, por lo tanto, el contenido de azúcares (fructosa y glucosa) en el momento de la recolección se mantiene prácticamente

constante y aumenta muy poco a lo largo de su almacenamiento. Además, el envasado de cerezas en AMs hace que el contenido de azúcares, varíe ligeramente o no varíe, a lo largo del periodo de conservación (Remón *et al.*, 2000, 2003). En el presente estudio no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) a lo largo de los 12 días del tiempo de conservación (Fig. 3), independientemente del tratamiento y del film utilizado.

Evolución del color

El índice Cromo, prácticamente, no varió a lo largo de los 12 días que duró el ensayo, independientemente del tratamiento y del tipo de film (resultados no mostrados). A lo largo del ensayo el color de las cerezas se mantuvo entre rojo y rojo caoba.

CONCLUSIONES

La mezcla de gases 5% O₂ / 5% CO₂ / 90 % N₂, mantiene las propiedades físico-químicas de las cerezas a lo largo de 12 días de conservación a temperatura de refrigeración. El film biodegradable PLA es apto para el envasado de cerezas en AMs, siempre que la transmisión al vapor de agua del film pudiera ser reducida para evitar una excesiva pérdida de agua y, de esta manera, mantener unas propiedades cualitativas más cercanas a las de las cerezas envasadas con materiales plásticos tradicionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Rosa Aguilera y a Albert Riudor la ayuda facilitada en la realización de las tareas de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Conte, A., Scrocco, C., Lecce, L., Mastromatteo, M. y Del Nobile, M. A., 2009. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 564-571.

Del Nobile, M.A., Conte, A., Buonocore, G.G., Incoronato, A.L., Massaro, A., y Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. J. Food Eng. 93, 1-6.

Giacalone, G. y Chiabrando, V., 2013. Modified atmosphere packaging of sweet cherries with biodegradable films. International Food Research Journal, 20(3), 1263-1268.

Kappel, F., Toivonen, P., McKenzie, D. L. y Stan, S., 2002. Storage Characteristics of New Sweet Cherry Cultivars. Hort Science, 37 (1), 139-143.

Koide, S. y Shi, J. (2007). Microbial and quality evaluation of green peppers stored in biodegradable film packaging. Food Control 18, 1121-1125.

Makino, Y. y Hirata, T. (1997). Modified atmosphere packaging of fresh produce with a biodegradable laminate of chitosan-cellulose and polycaprolactone. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 247-254.

Meheriuk, M., McKenzie, B., Girard, B., Moyls, A. L., Weintraub, S., Hocking, R. y Kopp, T., 1997. Storage of ‘Sweetheart’ cherries in sealed plastic film. *Journal of food quality*, 20, 189-198.

Remón, S., Ferrer, A., Marquina, P. Burgos, J y Oria, R., 2000. Use of modified atmospheres to prolong the postharvest life of Burlat cherries at two different degrees of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1545-1552.

Remón, S., Venturini, M. E., Lopez-Buesa, P. y Oria, R., 2003. Burlat cherry quality after long range transport: optimisation of packaging conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4, 425-434.

Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S. y Rosa, M.D., 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 19, 634-643.

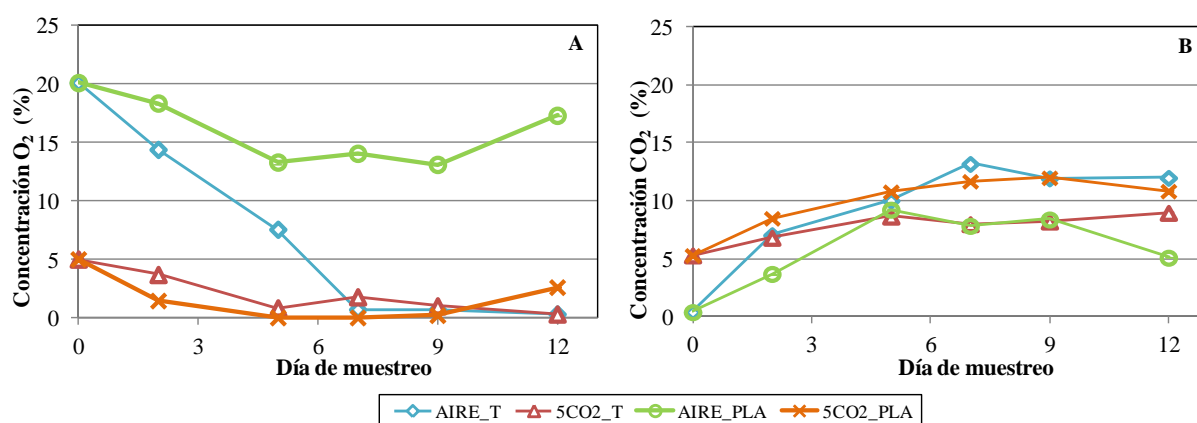


Figura 1: Evolución de la concentración de gases (%) en envases de film tradicional (T) o de PLA: A) oxígeno y B) dióxido de carbono, en muestras de cerezas, envasadas en aire o en atmósfera modificada con la mezcla de gases 5%CO₂ / 5%O₂ / 90%N₂ (5CO₂) y conservadas durante 12 días a temperatura de refrigeración (4°C). Los valores representados corresponden a los promedios de tres repeticiones ± error estándar.

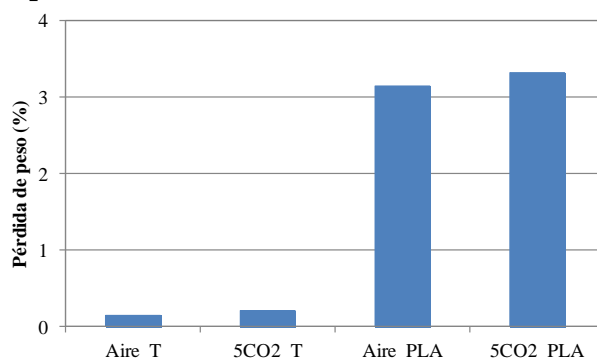


Figura 2. Pérdida de peso final (%) de cerezas envasadas con film tradicional (T) o en envases de ácido poliláctico (PLA). Las cerezas se envasaron en aire o en atmósfera modificada con la mezcla de gases 5%CO₂ / 5%O₂ / 90%N₂ (5CO₂) y, se conservaron durante 12 días a temperatura de refrigeración (4°C). Los valores representados corresponden a los promedios de tres repeticiones ± error estándar.

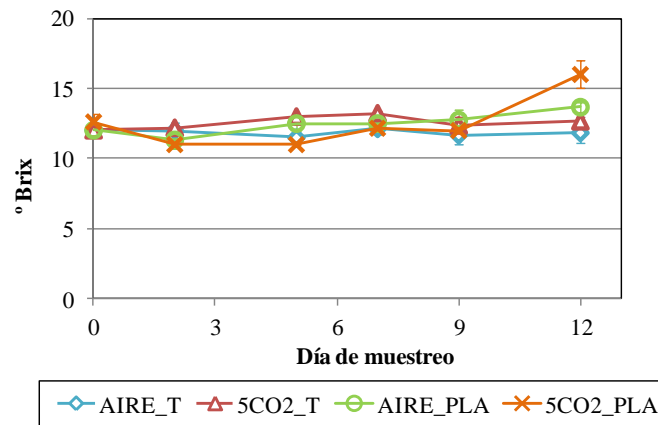


Figura 3. Evolución de los grados Brix en cerezas envasadas en bolsas de film tradicional (T) o en envases de ácido poliláctico (PLA). Las cerezas se envasaron en aire o en atmósfera modificada con la mezcla de gases 5% CO₂ / 5% O₂ / 90% N₂ (5CO₂) y, se conservaron durante 12 días a temperatura de refrigeración (4°C). Los valores representados corresponden a los promedios de tres repeticiones ± error estándar.

EFFECTO SINÉRGICO DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA Y EL ENVASADO CON DIÓXIDO DE CARBONO PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERADORES Y PATÓGENOS EN SALCHICHAS DE AVE

A. Al-Nehlawi^{a,b} *, S. Guri^{c,d}, J. Saldo^{a,b}

^a Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona).

^b Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XiT.

^c MATGAS Research Center, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra (Barcelona).

^d S.E. Carburos Metàlics – Air Products Group, Barcelona

RESUMEN

El efecto sinérgico que surge al combinar la alta presión hidrostática (HHP) y el envasado con CO₂ para la destrucción de microorganismos alteradores y patógenos ha sido demostrado en salchichas de ave. *Brochothrix thermosphacta*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria innocua* fueron inoculados por separado en salchichas de ave, que fueron envasadas con CO₂ y posteriormente tratadas con HHP (350 MPa 10 min a temperatura ambiente). Los resultados mostraron la existencia de un efecto sinérgico de la combinación de estas dos tecnologías de preservación contra todos los microorganismos estudiados, excepto en *C. jejuni*, que es especialmente sensible a altas presiones. El daño celular producido por la alta presión facilita la penetración de dióxido de carbono en las células de los microorganismos, que afecta a su metabolismo y por lo tanto a su desarrollo. Combinando la alta presión con el envasado con CO₂ es posible obtener mejores rendimientos de reducción microbiana, con la posibilidad de reducir la presión aplicada sin poner en peligro la seguridad alimentaria del producto.

INTRODUCCIÓN

Debido a la demanda de los consumidores y al avance de la ciencia, la ingeniería alimentaria ha desarrollado nuevas metodologías y tecnologías con el objetivo de mejorar la conservación de los alimentos y alargar su vida útil, garantizando la seguridad y la calidad de éstos. A pesar de que los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización siguen siendo los métodos de conservación más empleados, los nuevos procesos de conservación empleados siguen la tendencia de evitar el uso de la temperatura para mejorar la vida útil de los alimentos sin dañar sus propiedades. Los ultrasonidos, los campos magnéticos o

eléctricos, pulsos lumínicos o las altas presiones son algunas de las tecnologías que han potenciado su aplicación en alimentos; también el uso de ciertas sustancias químicas o biológicas como dióxido de carbono, bacteriocinas o algunas enzimas han sido estudiadas para tal fin (Mertens & Knorr, 1992).

La alta presión hidrostática (HHP), es una de las tecnologías no-térmicas más prometedoras para la inactivación de microorganismos en alimentos líquidos y sólidos, manteniendo sus propiedades nutricionales intactas (Wang, Pan, Xie, Yang, & Lin, 2010) y con muy leves cambios en la textura, el color y el flavor de estos alimentos comparados con los sistemas de conservación térmicos tradicionales (Cheftel, 1995; Knorr, 1993; Velazquez, Gandhi, & Torres, 2002). A diferencia de los tratamiento térmicos, los efectos causados por la alta presión son uniformes en todo el producto, independientemente de la geometría y el tamaño del equipo (Torres & Velazquez, 2005). Su eficacia ha sido demostrada en numerosas ocasiones, no solo contra microorganismos alteradores y patógenos (Gervilla, Capellas, Ferragut, & Guamis, 1997; Wilson, Dabrowski, Stringer, Moezelaar, & Brocklehurst, 2008) si no que también en la mejora de algunos procesos de producción y en las propiedades de algunos alimentos (Juan, Trujillo, Guamis, Buffa, & Ferragut, 2007; Saldo, McSweeney, Sendra, Kelly, & Guamis, 2002; Trujillo et al., 2000). Pero a pesar de sus múltiples ventajas, el elevado coste de los equipos de alta presión que alcanzan presiones superiores a los 600 MPa necesarios para la completa inactivación de microorganismos, ha limitado la extensión de su uso. Por ello, numerosos estudios combinando el uso de HHP a presiones más bajas con otras tecnologías más rentables se han llevado a cabo, hallando efectos sinérgicos muy interesantes como resultado de estas combinaciones.

El dióxido de carbono (CO_2) es un gas empleado en el envasado en atmosfera modificada (EAM) de numerosos productos alimentarios, generalmente combinado con otros gases como oxígeno (O_2) y/o nitrógeno (N_2). Gracias a sus propiedades bacteriostáticas el CO_2 es, de los gases empleados en el EAM, el más importante. Existen diversas teorías sobre los mecanismos bacteriostáticos del CO_2 (Tan & Gill, 1982), pero la más aceptada es que cuando el CO_2 entra en contacto con la fase acuosa del alimento se forman ácidos carbónicos que modifican el pH intracelular, provocando cambios en el metabolismo de los microorganismos que alteran su desarrollo. Independientemente de cuál sea el mecanismo, es evidente que la inhibición del crecimiento de microorganismos en alimentos envasados en atmosfera modificada está condicionada y es proporcional a la concentración de CO_2 introducida (Devlieghere & Debevere, 2000).

El efecto sinérgico entre la alta presión hidrostática y el CO₂ sobre algunos enzimas y microorganismos ha sido documentado anteriormente. No obstante, en la mayoría de estos estudios la concentración de CO₂ era muy baja (Corwin & Shellhammer, 2002; Park, Park, & Park, 2003). Wang *et al.* (2010) midieron la cantidad de CO₂ disuelto en caldo de cultivo tratado a alta presión, lo que supuso un avance importante puesto que la concentración de CO₂ disuelto determina la significancia del efecto sinérgico. Sin embargo, buscando en la bibliografía presente, no se han hallado investigaciones sobre este efecto sinérgico entre HHP y altas concentraciones de CO₂ en alimentos reales y tal y como ha sido demostrado en investigaciones posteriores, la presurización es más efectiva en suspensiones inoculadas (caldos o medios de cultivo) que en alimentos reales (Mor-Mur & Yuste, 2005; Solomon & Hoover, 2004).

Considerando su potencial y las posibilidades de mejorar y ampliar los usos comerciales de la HHP gracias a su combinación con una tecnología sustancialmente menos costosa como es el EAM, en el presente estudio el efecto sinérgico entre estas tecnologías ha sido estudiado en salchichas de ave.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las muestras

Considerando las características del alimento, cepas de *Brochothrix thermosphacta* (CECT 847), *Campylobacter jejuni* (CECT 7572) y *Listeria innocua* (CECT 910T) como cepa no patogénica de *Listeria monocytogenes* fueron recuperadas siguiendo las instrucciones de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, España) y conservadas en criobolas a -20 °C. Los inóculos fueron preparados inoculando las criobolas en 20 ml de medio nutritivo (BHI a 25 °C durante 48h para *B. thermosphacta*, Columbia Blood Agar a 37°C durante 48h para *C. jejuni* y TSB a 37 °C durante 24h para *L. innocua*). Este proceso se repitió añadiendo 0.1 mL de este primer inóculo en otros 20 mL de medio nutritivo estéril, incubando de nuevo según las características de cada microorganismo para así asegurar la fase estacionaria de su crecimiento. La concentración final del inóculo fue de 10⁶-10⁸ ufc/mL. Las salchichas fueron inoculadas con 0.1 ml de inóculo puro repartido en su superficie. Una vez inoculadas, las salchichas fueron introducidas en bolsas de plástico de material barrera a los gases (50 µm, transmisión O₂ < 5 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ y transmisión CO₂ < 25 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ bar⁻¹, ambos determinados por el fabricante a 23 °C i 0% RH; Linpac, España)

2.2. Envasado y tratamiento

Se realizaron cuatro tratamientos diferentes: 1. Envasado con CO₂ y tratamiento con HHP (HHP+CO₂), 2. Envasado con aire y tratamiento con HHP (HHP+Aire), 3. Envasado con CO₂ sin presión (CO₂) y 4. Envasado con aire sin presión (Aire).

El tratamiento a presión fue de 350 MPa durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

2.3. Recuentos microbiológicos

Los recuentos de las muestras se realizaron al día siguiente del tratamiento (18 ± 2 h) y al día 7, manteniendo las muestras en refrigeración (2 ± 1 °C) durante ese período.

Inmediatamente después de abrir los envases, las salchichas fueron volcadas a bolsas de stomacher estériles. La bolsa original fue lavada con agua de peptona estéril, que también fue traspasada a la bolsa de stomacher junto con la salchicha, para arrastrar cualquier resto de inóculo. La muestra fue homogeneizada durante 90 segundos. Se realizaron diluciones decimales, que fueron inoculadas en medio selectivo (STAA + suplemento a 25 °C durante 48h para *B. thermosphacta*, CCDA + suplemento a 37°C durante 48h para *C. jejuni* y ALOA agar a 37 °C durante 24h para *L. innocua*).

2.4. Análisis estadístico de los resultados

Este experimento fue realizado por duplicado y los análisis por día de muestreo, tratamiento y microorganismo fueron determinados por triplicado. Una ANOVA a dos vías y un modelo GLM fueron ejecutados con el software estadístico JMP (SAS Institute INC., U.S.A.) analizando las interacciones entre los factores “tratamiento” y “día de muestreo” y aplicando el test de Tukey-Kramer cuando la había significancia estadística.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras inoculadas con *B. thermosphacta* y tratadas con presión se observó una reducción de 3 log ufc/g, bajando a 4 log ufc/g después de 7 días de conservación. Sin embargo, cuando las salchichas tratadas con presión tenían una atmosfera de CO₂ esta reducción fue de más de 5 log ufc/g en el primer recuento, y a los 7 días no hubo recuperación celular, resultando la completa inactivación de *B. thermosphacta*. No se detectaron diferencias significativas entre las muestras no presurizadas (Figura 1A).

En el estudio con *C. jejuni* se detectó que después de la inoculación los recuentos de este microorganismo empezaron a descender antes incluso del tratamiento a presión, seguramente debido a las exigentes condiciones atmosféricas que requiere para su desarrollo.

Después del tratamiento a presión la inactivación de *C. jejuni* fue total, independientemente de la atmosfera empleada (Figura 1B); y en las muestras sin presión ésta inactivación total se cuantificó en el recuento realizado a los 7 días de conservación.

En el caso de *L. innocua*, el envasado con CO₂ o con aire no mostraron ser significativamente diferentes entre ellos y en ambos no se detectó ninguna variación significativa en recuento de colonias a lo largo del tiempo de control. Las salchichas envasadas con aire y tratadas a alta presión redujeron la concentración de *L. innocua* en menos de una unidad logarítmica según se detectó en el primer recuento. No obstante las células se recuperaron hasta alcanzar de nuevo los niveles iniciales en el recuento realizado a los 7 días. Sin embargo en las muestras envasadas con CO₂ y tratadas con alta presión se produjo una reducción de más de 2 log ufc/g en el primer recuento, que siguió descendiendo hasta casi 3 unidades logarítmicas en el recuento a los 7 días, (Figura 1C).

A diferencia de las pruebas realizadas con *C. jejuni* en las que los bajos recuentos no permitieron llegar a ninguna conclusión respecto a los tratamientos, en los experimentos con *B. thermosphacta* y *L. innocua* sí se ha podido demostrar que la combinación de atmosfera rica en CO₂ y alta presión produce un efecto sinérgico capaz de producir mayores reducciones de estos microorganismos que aplicando estas tecnologías por separado.

Es ampliamente conocida la capacidad que tiene el dióxido de carbono para disolverse en la fase acuosa y lipídica de los alimentos, especialmente la carne gracias a su composición (Carroll, Slupsky, & Mather, 1991; Jakobsen & Bertelsen, 2006), provocando una disminución en los valores del pH intracelular. Lin, Yang y Chen (1993) sugirieron que los valores de pH más ácidos incrementan la permeabilidad de la membrana celular, lo que facilitaría una mayor difusión del CO₂ a través de ella. Conjuntamente, después de un tratamiento a alta presión, la membrana celular de los microorganismos sufre daños en su estructura y propiedades, lo que incrementa su permeabilidad y facilita así una mayor entrada de CO₂ en el interior de la célula, provocando un efecto bacteriostático mayor. Esto explicaría por qué las salchichas envasadas con CO₂ y tratadas con alta presión obtuvieron recuentos más bajos que los demás tratamientos. Las mismas conclusiones fueron determinadas en estudios similares en los que se combinó alta presión y dióxido de carbono (Park et al., 2003; Wang et al., 2010).

Una de las hipótesis iniciales antes de realizar los tratamientos fue que la alta presión provocaría una disolución forzada del CO₂ que sería visible a través de una reducción inmediata del volumen de las bolsas. Sin embargo, ésta variación de volumen no se produjo. No obstante sí se detectaron algunas diferencias en el aspecto de las salchichas. Gracias a la

piel que cubre el exterior de éstas, una importante cantidad de burbujas se formaron en su superficie, mostrando diferencias significativas notables según la atmosfera con la que estaban envasadas. Las muestras envasadas con aire presentaron un mayor número de burbujas que las muestras envasadas con CO₂ (Figura 2). A pesar de que no se han documentado hechos similares, la explicación lógica para éste hecho se basa en que la alta presión provoca una disolución forzada del gas (sea aire o CO₂) dentro del alimento. Una vez la presión es alcanzada y durante el tiempo de presurizado, el gas va penetrando intracelularmente, y es entonces cuando el CO₂ se disuelve en la fase acuosa de la carne. Cuando la fase de despresurización se produce, el gas es extraído de forma abrupta. Esta rápida extracción es la responsable de la formación de las burbujas que se forman en la superficie de las salchichas, notablemente evidentes en las muestras envasadas con aire pero no tanto en las envasadas con CO₂, debido a que parte de este gas se ha quedado disuelto en el producto y por lo tanto el volumen de gas extraído es menor.

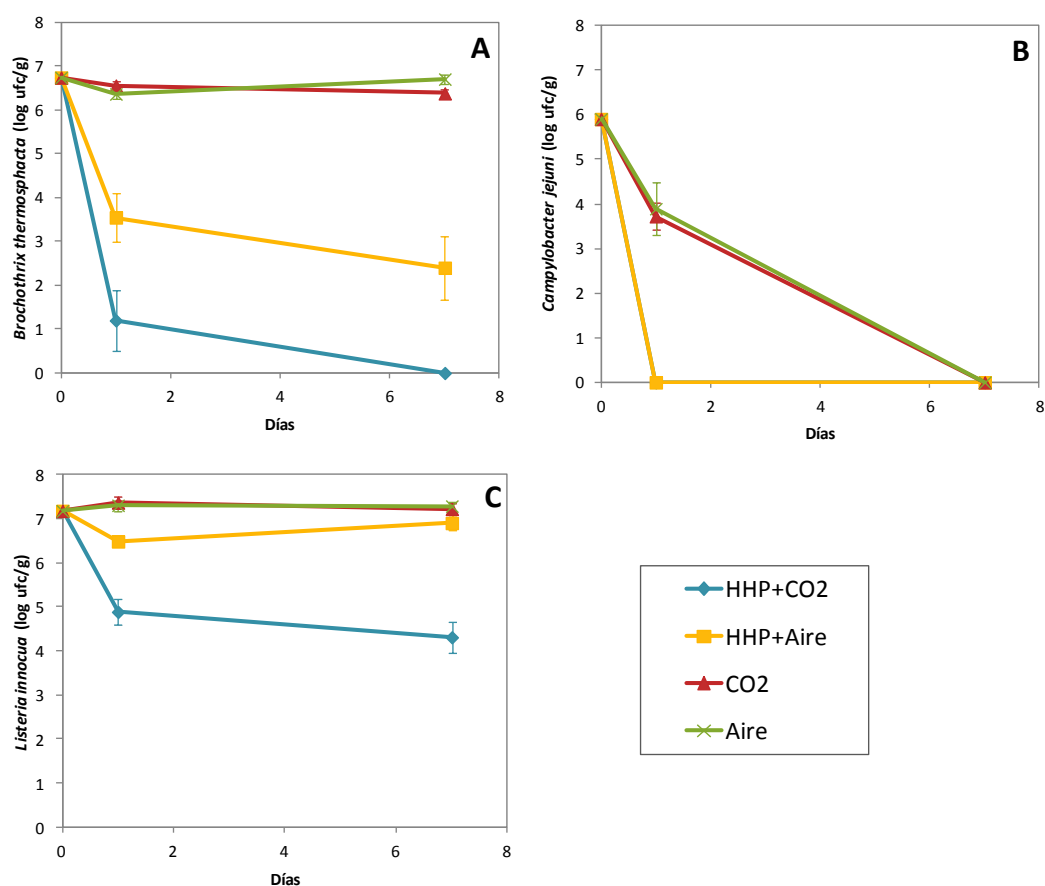


Figura 1. Efecto de la alta presión hidrostática (350 MPa durante 10 minutos a temperatura ambiente) y de la atmosfera con CO₂ sobre *Brochothrix thermosphacta* (A), *Campylobacter jejuni* (B) y *Listeria innocua* (C) inoculados en salchichas de ave. Los valores corresponden a la media de tres recuentos ± error estándar.

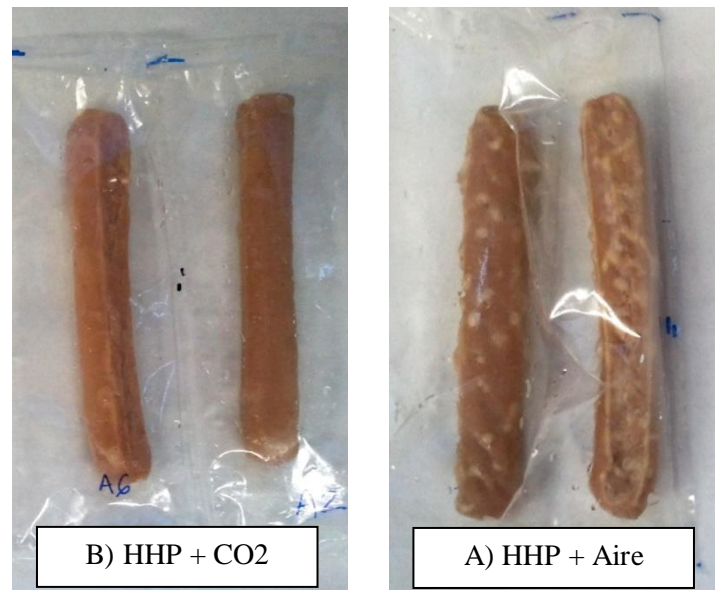


Figura 2. Imágenes del aspecto de las salchichas envasadas con 100% CO₂ (A) y con aire (B) después de ser tratadas con alta presión a 350 MPa durante 10 minutos a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

4. CONCLUSIONES

En este experimento se ha demostrado la existencia de un efecto sinérgico resultado de combinar la alta presión hidrostática y las atmósferas con CO₂ capaz de reducir significativamente e incluso inactivar algunos de los microorganismos alteradores y patógenos más comunes en la carne de ave. Los resultados sugieren que cuando se aplica alta presión la membrana celular se ve dañada, hecho que facilita la penetración del CO₂, mejorando la efectividad de su capacidad bacteriostática.

Empleando CO₂ se pueden aplicar presiones menos elevadas en los tratamientos HHP sin que se vean comprometidos los niveles de inactivación microbiana, lo que tendría un efecto positivo directo en los costes de esta tecnología de altas presiones, haciéndola más atractiva para la industria.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Roger Escriu del CERPTA su ayuda y soporte técnico en los tratamientos con alta presión, y a la Dra. Marta Cerdà del CRESA por su apoyo y formación. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto MALTA CONSOLIDER, del programa INGENIO2012.

6. REFERENCIAS

- Carroll, J. J., Slupsky, J. D., & Mather, A. E. (1991). The solubility of carbon dioxide in water at low pressure. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 20(6), 1201-1209.
- Cheftel, J. C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Comptes Rendus De l'Academie d'Agriculture De France*, 81(1), 13-38.
- Corwin, H., & Shellhammer, T. H. (2002). Combined carbon dioxide and high pressure inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase, *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Science*, 67(2), 697-701.
- Devlieghere, F., & Debevere, J. (2000). Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 33(8), 531-537.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V., & Guamis, B. (1997). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 60(1), 33-37.
- Jakobsen, M., & Bertelsen, G. (2006). Solubility of carbon dioxide in fat and muscle tissue. *Journal of Muscle Foods*, 17(1), 9-19.
- Juan, B., Trujillo, A. J., Guamis, V., Buffa, M., & Ferragut, V. (2007). Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17(3), 248-254. doi:DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.02.009
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47(6), 156-161.
- Lin, H., Yang, Z., & Chen, L. (1993). Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *The Chemical Engineering Journal*, 52(1), B29-B34.
- Mertens, B., & Knorr, D. (1992). Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technology*, 46, 124-133.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2005). Microbiological aspects of high-pressure processing. In Da-Wen Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 47-65). London: Academic Press.
- Park, S., Park, H., & Park, J. (2003). Inactivation kinetics of food poisoning microorganisms by carbon dioxide and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 68(3), 976-981.
- Saldo, J., McSweeney, P. L. H., Sendra, E., Kelly, A. L., & Guamis, B. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12(1), 35-44.
- Solomon, E. B., & Hoover, D. G. (2004). Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 505-509.
- Tan, K. H., & Gill, C. O. (1982). Physiological basis of CO₂ inhibition of a meat spoilage bacterium, *Pseudomonas fluorescens*. *Meat Science*, 7(1), 9-17.
- Torres, J. A., & Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 95-112. d
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., . . . Guamis, B. (2000). Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research International*, 33(3-4), 311-316.

Velazquez, G., Gandhi, K., & Torres, J. A. (2002). Hydrostatic pressure processing: A review. *Biotam*, 12(2), 71-78.

Wang, L., Pan, J., Xie, H., Yang, Y., & Lin, C. (2010). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by the synergistic action of high hydrostatic pressure and dissolved CO₂. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 118-125.

Wilson, D. R., Dabrowski, L., Stringer, S., Moezelaar, R., & Brocklehurst, T. F. (2008). High pressure in combination with elevated temperature as a method for the sterilisation of food. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 289-299.

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA BRASILEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) FRENTE À *LISTERIA MONOCYTOGENES* EXPERIMENTALMENTE INOCULADA EM HAMBÚRGUER.

Dannenber, G. S.¹; Iglesias, M. A.¹; Fagundes, G. A.²; Sawitzki, M. C.³; Fiorentini, Â. M.¹

¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas/RS, Brasil.

²Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande/RS, Brasil

³Laboratório de Controle Microbiológico, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana/RS, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais podem desencadear mecanismos naturais de defesa às variações climáticas, ataques de micro-organismos e animais superiores, sintetizando através de seu metabolismo secundário, moléculas biologicamente ativas como ésteres fenólicos, ácidos aromáticos e alifáticos, entre outros. Estas substâncias, após sua liberação das células vegetais, apresentam-se na forma de um líquido oleoso aromático definido como óleo essencial (OE) (KAVOOSI; ROWSHAN, 2013).

Segundo Rossi et al (2013) pesquisas têm demonstrado que a referida ação desempenhada por estas substâncias no vegetal, pode se estender a outros sistemas a partir da aplicação dos OE. O que se torna uma alternativa interessante para as indústrias que vem se preocupando com a atual e crescente demanda do mercado consumidor por produtos naturais, com redução de aditivos sintéticos, que podem fornecer riscos a saúde humana quando ingeridos em determinadas concentrações e/ou com certa frequência. Neste contexto os óleos essenciais têm sido aplicados em produtos como cosméticos, fármacos, implementos agrícolas e alimentos.

Para possibilitar uma aplicação industrial dos OE, além da eficácia, é necessário haver disponibilidade da matéria-prima. Atendendo a este quesito, encontra-se amplamente difundida na América do Sul, a pimenta brasileira (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Nos alimentos a aplicação destes extratos vegetais visa atribuir características sensoriais desejáveis, principalmente aroma, e promover a bioconservação, atuando como inibidor de reações oxidativas inerentes da deterioração, assim como controlar e/ou eliminar micro-organismos patogênicos e deteriorantes (PONCE; ROURA; MOREIRA, 2011).

Dentre os patógenos de ocorrência em alimentos destaca-se a *Listeria monocytogenes*, bactéria capaz de promover surtos de listeriose em indivíduos imunocomprometidos, com uma taxa de letalidade podendo atingir até 50% dos casos (CDC, 2005). Habitualmente encontra-se a presença de *L. monocytogenes* em carnes frescas e congeladas (CORNU, et al. 2006), demonstrando a importância de mecanismos capazes de controlar o desenvolvimento desta bactéria.

Com base neste contexto o presente estudo objetivou verificar a ação antimicrobiana do Óleo essencial de Pimenta Brasileira (OEPB) frente a *L. monocytogenes*, *in vitro*, quantificando as concentrações mínimas necessárias para inibir e destruir este patógeno, e posteriormente *in situ*, visando verificar a ação deste bioconservante em um sistema alimentício, para o qual se optou por um modelo cárneo, dado a sua ocorrência em produtos do gênero.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da Pimenta Brasileira

As amostras foram coletadas de árvores adultas situadas no Campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) na cidade de Capão do Leão/RS , latitude 31°48'0459'' e longitude 52°24'5532'', identificadas como *Schinus terebinthifolius* Raddi por similaridade em comparação com o exemplar registrado com o número 25.131 dentre as amostras existentes no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

2.2. Extração dos óleos essenciais

O OE foi extraído por hidrodestilação em clevenger, com adaptações da técnica descrita por Dourado (2012), onde os frutos foram inicialmente congelados em nitrogênio líquido e triturados em moinho de bola, para evitar a perda de substâncias voláteis e aumentar o rendimento da extração pelo aumento da superfície de contato, respectivamente.

2.3. Bactérias testadas

Na determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas 3 cepas de *L. monocytogenes*, sendo duas cepas padrões e uma isolada de alimentos, abrangendo 3 sorotipos diferentes, 1/2a, 4a e 4b, conforme descrito na Tabela 1.

2.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do OE foi avaliada por adaptações da técnica de disco difusão estabelecida por CLSI (2012a). As bactérias foram cultivadas em ágar TSA (Oxoid[®]), ativadas em caldo BHI por 12 horas, e a concentração bacteriana ajustada pela escala 0,5 do padrão de McFarland ($1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹) em água peptonada (0,1%), inoculou-se homogeneamente as bactérias com um *swab* estéril (Absorve[®]) na superfície de placas de petri (Cralplast[®], 90x15mm) com 10 mL de ágar Mueller-Hinton (Oxoid[®]) com pH 7±0,2. Na sequência foi adicionado um disco de papel filtro (Laborclin[®]) com 6 mm de diâmetro no centro de cada placa, sobre os quais adicionou-se 10µL do OE. As placas foram incubadas em BOD a 37°C, após 24 h foi verificado a existência de halos de inibição ao redor dos discos, sendo os mesmos aferidos com paquímetro digital *king.tools*[®]. Realizou-se duas repetições do teste com triplicatas para cada micro-organismo testado.

2.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da menor concentração do OE capaz de promover a inibição do desenvolvimento dos micro-organismos testados foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo descrita por CLSI (2012b), com algumas adaptações.

A diluição do OE foi realizada em caldo de cultivo (TSA-YE, com pH ajustado entre 7,2 e 7,4) adicionado de 3% de *tween* 80. Partindo inicialmente da concentração 261,87 mg.mL⁻¹ do OE de pimenta brasileira, foram realizadas diluições seriadas de razão 2 até as concentração mínima de 2,05 mg.mL⁻¹, em placas de microdiluição com 96 poços.

Os inóculos bacterianos foram preparados diluindo alçadas de colônias com crescimento de 24h em água peptonada a 0,1%, até a concentração de $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹, em comparação com o padrão 0,5 da escala de *McFarland* e conferido em espectrofotômetro (Jenway[®] 6705) a 625 nm até absorvância intermediária entre 0,08 e 0,10. Após estes inóculos iniciais foram diluídos 1:10 em AP 0,1% obtendo a concentração de $1,5 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹, da qual adicionou-se 10µL (10% do volume de meio no poço) a cada uma dos respectivos poços obtendo assim uma concentração final na ordem de aproximadamente 10^4 UFC/poço.

As placas foram incubadas a 37°C em BOD por 24h, e a leitura foi realizada em leitor de placas (Robonik[®] Readwel plate) a um comprimento de onda de 625 nm, admitindo-se como a CIM a menor diluição apresentando absorvância estável na triplicata.

2.6. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Determinou-se a menor concentração de OE capaz de promover a morte das células microbianas testadas, através da inoculação em ágar Muller-Hinton de alíquotas de 10 µL dos poços que não apresentaram crescimento no teste da CIM, as placas foram incubadas a 36°C assumindo como resultado para o teste a menor concentração que não apresentou crescimento em 24h.

2.7. Elaboração dos hambúrgueres

A elaboração dos hambúrgueres procedeu-se conforme a legislação brasileira e respectivo regulamento técnico de identidade e qualidade deste produto (BRASIL, 2000; 2006).

A formulação, bem como os tratamentos aplicados, se procedeu de acordo com a tabela 2, com produção de 33 unidades de hambúrgueres para cada tratamento, totalizando 99 peças (considerando-se a análise dos mesmos em triplicatas). Cada peça de hambúrguer foi embalada individualmente e armazenada à -18°C. A primeira análise do produto foi realizada no tempo 0 (no dia de elaboração do produto) e depois a cada três dias, durante o período de trinta dias.

2.8. Contagem de *L. monocytogenes*

A quantificação de *L. monocytogenes* presente nas amostras de hambúrguer foi realizada em similaridade com a metodologia descrita por HEGDE et al (2007), onde amostras de 25g ± 0,1g do hambúrguer foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonata (0,1 %), procedendo na sequência com as diluições seriadas de ordem 2, das quais seguiu-se com a semeadura em superfície (0,1 mL) em placas com ágar Cromogênico. A incubação foi feita em BOD a 37°C por um período de 48h, e a contagem realizada visualmente considerando apenas as colônias típicas para o referido meio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antimicrobiana

O teste de atividade antimicrobiana demonstrou a capacidade de inibição promovida pelo OEPB frente a diferentes cepas de *L. monocytogenes*, tendo apresentado halos representativos, como se verifica na tabela 2, quando comparados aos encontrados na literatura.

INDU (2006) não verificou halo de inibição frente a *L. monocytogenes* quando testou extratos de alho e gengibre, mas observou 22 mm para o extrato de noz-moscada.

O maior halo de inibição foi verificado na cepa isolada de alimentos ($49,14 \pm 0,78$) inferindo um potencial antilisterial relevante na situação testada mais similar a real.

3.2. Concentração Inibitória Mínima

A menor concentração de OE necessária para promover a inibição do desenvolvimento de *L. monocytogenes* nas condições testadas está apresentada na tabela 2, sendo de $3,48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ para a cepa isolada de alimento e $6,95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ para de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 19114.

HSOUNA (2011) verificou uma CIM de $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de OE de *Ceratonina siliqua* frente a um isolado de *L. monocytogenes* proveniente de alimentos, já TEIXEIRA (2012) verificou uma CIM de $2,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de OE de *Mentha pulegium* (Poejo europeu) frente a uma cepa padrão de *L. monocytogenes* CECT 5873.

3.3. Concentração Bactericida Mínima

A menor concentração do OE necessária para promover a morte celular das cepas de *L. monocytogenes* testadas, nas condições aplicadas, foi de $3,48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ para o isolado e $13,09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ para as cepas padrões de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 19114.

A capacidade apresentada pelos óleos essenciais de romper a barreira de permeabilidade presentes nas estruturas da membrana celular promovendo a perda do equilíbrio quimiosmótico são as razões mais prováveis para a sua ação letal, segundo COX et. al (2011).

Visando garantir a destruição do patógeno este resultado serviu de base para fundamentar a concentração escolhida para se aplicar no hambúrguer.

3.4. Contagem de *L. monocytogenes*

A cinética populacional apresentada pela *L. monocytogenes* nos tratamentos avaliados, encontra-se graficamente representada na Figura 1, onde se verifica que o OEPB promoveu uma redução significativa ($p \leq 0,05$) na população do patógeno já no terceiro dia de armazenamento, mantendo esta significância até o 15º dia quando ambos os tratamentos, C2 e T1, não apresentaram diferença significativa aproximando-se do limite de detecção, atingido no 21º dia.

4. CONCLUSÃO

O ensaio *in vitro* da atividade antimicrobiana do OEPB, demonstrou a capacidade do OE em atuar como agente antimicrobiano frente a *L. monocytogenes*, indicando um potencial

de aplicação tecnológica destes óleos como bioconservantes em alimentos. Quando aplicado no sistema cárneo, hambúrguer, o OE comprovou a sua ação sobre o patógeno promovendo uma redução significativamente mais rápida na população de *L. monocytogenes* em relação ao controle.

5. BIBLIOGRAFÍA

Brasil/ Ministério Da Agricultura E Do Abastecimento/Secretaria De Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 20, de 31 de julho de 2000: Anexo IV - Regulamento técnico de identidade e qualidade de hambúrguer. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: julho de 2013.

_____. Instrução normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006 - Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: julho de 2013.

Cdc - Center For Diseases Control And Prevention. Preliminary Foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through-food – 10 States, United States, 2005. Disponível em <<http://www.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm>>. Acesso em setembro de 2013.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012a.

CLSI b. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012b.

Cornu, M.; Beaufort, A.; Rudelle, S.; Laloux, L.; Bergis, H.; Miconnet, N.; Serot, T.; Delignette-Muller, M.L. Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. *Int. J. Food Microbiol.* v.106, p. 159–168, 2006.

Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllie, S.G. Determination the antimicrobial action of tea tree oil. *Molecules* v.6, p. 87–91. 2001.

Dourado, M. T., Óleos essenciais e oleorresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas. Tese de Doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos), Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2012.

Hegde, V.; Leon-Velarde, C.; Stam, C.; Jaykus, L.; Odumeru, J.. Evaluation of Bbl Chromagar *Listeria* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, v.68, p. 82-87, 2007.

Hsouna, A. B.; Trigui, M.; Mansour, R. B.; Jarraya, R. M.; Damak, M.; Jaoua, S. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial Activity of *Ceratonia siliqua* essential oil

with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. v.148, p. 66–72, 2011.

Indu, M. N.; Hatha, A. A. M.; Abirosh, C.; Harsha, U.; Vivekanandan, G. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes Of *escherichia coli*, *salmonella*, *listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*. V. 37, P.153-158, 2006.

Kavoosi, G.; Rowshan, V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Food Chemistry*, v.138, p.2180-2187, 2013.

Ponce, A.; Roura, S. I.; Moreira, M. R. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. *Jornal of Food Science*, v.76, p. 34-40, 2011.

Rossi, D.; Guerrini, A.; Guglielmo, P.; Bernacchia, G.; Conforti, F.; Statti, G.; Maietti, S.; Poppi, I.; Tacchini, M.; Sacchetti, G. *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. *Food Chemistry*, v.139, p. 439-447, 2013.

Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Batista, I.; Serrano, C.; Matos, O.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Saraiva, J. A.; Nunes, M. L. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, V.36, P. 81–87, 2012.

Tabela 1. Relação de bactérias utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana.

Bactéria	Cepa	Sorotipo
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	1/2a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114	4a
<i>Listeria monocytogenes</i>	Isolado 117	4b

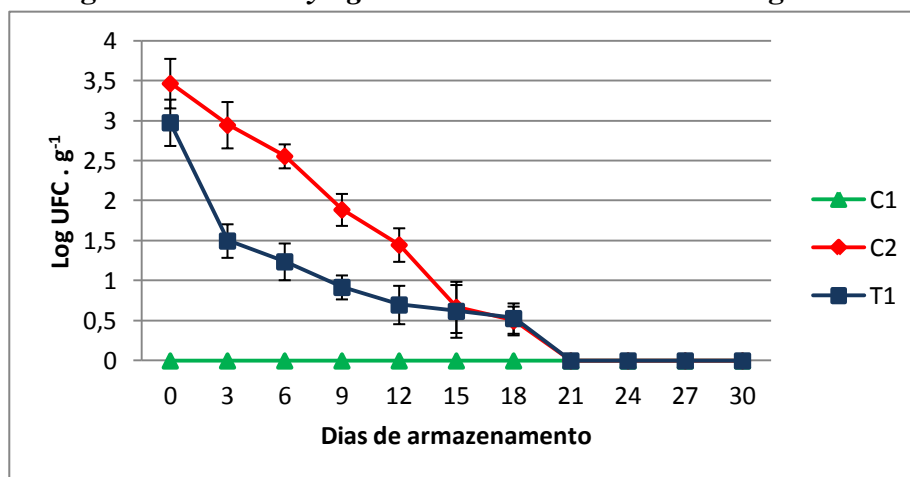
Tabela 2. Relação percentual (m/m) dos ingredientes utilizados nas formulações dos hambúrgueres.

Matéria-prima e Ingredientes	g / 100g de carne bovina		
	C1	C2	T1
<i>Carne bovina</i>	100	100	100
Sal (NaCl)	1,5	1,5	1,5
Leite em pó	0,4	0,4	0,4
Óleo Essencial	-	-	0,013
Inoculo de <i>L. monocytogenes</i> *	-	2,5	2,5

Tabela 3. Atividade antimicrobiana, CIM e CBM, pra cada uma das bactérias testadas.

Bactéria	Cepa	Sorotipo	Halo de inibição (mm)	CIM (mg . g ⁻¹)	CBM (mg . g ⁻¹)
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	1/2a	40,86 ± 0,31	6,95	13,09
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19114	4a	38,97 ± 0,17	6,95	13,09
<i>L. monocytogenes</i>	Isolado 117	4b	49,14 ± 0,78	3,48	3,48

Figura 1. Contagem de *L. monocytogenes* nas amostras de hambúrgueres.



VIABILIDAD DE UNA NOVEDOSA MEZCLA DE GASES PARA LA CONSERVACIÓN DE ATUN FRESCO

Pardilla S.*^{1,2}, Vega L.F.^{1,3}, Mor-Mur M.², Guri S.*^{1,3}

¹ MatGas Research Center, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra (Barcelona). spardilla@matgas.org

² Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona).

³ Carbuos Metálicos – Air Products Group. C/ Aragón, 300, 08009, Barcelona. guribas@carbuos.com

RESUMEN:

Los beneficios para la salud del pescado azul así como el cambio en los hábitos alimentarios hacia un mayor consumo de productos seguros, prácticos, sanos e hipocalóricos, han dado lugar a la aparición de nuevas técnicas de conservación de los alimentos, como es el uso de atmósferas modificadas en el envasado del pescado azul. Sin embargo, la mezcla de gases utilizada en el envasado en atmósfera modificada de este tipo de productos no contiene oxígeno, por lo que la vida útil organoléptica del alimento se ve limitada; en concreto el parámetro más afectado es la conservación del color rojo típico del atún fresco. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de una atmósfera modificada incluyendo oxígeno y argón, en comparación con su mezcla análoga balanceada con nitrógeno, sobre el mantenimiento de las propiedades organolépticas y microbiológicas de filetes de atún fresco almacenados en refrigeración (4 °C) durante 8 días. El envasado de las muestras se realizó con una termoselladora de barquetas utilizando bandejas y film de material barrera a los gases. Se emplearon dos mezclas de gases: 20%O₂:30%CO₂:50%Ar (50Ar_MAP) y 20%O₂:30%CO₂:50%N₂ (50N_MAP). Los parámetros físico-químicos analizados fueron: composición de los gases, pH, pérdida de peso y cambios de color en la superficie del producto. Los resultados indicaron una evolución constante del color rojo (a*) en la superficie de los filetes de atún fresco en las muestras envasadas con la mezcla que contenía argón. Estos resultados se correspondieron con los obtenidos para el parámetro Hue en las mismas muestras, donde se observaron valores comprendidos dentro del rango de las tonalidades rojas. En conclusión, los resultados obtenidos podrían sugerir una evaluación organoléptica más favorable en las muestras de atún envasadas con argón que en las envasadas con nitrógeno.

Palabras clave: envasado en atmósfera modificada, argón, atún fresco

1.INTRODUCCIÓN

El cambio en los hábitos alimentarios hacia un mayor consumo de alimentos sanos, saludables e hipocalóricos, ha reintroducido el pescado azul como alimento básico de una dieta equilibrada. Su perfil lipídico, así como su perfil proteico, hacen de él un alimento beneficioso para la salud. Sin embargo, es un alimento altamente perecedero, por lo que es indispensable desarrollar nuevas tecnologías que alarguen la vida útil del producto y que a la vez cumplan las expectativas del consumidor. Un ejemplo de ello es la aplicación de la tecnología de envasado en atmósfera modificada (MAP, por sus siglas en inglés) a este tipo de productos.

En nuestra cultura alimentaria, la venta de pescado fresco se asocia a establecimientos propios de este tipo de productos, más que a su venta en los estantes del supermercado. Es por ello que actualmente existe poco pescado fresco envasado en atmósfera modificada (AM); y de los productos que pueden encontrarse, la mezcla de gas más utilizada para el pescado azul contiene únicamente dióxido de carbono (40%) y nitrógeno (60%), a fin de ralentizar la oxidación lipídica propia de este alimento. En el departamento de Carburos Metálicos- Grupo Air Products, ubicado en las instalaciones de MATGAS (Campus de la Universidad Autónoma de Barcelona), se realizaron diversos ensayos, el resultado de los cuales fue que una mezcla de gases con un 20% de oxígeno resultaba viable para la conservación del pescado azul, ya que no se observaron efectos adversos en cuanto a la oxidación del producto y sin embargo, sí se mejoraban las características microbiológicas y sensoriales del mismo.

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la eficacia de una atmósfera modificada incluyendo oxígeno y argón, en comparación con su mezcla análoga balanceada con nitrógeno, sobre el mantenimiento de las propiedades organolépticas y microbiológicas de filetes de atún fresco almacenados a temperatura de refrigeración (4 °C) durante 8 días.

2.MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materia prima y preparación de las muestras

Los filetes de atún fresco fueron adquiridos en un mayorista local y trasladados, bajo condiciones de refrigeración (4 °C), al laboratorio de conservación de alimentos de Carburos Metálicos- Grupo Air-Products. Posteriormente, se realizó el envasado de las muestras utilizando una termoselladora de barquetas (BELCA, mod. Victoria), film barrera a los gases (THB lintop, LINPAC; con una ratio de transferencia al oxígeno $< 5\text{cm}^3/\text{m}^2 * 24\text{h} * \text{bar}$; a 23

°C) y barquetas (LINPAC) también de material barrera a los gases. Se realizaron dos tratamientos de atmósfera modificada: 20:30:50 / O₂:CO₂:N₂ (50N_MAP) y 20:30:50 / O₂:CO₂:Ar (50Ar_MAP). Las mezclas de gases alimentarios (S.E. Carburos Metálicos-Grupo Air Products, España), se prepararon con un mezclador de gases (Witt-Gasetechnik GmbH & Co KG, Alemania) y se almacenaron en un depósito intermedio conectado a la máquina envasadora. Las muestras, una vez envasadas, se mantuvieron en condiciones de refrigeración (4±1 °C) durante los 8 días de duración del ensayo. Se analizaron tres repeticiones por tratamiento y día de muestreo.

2.2. Análisis de los gases en el espacio de cabeza del envase

La composición de los gases en el espacio de cabeza del envase fue analizada mediante un analizador de O₂ y CO₂ (Witt-Gasetechnik GmbH & Co KG, Alemania; mod. MAPY4.0). Se cuantificaron las concentraciones de los gases a partir de una muestra de 5mL de volumen recogida a través de una jeringa conectada al analizador de gases. Los resultados se expresan en porcentaje.

2.3. Determinación del color

Se evaluó el color en la superficie del alimento mediante el colorímetro Minolta CR-400 (Iluminante C/ 0° observador estándar y 8 mm de área de visión). Antes de cada análisis, se calibró el instrumento con una placa blanca (L*=86,5; a*= 0,3171; b*= 0,3238). Se determinaron las coordenadas tricromáticas CIE-Lab (L*, a* y b*) y se calculó el ángulo Hue ($\tan^{-1} (b^*/a^*)$). Se realizaron 10 mediciones al azar por repetición, tratamiento y día de muestreo.

2.4. Pérdida de peso final

Se pesó cada repetición antes del envasado y tras cada período de almacenamiento mediante una balanza de precisión (Gram Precisión, mod. MS). La pérdida de peso se expresa como porcentaje de peso perdido respecto al peso inicial.

2.5. pH

Para cada repetición y día de muestreo se realizaron 3 medidas de pH (Crison España, modelo 20+ Basic) en diferentes zonas del filete de atún mediante un electrodo de penetración (Crison España, modelo 5231).

2.6. Análisis microbiológico

En base a las normas microbiológicas establecidas para los productos de la pesca frescos refrigerados (O. 2/08/1991) junto con el carácter preliminar del estudio, se decidió realizar

únicamente el seguimiento microbiológico de aerobios mesófilos en los días 0, 3, 6 y 8 de conservación.

2.7. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SAS[®] en JMP (SAS[®] Institute Inc., North Carolina, USA). Para determinar diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre los factores principales (tiempo de almacenamiento y tratamiento) o la interacción entre ellos, se realizó un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA GLM multivariante). Cuando se detectaron diferencias significativas se realizó el procedimiento Least Square Means (LSM) mediante el test de Tukey HSD.

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de los gases en el espacio de cabeza del envase

La evolución de los gases en el espacio de cabeza del envase presentó un efecto significativo para la interacción entre los factores principales, tiempo y tratamiento.

En ambos tratamientos se observó un descenso inicial del CO₂ (Fig. 1b), atribuible a la disolución de este gas en la fracción lipídica y acuosa del alimento (Parry, 1995). A partir del día 3 de almacenamiento, se observaron niveles de CO₂ más bajos en las muestras envasadas con el tratamiento 50Ar_MAP, que podrían atribuirse a la mayor solubilidad del argón en comparación con el nitrógeno, hecho que favorecería la adsorción del CO₂ en el interior de los tejidos del alimento (Ruiz-Capillas, 2010). Respecto al oxígeno (Fig. 1a), independientemente del tratamiento, se observaron niveles constantes entre los días 3 y 8 de almacenamiento.

3.2.Determinación del color

La apariencia (color), la textura y el sabor son las tres propiedades sensoriales por las cuales los consumidores juzgan la calidad de un alimento como el atún fresco. Y de entre estas tres propiedades, la apariencia es la que más fuertemente influye en la decisión de compra del producto (Faustman & Cassens, 1990). La baja luminosidad inicial de los filetes de atún ($L^* \pm 50$) se correspondió con el alto valor inicial del pH (6,8), ya que a pH altos la red proteica del músculo absorbe mayor cantidad de haces de luz, disminuyendo así la cantidad de luz reflejada por la superficie del alimento, el cual se percibe de color oscuro (López *et al.*, 2001; Aracena, 2007). Independientemente de los gases de envasado, los resultados mostraron un descenso inicial en los valores de luminosidad (Fig. 2a),

manteniéndose constante entre los días 3 y 8 de conservación. Respecto al tratamiento, las muestras envasadas con 50Ar_MAP mostraron valores de L^* estadísticamente más altos que las muestras del tratamiento 50N_MAP; resultado que se relacionaría con la pérdida de peso final observada en cada tratamiento, ya que a menor pérdida de peso mayor luminosidad del producto (Véase apartado 3.3). Respecto al parámetro índice de rojo (a^*), el valor inicial positivo indicó un color rojizo en los filetes de atún fresco. Este parámetro se mantuvo constante durante los 6 primeros días de conservación, independientemente de la mezcla de gases empleada para el envasado de los filetes de atún. Sin embargo, se observó una tendencia a la estabilidad en la AM balanceada con argón; mientras que en la balanceada con nitrógeno la tendencia fue a un descenso en el parámetro a^* , indicando tonalidades más verdosas (Fig. 2b). Estos resultados se correlacionarían con el aumento ($P < 0,05$) en los valores Hue, en ambos tratamientos (no se muestran los datos), hasta alcanzar valores finales dentro de la escala de rojos para el tratamiento 50Ar_MAP ($h^* = 58$) y pertenecientes a la escala de los verdes en el tratamiento 50N_MAP ($h^* = 69$).

3.3. Pérdida de peso final

La pérdida de peso final de los filetes de atún no presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto al tratamiento. Sin embargo, en base a los valores obtenidos (no se muestran los datos) y, dado que el contenido en oxígeno fue el mismo en ambos tratamientos, se observó una tendencia a perder más peso en las muestras envasadas con nitrógeno (4,85%) que en las muestras envasadas con argón (3,85%).

3.4.pH

La evolución del pH de las muestras de atún fresco en MAP (Fig.3) se vio influenciada por la interacción entre los factores tiempo y tratamiento ($P < 0,05$). En ambos tratamientos, el pH mostró un descenso inicial (día 1), coincidiendo con la disminución de CO_2 en el mismo intervalo de tiempo (Fig. 1b) y atribuible a la acidificación del medio al disolverse el CO_2 en los tejidos del alimento y formar ácido carbónico (Parry, 1995). A partir de ese momento, los resultados mostraron valores de pH constantes entre los días 1 y 8 ($P > 0,05$), y al final del período de conservación los valores de pH aumentaron en ambos tratamientos, siendo dicho incremento estadísticamente mayor ($P < 0,05$) en las muestras envasadas en 50N_MAP. El aumento final del pH se podría relacionar con el crecimiento microbiano observado en el mismo día (Fig.4) y podría indicar el inicio del deterioro del producto. Estos resultados coincidirían con los obtenidos por Jiménez-López (2012) también en filetes de atún fresco.

3.5. Análisis microbiológico

Uno de los indicadores microbiológicos de calidad más utilizados para evaluar los alimentos son los aerobios mesófilos, ya que representan parte de la flora total y reflejan la condición higiénica de la materia prima, de las condiciones de manipulación y finalmente, de la calidad sanitaria del alimento. El tiempo de almacenamiento resultó ser el único factor con significación estadística sobre la evolución de aerobios mesófilos en el atún fresco en MAP (Fig. 4), mostrando recuentos constantes y próximos a los niveles de inicio, hasta el día 6 de almacenamiento, a partir del cual, independientemente de la mezcla de gases aplicada, se observó un aumento significativo en el recuento de aerobios; aunque en ningún caso superó el límite máximo legal permitido en este tipo de productos (B.O.E nº 195 del 15/8/1991).

Cabe destacar, sin embargo, que se observa una tendencia a un mayor aumento del recuento de aerobios mesófilos al final del período de conservación en las muestras envasadas con nitrógeno (Fig. 4) y, dado que el contenido en oxígeno de ambos tratamientos era el mismo, se podría sugerir un posible efecto inhibitor del argón frente al crecimiento de este tipo de microorganismos, tal y como sucede en la carne de pavo (Fraqueza & Barreto, 2008).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicarían una tendencia a la estabilidad en cuanto al color rojo típico del atún fresco en aquellas muestras envasadas con la atmósfera enriquecida con argón, así como un posible efecto inhibitor de este gas noble frente a los aerobios mesófilos.

REFERENCIAS

Aracena, 2007. Tesis doctoral: Evaluación del cambio de color en carnes de canales bovinas mantenidas en cámara frigorífica con exposición a ozono gaseoso. Universidad de Concepción. Facultad de ciencias Veterinarias. Chillan, Chile. Disponible en: http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2007/aracena_e/doc/aracena_e.pdf (descargado el 15 de junio de 2011).

BOE número 195. Orden de 15 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura. Fecha de publicación 15/08/1991.

Faustman, C. & Cassens, R.G. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, 1:217-243.

Fraqueza, M.J. & Barreto, A.S. 2009. The effect on turkey meat shelf life of modified-atmosphere packaging with an argon mixture. *Poultry Science Association Inc.*, 88:1991-1998.

Jiménez López, JF. 2012. Trabajo de Máster: Optimización del Envasado con Atmósferas Modificadas Innovadoras en Pescado Fresco. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Disponible en:

López, B.J., Carmona, C.JM., Soares, M. 2001: La calidad de la carne. En: *Enciclopedia de la carne y productos cárnicos*. Editor: S. Martín Bejarano. Volumen 1. Ediciones Martin & Macias, Cáceres. pp: 539-569.

Parry, R.T. 1995. Introducción al envasado de los alimentos en atmósfera modificada. En: *Envasado de los alimentos en atmósfera modificada*. Editor: Parry, R.T. A. Madrid Vicente, Ediciones. Madrid. pp. 13-32.

Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2010. Effect of an argon-containing packaging atmosphere on the quality of fresh pork sausages during refrigerated storage. *Food control*, 21: 1331-1337.

FIGURAS:

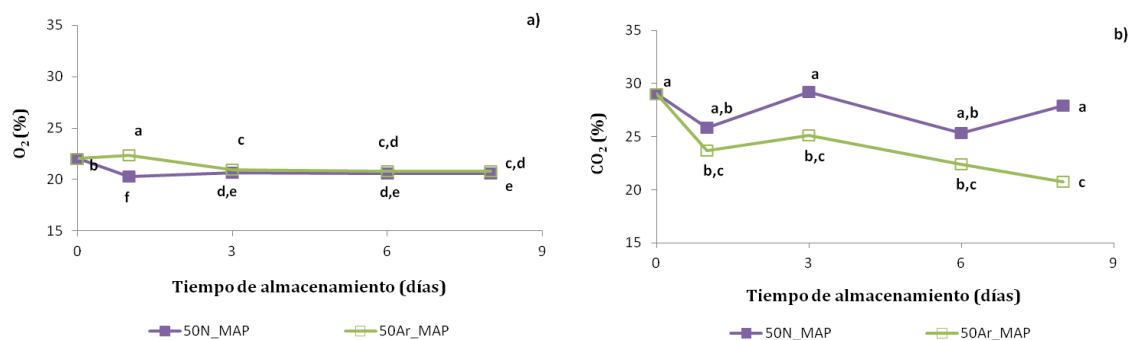


Figura 1: Evolución de la concentración (%) de a) oxígeno y b) dióxido de carbono en filetes de atún fresco envasados en 50Ar_MAP y 50N_MAP durante 8 días a 4 °C. Los valores representados son la media de 3 repeticiones. Los niveles no unidos por la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05; Test Tukey HSD).

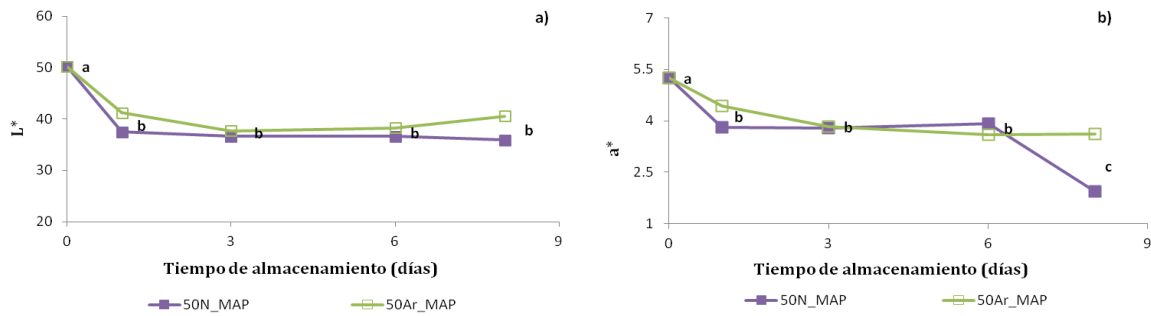


Figura 2: Evolución del color en filetes de atún fresco envasados en 50Ar_MAP y 50N_MAP durante 8 días a 4 °C, a) Luminosidad (L *) y b) color rojo (a*). Los valores representados son la media de 3 repeticiones. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05; Tukey HSD test).

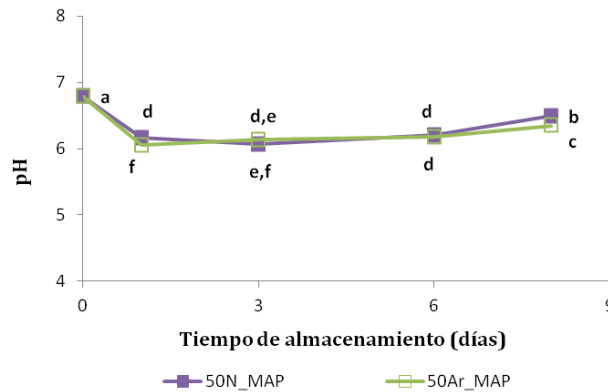


Figura 3: Evolución del pH en filetes de atún fresco envasados en 50Ar_MAP y 50N_MAP durante 8 días a 4 °C. Los valores representados son la media de 3 repeticiones. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05; Test Tukey HSD).

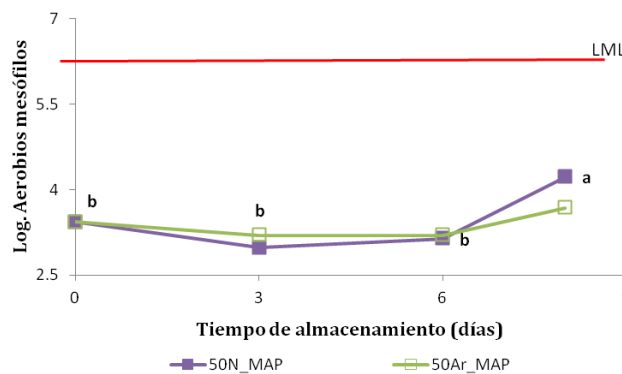


Figura 4: Evolución de aerobios mesófilos (log) en filetes de atún fresco envasados en 50Ar_MAP y 50N_MAP durante 8 días a 4 °C. Los valores representados son la media de 3 repeticiones. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05; Test Tukey HSD).

LOMBARDA (*Brassica oleracea*) COMO FUENTE DE PEROXIDASA TERMOESTABLE

Pellicer, J.A.^a, **Fortea, M.I.**^b, **Serrano-Martínez, A.**^a, **Lucas-Abellán, C.**^a, **Núñez-Delicado, E.**^a

^aDepartamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Campus de los Jerónimos s/n, 30107, Guadalupe, Murcia, España.

^bDepartamento de Enfermería. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Campus de los Jerónimos s/n, 30107, Guadalupe, Murcia, España.

INTRODUCCIÓN

La lombarda roja (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) es una verdura que tiene su origen en la región Mediterránea y en el suroeste de Europa, aunque actualmente se cultiva a lo largo de todo el mundo. La lombarda pertenece a la familia de las Brassicáceas, cuya producción anual se sitúa en torno a 70 millones de toneladas (Björkman y col. 2011).

El alto consumo de verduras del género *Brassica* como por ejemplo, brócoli, lombarda, coles de Bruselas y coliflor se relaciona con una reducción de diferentes tipos de cáncer (Kristal y Lampe, 2002; Wang y col. 2004). El efecto anticarcinogénico de estas verduras se atribuye a los productos de descomposición de los glucosinolatos, índoles, isotiocianatos y compuestos fenólicos (Zukalova y Vasak, 2002). Estos compuestos fenólicos son susceptibles de ser oxidados, proceso en el que se encuentra implicada la enzima peroxidasa (POD).

POD es una enzima que pertenece al grupo de las oxidorreductasas, catalizando la reducción de peróxidos, como peróxido de hidrógeno, acoplado a la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (Fortea y col. 2011).

El pardeamiento causado en frutas y verduras durante su manejo y procesado post-cosecha es una de las principales causas en la pérdida de calidad de estos alimentos. POD es responsable de una gran variedad de alteraciones de calidad en frutas y verduras, por ello se asocia a pérdidas en color, flavor y valor nutricional (Serrano-Martínez y col. 2008).

POD es una de las enzimas más termorresistentes en verduras, por esta razón, se usa como indicador del tratamiento térmico en el procesado de alimentos. De esta manera, el objetivo del trabajo consistió en la extracción de la enzima en su forma ligada y soluble para estudiar la estabilidad térmica de ambas, con el objetivo de obtener una nueva fuente de POD termoestable y barata que sea alternativa a la POD de rábano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: La lombarda se compró en un supermercado en Murcia. Sólo las hojas se usaron para la obtención de POD. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Reactivos: Todos los reactivos empleados se compraron a Sigma (Madrid, España).

Extracción de POD: La extracción de POD de lombarda se realizó siguiendo el método descrito por Núñez-Delicado y col. 2005. El sobrenadante obtenido de la homogeneización se usó como fuente de enzima soluble. Para obtener la enzima ligada, al precipitado se le adicionó Triton X-114, lo que permite obtener extractos libres de fenoles y antocianos. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Actividad enzimática: La actividad POD de lombarda se determinó espectrofotométricamente (Shimadzu, modelo UV-1603) en el máximo de absorción del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinsulfónico) (ABTS) a 414 nm ($\epsilon_{414} = 31.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Temperatura óptima: La temperatura óptima se determinó midiendo la actividad enzimática entre 5 y 70 °C, cada 5 °C en el pH óptimo de la enzima. La temperatura se controló usando el controlador TCC, Shimadzu Corporation (modelo TCC-240A).

Estabilidad térmica: Las muestras de enzima se incubaron en un baño (Julabo Shake Temp SW 22) a diferentes temperaturas (50, 60, 70 y 80 °C para POD ligada y 30, 40, 50, 70 y 80 °C para POD soluble) y diferentes tiempos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La temperatura óptima de POD ligada fue 45 °C (Figura 1), resultado similar al obtenido en otras fuentes vegetales como melón “Charantais” (Chisari y col. 2008) o nabo (Rodríguez-Cabrera y col. 2011). La temperatura óptima de POD soluble fue 30 °C (Figura 1), resultado similar al obtenido en melón “Amarillo” (Chisari y col. 2008).

La actividad residual de POD ligada y soluble en función del tiempo de calentamiento, mostró un comportamiento lineal en todas las temperaturas estudiadas (Figura 2A y 2B). Este hecho pone de manifiesto que la inactivación ocurre a través de un mecanismo de primer orden. Cuando todas las líneas parten de un mismo punto, indica que sólo una isoenzima se está midiendo en cada caso. De las pendientes de estas rectas, la constante de la velocidad de inactivación (k) se calculó por regresión lineal mediante la ecuación descrita por Anthon y Barrett, 2002. Los valores de k obtenidos se utilizaron para la

representación de Arrhenius, en la que se observa un ajuste lineal para POD ligada y soluble (Figura 3).

La energía de activación (E_a) se calculó a partir de la pendiente de la representación de Arrhenius mediante la ecuación descrita por Anthon y Barrett, 2002. La linealidad obtenida en la representación de Arrhenius contrasta con la curvatura observada en POD en otras fuentes vegetales como patata y zanahoria (Anthon y Barrett, 2002) o uva (Fortea y col. 2009). Sin embargo, es similar a la obtenida en pimiento (Serrano-Martínez y col. 2008) y alga roja (Fortea y col. 2011). La explicación para esta linealidad en la representación de Arrhenius se encuentra en el hecho de que la inactivación en POD ligada y soluble ocurre a través de un único mecanismo dependiente de la temperatura.

En el caso de POD ligada, la E_a obtenida fue 143.1 kJ/mol, mientras que en el caso de POD soluble fue 38.5 kJ/mol. El rango de temperaturas de inactivación requerido para POD ligada fue 50-80 °C, que es un rango superior al observado en pimiento (Serrano-Martínez y col. 2008) y alga roja (Fortea y col. 2011). El rango de temperaturas requerido para la inactivación de POD soluble fue 30-80 °C, que es similar al obtenido en POD de melón (Chisari y col. 2008).

En algunas ocasiones, la inactivación es expresada mediante el valor D , que es el tiempo necesario para reducir la actividad enzimática al 10 % de su valor original. La temperatura necesaria para un valor D de 5 minutos en el caso de POD ligada fue 76.6 °C, resultado superior al observado en alga roja (48.4 °C) y pimiento (44.5 °C). La temperatura necesaria para obtener el valor D de 5 minutos en POD soluble fue 30.2 °C, resultado muy inferior al observado en POD ligada.

CONCLUSIONES

Los valores de E_a , D y el rango de temperaturas necesarias para la inactivación son muy superiores en POD ligada, comparados con los valores obtenidos en POD soluble. Estos resultados de estabilidad térmica indican que POD ligada es más termoestable que POD soluble. La termoestabilidad de POD es muy importante debido a que esta enzima puede ocasionar efectos negativos en el color y flavor de las verduras durante su almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Anthon, G. E.; Barrett, D. M. Kinetics parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4119–4125.

- Björkman, M.; Klingen, I.; Birch, A. N. E.; Bones, A. M.; Bruce, T. J. A.; Johansen, T. J.; Meadow, R.; Molmann, J.; Seljasen, R.; Smart, L. E.; Stewart, D. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health-Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* 2011, 72, 538–556.
- Chisari, M.; Barbagallo, R. N.; Spagna, G. Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 132–138.
- Fortea, M. I.; López-Miranda, S.; Serrano-Martínez, A.; Carreño, J.; Nuñez-Delicado, E. Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (crimson seedless). *Food Chem.* 2009, 113, 1008–1014.
- Fortea, M. I.; López-Miranda, S.; Serrano-Martínez, A.; Hernández-Sánchez, P.; Zafrilla, M. P.; Martínez-Cacha, A.; Nuñez-Delicado, E. Kinetic characterization and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. *Food Chem.* 2011, 127, 1091–1096.
- Kristal, A. R.; Lampe, J. W. Brassica vegetables and prostate cancer risk: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 2002, 42, 1–9.
- Nuñez-Delicado, E.; Sánchez-Ferrer, A.; García-Carmona, F.; López-Nicolás, J. M. Effect of organic farming practices on the level of latent polyphenoloxidase in grapes. *J. Food Sci.* 2005, 70, 74–78.
- Rodríguez-Cabrera, N. A.; Regalado, C.; García-Almendárez, B. E. Cloning, heterologous expression and properties of a recombinant active turnip peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 7120–7126.
- Serrano-Martínez, A.; Fortea, M. I.; del Amor, F. M.; Nuñez-Delicado, E. Kinetic characterization and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chem.* 2008, 107, 193–199.
- Wang, L. I.; Giovannucci, E. L.; Hunter, D.; Neuberg, D.; Su, L.; Christiani, D. C. Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer, Causes Control, Pap. Symp.* 2004, 15, 977–985.
- Zukalova, H.; Vasak, J. The role and effect of glucosinolates of 500 Brassica species: A review. *Rostl. Vyroba* 2002, 48, 175–180.

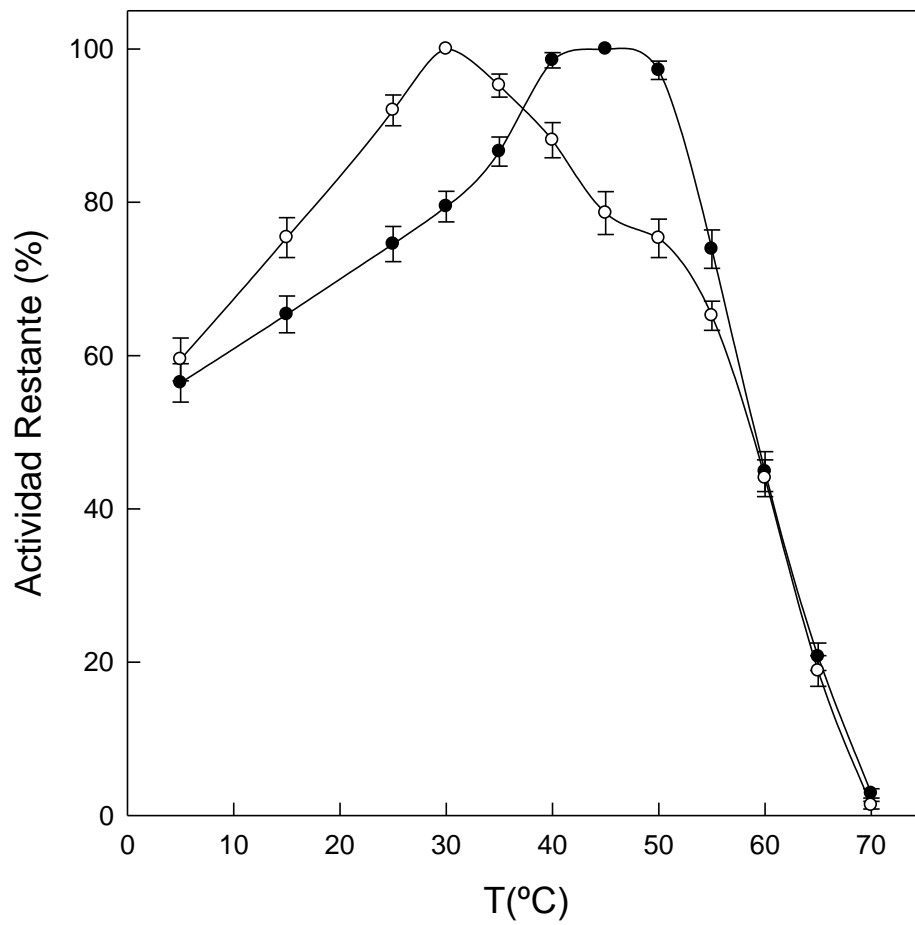


Figura 1: Temperatura óptima para POD ligada (●) y soluble (○).

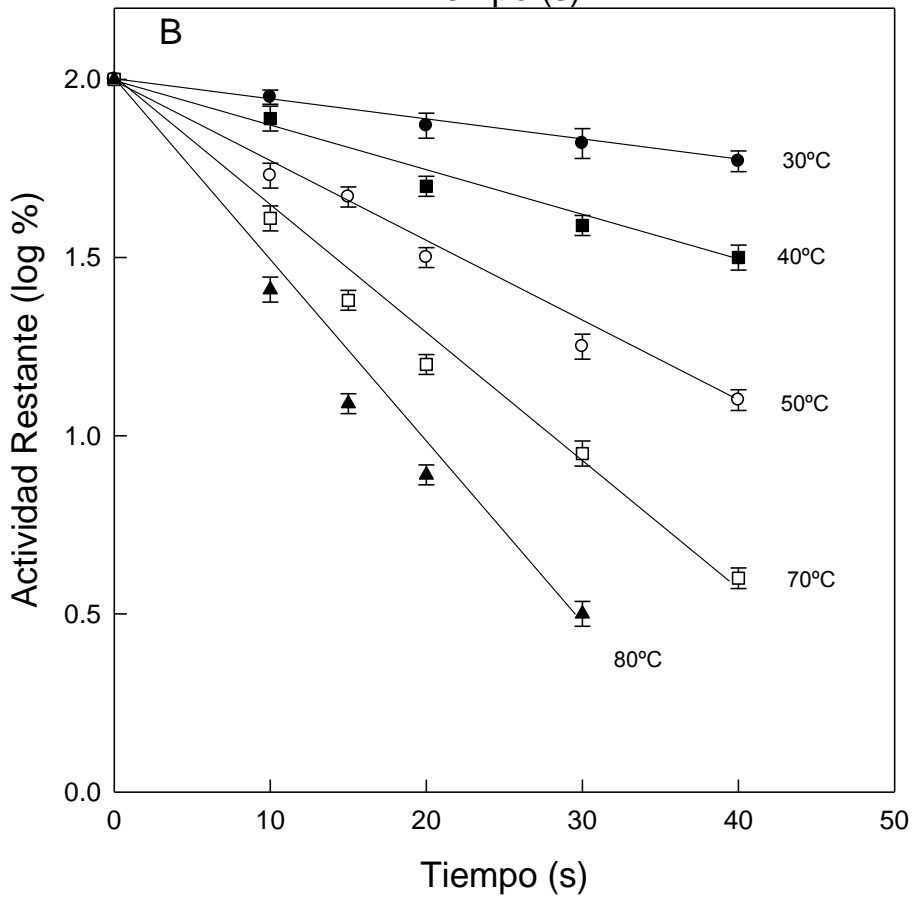
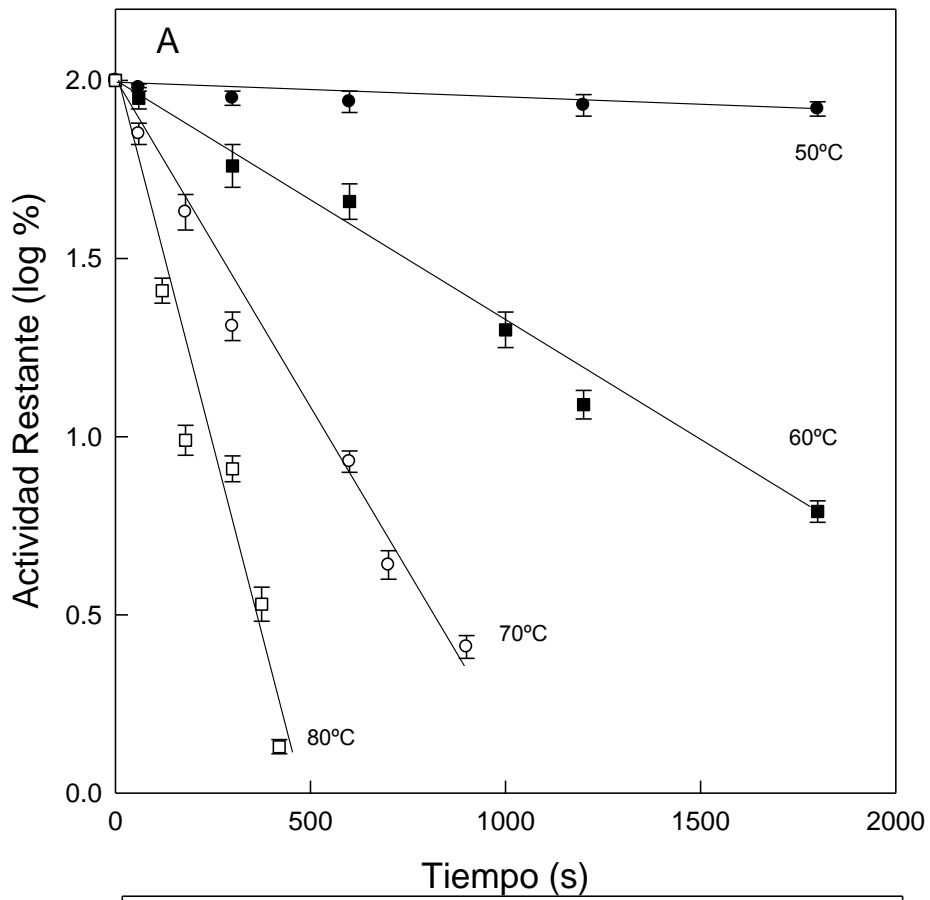


Figura 2A: Inactivación térmica en POD ligada. Actividad de POD frente al tiempo de calentamiento a 50 °C (●), 60 °C (■), 70 °C (○) y 80 °C (□). 2B: Inactivación térmica en POD soluble. Actividad de POD frente al tiempo de calentamiento a 30 °C (●),40 °C (■),50 °C (○),70 °C (□) y 80 °C (▲).

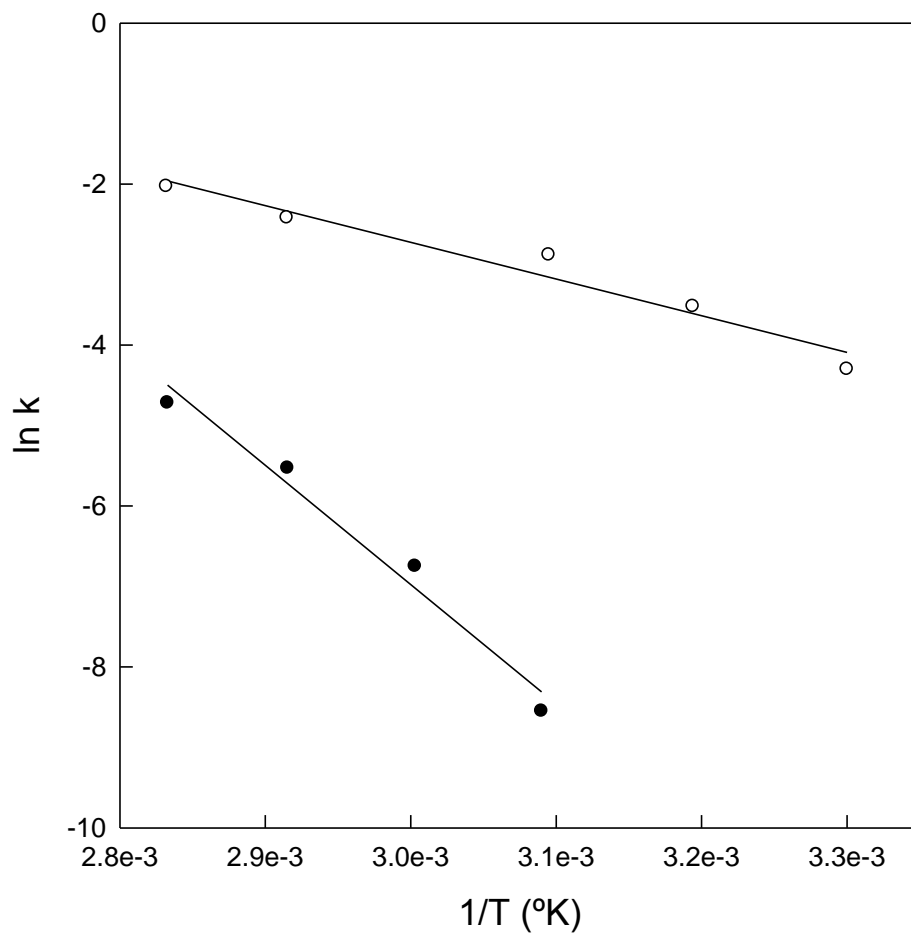


Figura 3: Representación de Arrhenius para POD ligada (●) y soluble (○).

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE GLICEROL Y SORBITOL EN LA CAPACIDAD DE SORCIÓN, EN LAS PROPIEDADES TERMOFÍSICAS DE PELÍCULAS A BASE DE GELATINA DE BOVINO Y SALMÓN EN ESTADO VÍTREO

Vásquez, C.^a; Díaz-Calderón, P.^b; Matiacevich, S.^a; Enrione, J.^b

^a Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile, Obispo Umaña 050, Estación Central, 9170201 Santiago, Chile.

^b Departamento de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, San Carlos de Apoquindo 2200, Las Condes, 7620001 Santiago, Chile.

INTRODUCCIÓN.

La gelatina es un biopolímero ampliamente utilizado en la industria de alimentos y en la industria farmacéutica para encapsular compuestos volátiles (sabores y aromas) y fármacos, proporcionándoles protección contra la oxidación y degradación durante su almacenamiento. Mundialmente, la mayor fuente de colágeno utilizada para obtener gelatina es de mamíferos (~74%) mientras que sólo el 2% es de pescado y aves de corral (Haug & Draget, 2009). El interés por la gelatina de origen marino ha crecido ya que se considera una alternativa a la gelatina de origen mamífero al no estar asociada a la encefalopatía esponjiforme bovina y a consideraciones culturales (Karim & Bhat, 2009). Una potencial fuente de colágeno de origen marino es el salmón atlántico (*Salmo salar*), del cual Chile es uno de los principales productores.

La gelatina puede utilizarse como un recubrimiento o película comestible (Langmaier et al., 2008; Cao, Yang & Fu, 2009). Uno de los fenómenos que puede afectar a las películas durante su almacenamiento es el de densificación, a través del cual la matriz se encoge o densifica provocando variaciones en sus propiedades termofísicas (Díaz et al., 2011; Roussanova et al., 2012).

Para lograr una película con mejores propiedades tecnológicas (mayor o menor elasticidad, barrera a gases o rigidez según se requiera), se utilizan aditivos como los plastificantes, los cuales generan movilidad entre las cadenas poliméricas aumentando el volumen libre (Orliac et al., 2003; Vanin et al., 2005), lo que puede afectar la conformación estructural de las películas de gelatina.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de glicerol y sorbitol sobre la densificación de películas de gelatina de bovino (PGB) y salmón (PGS) en estado vítreo, se evaluaron isotermas de sorción, temperatura de transición vítreo (T_g), volumen específico (V_{esp}) y densidad (ρ).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Extracción de gelatina de salmón (*Salmo salar*)

Se realizó una extracción ácida similar a la descrita por Zhou & Regenstein (2005). Piel de salmón (donadas gentilmente por Salmonoil S.A., Puerto Montt, Chile) fueron lavadas en agua fría, cortadas en pequeños trozos y colocadas en soluciones de NaOH 0,1M con agitación constante por 1 h (dos veces) a 10 °C, luego se colocaron en una solución de CH₃COOH 0,05M por 1 h a 10 °C. La extracción de la gelatina se realizó a 64 °C en agua por 3 horas manteniendo pH constante (3,8-4,0). Posteriormente, la suspensión se filtró y secó a 55 °C por 24 h (Zhou & Regenstein, 2005). Se obtuvo un ~23% ($\frac{\text{g}_{\text{gelatina seca}}}{100\text{g}_{\text{piel húmeda}}}$) de gelatina de salmón.

Formación de películas

Las películas se obtuvieron a partir de suspensiones al 7% p/v de gelatina de bovino (Bloom 220 g, Rousselot, Brasil) y salmón (Bloom ~17 g) en agua con 0%, 6% y 10% ($\frac{\text{g}_{\text{plastificante}}}{100\text{g}_{\text{gelatina}}}$) de glicerol (MERK) y sorbitol (BLUMOS) a pH 5,0. Las suspensiones fueron sometidas a *casting* a ~6 °C obteniéndose una película de ~0,3 mm de espesor. Algunas de las películas obtenidas fueron cortadas (~85x9 mm) y otras fueron molidas usando una minipimer (Black & Decker, USA) y luego tamizadas (100-315 µm) (Fritsch Analysette, Alemania).

Contenido de humedad y curvas de sorción

Las muestras molidas y secas (~0% humedad relativa de equilibrio, HRE) fueron colocadas a equilibrar en un sistema de sorción de vapor dinámico (DVS intrinsic, Surface Measurement Systems, USA), utilizando ~30 mg, con $\frac{dm}{dt} < 0,002$ y un rango de humedad entre 0-45% HRE (Enrione, Hill & Mitchell, 2007).

Se cuantificó el contenido de agua de las muestras equilibradas mediante secado en estufa a 105 °C por 24 h (A.O.A.C., 1990). Con estos datos (triplicado) se construyeron isotermas de sorción y se utilizó la ecuación de B.E.T. (Ec. 1) para ajustar los datos experimentales.

$$M = \frac{M_0 \times C \times a_w}{(1 - a_w) \times [1 + (C - 1) \times a_w]} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde; M es la humedad de la muestra (% , base seca); M_0 es la humedad correspondiente a la monocapa (% , base seca), C es la constante relacionada al calor de sorción en la monocapa y a_w es la actividad de agua.

Análisis térmico

Se realizó un análisis térmico de las muestras mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) (PERKIN ELMER, USA) a partir de dos calentamientos entre -40 y 120-180 °C (dependiendo del contenido de humedad de las muestras), siendo el primer calentamiento el utilizado para evaluar la temperatura de fusión (T_m) y el segundo calentamiento el utilizado para evaluar la temperatura de transición vítrea (T_g). Se utilizó la ecuación de Couchman-Karasz (Ec. 2) para el ajuste de los datos experimentales.

$$T_g = \frac{\sum_{i=1}^n W_i \times \Delta C p_i \times T g_i}{\sum_{i=1}^n W_i \times \Delta C p_i} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde; W_i es la fracción del peso del componente i , $T g_i$ la temperatura de transición vítrea del componente i en estado puro (K) y $\Delta C p_i$ el cambio en la capacidad calorífica del componente i para $T g_i$ en estado puro (J/g K).

Volumen específico (V_{esp}) y densidad (ρ)

Se determinó el volumen de esqueleto (V_{esq}) de las muestras molidas equilibradas mediante picnometría de gas (MICROMERITICS, USA), utilizando helio como gas *carrier*. Luego el V_{esq} de la muestra se dividió por la masa de la muestra y se obtuvo el volumen específico (V_{esp} , cm³/g). La densidad (ρ , g/cm³) se obtuvo como $1/V_{esp}$.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism v5* con un 95% de confianza y post-test de Bonferroni para evaluar las diferencias significativas ($p < 0,05$). El proceso de ajuste de las ecuaciones señaladas se consideró adecuado al generar un error relativo estándar (*ERE*) menor al 10% (Yan, Sousa-Gallagher & Oliveira, 2008). Cuando el coeficiente de variación (CV) de los datos fue menor al 10%, se consideró que había una baja dispersión de los datos y no se mostraron las desviaciones en los gráficos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Isotermas de sorción

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para las isotermas de películas de gelatina de bovino (PGB) y salmón (PGS) obtenidas a partir del equilibrio dinámico. En ellas se observa un aumento del contenido de agua al adicionar glicerol y sorbitol ($p < 0,05$) a películas equilibradas sobre el 25% HRE en el caso de PGB y el 35% HRE en PGS, mientras que no hubo diferencias ($p > 0,05$) entre las concentraciones de plastificante utilizadas.

Se obtuvo un buen ajuste ($ERE < 10\%$) de la ecuación 1 en todos los sistemas analizados en PGB y PGS. Se observó (Tabla 1) una disminución de los valores de M_o con la adición de glicerol y sorbitol, lo que pudo estar asociado a que el espacio entre las cadenas en estado vítreo es limitado, y los sitios disponibles para reaccionar con el agua son usados por las moléculas del plastificante (Enrione, Hill & Mitchell, 2007; Kristo & Biliaderis, 2006).

Temperatura de transición vítrea (T_g)

La T_g de PGB (Figura 2A y 2B) disminuyó a medida que aumentó la concentración de plastificante y el contenido de agua. Esto indica el efecto plastificante tanto del agua, como de los plastificantes glicerol y sorbitol en la matriz, en donde se genera un mayor grado de movilidad intermolecular (Marcilla & Beltrán, 2004). Por otra parte, se obtuvo una disminución de T_g por adición de glicerol en PGS equilibradas a $HRE/100=0,07$ ($\sim 50^\circ\text{C}$) ($p < 0,05$).

Al comparar entre ambas gelatinas, se obtuvo que PGB equilibradas a $HRE/100=0,07$ ($\sim 50^\circ\text{C}$) tuvieron menores valores de T_g que las de PGS ($\sim 105^\circ\text{C}$) ($p < 0,05$).

La Tabla 2 indica los valores obtenidos de la variación en la capacidad calorífica (ΔCp) de los componentes puros, obtenidos mediante el ajuste de la ecuación 2 a los datos experimentales. Las curvas de PGB tuvieron un buen ajuste ($ERE < 10\%$), no así las PGS plastificadas con sorbitol.

Volumen específico y densidad

La adición de glicerol a PGB disminuyó significativamente el V_{esp} y aumentó ρ ($p < 0,05$) (Figura 3A) en todo el rango de humedad analizado, sin obtenerse un efecto con respecto a la concentración de plastificante o al contenido de agua. Roussenova et al. (2012) asociaron este efecto a que este poliol interfiere con los puentes de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, haciendo que el empaquetamiento molecular sea más eficiente. En el caso de la adición de sorbitol, sólo hubo un aumento en la ρ al comparar el control con 10 %p/p en PGS (Figura 3D) equilibradas al 7% HRE ($p < 0,05$).

Con respecto las diferencias en los resultados obtenidos entre glicerol y sorbitol, estas pudieron estar influenciadas por las diferencias moleculares entre ellos (Sothornvit & Krochta, 2001). Glicerol y sorbitol son polioles con moléculas de cadena lineal (efecto estérico) similares; sin embargo, la molécula de glicerol es menor ($PM=92$ g/mol) y tiene 3 grupos hidroxilo, mientras que la molécula de sorbitol ($PM=182$ g/mol) tiene 6 grupos hidroxilo. A pesar de que sorbitol presenta más grupos hidroxilo para interactuar con el agua

por puentes de hidrógeno, el glicerol ha demostrado tener mayor afinidad al agua en isotermas de adsorción y desorción (Leung, 1996).

CONCLUSIONES.

La adición de glicerol y sorbitol generó una disminución aproximada de un 20% en el contenido de agua de ambas películas de gelatina en estado vítreo, con respecto al control y disminuyó la T_g a bajas humedades (anhidro en PGB y $HRE/100=0,07$ en PGS).

En las PGB plastificadas con glicerol se mostró un efecto densificante, mientras que en PGS, sorbitol mostró el efecto densificante sólo a la menor humedad evaluada ($HRE/100=0,07$). La diferencia en la composición de aminoácidos entre ambas gelatinas pudo afectar la formación de triple hélice y su configuración microestructural, generando distintos grados de densificación junto con la distinta interacción con el plastificante utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (1990). Official methods of analysis. 15th Edition.
- Cao, N., Yang, X., & Fu, Y. (2009). Food Hydrocolloid, 23(3), 729–735.
- Díaz, P., Arratia, C., Vásquez, C., Osorio, F., & Enrione, J. (2011). Procedia Food Science, 1, 267–274.
- Enrione, J. I., Hill, S. E., & Mitchell, J. R. (2007). J. Agr. Food Chem., 55(8), 2956–2963.
- Haug, I. J., & Draget, K. I. (2009). Gelatin. En Handbook of Hydrocolloids. Phillips, G. O. & Williams, P. A. (Eds.). Oxford: Woodhead Publishing Limited. pp. 142–163.
- Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Food Hydrocolloid, 23, 563–576.
- Kristo, E., & Biliaderis, C. G. (2006). Food Hydrocolloid, 20(7), 1057–1071.
- Langmaier, F., Mokrejs, P., Kolomaznik, K., & Mladek, M. (2008). Thermochim. Acta, 469, 52–58.
- Leung, H. K. (1986). Water activity and other colligative properties of foods. En Physical and chemical properties of food. Okos, M. R. (Ed.). Michigan: American Society of Agriculture Engineers. pp. 138–185
- Marcilla, A., & Beltrán, M. (2004). Mechanisms of Plasticizers Action. En Handbook of Plasticizers. Wypych, G. (Ed.). Toronto: ChemTec Publishing. pp. 107–120.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., & Rigal, L. (2003). Ind. Crop Prod., 18(2), 91–100.
- Roussanova, M., Enrione, J., Díaz-Calderon, P., Taylor, J., Ubbink, J., & Alam, M. (2012). New J. Phys., 14(3), 1-19.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2001). J. Food Eng., 50, 149–155.

Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). *Food Hydrocolloid*, 19(5), 899–907.

Yan, Z., Sousa-Gallagher, M. J., & Oliveira, F. a. R. (2008). *J. Food Eng.*, 84, 359–367.

Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2005). *J. Food Sci.*, 70(6), 392–396.

TABLAS

Tabla 1: Parámetros ajuste de la ecuación de B.E.T. (Ec. 1) para películas de gelatina de bovino y salmón en estado vítreo equilibradas en el equipo DVS a 30 °C.

	Control (%p/p)	Glicerol (%p/p)		Sorbitol (%p/p)	
	0	6	10	6	10
Bovino $MO_{B.E.T.}$ (% <i>, bs</i>)	7,50	6,86	7,0	6,86	6,99
$C_{B.E.T.}$	7,9	7,2	6,4	7,2	5,3
ERE (%)	1,6	0,6	0,9	0,6	0,4
Salmón $MO_{B.E.T.}$ (% <i>, bs</i>)	7,18	6,32	-	6,19	6,21
$C_{B.E.T.}$	7,1	6,6	-	6,5	5,3
ERE (%)	1,3	1,3	-	1,4	1,3

Donde; $C_{B.E.T.}$ es la constante asociada al calor de sorción de la monocapa, $MO_{B.E.T.}$ es el contenido de agua de la monocapa (base seca) y ERE indica el error relativo estándar.

Tabla 2: Parámetros de la ecuación de Couchman-Karasz (Ec. 2) para PGB y PGS con la adición de glicerol y de sorbitol en estado vítreo a 20°C.

Parámetro	Concentración (%p/p)				
	Control	Glicerol		Sorbitol	
	0	6	10	6	10
Bovino ΔC_p Bovino [J/g °C]	0,60	0,75	1,18	0,80	1,06
ΔC_p Plast. [J/g °C]	-	2,69	3,57	1,99	2,28
ΔC_p Agua [J/g °C]	2,60	2,32	3,39	3,16	5,57
ERE (%)	5,6	2,8	9,8	8,9	8,6
Salmón ΔC_p Salmón [J/g °C]	0,42	0,48	0,45	0,38	0,23
ΔC_p Plast. [J/g °C]	-	0,69	0,68	0,44	1,14
ΔC_p Agua [J/g °C]	1,84	2,3	2,4	2,20	1,70
ERE (%)	6,8	8,7	12,2	18,0	13,5

Donde; ERE es el error relativo estándar.

FIGURAS

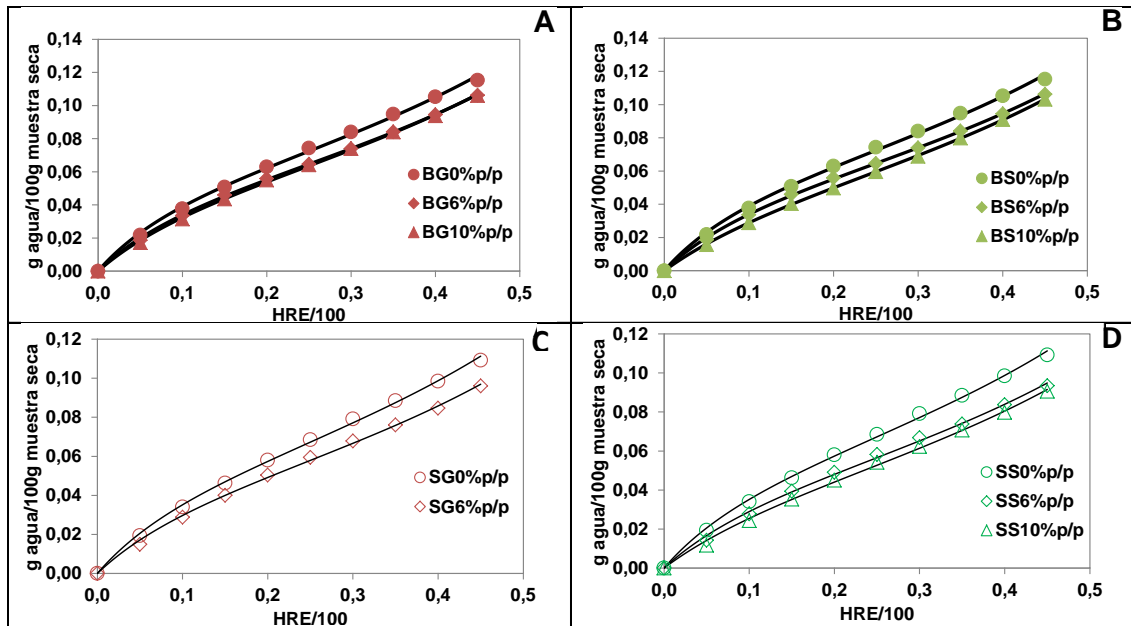


Figura 1: Isotermas de sorción ajustadas con la ecuación de B.E.T. en (A) PGB con glicerol, (B) PGB con sorbitol, (C) PGS con glicerol y (D) PGS con sorbitol (Coeficiente de Variación, CV<10%).

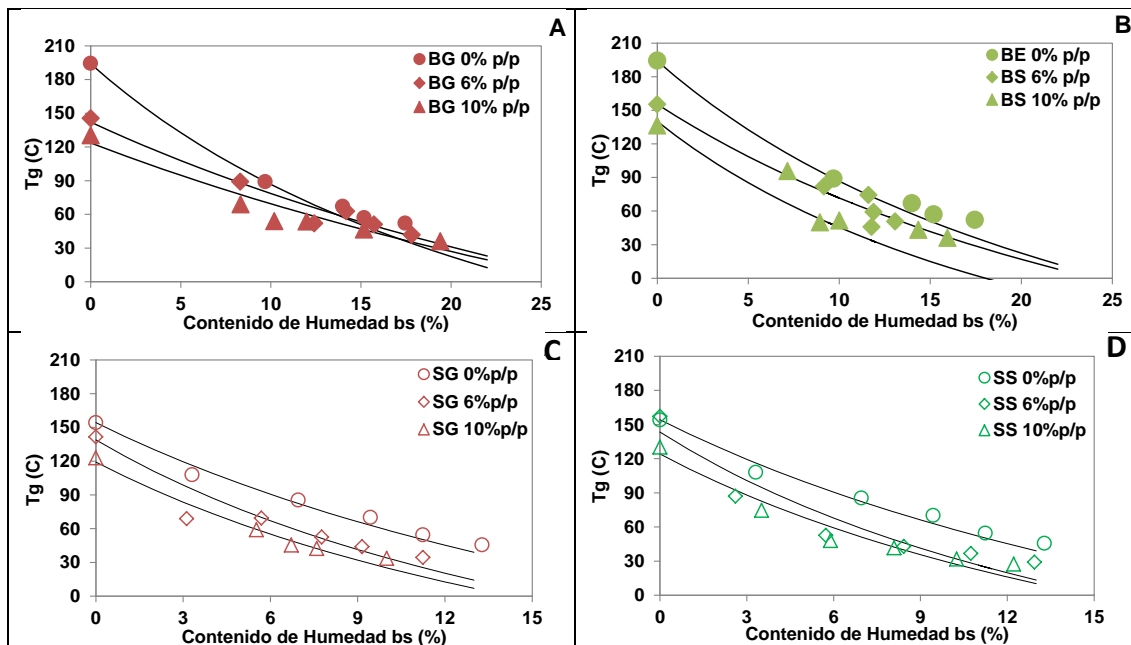


Figura 2: T_g de (A) PGB con glicerol, (B) PGB con sorbitol, (C) PGS con glicerol y (D) PGS con sorbitol ajustadas con la ecuación de Couchman-Karasz (línea continua) (CV<10%).

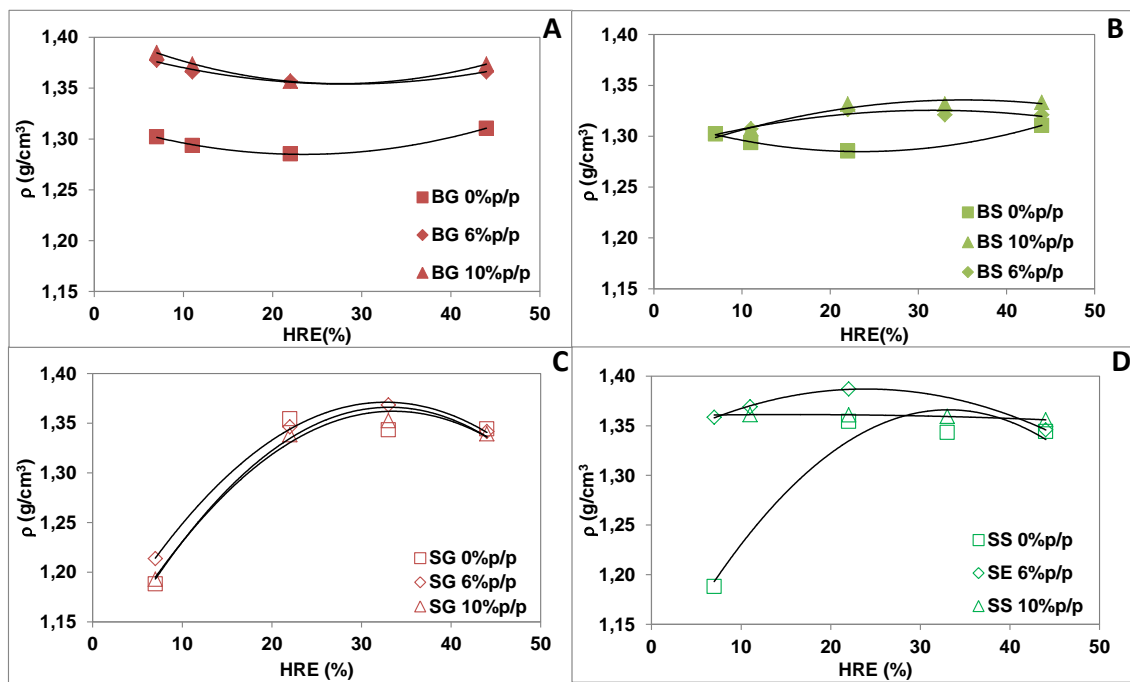


Figura 3: Densidad de (A) PGB con glicerol, (B) PGB con sorbitol, (C) PGS con glicerol y (D) PGS con sorbitol (CV<10%).

COMPLEJACIÓN DE SULFATIAZOL EN β -CDS. CAMBIOS EN EL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA.

Carmen Lucas-Abellán, María Teresa Mercader-Ros, José Antonio Pellicer, Ana Serrano-Martínez, José Antonio Gabaldón, Estrella Núñez-Delicado

Dpto. de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, Guadalupe, Murcia, 30107.

*email: clucas@ucam.edu

INTRODUCCIÓN.

Las sulfamidas son antibióticos utilizados en apicultura. Se utilizan en las colonias de abejas melíferas para el control de enfermedades infecciosas. La Loque americana y europea (AEFD) es una enfermedad bacteriana producida por un bacilo denominado *Paenibacillus larvae* White. Esta enfermedad es muy contagiosa y altamente destructiva para las colonias de abejas melíferas. El sulfatiazol (STZ) es una sulfamida que ha sido utilizada en todo el mundo durante mucho tiempo para combatir esta enfermedad de las abejas. Actualmente, su uso ha sido prohibido ya que la presencia de residuos de sulfamidas en miel representa un grave problema toxicológico, puesto que pueden desencadenar reacciones tóxicas o alérgicas, o crear resistencias (Mandell y Sande 1990).

Las ciclodextrinas (CDs) son azúcares cíclicos naturales de seis (α -CDs), siete (β -CDs) u ocho (γ -CDs) unidades de glucosa, unidas por enlaces α (1-4). La característica más notable de las CDs es su capacidad para formar complejos de inclusión con numerosos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos en sus diferentes estados de agregación, siempre que el compuesto que se vaya a incluir tenga un tamaño compatible con las dimensiones de la cavidad hidrofóbica de la CDs. La inclusión en CDs puede cambiar las propiedades físico-químicas de la molécula complejada (Schmid, 1989). Algunas de las propiedades que pueden ser modificadas por efecto de la complejación son: solubilidad acuosa de moléculas insolubles, estabilidad de las moléculas frente a los efectos de degradación del oxígeno, luz visible o ultravioleta y calor, volatilidad y sublimación, aislamiento físico de los compuestos incompatibles, movilidad cromatográfica, olores y sabores.

En este trabajo se ha caracterizado la complejación de STZ con β -CDs mediante el estudio de los cambios que se producen en el espectro de fluorescencia del sulfatiazol tras producirse la complejación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El STZ fue proporcionado por Fluka–Sigma–Aldrich Química (Madrid, España) y los β -CDs se obtuvieron de TCI (Eschborn, Alemania)

Las medidas de fluorescencia de sulfatiazol se llevaron a cabo en un Shimadzu RF 5301 PC espectrofluorímetro. El espectro de emisión se fijó en un rango de 435 a 483 nm (paso 1 nm), con una longitud de onda de excitación fija de 229 nm. El medio de reacción contenía 100 ng / ml STZ y concentraciones crecientes de β -CD, en tampón acetato sódico 100 mM (pH 5,5), para llegar a un volumen final de 1 ml a 25 °C.

La constante de complejación entre STZ y β -CDs fue calculada mediante el método fluorimétrico descrito por Benesi-Hildebrand en el cual se medía la fluorescencia de STZ en presencia de concentraciones crecientes de β -CDs. Los datos experimentales se ajustaron con la siguiente ecuación descrita por nuestro grupo Lucas-Abellán (2008) para calcular las constantes de complejación y determinar la estequiometría de los complejos:

$$\frac{1}{(F - F_0)} = \frac{2}{(F_\infty - F_0)} + \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_1[CD]_f} + \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_1K_2[CD]_f^2} \quad [1]$$

Donde F es la señal de fluorescencia del STZ con diferentes concentraciones de β -CDs, F_0 es la señal de fluorescencia del STZ solo, K_1 es la constante de complejación de los complejos 1:1 es decir un STZ y una molécula de CDs y K_2 es la constante de complejación de los complejos 1:2, es decir un STZ y dos moléculas de CDs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se pretende caracterizar la complejación de STZ en β -CDs, para ello se utilizó el método fluorimétrico de Benesi-Hildebrand (1949) en el cual como se observa en la Figura 1 conforme aumenta la concentración de CDs en el medio aumenta la intensidad de fluorescencia de sulfatiazol, indicando que STZ estaba siendo complejado por β -CDs. El aumento de la intensidad de fluorescencia aumentó hasta que todo el STZ estuvo complejado.

Los datos experimentales obtenidos del estudio de fluorescencia de Benesi-Hildebrand fueron ajustados con la ecuación descrita por nuestro grupo (Lucas-Abellán y col., 2008) y se representaron obteniendo una regresión lineal de los mismos indicando que la estequiometría de los complejos era 1:2, es decir que una molécula de STZ estaba siendo complejada por dos moléculas de STZ (Figura 2).

También se calcularon los valores de las constantes de complejación con dicha fórmula y los valores de constantes obtenidos fueron K_1 5.1 M^{-1} y K_2 46.78 M^{-1} , siendo K_2 la que presentó un mayor valor, lo cual nos estaba indicando que los complejos predominantes en el medio de reacción eran los que presentaban una estequiometría 1:2.

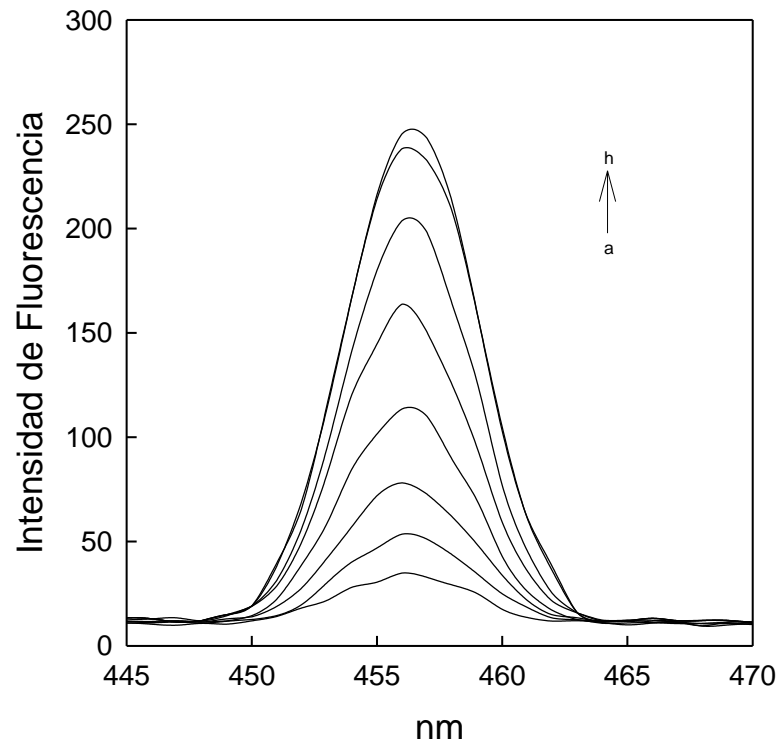


Figura 1: Espectro de fluorescencia de STZ con varias concentraciones de β -CDs λ_{exc} 229 nm: (a) 0, (b) 2.5, (c) 5 (d) 7.5 (e) 10 (f) 13 (g) 15 mM de β -CDS y 0.1 mg/L STZ.

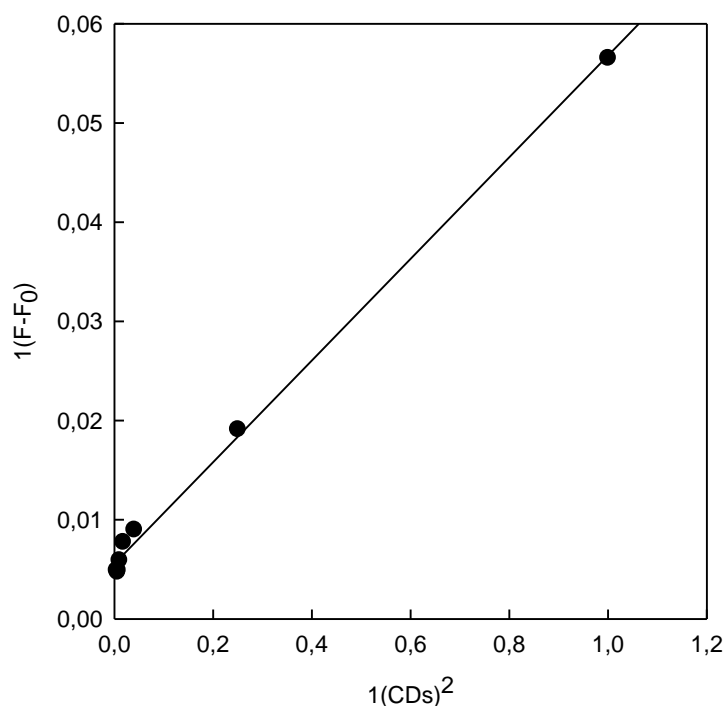


Figura 2: Representación Benesi-Hildebrand de STZ 100 ng/mL y β -CDs [Eq. 1].

CONCLUSIÓN

Como conclusión podemos decir que el sulfatiazol puede ser complejado por β -CDs, ya que su espectro de fluorescencia se ve modificado aumentando su intensidad de fluorescencia conforme aumenta la concentración de β -CDs, hasta estar el STZ completamente complejado por β -CDs. La estequiometría de los complejos son 1:2 ya que al ajustar los datos experimentales con la ecuación descrita por Lucas-Abellán (2008) se obtiene una regresión lineal, obteniendo dos valores de constantes de complejación K_1 y K_2 . Como K_2 es la que presenta un mayor valor de constante, indica que los complejos predominantes en el medio tienen una estequiometría 1:2.

BIBLIOGRAFÍA

Lucas-Abellán, C., Gabaldón, J. A., Penalva, J., Fortea, M. I., & Núñez-Delicado, E. (2008a). Preparation and characterization of the inclusion complex of chlorpyrifos in cyclodextrins to improve insecticide formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 8081-8085.

Benesi, H. A., & Hildebrand, J. H. (1949). A spectrophotometric investigation on the interaction of Iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*. 71, 2703-2707.

Mandell, G. L., & Sande, M. A. (1990). Drugs used in the chemotherapy of TBC and leprosy. In A. Goodman, T. W. Gilman, A. S. Rall, & P. N., Taylor (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (pp. 1047–1064). New York: Pergamon Press.

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS DE PRODUCTOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR Y SUS EXTRACTOS.

Seguí, L.⁽¹⁾, Barrera, C.⁽¹⁾, Betoret, N.⁽¹⁾ y Fito, P.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València, Valencia, España.

1. INTRODUCCIÓN

El azúcar común, azúcar blanco o azúcar refinado es muy valorado por sus características organolépticas y tecnológicas, además de por su contribución a la conservación de alimentos (Payet *et al.*, 2005; Harish Nayaka *et al.*, 2009). Sin embargo, su aporte nutricional es muy pobre y su consumo excesivo causa desórdenes metabólicos y caries. A pesar de la búsqueda de alternativas acalóricas y anticariogénicas como los edulcorantes, el azúcar sigue siendo un alimento básico consumido en todo el mundo, utilizado en la formulación de gran cantidad de alimentos.

En los últimos años, la caña de azúcar y sus extractos han suscitado gran interés por su potente actividad antioxidante, asociada a la presencia de compuestos fenólicos (principalmente flavonoides), y sus probados efectos beneficiosos para la salud. Entre otras patologías, el consumo de caña de azúcar se recomienda para hacer frente a infecciones urinarias, resfriados, bronquitis, anemia, diarrea, debilidad general, ictericia, baja presión sanguínea y un largo etcétera (Kadam *et al.*, 2008). Otra particularidad beneficiosa de la caña es que, así como en occidente el consumo de azúcar se relaciona con una mayor incidencia de caries dental, el consumo de la caña de azúcar o su jugo se ha asociado con una menor incidencia de caries, lo cual ha sido objeto de diversos estudios publicados en revistas especializadas desde 1937 (Osborn *et al.*, 1937a, b) hasta la actualidad (Takara *et al.*, 2007).

Aunque menos consumidos, la diversidad y disponibilidad de azúcares de caña no refinados en el mercado español ha aumentado sensiblemente en los últimos años debido a que existe un creciente interés por los alimentos e ingredientes naturales, así como a una importante demanda de algunos de estos productos por parte de ciudadanos originarios de otros países, donde su consumo como endulzante es muy habitual.

Por todo lo comentado anteriormente, el objetivo del presente estudio consiste en evaluar las propiedades antioxidantes, fisicoquímicas y antimicrobianas de 6 productos derivados de la caña de azúcar con el fin de determinar qué alternativas representan la mejor opción como sustitutivo del azúcar refinado en alimentos tradicionales ricos en azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se tomaron como materia prima 6 productos derivados de la caña de azúcar, todos ellos adquiridos en supermercados y comercios especializados de la ciudad de Valencia (España):

- azúcar de caña granulado (ACG)
- azúcar mascavo granulado (AMG)
- panela en bloque clara (PBC)
- panela en bloque oscura (PBO)
- miel de caña (MC)
- azúcar moreno (AM)

Durante la duración del trabajo, el material objeto de estudio se almacenó en un lugar fresco, seco y fuera del alcance de la luz solar.

Caracterización físico-química

La humedad de las muestras se calculó a partir de la pérdida de peso que experimentan las mismas durante su secado en una estufa de vacío a 105 °C durante 3 horas.

El contenido en sólidos solubles totales (SST) de diluciones acuosas 1:10 (p/v) se midió con un refractómetro termostatado a 20 °C (ABBE ATAGO, NAR T3, Japón), mediante la lectura directa del índice de refracción en °Brix.

El índice de color ICUMSA se calculó a partir de la absorbancia medida a 420 nm (A_{420}) de diluciones acuosas de 15 Brix, tal y como se indica en la ecuación 1:

$$\text{Color (UI a 420 nm)} = (A_{420} \cdot 100)/(b \cdot c) \quad \text{ecuación 1}$$

donde b es la longitud de la celda en cm y c la concentración de sólidos totales (0,16 g/cm³) calculada a partir de la medida de °Brix y la densidad a 20°C.

El perfil de azúcares se obtuvo analizando las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa de diluciones acuosas 1:10000 (p/v) mediante cromatografía líquida de intercambio iónico (cromatógrafo modelo 716 Compact IC Metrohm con columna Metrosep Carb y NaOH 0,1M como eluyente). La interpretación y lectura de los cromatogramas se realizó con el programa ICnet 2.0 (Metrohm) y para la cuantificación se obtuvieron curvas de calibrado de patrones de glucosa, fructosa y sacarosa (Sigma-Aldrich) en el rango de 2,5 a 50 ppm.

Caracterización funcional

El contenido en fenoles totales se determinó según el método espectrofotométrico del reactivo Folin–Ciocalteu reportado para muestras de vino por Singleton y Rossi (1965). Para

tal fin, se añadió a las cubetas de espectrofotometría 0,125 mL de una disolución de azúcar (1:5 para el azúcar moreno y 3:25 para el resto de azúcares), 0,5 mL de agua bidestilada y 0,125 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y se dejó reaccionar en oscuridad durante 6 minutos. Se paró la reacción añadiendo 1,25 mL de Na_2CO_3 al 7% en agua bidestilada y agua bidestilada hasta completar 3 mL y tras 90 minutos de reposo en oscuridad, se midió la absorbancia a 760 nm con un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific. Para la cuantificación se obtuvo la curva de calibrado de ácido gálico en el rango de 0 a 0,5 ppm.

El contenido en flavonoides totales se determinó según el método colorimétrico modificado del cloruro de aluminio (Luximon-Ramma *et al.*, 2005). Este método consiste en hacer reaccionar 1,5 mL de una disolución de azúcar (1:25 para el azúcar moreno y 1:100 para el resto de azúcares) con 1,5 mL de una disolución de $\text{AlCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al 2% en metanol y, tras 15 minutos de reposo en oscuridad, medir la absorbancia a 337 nm con un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific. Para la cuantificación se obtuvo la curva de calibrado de apigenina en el rango de 0 a 300 ppm.

La capacidad antioxidante se midió por el método del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), reportado por Brand-Williams *et al.*, (1995), y por el método de decoloración del ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico (ABTS), reportado por Re *et al.* (1999). El primer método consistió en medir la absorbancia a 517 nm de 3 mL de una disolución que contiene 30 μL de agua bidestilada y 2970 mL de una disolución de DPPH en metanol en una concentración de 0,024 g/L (A_{control}) en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific y compararla, tras 70 minutos de reposo, con la de 3 mL de la misma disolución en la que los 30 μL de agua bidestilada se han reemplazado por una disolución de azúcar 1:10 (A_{muestra}). Los resultados se expresaron como % de inhibición del DPPH (ecuación 2):

$$\%DPPH = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) \cdot 100 / A_{\text{control}} \quad \text{ecuación 2}$$

El segundo método consistió en hacer reaccionar 90 μL de una disolución de azúcar 1:30 con 2,91 mL de una disolución 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato potásico a la que se ha añadido tampón fosfato hasta conseguir 0,7 de absorbancia a 734 nm y, tras 30 minutos, medir la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific. Se utilizó Trolox como antioxidante estándar de referencia en una concentración entre 0 y 1000 μM de concentración final en tampón fosfato.

Por otro lado, se trató de identificar los principales compuestos fenólicos presentes en las muestras mediante cromatografía líquida de alta resolución (cromatógrafo Alianza 1996-Water, columna de fase inversa Luna II Phenomenex C18 (5 mm) de acero inoxidable (250 × 4,6 mm de d.i.) y detector de diodos), utilizando como solventes agua/tetrahidrofurano/ácido trifluoroacético (98:2:0,1) y acetonitrilo, según el método descrito por Price *et al.*, 1999. Para la extracción y concentración de los compuestos fenólicos presentes en una disolución de azúcar problema se aplicó el procedimiento descrito por Duarte-Almeida *et al.* (2011). La identificación de los compuestos fenólicos se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de absorción UV-visible con los de estándares de apigenina, luteolina y ácidos cafeico, clorogénico, cumárico y ferúlico. Para la cuantificación se prepararon rectas de calibrado para cada uno de los estándares en el rango de concentración esperado.

Actividad antimicrobiana

La actividad anticariogénica de cada uno de los productos estudiados, se evaluó realizando ensayos de crecimiento en placa de especies estreptocócicas orales (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) en presencia de azúcar, utilizando clorhexidina como control positivo y azúcar blanco como control negativo. Para poder apreciar mejor los halos de inhibición de crecimiento de cada una de las cepas estudiadas, se llevó a cabo la extracción y posterior concentración de los compuestos fenólicos presentes en una disolución de azúcar problema, según el procedimiento descrito por Duarte-Almeida *et al.* (2011). Una vez obtenido, el extracto seco se diluyó en 0,5 mL de metanol o agua y se utilizó para impregnar los discos de papel estériles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos a partir de la caracterización físico-química de los seis azúcares comerciales.

Por lo que respecta al contenido en sólidos solubles totales, prácticamente todas las muestras se encuentran cercanas al 100%. Únicamente en los productos más húmedos, como son la miel de caña y la panela en bloque clara, el contenido en solutos toma valores más bajos.

En cuanto al contenido en agua de las muestras, se observa una relación estrecha entre ésta y su estado de agregación, de manera que el más fluido de todos los productos analizados, la miel de caña, presenta valores de humedad superiores a los de las panelas en bloque y éstas, a su vez, son más húmedas que los azúcares granulados. En comparación con

los valores de humedad reportados por otros autores se observa que, en el caso de la miel de caña, los valores obtenidos en este trabajo son un 46% inferiores (Solís-Fuentes *et al.*, 2010). En cuanto a las panelas, las granuladas no alcanzan el 3% de humedad que la Norma Técnica Ecuatoriana establece como límite máximo (NTE INEN 2 332:2002), mientras que las que se presentan en bloque lo superan. El azúcar moreno tampoco sobrepasa el 0,5% de humedad establecido como máximo por la norma NCR 189:1991 de la República Dominicana.

Tabla 1. Caracterización físico-química de los productos derivados de la caña de azúcar.

muestra	SST (g/100 g)	HUMEDAD (g/100 g)	COLOR (UI a 420 nm)	GLUC (g/100 g)	FRUC (g/100 g)	SAC (g/100 g)
ACG	99,7 (0,9) _c	1,83 (0,05) _b	23077 (513) _c	6,01 (1,12) _a	5,8 (0,8) _a	101 (5) _d
AMG	99 (2) _c	1,70 (0,14) _b	32739 (220) _d	8 (4) _a	8 (4) _a	94 (15) _{cd}
PBC	91,7 (0,9) _b	6,4 (0,4) _d	11727 (270) _a	11, 2 (0,7) _{ab}	9,4 (0,4) _a	72 (3) _{bc}
PBO	98 (2) _c	4,0 (0,6) _c	18926 (268) _b	10 (4) _{ab}	9 (3) _a	77 (18) _{bcd}
MC	77 (4) _a	16,9 (0,8) _e	36719 (1352) _e	17,3 (1,2) _c	14,18 (0,06) _{ab}	29 (2) _a
AM	98 (5) _c	0,12 (0,03) _a	12734 (1147) _a	14,5 (0,9) _{bc}	20 (7) _b	55 (1) _b

Valores entre paréntesis: desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al analizar la contribución de cada uno de los azúcares identificados (glucosa, fructosa y sacarosa) al contenido total de azúcares se observa que, en la mayoría de los productos analizados, la práctica totalidad de los azúcares presentes son sacarosa. Esto sugiere que el control de la inversión de la sacarosa y/o la eliminación de azúcares contaminantes durante el procesado han sido óptimos. Destaca la semejanza que existe, para cada muestra, entre los porcentajes de fructosa y glucosa (procedentes fundamentalmente de la inversión de la sacarosa), así como la semejanza en los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa en el caso de la miel de caña (por tratarse de un subproducto de la cristalización de la sacarosa).

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos a partir de la caracterización funcional de los seis azúcares comerciales.

De todas las muestras analizadas, el azúcar de caña granulado (ACG) y la miel de caña (MC) son las que contienen más fenoles y flavonoides totales y las que poseen una mayor actividad antioxidante, medida tanto por el método del DPPH como por el método del ABTS. Se observa que los valores obtenidos para estos productos son similares a los

reportados para algunos de los alimentos más ricos en fenoles, como es el caso de la manzana (2,72 mg GAE/g) o el arándano (5,07 mg GAE/g), según Sun *et al.*, (2002), y superiores a los de algunos de los alimentos con mayor cantidad de flavonoides, como es el caso de la ciruela (1,21 mg CATEQUINA/g), según Kim *et al.*, (2003). Como era de esperar, el azúcar moreno obtenido a partir del azúcar refinado al que se le dado un baño de miel o jugo de caña resultó ser el producto menos interesante desde un punto de vista funcional.

Tabla 2. Caracterización funcional de los productos derivados de la caña de azúcar.

muestra	Fenoles totales (mg GAE/g)	Flavonoides totales (mg APIGENIN/g)	DPPH (% inhibición)	ABTS (mmol TROLOX/g)
ACG	2,1 (0,6) ^b	5,64 (0,07) ^d	41 (3) ^d	33,4 (0,4) ^d
AMG	2,0 (0,6) ^b	4,27 (0,0,2) ^c	31 (6) ^{bc}	30,5 (0,7) ^b
PBC	1,6 (0,4) ^{ab}	3,076 (0,012) ^b	28,2 (1,2) ^b	30,2 (0,4) ^b
PBO	2,0 (0,6) ^b	3,168 (0,012) ^b	31 (4) ^b	29,5 (0,7) ^b
MC	2,1 (0,6) ^b	4,36 (0,08) ^c	34 (3) ^c	32,2 (0,4) ^c
AM	0,73 (0,02) ^a	1,158 (0,007) ^a	6,6 (0,2) ^a	9,0 (0,2) ^a

Valores entre paréntesis: desviación estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En relación a la identificación de los principales compuestos fenólicos presentes en las muestras mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la conclusión a la que llegamos en este estudio fue que, de todos los patrones seleccionados, únicamente los ácidos cumárico y clorogénico estaban presentes en los extractos analizados (figura 1A). En un primer lugar se pensó en concentrar más los extractos, pero el resultado no mejoró. En segundo lugar, mediante la adición de diferentes concentraciones de cada uno de los patrones a una disolución de azúcar se pudo descartar que el método de extracción y concentración previo al análisis cromatográfico fuera inadecuado, al aparecer en los cromatogramas de las muestras enriquecidas los picos de todos los compuestos de referencia empleados (figura 1B).

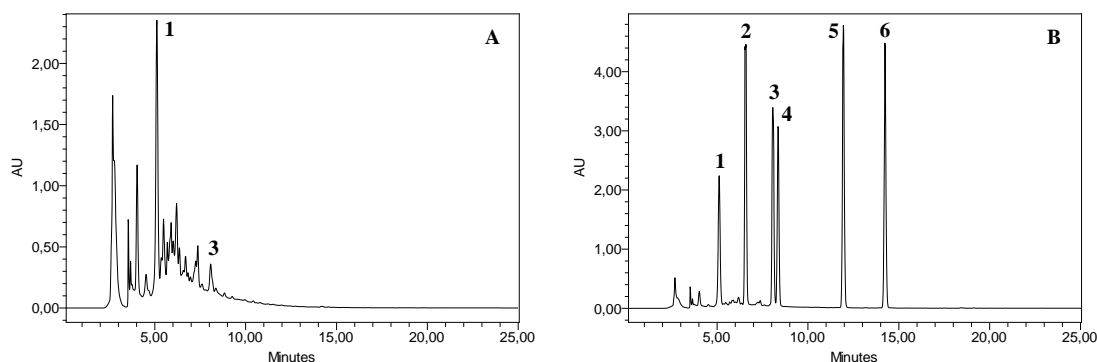


Figura 1. Cromatograma obtenido a 323 nm para el azúcar de caña granulado sin (A) y con (B) adición de 100 ppm de cada uno de los patrones ensayados: ácidos clorogénico (1), cafeico (2), cumárico (3) y ferúlico (4), luteolina (5) y apigenina (6).

Finalmente, mediante este estudio se constató que los extractos obtenidos a partir de diferentes productos derivados de la caña de azúcar poseen actividad antimicrobiana frente a las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. En general, los halos de inhibición resultaron débiles. Como se muestra en la figura 2, los mejores resultados se obtuvieron para el azúcar de caña granulado (ACG) y para las panelas en bloque, tanto la clara como la oscura (PBC y PBO, respectivamente).

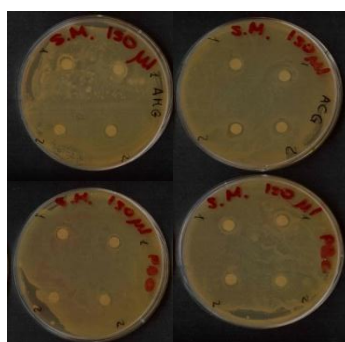


Figura 2. Detalle de los halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* (SM) en presencia de extractos de los azúcares granulados AMG y ACG y de las panelas PBO y PBC.

CONCLUSIÓN

Atendiendo a las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y anticariogénicas de los productos evaluados, y teniendo en cuenta la facilidad de dosificación de los mismos, el azúcar de caña granulado (ACG) y la miel de caña (MC) se presentan como la mejor alternativa para sustituir el azúcar blanco en la formulación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Duarte-Almeida, J.M., Salatino, A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry*, 125, 660-664.
- Harish Nayaka, M.A., Sathisha, U.V., Manohara, M.P., Chandrashekara, K.B., Dharmesh, S.M. (2009) Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar. *Food Chemistry* 11, 113–118.
- Kadam, U.S., Ghosh, S.B., Strayo De., Suprasanna, P. (2008). Antioxidant activity in sugarcane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. *Food Chemistry* 106, 1154–1160.
- Kim, D.O., Jeongb, S.W., Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321–326.
- Luximon-Ramma, A., Bahoruna, T., Crozierb, A., Zbarskyc, V., Datlac, K.P., Dexter, D.T., Aruomad, O.I. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, 38(4), 357-367.
- Norma Azúcar Moreno NCR N° 20688-MEIC. URL [www.mag.go.cr/legislacion/1991/de-20688.pdf].
- Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 2 332:2002. Panela granulada: requisitos. URL [<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2332.2002.pdf>].
- Osborn, T.W.B., Noriskin, J.N., Staz, J. (1937a). A Comparison of Crude and Refined Sugar and Cereals in their Ability to produce in vitro decalcification of teeth. *Journal of Dental Research*, 16, 165.
- Osborn, T.W.B., Noriskin, J.N., Staz, J. (1937b). Inhibition in Vitro of Decalcification in Teeth. *Journal of Dental Research*, 16, 545.
- Payet, B., Chong Sing, A.S., Smadja, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane browns sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10074-10079.
- Price, K.R., Prosser, T., Richetin, A.M.F., Rhodes, M.J.C. (1999). A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry*, 66, 489-494.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231-1237.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Solís-Fuentes, J.A., Calleja-Zurita, K., Durán-de-Bazúa, M.C. (2010). Desarrollo de jarabes fructosados de caña de azúcar a partir del guarapo. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 25(1), 53-62.

Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X.Z., Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449–7454.

Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M. (2007). Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Oleo Science*, 56, 611-4.

PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE PIÑA: UNA PROPUESTA DE MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Conesa, C.¹; Bernat-Senent, I.¹; Seguí, L.¹; Fito, P.¹

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València. Camí de Vera s/n, 46022 Valencia (España)

RESUMEN

Los residuos procedentes de la industrialización de la piña pueden llegar a alcanzar hasta un 50% (m/m) del total de fruta procesada. Al tratarse de un material con una proporción significativa de azúcares fermentables, celulosa y hemicelulosa, podría constituir una materia prima de bajo coste para la producción de bioetanol. No obstante, la estructura lignocelulósica es difícilmente degradable por lo que resulta necesario aplicar algún pretratamiento como paso previo a la hidrólisis enzimática. En concreto, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la eficacia del pretratamiento con microondas previo a la hidrólisis enzimática de los residuos industriales de la piña para la obtención de bioetanol. Para ello, se aplicaron diferentes potencias (10.625, 8.5, 6.375, 4.25 y 2.125 W/g) y tiempos (1-6 min, 8, 10, 14 y 20 min) y, posteriormente, se procedió a la sacarificación de las muestras (pH 5, 50 °C, 0.4% (m/m) de celulasa, 0.1% (m/m) de hemicelulasa de *Aspergillus niger*, durante 24 h). Por último, se determinaron los perfiles de azúcares de los residuos hidrolizados sin pretratamiento y con pretratamiento. Los resultados obtenidos sugieren que pretratar con microondas el residuo sólido de la piña permite mejorar la eficacia de la hidrólisis enzimática posterior. Los pretratamientos a 6.375 W/g, a 4.25 W/g entre 11-14 min y a 8.5 W/g entre 1-3 min generaron un incremento estadísticamente significativo de los azúcares con respecto a la muestra hidrolizada no sometida a pretatamiento. En concreto, en la muestra pretratada a 6.375 W/g durante 4 min se produjo un incremento del 47% para los azúcares fermentables y del 46% para los totales con respecto al residuo sólido hidrolizado sin pretratamiento.

Palabras clave: Pretratamiento con microondas, hidrólisis enzimática, bioetanol, residuos industriales de la piña.

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de piñas se ha incrementado progresivamente hasta alcanzar los 21 millones de toneladas en el 2011, lo que la convierte en la tercera fruta tropical más importante por detrás de la banana y del mango (FAO, 2013). Sus dos principales industrias de transformación son la industria de zumos y la conservera, que en muchos casos se combinan para la obtención simultánea de zumos y de concentrados, y de piña enlatada. Durante su procesado, alrededor de un 50% (m/m) de la fruta acaba convirtiéndose en residuos, constituidos principalmente por la corteza, el corazón y la corona, muy difíciles de degradar y de gestionar (Ketnawa et al., 2012). No obstante, nuevas investigaciones se centran en la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de estos residuos al tratarse de un material lignocelulósico que contiene altas proporciones de mono y disacáridos fermentables, y de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables (Ruangviriyachai et al., 2010). La obtención de dicho combustible contribuye a la diversificación de las fuentes de suministro de energía y a la disminución de la emisión de gases contaminantes a la atmósfera, sin competir con el mercado mundial de alimentos (Rutz y Janssen, 2008; Bacovsky, 2010). Las moléculas de celulosa se organizan en largas cadenas lineales recubiertas por hemicelulosa y lignina que la protegen de la hidrólisis enzimática (Taherzadeh y Karimi, 2008), por lo que pretratar la matriz lignocelulósica es un paso primordial para la obtención de bioetanol. En la actualidad existen diferentes tipos de pretratamientos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos, así como una combinación de algunos de ellos (Sun y Chen, 2002). Muchos de estos pretratamientos requieren altas temperaturas, que se alcanzan mediante calentamiento por conducción o por convección (Liu y Wyman, 2005). Esto genera un elevado coste energético y pueden producir compuestos inhibidores de la fermentación alcohólica, como: los ácidos orgánicos y los derivados fenólicos.

El empleo de microondas, radiaciones electromagnéticas no ionizantes que se hallan dentro de una gama de frecuencias de 300 MHz ($\lambda = 1$ m) a 300 GHz ($\lambda = 1$ mm), es un método alternativo a los pretratamientos convencionales (Hu y Wen, 2008). En concreto, el calentamiento por microondas se basa en la capacidad de algunos compuestos para transformar la energía eléctrica en calor, como consecuencia de dos mecanismos: la orientación e inducción dipolar y la conducción iónica (Lidström et al, 2001). Además, permite un calentamiento volumétrico, selectivo y más rápido del producto ya que existe un contacto directo entre este y el campo electromagnético generado por el microondas. Esto se traduce en una mayor efectividad energética y facilidad de manejo con respecto a los

pretratamientos convencionales (De la Hoz et al., 2005). Además el empleo de microondas genera un calentamiento de elevada penetración que permite cambios estructurales masivos a diferencia del calentamiento por conducción y convección (Talens et al, 2013). Estas características hacen que el empleo de las microondas pueda mejorar el rendimiento de ciertos procesos bioquímicos, reestructurar el medio y favorecer el acceso de las enzimas hidrolíticas al sustrato lignocelulósico (Kitchaiya et al.; 2003; Zhu et al., 2006). No obstante, la efectividad de cualquier pretratamiento depende tanto de las condiciones del proceso como de la matriz lignocelulósica objeto de estudio. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar la eficacia del pretratamiento con microondas previo a la hidrólisis enzimática de los residuos industriales de la piña para la obtención de bioetanol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención del residuo sólido

Las piñas (*Ananas comosus*) utilizadas pertenecen a la variedad de cultivo MD-2, más conocida como Extra Sweet o Golden Sweet. Para la obtención de la muestra se eliminó la corona del fruto y se separaron la corteza y el corazón de la pulpa con un cortador de piña. A continuación se trocearon la corteza y el corazón y se prensaron en una prensa hidráulica a 2.5 bar (Vincent Corporation modelo CP-4). La torta de prensado se trituró con una batidora americana (Solac Professional Mixer 1000W Inox.). Por último, el residuo triturado se introdujo en frascos de vidrio que se llevaron a congelación a -22 °C hasta la realización de los experimentos.

2.2. Pretratamiento con microondas

El pretratamiento se llevó a cabo usando un horno microondas (LG MH6340F/MH6340FS) con una frecuencia de 2.45 GHz. Se introdujeron 40 g de residuo triturado y 40 mL de agua destilada en recipientes de plástico especiales para microondas. La mezcla se trató a 850, 680, 510, 340 y 170 W, lo que se traduce en las siguientes potencias W/g: 2.125, 4.25, 6.375, 8.5 y 10.625, y a intervalos de tiempo de 1 minuto hasta 6, 8, 10, 12 y 20 minutos, respectivamente. Finalmente se ajustó el pH del residuo a 5 mediante la adición de NaOH 1 N (Panreac Química, S.L.U.). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

2.3. Hidrólisis enzimática

Se combinaron 0.4% (m/m) de celulasa (1.13 Unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich Spain) y 0.1% (m/m) de hemicelulasa (1.5 Unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich Spain)

producidas ambas por *Aspergillus niger* con el residuo pretratado con microondas y sin pretratar. La mezcla se llevó a estufa de incubación (PSelecta modelo Incudigit) a 50 °C durante 24 h.

2.4. Determinación del perfil de azúcares

La determinación de los azúcares presentes en la fase líquida del residuo se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), cromatógrafo modelo 716 Compact IC Metrohm, con columna Metrosep Carb 1 250/4.6 (250 mmLx 4.6 mmID), utilizando 0.1 M NaOH (1 mL/min, 8.8 MPa) como fase móvil y una temperatura de trabajo de 32 °C. Para realizar las determinaciones, se prepararon diluciones 1:2000 con agua milliQ de la fase líquida del residuo que se filtraron con un filtro de nailon de 0.45 µm. Los patrones utilizados (Sigma-Aldrich, Co.) para la cuantificación del contenido en azúcares del residuo fueron arabinosa (pureza ≥ 98%), glucosa (pureza ≥ 99.5%), xilosa (pureza ≥ 99%), fructosa (pureza ≥ 99%) y sacarosa (pureza ≥ 99.5%), preparados en diluciones de 2.5, 5, 10, 15, 25 y 50 ppm. La lectura de los cromatogramas se realizó mediante el programa IC Net 2.3 (Metrohm).

2.5. Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para estudiar los resultados obtenidos en los experimentos. Para ello se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del residuo hidrolizado enzimáticamente sin pretratamiento

En la tabla 1 se muestra el contenido en azúcares del residuo sólido hidrolizado (24 h) sin pretratamiento con microondas. A partir de trabajos anteriores (Conesa et al., 2012), se deduce que, en general, la sacarificación genera un incremento en el contenido en glucosa, fructosa y sacarosa con respecto al residuo sólido inicial. En concreto, el aumento del contenido en glucosa se debe a la acción de la celulasa fúngica que hidroliza la celulosa (polímero de D-glucosas unidas por enlaces β-1,4-glucosídicos) y que consta a su vez de tres grupos de enzimas: las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), las celobiohidrolasas o exoglucanasas (EC 3.2.1.74) y las β-glucosidasas (EC 3.2.1.21) (Goyal et al., 1991). En cuanto a la fructosa, su incremento podría provenir de la inversión de la sacarosa en medio ácido como sugieren algunos autores como Ban-Koffi y Han (1990). Por otro lado, la hidrólisis enzimática favorece la liberación de dos nuevos azúcares: la arabinosa y la xilosa. Como se ha indicado

en la introducción, la celulosa está recubierta por hemicelulosa. Este polímero complejo de heteropolisacáridos está formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y ácidos urónicos (Scheller, 2010). En el caso del residuo de la piña, la cadena principal recibe el nombre de xilano al tratarse de un polímero de xilosas con enlaces β -(1 \rightarrow 4) sustituidos por cadenas de L-arabinosa y D-ácido glucurónico, fácilmente hidrolizables. La aparición de estos dos azúcares se debe a la hidrólisis de la hemicelulosa por la acción de la hemicelulasa. Este complejo enzimático consta de enzimas que hidrolizan la cadena principal: las xilanasas y las β -xilosidasas (Shallom y Shoham, 2003); así como de las responsables de la hidrólisis de las ramificaciones de la hemicelulosa: las α -L-arabinofuranosidasas y las α -D-glucuronosidasas (Saha, 2005). Según puede observarse en la tabla 1, existe una mayor liberación de xilosa que de arabinosa al tratarse la primera del principal constituyente de la cadena lineal de xilano.

El término azúcares fermentables hace referencia, a lo largo de este trabajo, al conjunto formado por la glucosa, la fructosa y la sacarosa. Esto se debe a que estos son los azúcares naturalmente fermentables por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo mejor estudiado y más utilizado a nivel industrial para la fermentación. No obstante existen en la actualidad diferentes bacterias (Cardona y Sánchez, 2007) y levaduras (Huang et al., 2009), así como cepas modificadas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar tanto la glucosa, la fructosa y la sacarosa, como la xilosa y la arabinosa a etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2007). Es por ello que el término azúcares totales hace referencia en este trabajo al conjunto formado por los azúcares fermentables, junto con la arabinosa y la xilosa.

3.2. Caracterización del residuo pretratado con microondas e hidrolizado enzimáticamente

En la figura 1 se muestra el contenido en azúcares totales y fermentables del residuo sólido hidrolizado enzimáticamente sin pretratamiento (SP) y del residuo sólido pretratado con microondas y sacarificado para cada uno de los tratamientos estudiados. Para evaluar el efecto del pretratamiento con microondas, se realizaron sendos ANOVA de tipo monofactorial para cada una de las potencias estudiadas (nivel de confianza del 95%) escogiendo como variables respuesta el contenido en azúcares totales y fermentables para cada tiempo de exposición al pretratamiento. El resultado del contraste de rango múltiple de este análisis se muestra también en la figura 1.

En general, se observó un comportamiento similar de los azúcares totales y de los fermentables para todos los tratamientos. Esto se debe a que la mayor proporción de los azúcares totales está compuesta por los azúcares fermentables, como se ha visto previamente.

Pretratar con microondas el residuo industrial de piña a 2.125 W/g no genera un incremento estadísticamente significativo en el contenido de azúcares totales y fermentables con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento. En este caso (Figura 1.A), los valores de azúcares obtenidos tras el pretratamiento para los diferentes tiempos de exposición oscilan alrededor del contenido en azúcares del residuo hidrolizado sin pretratamiento. El pretratamiento a una potencia ligeramente superior (4.25 W/g, Figura 1.B) generó un incremento del contenido en azúcares totales y fermentables a tiempos de exposición altos (a partir de 8 min), aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento. Por su parte, pretratar con microondas el residuo industrial de piña a 6.375 W/g y para cualquier tiempo de exposición produjo un incremento estadísticamente significativo del contenido en azúcares fermentables y totales con respecto al residuo hidrolizado sin pretratar como se aprecia en la figura 1.C. No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de exposición a las microondas, alcanzándose el mayor rendimiento en azúcares fermentables (40.65 g/L) y totales (41.93 g/L) a los 4 min de tratamiento. El pretratamiento con microondas a 8.5 W/g (Figura 1.D) a tiempos cortos de exposición (hasta 3 min para los azúcares fermentables y hasta 4 min para los azúcares totales) provocó un incremento del contenido en azúcares totales y fermentables con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento, aunque este efecto no resultó estadísticamente significativo. Por otro lado, se observa cierta tendencia a una disminución del rendimiento en azúcares en el residuo hidrolizado a medida que aumenta el tiempo de exposición. Por último, el pretratamiento del residuo a 10.625 W/g y para cualquier tiempo de exposición generó un descenso del contenido en azúcares totales y fermentables con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento, como se observa en la figura 1.E.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que a potencias bajas (2.125 W/g) no existe ningún efecto del pretratamiento con microondas en el rendimiento en azúcares fermentables y totales durante la hidrólisis enzimática. Esto se debería a que la potencia aplicada no sería suficiente para generar la desestructuración de la matriz lignocelulósica y, por lo tanto, no actuaría como facilitador de la posterior acción de las enzimas. En el extremo opuesto, pretratar la matriz lignocelulósica a potencias elevadas (10.625 W/g) tampoco supondría un beneficio puesto que disminuye el contenido en azúcares totales y fermentables en el residuo hidrolizado con respecto al que no ha sido pretratado. Algunos autores sugieren que a potencias elevadas, la temperatura alcanzada durante el pretratamiento puede provocar la degradación de los azúcares, produciéndose así un efecto contrario al deseado (Zhu et al.,

2005). No obstante, a potencias intermedias sí se observa un efecto positivo del pretratamiento con microondas sobre la desestructuración de la matriz lignocelulósica. En concreto, a potencias intermedias bajas (4.25 W/g) el mayor rendimiento en azúcares fermentables y totales se obtiene para tiempos de exposición altos. Para potencias intermedias altas (8.5 W/g), las mayores concentraciones se alcanzan a tiempos cortos de exposición mientras que para potencias intermedias de pretratamiento (6.375 W/g), cualquier tiempo de exposición al microondas favorece la hidrólisis enzimática.

Considerando todos los tratamientos, el análisis estadístico mostró que el mayor contenido en azúcares fermentables y totales se obtiene para cualquier tratamiento a 6.375 W/g, a 4.25 W/g entre 11-14 min y a 8.5 W/g entre 1-3 min, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores correspondientes al residuo hidrolizado sin pretratamiento. Para ello se realizaron ANOVA monofactoriales (nivel de confianza del 95%) escogiendo como variables respuesta el contenido en azúcares totales y fermentables y como factores cada combinación de potencia y tiempo de exposición. De esta manera, pretratar el residuo sólido a 6.375 W/g durante 4 min genera un incremento del 47% para los azúcares fermentables y del 46% para los totales comparándolo con el residuo sólido hidrolizado sin pretratamiento.

4.CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que, en general, pretratar con microondas el residuo sólido de la piña permite mejorar el proceso de hidrólisis enzimática. El efecto ejercido por las microondas facilitaría la ruptura de la estructura lignocelulósica, favoreciendo así la hidrólisis posterior. Los pretratamientos a potencias intermedias, alrededor de 6.375 W/g, permiten obtener una mejora estadísticamente significativa con respecto a la liberación de azúcares. Potencias menores, sobre todo a tiempos de tratamiento cortos, no producen diferencias notables, mientras que potencias mayores o tiempos de exposición más largos provocan una degradación de azúcares. La combinación 6.375 W/g – 4 min produjo la mejora más significativa, incrementando en un 47% los azúcares fermentables y en un 46% los totales con respecto al residuo sólido no pretratado e hidrolizado. Futuros trabajos se centrarán en el estudio de los cambios (micro) estructurales producidos en la estructura lignocelulósica para entender mejor el efecto del pretratamiento con microondas, como por ejemplo examinar las muestras mediante microscopía electrónica de barrido de congelación (Cryo-SEM). Por otro lado, es necesario la realización de estudios utilizando microondas continuos de tipo industrial para determinar el beneficio potencial del empleo de

pretratamientos con microondas a escala industrial. Además sería conveniente analizar la eficacia de un pretratamiento combinando el efecto de las microondas junto con un pretratamiento químico convencional, es decir, en medio alcalino o ácido.

5. BIBLIOGRAFÍA

Bacovsky, D. (2010). How close are second-generation biofuels? *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 4: 249-252.

Ban-Koffi, L y Han, Y. W. (1990). Alcohol production from pineapple waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6: 281-284.

Cardona, C. A. y Sánchez, O. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98: 2415-2457.

Conesa, C.; Seguí, L.; Fito, P. (2012). Saccharification of industrial pineapple waste with comercial enzyme mixture. *Proceedings: 2012 EFFoST Annual Meeting*.

De la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A. (2005) Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwaves effects. *Chemical Society Reviews*, 34: 164-168.

FAO. FAOSTAT database [en línea]. Dirección URL: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> [Consulta 18 Abril 2013]

Goyal, A.; Ghosh, B.; Eveleigh, D. (1991). Characteristics of fungal cellulase. *Bioresource Technology*, 36: 37-50.

Hahn-Hagerdal, B.; Karhumaa, K.; Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 113: 1207-1209.

Hu, Z. y Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38: 369-378.

Huang, C. F.; Lin, T. H.; Guo, G. L.; Hwang, W. S. (2009). Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 100: 3914-3920.

Ketnawa, S.; Chaiwut, P.; Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 385-391.

Kitchaiya, P.; Intanakul, P.; Krairish, M. (2003). Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric pressure. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 23: L 217-225.

Lidström, P.; Tierney, J.; Wather, B.; Westman, J. (2001). Microwave assisted organic synthesis. A review. *Tetrahedron*, 57: 9225-9283.

Liu, C. G. y Wyman, C. E. (2005). Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*, 96: 1978–1985.

Ruangviriyachai, C.; Niwaswong, C.; Kosaikanon, N.; Chanthai, S.; Chaimart, P. (2010). Pineapple Peel Waste for Bioethanol Production. *Journal of Biotechnology*, 150: 10.

Rutz, D.; Janssen, R. (2008). *Biofuel Technology Handbook*, WIP Renewable Energies. München, Germany.

Saha, B. C.; Iten, L. B.; Cotta, M. A.; Wu Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40: 3693-3700.

- Scheller, H. V. y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61: 263-289.
- Shallom, D. y Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 219-228.
- Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1–11.
- Taherzadeh, M. J. y Karimi, K. (2007) “Process for etanol from lignocellulosic materials I: Acid-based hydrolysis processes”. *Bioresources*, 2: 472-499.
- Talens, C.; Castro-Giráldez, M.; Bald, C.; Fito, P.J. (2013). Thermodynamic model of microwave drying of citrus peel with different treatments. *Book of Proceedings: InsideFood Symposium 2013*.
- Zhu, S. D.; Wu, Y. X.; Yu, Z. N. (2006). Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosystems Engineering*, 94: 437-442.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Contenido en azúcares del residuo sólido hidrolizado y sin pretratamiento con microondas. 24 h de hidrólisis con 0.4% (m/m) celulasa y 0.1% (m/m) hemicelulasa¹.

Contenido en azúcares del residuo sólido hidrolizado y sin pretratamiento con microondas						
Arabinosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Azúcares Fermentables (g/L)	Azúcares Totales (g/L)
0.59 (0.12)	16 (5)	0.61 (0.14)	10.1 (1.3)	1.6 (0.3)	28 (7)	29 (7)

¹Los valores se corresponden a la media de tres repeticiones (Desviación Estándar).

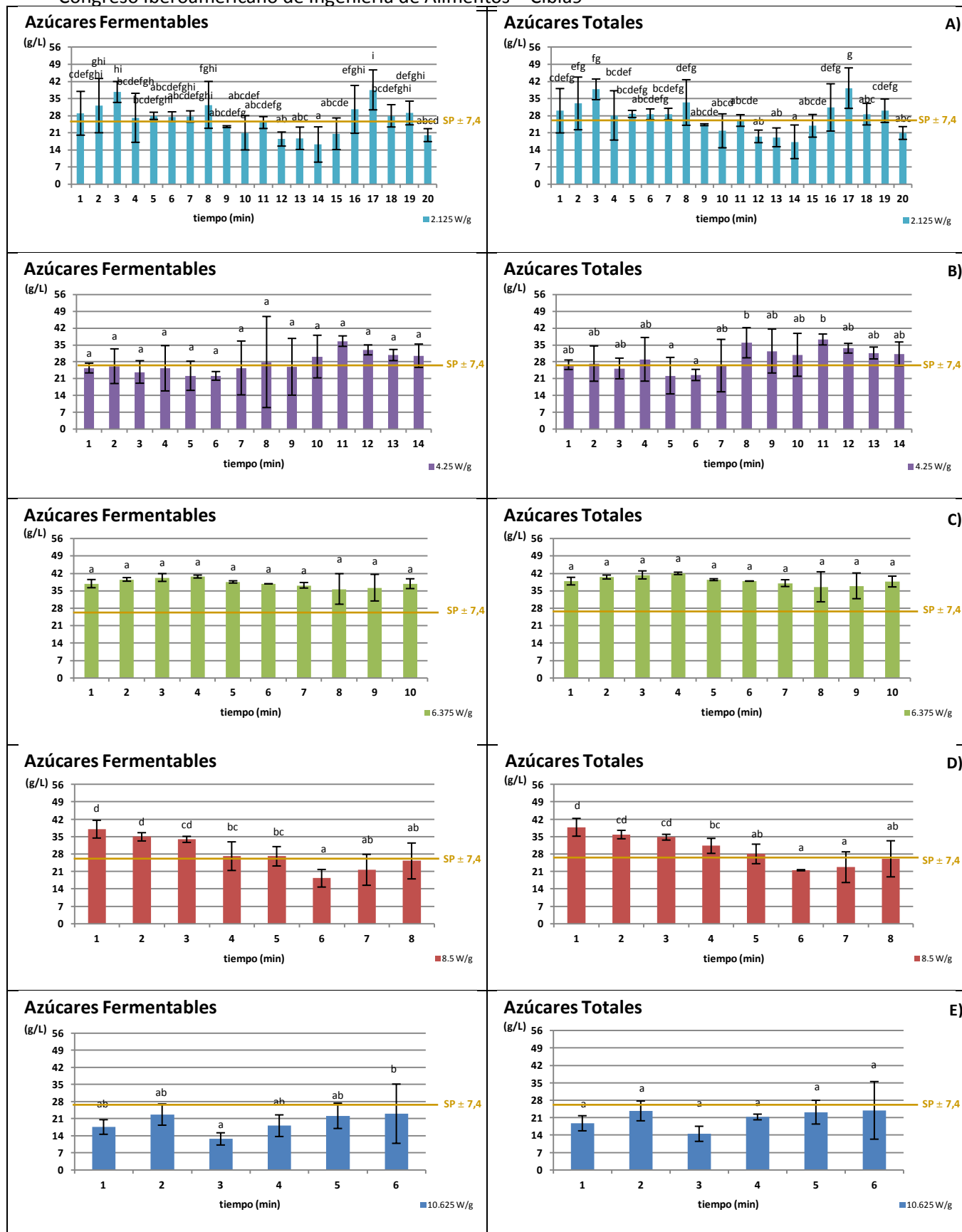


Figura 1. Contenido en azúcares totales y fermentables del residuo hidrolizado enzimáticamente sin pretratamiento (SP) y del residuo pretratado con microondas e hidrolizado enzimáticamente: A) 2.125 W/g; B) 4.25 W/g; C) 6.375 W/g; D) 8.5 W/g; E) 10.625 W/g.

EFFECTO PREBIÓTICO *IN VITRO* DE CONCENTRADOS DE FIBRA DE PULPA DE CLADODIO DE TUNA (*Opuntia ficus-indica* L.) Y TESTA DE CACAO (*Teobroma cacao* L.)

Paulina Torres¹ y Christian Encina²

¹Departamento de ciencias agropecuarias y de alimentos. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador. mptorres@utpl.edu.ec.

²Escuela de posgrado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un creciente y acelerado consumo de productos alimenticios que ofrecen beneficios para la salud y existen un creciente número de estudios científicos con el fin de validar los beneficios de los alimentos funcionales en la prevención de enfermedades cardiovasculares y del cáncer lo que nos muestra el interés que existe por mejorar la nutrición y la salud en el ámbito de salud pública y comercial (Madrigal and Sangronis ; Sánchez)

La pulpa de los cladodios de la tuna es una fuente interesante de compuestos funcionales, entre los que destaca la fibra dietaria insoluble 22,3% variedad amarilla 25,3% variedad blanca y finalmente fibra dietaria soluble 9,1% variedad amarilla, 8,8% variedad blanca respectivamente. La fibra dietaria de los cladodios de tuna son excelentes fuentes de fibra al cumplir la relación FDI/FDS 3:1 (Abraján ; Muñoz and Torres ; Vaquero)

En la explotación cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla que representa el 10% del peso del fruto fresco y de acuerdo a estudios realizado en residuos son una buena fuente de fibra, la testa o cascarilla tiene del 15-16% de fibra dietaria soluble y 45-46% de fibra dietaria insoluble con una relación de FDI/FDS de 3:1 (Abarca and Guamán).

La fibra dietaria está compuesta de varios componentes químicos principalmente carbohidratos que son resistentes a las enzimas digestivas como: celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, gomas, mucilagos, etc (Balanzá).

El efecto prebiótico “componentes no digeribles de la dieta que resultan beneficiosos para el huésped porque producen el crecimiento selectivo y/o la actividad y/o de una o un número limitado de bacterias del colon” (Álvarez and González); suele valorarse en función de su capacidad de estimular la proliferación de bacterias “saludables” o deseables (bifidobacterias, lactobacilos) en detrimento de las no deseables (bacteroides, clostridio, *E. coli*) (García).

Ciertos tipos de fibras pueden estimular durante su fermentación, el crecimiento de determinadas bacterias intestinales beneficiosas para la salud como lo son las

Bifidobacterium, *Lactobacillus* y otras bacterias ácido-lácticas (Vaquero).

No toda la fibra o carbohidratos no digeribles tienen actividad prebiótica. De hecho, parece que las bacterias o probióticos prefieren metabolizar los carbohidratos de tamaño pequeño (oligosacáridos) que los de tamaño mayor (polisacáridos). En la actualidad existen tres carbohidratos permitidos en Europa con probada eficacia prebiótica: la inulina, los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS), utilizándose principalmente productos de origen sintéticos (García).

El Departamento de Ciencias agropecuarias y de alimentos, se encuentra realizando investigaciones para el aprovechamiento de residuos y rechazos en el área de diseño y desarrollo de alimentos funcionales, dentro del cual se analiza nuevas fuentes de fibra dietaria, como una opción para que las empresas productoras de alimentos, puedan aprovechar estas propiedades funcionales tendencia que va en aumento a nivel mundial.

Por los antecedentes antes citados este estudio surge como una necesidad de complementar estudios anteriores, donde es conocido que tanto el cladodio de tuna como la testa (cascarilla) del cacao son fuentes de fibra dietaria que cumplen con una relación de fibra dietaria insoluble/soluble de 3:1, no se conoce aún si pueden ser considerados como fibra funcional y mucho menos si tienen propiedades prebióticas similares a los oligosacáridos para ser usados como suplemento de alimentos funcionales

El objetivo principal de la presente investigación fue determinar la actividad prebiótica a través de la observación de su comportamiento en la fermentación *in vitro* de los concentrados pulpa de cladodio de tuna (*Opuntia ficus indica* L.) variedades blanca y amarilla y de la testa o cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) con cepas de *Lactobacillus* LGG y *Bifidobacteria* BB12.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó en las instalaciones del departamento de ciencias agropecuarias y de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se trabajó con pencas de tuna variedades blanca y amarilla de la Asociación de Productores de tuna cochinilla del Ecuador (PROCOE), cascarilla de cacao residuos de la industrialización del cacao del proyecto DREAM de la empresa TRANSMAR y con una muestra comercial Beneo Orafiti 95 que contiene $\geq 93,5\%$ de oligofructosa usada como blanco positivo.

Las muestras del cladodio de tuna fueron desinfectadas con hipoclorito de calcio con una concentración de 75 ppm y luego deshidratada la pulpa en un secadero de bandejas a

35°C y las muestras de cascarilla de cacao fueron desinfectadas por vapor y luego igualmente deshidratadas en un secador de bandejas a 35°C. Las muestras deshidratadas y secas fueron envasadas en fundas con cierre hermético ZIPLOC y conservados a temperatura y humedad ambiente ($16\pm 4^\circ\text{C}$ y $64\pm 10\%\text{HR}$).

Análisis Proximal

Humedad por el método gravimétrico AOAC (2005) 934.01; proteína por el método Kjeldahl AOAC (2005) 920.152 ; grasa se usó el método Soxhlet AOAC (2005) 954.02; fibra bruta por el método de la AOAC (2005) 962.09 ; cenizas usando el método de la AOAC (2005) 940.26 ; Fibra Dietaria Total (FDT) se usó el método enzimático gravimétrico AOAC (2005) 991.43.

Análisis Microbiológico

El recuento de aerobios mesófilos por el método AOAC (2005) 990.12; recuento de mohos y levaduras por el método AOAC (2005) 997.02; salmonella por el método del FDA, Capítulo 5 (2011); E. coli y coliformes totales AOAC (2005) 991.14.

Hidratación de muestras

Se realizó por batch de 25 gramos de muestras, se hidrataron con 100 ml de buffer fosfato (1 M, pH 6,3) para representar las condiciones buffer de los alimentos esto basado en la metodología para propiedades funcionales indicado por Femenia et al.

Digestión in vitro : Se siguió la metodología de Aura;

A las muestras hidratadas se les corrigió el pH a 6,9 y se adicionó 666u de α amilasa porcina se mantuvo 5 minutos a 37°C, se llevó el pH a 2,5 se adicionó 0,02 g de pepsina y se mantuvo 2 h a 37°C se cambió el pH a 7 y se adicionó 0,66 g de pancreatina porcina y se mantuvo igualmente a 37°C por tres horas Se centrifugó a 3 000 rpm por 10 minutos con la finalidad de obtener los componentes que resistieron al procedimiento de digestión. Este residuo fue liofilizado para obtener las muestras en polvo. La corrección del pH se la realizó con NaOH (1M) y HCl (1 M) respectivamente.

Fermentación in vitro .- Se siguió la metodología de Kedia et al., se utilizó un medio de cultivo básico a pH 7 constituido por los siguientes ingredientes: bicarbonato de sodio Riedel-de Haën (2g/L), cloruro de sodio MERCK (0,5g/L), Peptona de caseína MERCK (1g/L), Extracto de levadura SIGMA (2g/L), fosfato monobásico de potasio MERCK (0,04g/L), Fosfato dibásico de potasio MERCK (0,04g/L), Sulfato de Magnesio Heptahidratado SIGMA (0,01g/L), cloruro de calcio exahidratado SIGMA (0,01g/L), tween 80 SIGMA (2ml/L), Hemin SIGMA (0,02g/L), Cysteine HCl SIGMA (0,5g/L), Bile salts

SIGMA (0,5g/L), Fosfato monobásico de sodio MERCK (0,3g/L), Fosfato dibásico de sodio MERCK (0,1g/L).

Para cada una de las fermentaciones se colocó en 5 tubos estériles aproximadamente 1,2 gramos de muestra liofilizada (5% p/v de fibra) y 9 ml de medio de cultivo, se esterilizó y se inoculó con 1 ml de solución con cultivo *Bifidobacterium lactis* BB12 o *Lactobacillus lactis* LGG a una escala de 0,5 de Mac Farland que equivale aproximadamente a 150×10^6 cells/ml dependiendo del tamaño del microorganismo.

Se incubó en anaerobiosis, tres repeticiones para cada microorganismo y cada muestra a 37°C y se cuantificó por duplicado el crecimiento microbiano (recuento en placa de agar MRS) y pH a las 0, 2, 8, 24 y 48 horas. En todas las repeticiones se realizó un control positivo y blanco.

Cuantificación de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGCC).- Se cuantifico mediante cromatografía de gas se analizó el contenido de ácido acético, propiónico, butírico. El sobrenadante de la fermentación in vitro sirvió para obtener dichos valores por inyección directa basándonos en la metodología usada por Zhao et al., (2005).

Diseño estadístico

Para el análisis de datos se utilizó un diseño factorial 4x2x4, siendo los factores de estudio las muestras (pulpa de cladodio variedad blanca, pulpa de cladodio variedad amarilla, cascarilla de cacao y oligofructosa Orafit Beneo 95), los microorganismos (*Bifidobacterium lactis* BB12 y *Lactobacillus lactis* LGG) y el tiempo de fermentación (2, 8, 24 y 48), las variables de respuesta que se evaluó fueron disminución de pH, crecimiento de microorganismos (\log_{10} u.f.c./tubo), producción total de ácidos grasos de cadena corta (mg/g). El análisis de resultados se realizó en el paquete estadístico Minitab® Statical Software, versión 16.

Además se realizó un análisis comparativos usando las pruebas de rango múltiples entre los tiempos de fermentación en una misma muestra y entre microorganismos en un mismo tiempo de fermentación y con la misma muestra. El análisis de resultados se realizó en el paquete estadístico Statgraphic® Statical Software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los Cuadros 1 y 2 se presenta los resultados del análisis proximal y microbiológico respectivamente de las muestras deshidratadas, se puede observar que las muestras de pulpa de cladodio variedades blanca y amarilla tienen un número mayor de presencia de mohos y

levaduras esto puede deberse a la gran riqueza en el contenido de carbohidratos que se encuentran en este tipo de vegetales como monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y el exudado que producen ante un corte que constituyen una mezcla de sacáridos, además el alto contenido de agua característico de estas planta y la temperatura a la cual fueron deshidratado que dieron las condiciones ideales para el crecimiento de mohos y levaduras (Abraján ; Guzmán- Loayza and Chávez).

En el cuadro 3 se presenta la disminución de pH para cada uno de los tiempo de control de la fermentación *in vitro*, se puede observar que el producto comercial Orafti® Beneo P95 fue el que mostró una mayor disminución para los dos microorganismos BB12 y LGG de 1,94 y 1,75 respectivamente esto puede deberse a la biodisponibilidad de la oligofructosa que se encuentra en el producto comercial a diferencia de las muestras de cascarilla de cacao, pulpa de cladodio variedades blanca y amarilla donde se tiene una gran cantidad de compuestos que interactúan en sinergia para brindar diversos beneficios positivos o negativos.

Los resultados obtenidos para la muestra comercial a las 8 horas son menores al obtenido por Hernot et al. en una fermentación *in vitro* usando los microorganismo proveniente de heces fecales de donantes y que utilizó igualmente Orafti Beneo P95 y obtuvo una disminución de 1,23 a las 12 horas de fermentación, en un estudio realizado Warnakulasuriya et al. con fracciones de fibra de cuatro tipos de arroz observó una disminución de pH entre 0,5-0,9 puntos en 24 horas siendo la disminución de pH de las muestras de cascarilla de cacao y pulpa de cladodio variedades blanca y amarilla menor a estos valores a las 24 y 48 horas.

En la Figura 1 se presenta el análisis comparativo de pH entre los diferentes tiempos de fermentación en una misma muestra, se observa que existió una diferencia significativa de pH al transcurrir el tiempo de fermentación con la muestra cascarilla de cacao tanto con cultivo BB12 y LGG. La muestra pulpa de cladodio variedad blanca con BB12 presenta un cambio significativo a las 48 horas. No existe cambio significativo en la fermentación con la muestras pulpa de cladodio variedad amarilla con los dos cultivos y pulpa de cladodio variedad blanca con cultivo LGG. El cambio de pH es el resultado de la acidificación del medio de cultivo que se ve influenciado por la composición y disponibilidad de la fuente de carbono usado en la fermentación y que provoca la disminución de pH por la producción de ácidos grasos de cadena corta.

Al analizar los datos de pH experimentalmente mediante un análisis estadístico factorial ($P < 0,005$), podemos observar que existió diferencia estadística entre las muestras,

tiempo de fermentación y la interacción de estos dos factores. Al observar la interacción de muestras vs tiempo de fermentación (Figura 2), podemos ver la diferencia significativa que hay entre las muestras de cascarilla de cacao y pulpas de cladodio variedades blanca y amarilla con el blanco positivo a las 8, 24 y 48 horas de fermentación con las dos cepas de estudio BB12 y LGG, entre las muestras de cascarilla de cacao y pulpa de cladodio blanca y amarilla no existe diferencia significativa en la disminución de pH.

En el Cuadro 4 se presenta los resultados de crecimiento de *Bifidobacterium lactis* BB12 y *Lactobacillus* LGG, se observa crecimiento de los dos microorganismos únicamente para el blanco positivo Orafti P95, en las muestras de estudio cascarilla de cacao y pulpa de cladodio variedad amarilla únicamente hay incremento con el microorganismo *Lactobacillus* LGG en el resto de tratamientos existe una disminución o muerte de los microorganismos en la fermentación *in vitro*. Estos resultados nos demuestran que existe una relación directa entre el crecimiento de la bacteria y la caída de pH, siendo el blanco positivo el que presento mejor crecimiento para las dos microorganismos de estudio, en muchas investigaciones ha sido demostrado que las propiedades prebióticas son influenciadas por la composición química de los carbohidratos que contiene y ha sido demostrado en algunos estudios que este género de microorganismos usan los fructanos como fuente de carbono y producen ácidos grasos de cadena corta lo que provoca la disminución de pH (Hernot, Thomas, Laura, Ingmar, Michael, Kelly and George ; Marrero et al.).

En la figura 3 se presenta el análisis comparativo del crecimiento de las cepas BB12 y LGG por muestra y en los diferentes tiempos de control de la fermentación *in vitro*, se observa que a las 24 horas de fermentación en el control positivo existe una diferencia significativa positiva dado por el crecimiento e incremento de colonias de BB12 y LGG; en las muestras de estudio se observa diferencias significativas negativa en el transcurso del tiempo de fermentación por la muerte de los microorganismos, y a las 48 horas se observa en todas las muestras que existen diferencias significativas entre las mismas muestras y las cepas de BB12 y LGG

Del análisis factorial existió diferencia significativa en el factor principal microorganismos que corresponde a cada una de las cepas de estudio BB12 y LGG y en las Figuras 3 y 4 podemos observar que evidentemente existe diferente comportamiento de los Bifidobacterias BB12 y *Lactobacillus* LGG, los *Lactobacillus* LGG a las 48 horas tiene una tendencia ascendente de crecimiento mientras que el género *Bifidobacterium* BB12 a partir de las 8 horas empieza a decrecer esto puede deberse a la sensibilidad que tienen el género *Bifidobacterium* en relación a las *Lactobacillus* para la sobrevivencia (Mayorga-Reyes et al.).

Las muestras cascarilla de cacao y pulpas de cladodio variedad blanca y amarilla tienen la misma tendencia de crecimiento a los diferentes tiempos de fermentación a diferencia del blanco positivo que tiene una tendencia totalmente diferente esto puede deberse a la composición de las muestra de este estudio que son una mezcla de carbohidratos que pueden o no estimular el crecimiento de estas especies (Khan and Edwards).

Se conoce por bibliografía que la fermentación de carbohidratos en el colon causa la disminución de pH y producción de AGCC (Jiang and Savaiano). De los resultados obtenidos se observo mayor producción de AGCC fue para la el blanco positivo. En la presente investigación existió un comportamiento similar a muchas investigaciones existentes de fermentación colónica *in vitro* con diferentes pH y con bifidobacteria donde han observado que cambios en el pH causa cambios en las porciones de AGCC y que el incremento del porcentaje molar de acetato va acompañado de un disminución de pH (Jiang and Savaiano). Como se observa en el cuadro 5 y figura 5 existió producción de ácido acético en todas las muestras de estudio sin cambios significativos durante el transcurso de la fermentación lo que influyó además para que el pH no se vea disminuido significativamente.

Como producto de la fermentación *in vitro* se obtuvo principalmente ácido acético al igual que en el estudio de Sembries et al. que evaluó los efectos de fibra dietaria presente en jugos de manzana donde observó el acetato como el ácido graso dominante liberado por la fermentación intestinal de pectina. En la investigación realizada por Warnakulasuriya *et al.* con fracciones de fibra de arroz usando la microflora de heces fecales para la fermentación *in vitro* el porcentaje de formación de ácido acético fue superior al de ácido propiónico y butírico. En otro trabajo de fermentación donde los sustratos fueron pectina y glucosa con microorganismos aislados de desechos de conejos igualmente se cuantificó mayor proporción de acetato y menos cantidad de formate, lactato, fumarate y succinate en pectina que en glucosa (Sirotek et al.) . La mayor o menor producción de uno u otro ácido dentro de la fermentación *in vitro* depende de la composición en monosacáridos de las fracciones de fibra, por ejemplo cuando la cantidad de arabinogalactanos es alta en el sustrato mas ácido propiónico es producido (Warnakulasuriya, Kamburawala, Bamunuarachchi and Brennan).

CONCLUSIONES

En las condiciones de la presente investigación no se evidenció cambio significativo ($p < 0,05$) de pH, producción de ácidos grasos de cadena corta, crecimiento de bifidobacteria

BB12 y *Lactobacillus* LGG en las muestras de estudio cascarilla de cacao y pulpa de cladodio variedades blanca y amarilla.

Se evidenció en el control positivo disminución de pH e incremento la producción de AGCC y crecimiento de los microorganismos BB12 y LGG.

No se pudo determinar si las muestras estudiadas tienen o no una actividad prebiótica.

BIBLIOGRAFÍA

abarca, D. And J. M. Guamán. Cuantificación de fibra dietaria y determinación de propiedades funcionales del cacao *Teobroma cacao L.* In. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja, 2009.

Abraján, M. A. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Universidad Politécnica De Valencia, 2008.

Balanzá, R. Efectos Metabólico-Terapéuticos A Corto Y Largo Plazo De La Suplementación Con Fibra Dietética. Universitat Rovira I Virgili, 2007.

Domínguez, A., L. Moreno And G. Clamont Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. Archivos Latinoamericanos De Nutricion, 2009, 59(4), 358-368.

García, P. Apuntes sobre fibra. In *Medical Nutrition*. Novartis, 2002.

Guzmán- Loayza, D. And J. Chávez Estudio Bromatológico Del Cladodio Del Nopal (*Opuntia ficus-indica*) Para El Consumo Humano. *Revista Sociedad Química de Perú*, 2007, 73(1), 41-45.

Hernot, D., B. Thomas, B. Laura, M. Ingmar, et al. In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *Journal of agricultural and food chemistry*, 18 de mayo 2012 2009, 57, 1354-1361.

Jiang, T. And D. Savaiano Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH *in vitro*. *Journal Digestive Diseases and Sciences*, 1997, 42(11), 2370-2377.

Khan, K. And C. Edwards In vitro fermentation characteristics of a mixture of reftilosa and guar gum by human faecal bacteria. *European Journal Nutrition*, 2005, 44, 371-376.

Madrigal, L. And E. Sangronis La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos De Nutricion, 2007, 57(Nº4).

Marrero, G., B. Juarez, A. Rendón And R. Delgado. Efectos prebióticos de los fructanos de maguey. Universidad Autónoma de Coahuila, Universidad Autónoma de San Luís Potosí, 2007.

Mayorga-Reyes, L., P. Bustamante-Camilo, A. Gutiérrez-Nava, E. Barranco-Florido, et al. Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2009, 8(3), 259-264.

Muñoz, J. J. And M. P. Torres. Cuantificación de fibra dietaria y determinación de propiedades funcionales en el cladodio, y en el residuo de la extracción de tónico de penca de

tuna (*Opuntia ficus indica*), variedades amarilla y blanca. In. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja., 2009.

Sembries, S., G. Dongowski, G. Jacobasch, K. Mehrländer, et al. Effects of dietary fibre-rich juices colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *British Journal of Nutrition*, 2003, 90, 607-615.

Sirotek, K., L. Slováková, J. Kopec`Ny' And M. Marounek Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bacteroides caccae*. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 38, 327-332.

Sánchez, H. La biotecnología en la producción de alimentos funcionales. Instituto Politécnico Nacional, 2004.

Vaquero, M. P. Ingredientes Funcionales De Los Alimentos. Calcio. Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). 2006.

Warnakulasuriya, F., R. Kamburawala, A. Bamunuarachchi And C. Brennan The influence of rice fibre fractions on the *in vitro* fermentation production of short chain fatty acids using human faecal micro flora. *International Journal of Food Science and Technology*, 2008, 43, 2237-2244.

Álvarez, E. And P. González La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 2006, 21(Nº2), 62-72.

Cuadro 1. Análisis proximal (expresado en g/100g) de las materias primas de estudio.

Muestra	Grasa	Humedad	Ceniza	Fibra	Proteína	Hidratos de Carbono	FDT luego de digestión
Pulpa cladodio variedad amarilla (MPVA)	0,69	9,60	23,40	5,11	3,32	63,11	34,10
Pulpa cladodio variedad blanca (MPVB)	1,56	13,20	23,70	2,58	3,32	58,22	26,10
Cascarilla de cacao (MCC)	3,59	7,91	8,29	14,46	12,98	52,77	56,34

Cuadro 2. Resultado de análisis microbiológico de materia prima de estudio.

Muestra	Aerobios mesófilos	Coliformes totales	<i>Escherichia Coli</i>	Mohos y levadura	<i>Salmonella</i>
Pulpa cladodio variedad amarilla (MPVA)	300 u.f.c./g	< 10 u.f.c./g	<10 u.f.c./g	150 u.f.c./g	aus/25g
Pulpa cladodio variedad blanca (MPVB)	300 u.f.c./g	< 10 u.f.c./g	<10 u.f.c./g	130 u.f.c./g	aus/25g
Cáscarilla de cacao (MCC)	200 u.f.c./g	< 10 u.f.c./g	<10 u.f.c./g	<10 u.f.c./g	aus/25g

Cuadro 3. pH inicial y variación del pH después de 2, 8, 24 y 48h de *in vitro* fermentación.

Sustrato	Microorganismo	pH inicial	Cambio de pH			
			2h	8h	24h	48h
Pulpa variedad blanca (MPVB)	LGG	6,83	-0,01	-0,01	-0,05	-0,24
	BB12	6,91	-0,01	-0,01	-0,03	-0,08
Pulpa variedad amarilla (MPVA)	LGG	6,78	-0,01	-0,01	-0,2	-0,3
	BB12	6,87	-0,01	-0,01	-0,13	-0,09
Cascarilla de cacao (MCC)	LGG	6,65	-0,01	-0,01	-0,21	-0,8
	BB12	7,08	-0,04	-0,06	-0,12	-0,13
FOS (Beneo P95)	LGG	6,69	-0,07	-0,36	-0,95	-1,75
	BB12	6,47	-0,01	-0,13	-1,4	-1,94

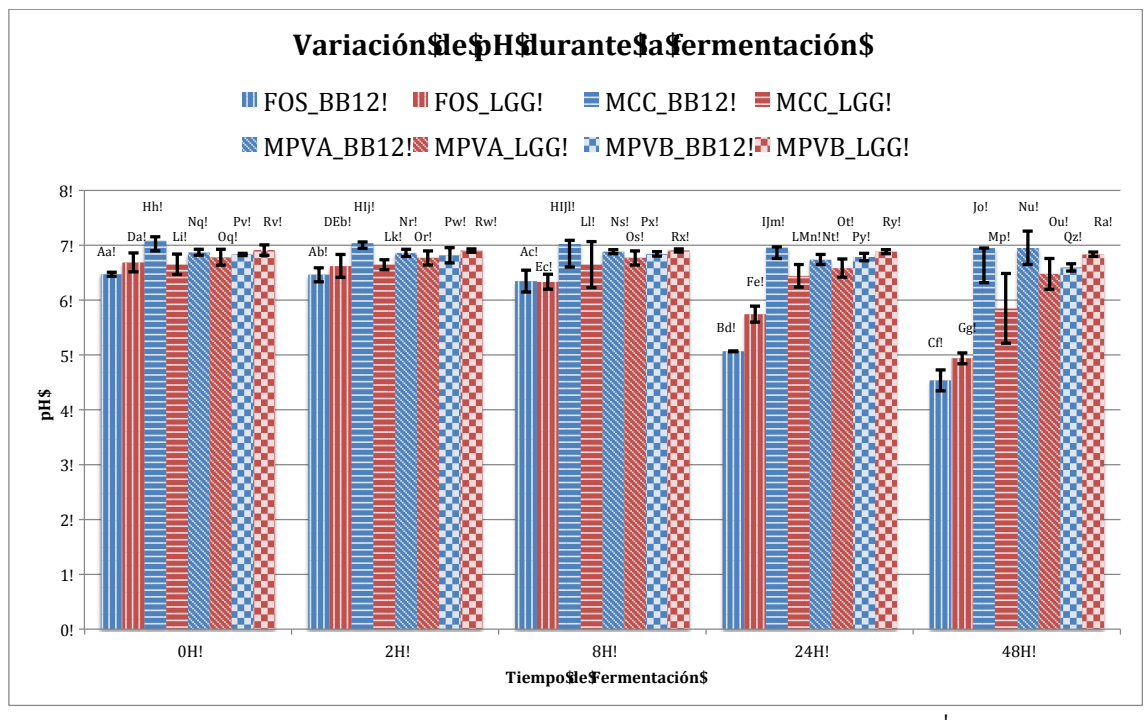
Cuadro 4. Crecimiento bacteriano (\log_{10} u.f.c./tubo) en *batch* de fermentación.

Sustrato	<i>Bifidobacterium</i> BB12					<i>Lactobacillus</i> LGG				
	0h	2h	8h	24h	48h	0h	2h	8h	24h	48h
MPVB	7,5±0,3	7,5±0,7	7,6±0,1	7,0±0,3	7,4±0,2	7,2±0,1	7,1±0,2	7,2±0,0	7,1±0,2	6,6±0,0
MPVA	7,6±0,3	7,1±0,3	7,1±0,0	5,4±1,0	5,9±0,5	7,2±0,0	7,2±0,1	7,1±0,0	7,5±0,4	7,5±0,4
MCC	7,0±0,1	6,9±0,2	6,8±0,3	6,8±0,1	5,9±0,0	7,5±0,2	7,4±0,1	7,5±0,2	6,7±1,6	7,8±0,2
FOS	6,7±0,1	6,5±0,5	7,4±0,3	8,1±0,1	7,3±0,6	6,9±0,0	6,7±0,1	7±0,2	7,9±0,1	7,4±0,9

MPVB.- Muestra pulpa variedad blanca; MPVA.- Muestra pulpa variedad amarilla; MCC.- Muestra cascarilla de cacao; FOS.- fructooligosacarido comercial

Sustrato		Acido Acetico				Acido Propionico				Acido Butirico			
		2h, mg/g	8h mg/g	24 mg/g	48 mg/g	2h mg/g	8h mg/g	24 mg/g	48 mg/g	2h mg/g	8h mg/g	24h mg/g	48h mg/g
FOS	BB12	4418	8346	5686	11016	15,53	75,38	46,04	48,09	13,37	18,25	1,18	12,36
	LGG	14653	14582	15427	15680	86,1	68,70	73,61	77,30	145,5	160,6	161,6	167,0
MCC	C BB12	745	898	824	785	5,14	8,20	8,05	9,57	2,46	3,05	2,41	2,67
	LGG	1036	1067	1076	939	4,88	12,56	3,05	13,06	4,30	5,86	6,75	5,23
MPVA	BB12	1192	1272	1317	1113	0,00	0,00	0,00	0,00	13,41	14,33	12,48	10,89
	LGG	1305	1598	1693	1732	0,00	5,70	8,81	13,06	6,35	5,34	7,95	6,72
MPVB	BB12	1246	1049	1163	1057	2,66	0,00	0,30	1,50	6,57	6,08	6,13	5,47
	LGG	896	882	902	1075	4,02	0,23	1,45	1,59	4,66	3,85	3,74	0,26

.Contenido de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC)



Letras mayúsculas comparan a las mismas muestras en diferentes tiempos de fermentación.
 Letras minúsculas comparan el comportamiento de una muestra en el mismo tiempo de fermentación entre los dos microorganismos de estudio.
 Color azul son fermentaciones realizadas con cepa BB12 y color rojo con cepa LGG.

Figura 1. Análisis comparativo del cambio de pH durante la fermentación.

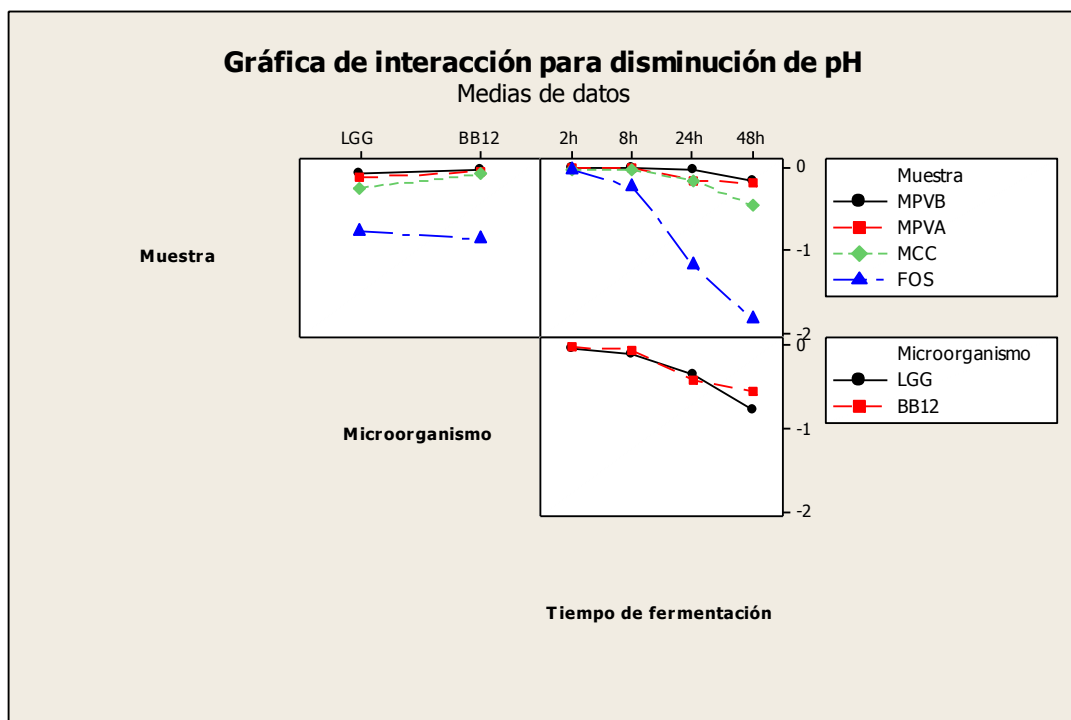
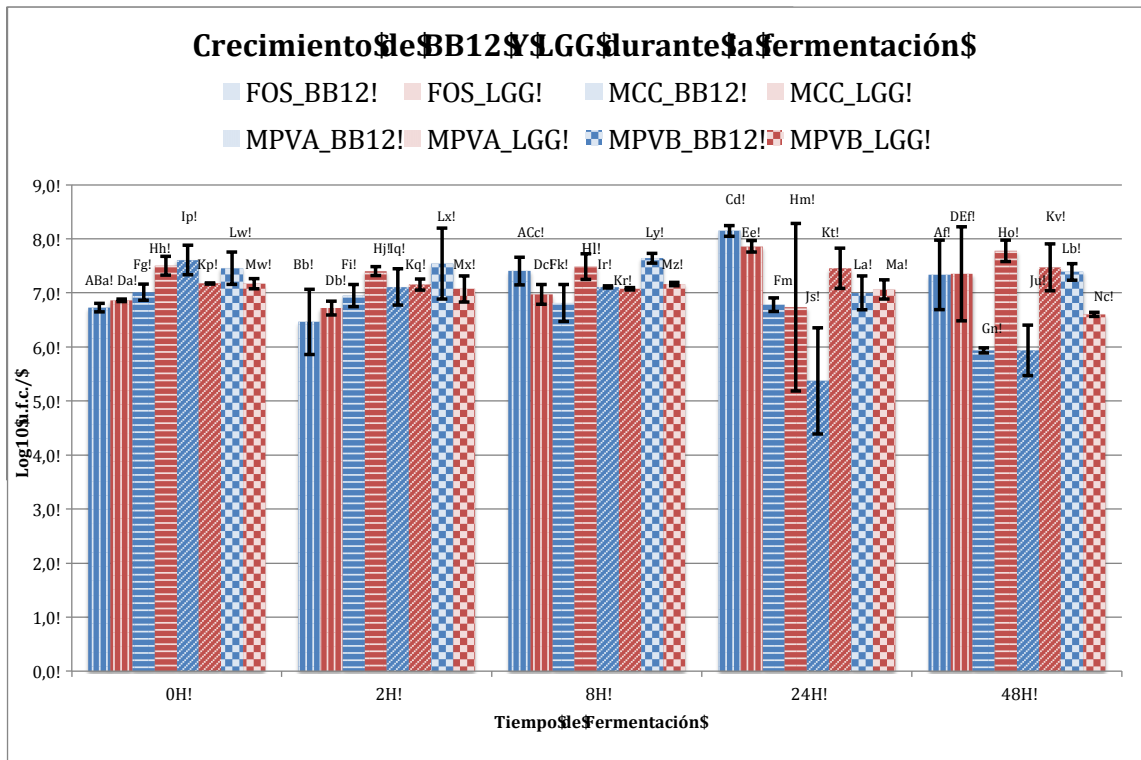


Figura 2. Interacciones dobles de factores de estudio en la disminución de pH.



Letras mayúsculas compara la misma muestra en diferentes tiempos de fermentación.
 Letras minúsculas compara el comportamiento de una muestra en el mismo tiempo de fermentación entre los dos microorganismos de estudio
 Color azul son fermentaciones realizadas con cepa BB12 y color rojo con cepa LGG

Figura 3. Análisis comparativo de crecimiento de BB12 y LGG durante la fermentación

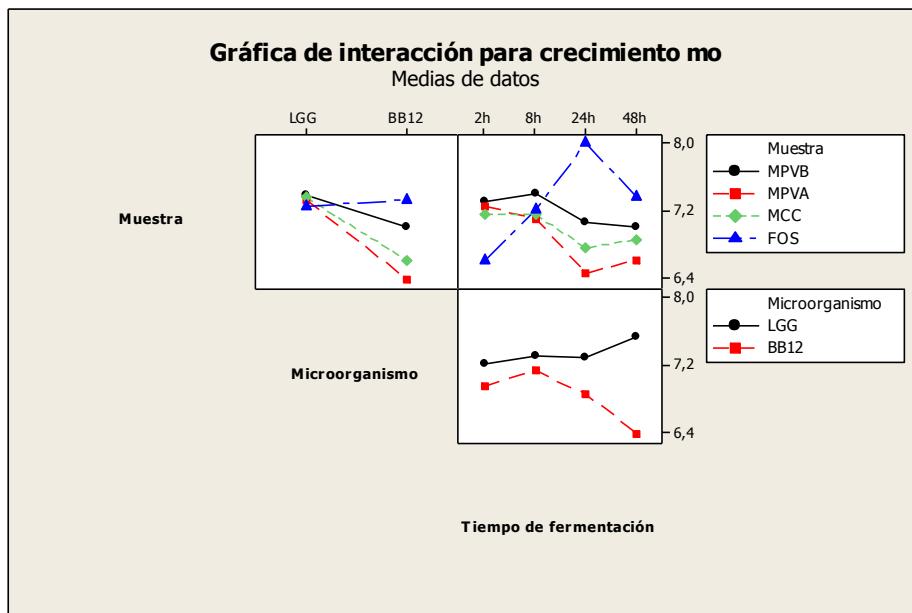


Figura 4. Interacción dobles de factores de estudio en el crecimiento de BB12 y LGG

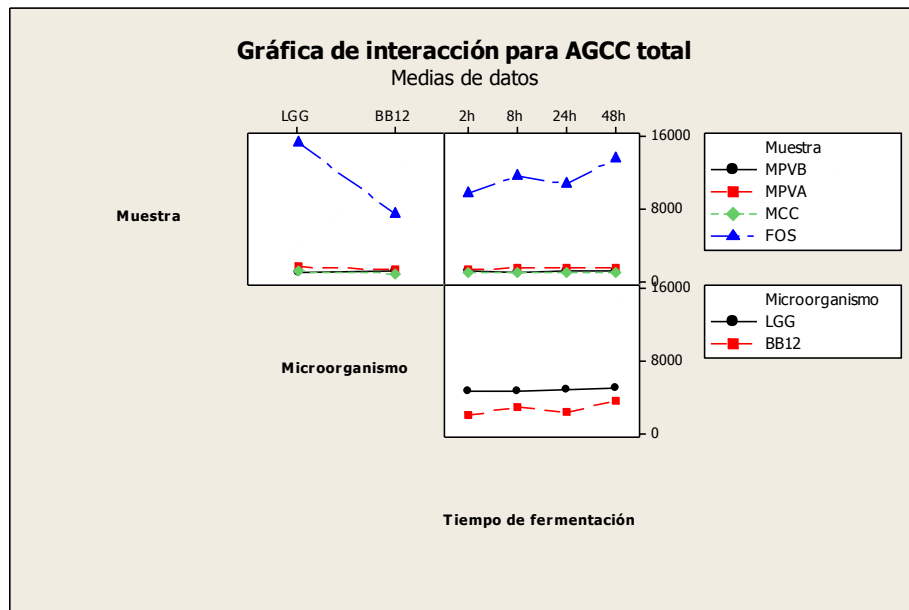


Figura 5. Interacción dobles de factores de estudio la producción de AGCC

SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO E LACTOSE POR ADSORÇÃO EM HIDROXIAPATITA SEGUIDO DE FILTRAÇÃO À VÁCUO

Monteiro, A. A.¹; Falkoski, D. L.¹; Costa, A. R.¹; Garcia, N. H.¹; Brandão, S. C. C.¹; Carvalho, A. F.¹; Rezende, S. T.¹; Coimbra, J. S. R. C.¹

¹Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

1.INTRODUÇÃO

O soro de leite apresenta composição variada, sendo afetada pelo tipo de queijo do qual se origina, pelo tipo de processamento e manuseio dentro da indústria. Sua composição média é: 0,9% de proteínas, 4,9% de lactose, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura e 93,3% de água (SANTANA et al, 2005). Os componentes do soro, se isolados, podem ser usados na indústria de alimentos, conferindo aos produtos elevado valor agregado, podendo também ser utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e áreas médicas. O desenvolvimento de estratégias de mercado e o advento de novas tecnologias têm permitido aproveitar melhor o soro nos processos industriais, como matéria prima de formulações, na concentração e na separação de seus componentes (ROSSANO et al., 2001). Nos últimos anos houve um interesse crescente em suplementos alimentares de alta qualidade oriundos de proteínas do soro de leite. As proteínas do soro possuem propriedades físico-químicas de grande interesse tecnológico como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante, capacidade espumante e gelificante, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis. Em biotecnologia, proteínas como a α -lactalbumina, vêm sendo estudadas e aplicadas como nanotubos protéicos, melhorando propriedades sensoriais e aceitação de novos produtos alimentícios. Os nanotubos de proteínas também podem ser aplicados no encapsulamento de produtos farmacêuticos, embalagens, e na formação de mini géis transparentes (IPSEN et al, 2007). Dentre os diversos processos descritos na literatura, a cromatografia de adsorção em hidroxiapatita (HA) apresenta-se como um método alternativo e de baixo custo com potencial para separar as proteínas do soro de leite. A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio pertencente à família de apatitas com fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Ca}(\text{OH})_2$. O tampão fosfato de sódio e de potássio em pH próximo do neutro são utilizados como eluentes para a maioria das aplicações no fracionamento e purificação de vários compostos biológicos por cromatografia em hidroxiapatita (GAGNON, 2009). Rossano et al. (2001) utilizou o tampão fosfato na purificação das principais proteínas do soro de leite. Recentemente o cloreto de sódio também foi reportado nesta cromatografia para

a purificação de lactoferrina e lactoperoxidase (GAGNON, 2009; PAUL e YOSHITAKE, 2010). Outros métodos de purificação incluem interações hidrofóbicas, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão molecular e ultrafiltração (TOMITA et al., 2002; WOLMAN et al., 2007). Em escala industrial a membrana de ultrafiltração e diafiltração é usada na separação e purificação de proteínas. Experimento realizado por Vogt (1997) evidenciou o melhor desempenho da cromatografia de troca aniônica comparada à cromatografia de adsorção em HA, porém tem elevado custo e necessita de equipamento mais sofisticado. Neste trabalho, objetivou-se sintetizar hidroxiapatita e estudar um método de separação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (que representam 70% do total das proteínas do soro de leite) utilizando adsorção seguida de filtração à vácuo, deixando o método com o custo mais baixo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Preparação do soro

O soro de leite utilizado foi obtido a partir da fabricação de queijo Minas Frescal. O soro foi centrifugado a $12000 \times g$ (Beckman J2-MI, USA), por 10 minutos, sob refrigeração (4°C) para a separação de gorduras (sobrenadante) e resíduos de paracaseinatos (decantado). Em seguida, o pH do soro foi ajustado para 5,0, com ácido láctico. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) e o índice de lactose foi determinado pelo método do DNS descrito por Miller (1959).

2.2.Preparação da hidroxiapatita

A HA foi preparada conforme metodologia proposta por Tiselius et al, (1958), adaptada por Rossano et al (2001). Para a obtenção da HA, foram misturados em um béquer contendo 50 mL de NaCl 1 mol/L, 500 mL de solução aquosa de CaCl_2 0,5 mol/L e 500 mL de solução aquosa de Na_2HPO_4 0,5 mol/L em um fluxo de 250 mL/h, sob agitação a 210 rpm. O precipitado leitoso formado foi lavado duas vezes com água destilada, e adicionados de 25 mL de NaOH 40% (m/v). A mistura foi aquecida até iniciar a fervura, sob agitação a 100 rpm, por 1 hora. O precipitado formado foi decantado e lavado três vezes com água destilada. Foram obtidos cerca de 80 g de HA úmida, correspondendo a, aproximadamente, 25 g de material seco. A HA foi armazenada em solução de fosfato de sódio 10 mM sob refrigeração.

2.3. Determinação da natureza da hidroxiapatita

A HA foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho, difração de raio x (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para todas as análises, inicialmente, foi necessária a secagem da HA em estufa a 200 °C por 1 hora. Na determinação do espectro no infravermelho (PERKIN ELMER SPECTRUM 1000 - USA), a amostra foi preparada em pastilha de brometo de potássio (KBr), contendo 1% (m/m) da HA sólida. O teste de DRX foi realizado num difratômetro (Geigerflex D/Max - Rigaku) equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K α , $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$), com um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com uma diferença de potencial de 40 kV e uma corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo *step by step* em intervalo de 15 a 50° 2 θ com 0,05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. Os resultados obtidos dos difratogramas representados por meio de gráficos e análise descritiva não estão apresentados neste trabalho. A análise em MEV revelou as estruturas cristalográficas e a morfologia porosa da HA sintetizada, que favorecem a adsorção das proteínas. O microscópio usado foi MEV: LEO modelo VP, 1430 de voltagem e 20 kV de potência. A metalização: Balzers modelo FDV 010. Os resultados obtidos foram apresentados por meio de micrografias eletrônicas da HA.

2.4. Análise de eletroforese (SDS-PAGE)

A identificação das proteínas separadas pelo método utilizado foi realizada em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando o sistema Mini-Gel (Sigma Chemical Co). As amostras e os padrões de β -lactoglobulina, de α -lactoalbumina foram aplicados no gel e as corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 100 V por duas horas. As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al. (1987).

2.5 Separação das proteínas

Depois de sintetizada, a HA foi previamente equilibrada. Adicionou-se a 100 mL de HA, solução de HCl 0,5 mol·L⁻¹ até pH 5,0 e 100 mL de tampão fosfato de sódio 10 mol·L⁻¹ pH 5,0 (1), mantendo em repouso por 30 minutos. A mistura de HA e do tampão de equilíbrio obtida foi filtrada em papel (Whatman® 4) a vácuo na temperatura de 55 °C. A HA retida no papel de filtro foi transferida para um béquer e adicionada de 30 mL de soro de leite, permanecendo em repouso por 2 horas com leve agitação para maior interação entre a HA e os constituintes do soro. Para a eluição sequencial, em todas as etapas, houve adição de tampão, mantendo-se repouso com leve agitação por 30 min., seguido por filtração a vácuo a

55 °C. Os filtrados obtidos foram analisados para quantificação de proteína e lactose. Na primeira etapa, foram utilizados 50 mL de tampão fosfato de sódio $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,0 (1). O filtrado 1 obtido foi armazenado sob refrigeração. Em seguida, foram adicionados a HA, 50 mL do tampão (1) seguido de filtração a vácuo a 55 °C para retirada da lactose residual. O filtrado 1 e o filtrado 2 coletado foram analisados quanto ao teor de proteína e lactose. Na segunda etapa, foram utilizados 100 mL de tampão fosfato de sódio $400 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,0 (2). O filtrado 3 obtido foi coletado para análise de proteínas. Na terceira etapa, foram utilizados 100 mL de tampão fosfato de sódio $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,0 (3). O filtrado 4 obtido foi coletado para análise de proteína. Na quarta etapa, foram utilizados 100 mL de tampão fosfato de sódio $400 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,0 (4) e o filtrado 5 obtido foi coletado para análise de proteína. Na etapa final, foram utilizados 100 mL de tampão fosfato de sódio $400 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0 (5) a HA e o filtrado 6 foi coletado para análise de proteínas. Em seguida, foram adicionados a HA, mais 100 mL do tampão (5) seguido de filtração a vácuo a 55 °C para retirada das proteínas residuais. Foram realizadas análises de eletroforese em gel de poliácridamida dos filtrados 3, 5 e 6 para confirmação da separação das proteínas. A quantificação das proteínas foi feita em triplicata.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A HA sintetizada foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho, por difração de raio X e pela microscopia eletrônica de varredura para a caracterização da natureza da hidroxiapatita. A Figura 1 mostra o resultado da espectroscopia de infravermelho, usada para identificar os grupos funcionais presentes na HA sintetizada, que foram comparados com a HA padrão (HAP-91 JHS Biomateriais). A HA sintetizada apresentou espectros com bandas referentes a grupos da hidroxiapatita padrão em: 474 cm^{-1} , $(561 - 573) \text{ cm}^{-1}$, $(959 - 963) \text{ cm}^{-1}$, e $(1045 - 1092) \text{ cm}^{-1}$ que são características do grupo fosfato PO_4^{3-} e 890 cm^{-1} e 1104 cm^{-1} referentes a P-OH. A banda larga observada em torno de 3600 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação OH da HA. A análise descritiva por difração por raio x ajudou na elucidação das propriedades cristalográficas. A HA é um fosfato de cálcio que se cristaliza no sistema hexagonal com parâmetros de rede *a* e *b* com mesmo valor igual a $9,41 \text{ \AA}$ e *c* igual $6,875 \text{ \AA}$, o que gera picos característicos aos diversos planos atômicos dentro de sua estrutura (MARTINEZ, 2008). A Figura 2 apresenta micrografias eletrônica de varredura das estruturas cristalográficas e a morfologia porosa da HA sintetizada que colaboram para que ela tenha uma boa capacidade como adsorvente de proteínas.

4. ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS

A eluição com tampão (1) resultou em 97% de recuperação de lactose. Das proteínas que adsorveram a HA, 23,0% foram recuperadas quando eluídas com tampão (2) predominando α -lactoalbumina, 25,6% com o tampão (4) e 25,0% com tampão (5), ambos predominando a β -lactoglobulina, analisadas por eletroforese SDS – PAGE. Na Figura 3, podem ser observadas as bandas características das proteínas purificadas na análise de SDS-PAGE. Esses resultados estão em conformidade com o experimento realizado por Rossano et al. (2002). O Gráfico 1 apresenta a média e o desvio padrão da recuperação das proteínas do soro em HA seguida de filtração a vácuo em diferentes concentrações e valores de pH para os tampões nas eluições sequenciais das proteínas. Verificou-se com este método simples e alternativo a recuperação média de 73,6% das proteínas do soro.

5. CONCLUSÃO

A HA sintetizada neste trabalho, a partir de reações químicas com cloreto de cálcio, fosfato bibásico de sódio, hidróxido de sódio e cloreto de sódio, apresentou semelhanças estruturais com a HA padrão. Os estudos de adsorção com eluição sequencial, utilizando diferentes tampões, mostraram que a HA pode ser utilizada em substituição a outros materiais sólidos adsortivos que possuem elevados custo no mercado. A recuperação média das proteínas do soro foi de 73,6%, indicando que este método apresenta elevada capacidade para produzir isolados proteicos de soro de uma maneira simples e alternativa, de forma a facilitar sua disponibilidade no mercado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. v. 8, p. 93-99, 1987.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.
- Gagnon, P. Monoclonal antibody purification with hydroxyapatite. *New Biotechnology*. v.5, p.287, 2009.
- Ipsen, R.; Otte, J. Self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin. *Biotechnology Advances*. v. 25, p. 605, 2007.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680-685, 1970.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 31, p.426-428, 1959.

Paul K. N.; Yoshitake, T. Purification of lactoferrin using hydroxyapatite. *Journal of Chromatography B*, v.878, p. 976–980, 2010.

Rossano, R.; D’elia, A.; Riccio, P. One-Step Separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hidroxyapatite – A flexible procedure suitable for small – and médium – scale preparations. *Protein Expression and Purification*. v. 21, p. 165-169, 2001.

Santana, R.S.; Costa, S.A.; Abreu, C.A.M.; Albuquerque, S.S.M.C. Separação das proteínas do soro de queijo por adsorção utilizando hidroxiapatita e carvão ativado como adsorventes. *Revista de Laticínios “Cândido Tostes”*. v. 60, n.345, p. 239 - 242, 2005.

Tiselius, A.; Hjrtién, S.; Levin, O. Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. of Biochem. Biophys.* v. 65, p. 132 – 155, 1956.

Tomita, N.; Wakabayashi, H.; Yamauchi, K.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*. v. 80, p.109, 2002.

Vogt, S. Ruth, F. 1997. Comparison of anion – exchange and hydroxyl apatite displacement chromatography for the isolation of whey proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 760, p.125-137, 1997.

Wolman, F. J.; González Maglio, D.; Grasselli, M.; Cascone. One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*. v. 288, p. 132-138, 2007.

AGRADECIMENTOS:

A Capes, Cnpq E Fapemig pelo apoio financeiro.

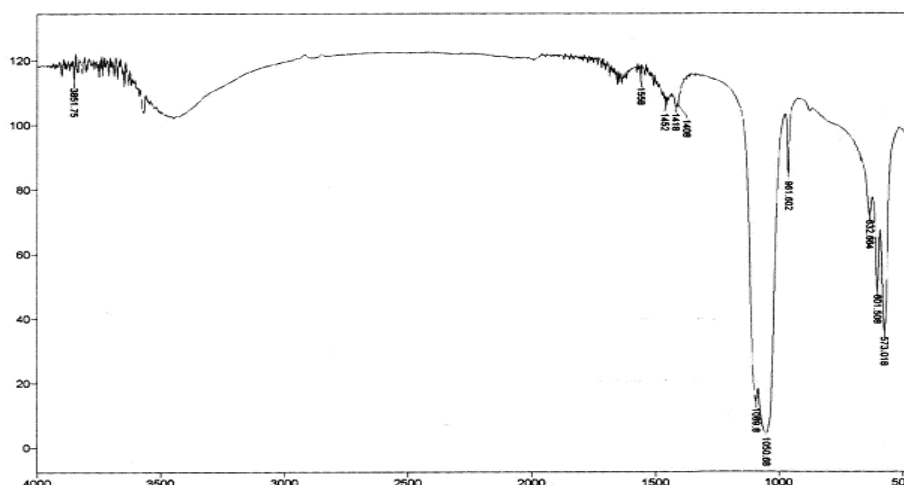


Figura 1: A HA sintetizada apresentou espectros com bandas em 474 cm^{-1} , $561 - 573\text{ cm}^{-1}$, $959-963\text{ cm}^{-1}$, e $1045 - 1092\text{ cm}^{-1}$ que são características do grupo fosfato PO_4^{3-} e as bandas 890 cm^{-1} e 1104 cm^{-1} referentes a P-OH. A banda larga observada em torno de 3600 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação OH.

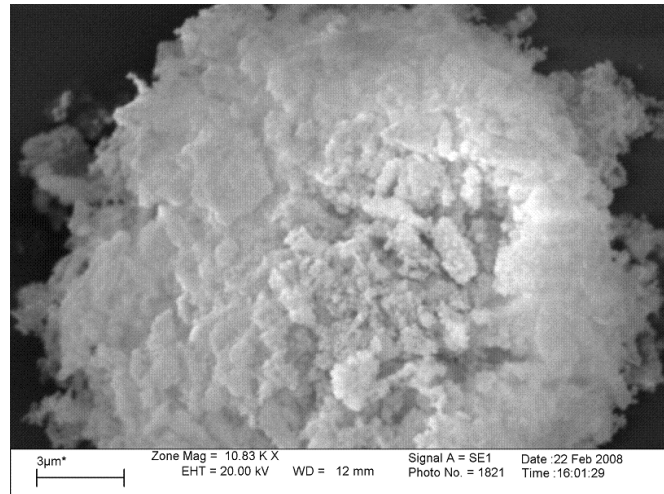


Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura de HA sintetizada. Visualização das estruturas cristalográficas e observação da matriz de HA.

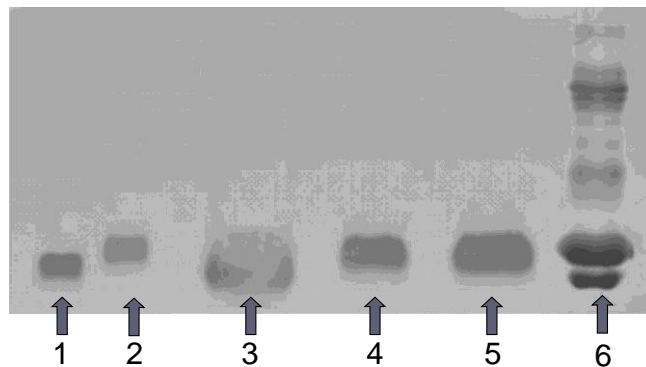
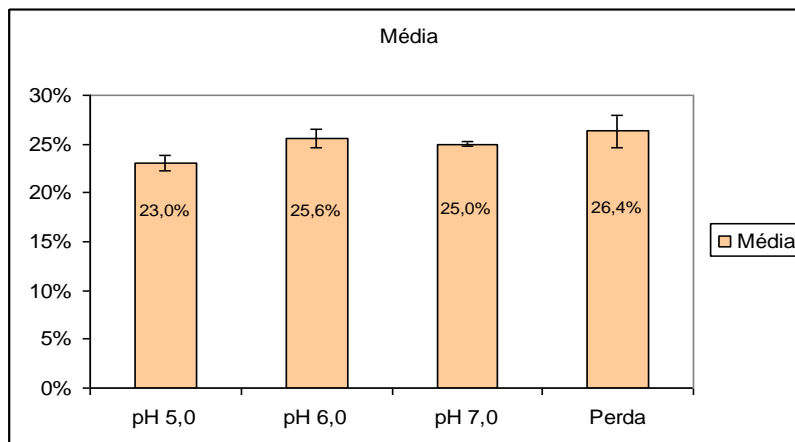


Figura 3: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas separadas por adsorção de em HA seguido de filtração a vácuo. 1 - Padrão de α -lactalbumina; 2 – Padrão de β -lactoglobulina; 3- Filtrado 400 mM, pH 5,0; 4 - Filtrado 400, mM pH 6,0; 5 - Filtrado 400 mM, pH 7,0; 6- Soro de leite.

Gráfico 1: Média e desvio padrão da recuperação das proteínas do soro em HA seguida defiltração a vácuo.



DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MEDIDA RÁPIDO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO EN GRASA DE LECHE

Antonio Fuertes¹, Ana Fuentes², Nicolás Laguarda-Miro¹, Isabel Fernández-Segovia², Miguel Alcañiz¹, Rafael Masot¹, José Manuel Barat².

- 1) Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Universitat Politècnica de València (UPV). Camí de Vera s/n, 46022 València, Spain.
- 2) Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n, 46022, València, Spain.

ABSTRACT

La determinación del contenido lipídico de la leche es de gran importancia ya que la cantidad en grasa de la leche fija el precio de referencia para los productores, es necesario para estandarizar la leche a los parámetros de referencia y además permite determinar si la leche cumple con los valores legales establecidos, entre otros aspectos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la aplicación de la Espectroscopía de Impedancia (EI) como técnica de medida rápida y no destructiva para determinar el contenido en grasa de leche de vaca. Para llevar a cabo el presente estudio se emplearon muestras de leche con diferente contenido lipídico, todas ellas pertenecientes a una misma marca comercial. Las muestras analizadas correspondieron a leches envasadas con 0, 0.25, 1, 1.5, 2 y 3.6% de grasa, según indicaba el etiquetado del producto. Se analizó la composición centesimal de las muestras de estudio (humedad, grasa, proteína y cenizas). Asimismo se realizaron lecturas de EI empleando dos equipos de medida distintos (*FRA* (Frequency Response Analyser) y *AVISA* (Advanced Voltammetry and Impedance Spectroscopy Analyser) diseñados por *Group of Electronic Development and Printed Sensors* de la UPV) y dos electrodos de medida diferentes (“Electrodo de aguja” (A) y “Electro Doble” (ED)). Los resultados obtenidos mostraron que la EI utilizando el ED fue el sistema que mejor correlaciones ofreció con el contenido lipídico de la leche. Estos resultados muestran el potencial de esta técnica como alternativa a las determinaciones analíticas tradicionales.

1. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento fundamental en el desarrollo humano, no solamente por ser la leche materna fuente nutricional de los recién nacidos sino porque ya de adultos leche y los productos lácteos siguen formando parte de nuestra dieta habitual. La leche está formada por agua, grasas, azúcares, proteínas, así como minerales y vitaminas esenciales. Entre los diferentes nutrientes que componen la leche la grasa es uno de los más importantes. La determinación del contenido lipídico de la leche es de gran importancia ya que la cantidad en grasa de la leche fija el precio de referencia para los productores, es necesario para estandarizar la leche a los parámetros de referencia y además permite determinar si la leche cumple con los valores legales establecidos, entre otros aspectos.

En la actualidad, las metodologías empleadas para determinar la composición de los alimentarios son técnicas en general, costosas, lentas y exigen de personal altamente cualificado. Sin embargo, la industria demanda metodologías más rápidas y sencillas, de naturaleza no-destruktiva y que permitan un control on-line del producto a lo largo de la cadena de producción y comercialización. Atendiendo a estas demandas, la investigación centrada en el desarrollo de técnicas de medida rápidas, supone una de las líneas científicas con más futuro en el área de la tecnología de los alimentos. En este sentido, numerosos estudios se han centrado en el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos capaces de sustituir a las técnicas analíticas convencionales. Entre este tipo de sensores electroquímicos, destacan aquellos basados en la Espectroscopía de Impedancia. Comparado con otras metodologías de análisis, la espectroscopía de impedancia es una técnica de bajo coste, simple y no destructiva. Mediante esta técnica, la señal aplicada a las muestras permite obtener información sobre cambios estructurales y de composición de los productos que van a ser evaluados.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la aplicación de la espectroscopía de impedancia como técnica de medida rápida y no destructiva para determinar el contenido en grasa de leche de vaca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras analizadas

Para llevar a cabo el presente estudio se emplearon muestras comerciales de leche fresca con diferente contenido lipídico. Las muestras analizadas correspondieron a leche pasteurizada de una misma marca comercial y con contenido un contenido en grasa diferente (0, 0.25, 1, 1.5, 2 y 3.6%) según indicaba el etiquetado del producto. Las muestras se adquirieron en un supermercado de la ciudad de Valencia donde se encontraban en condiciones de refrigeración, una vez en el laboratorio estas muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de análisis. Las muestras fueron analizadas en mismo día de compra.

Para cada tipo de muestra se emplearon 4 lotes diferentes, de manera que cada día de muestreo se analizaba un lote por tipo de muestra, lo que correspondió a 4 días de muestreo en total. Cada día de muestreo se analizaban los 6 tipos de muestra, realizándose todos los ensayos por triplicado.

2.2. Análisis de la composición centesimal

Se analizó la composición centesimal de los diferentes tipos de leche, determinándose el contenido en humedad, grasa, proteína y cenizas azúcares de todas las muestras de estudio.

El contenido en humedad de la leche se llevó a cabo por desecación en estufa a 102±1 °C hasta peso constante (AOAC, 1997). El contenido lipídico se determinó por el método Gerber (Norma ISO 2446:2008 (ISO, 2008)). La concentración en proteínas se midió mediante el procedimiento kjedahl, tal como se describe el método IFL-20 de la Federación Internacional de lechería (recogido en los Métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, cereales y derivados, productos lácteos y productos derivados de la uva (BOE, 1977)). La cenizas se determinaron por calcinación a 550 °C durante 2-3 h (AOAC, 1997).

2.3. Medidas de Espectroscopía de Impedancia

Se llevaron a cabo lecturas de EI empleando dos equipos de medida distintos: *FRA* (Frequency Response Analyser) y *AVISA* (Advanced Voltmetry and Impedance Spectroscopy Analyser) ambos diseñados por *Group of Electronic Development and Printed Sensors* de la Universitat Politècnica de València (UPV) (Alcañiz, 2010; Masot, 2008). En el presente trabajo se emplearon también dos sensores de características diferentes, de forma que se utilizó un electrodo de aguja (A) con el equipo *FRA*, mientras que las medidas con el sistema *AVISA* se llevaron a cabo mediante un electrodo doble (ED).

El electrodo de aguja (A) consiste en una aguja coaxial TECAN 53156 (Oxford - FEDELEC) que es comercializada habitualmente para su aplicación en técnicas

electromiográficas. Esta aguja se encuentra seccionada con un ángulo de 15°, y presenta una dimensiones de 75 mm de longitud, 0.46 mm de diámetro del electrodo interno y área efectiva de 0.07 mm². La parte externa de la aguja, de acero inoxidable, actúa como electrodo exterior o de referencia y la parte interna, del mismo material, actúa como electrodo interno o de trabajo. Entre los dos electrodos hay un material dieléctrico, una resina epoxi. El electrodo doble (ED) fue diseñado, al igual que los sistemas electrónicos de medida, por el mismo grupo de investigación de la UPV. Este sensor se compone de dos agujas paralelas de acero inoxidable de 1.5 cm de longitud y 1 mm de diámetro, separadas por una distancia de 1 cm y embutidas en una estructura no conductiva, lo que permite mantener la separación entre las agujas constante durante las medidas.

Para la realización de las medidas de EI se tomaron 3 muestras por cada uno de los envases de leche analizados, realizando las medidas sobre cada una de estas muestras por triplicado. Para ello se introdujeron 40 mL de leche en frascos estériles de polipropileno, se dejaron atemperar hasta alcanzar temperatura ambiente y agitaron durante 5 min en un agitador magnético para asegurar la correcta homogenización de la muestra. Inmediatamente se llevaron a cabo las medidas de EI agitando de nuevo entre las medidas efectuadas con ambos sistemas electrónicos.

2.4. Análisis estadístico

Para evaluar las posibles diferencias respecto a la composición nutricional de las muestras evaluadas se realizó un ANOVA simple para cada uno de los nutrientes analizados. Para ello se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

Por otro lado, con objeto de evaluar la capacidad de los sistemas de EI para determinar el contenido lipídico de la leche, se emplearon modelos estadísticos de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). El PLS maximiza la correlación entre variables independientes y variables dependientes. Los modelos de predicción PLS fueron creados usando un set de datos experimentales (set de calibración). El modelo fue validado con un nuevo set de datos experimentales (set de validación). Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa SOLO[®] (Eigenvector Research, Inc.).

3.- RESULTADOS

3.1.- Composición nutricional de las muestras de leche

Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones analíticas mostraron que los valores de composición de las leches analizadas correspondían con los dados en la información nutricional que aparece en el envase del producto. No se observaron diferencias en los valores de proteínas, y cenizas entre las diferentes muestras analizadas (datos no mostrados). Tal y como cabría esperar, las diferencias entre muestras radicaron en su contenido lipídico (Figura 1). Estas diferencias también fueron observadas en el contenido en humedad de las muestras, debido a que ambos parámetros están inversamente correlacionados; de esta forma, las muestras de leche con mayor contenido lipídico son las que presentaron un menor contenido en humedad.

3.2. Espectroscopía de impedancia

El análisis de las medidas generadas por los sistemas de espectroscopía de impedancia mostró una clara ordenación de la respuesta óhmica en función del contenido de grasa de la leche, tal como se observa en la figura 2. En este sentido, cuanto mayor era el contenido lipídico de las muestras evaluadas mayores fueron los valores del módulo de la impedancia, lo que indicaría una mayor resistencia al paso de la corriente eléctrica de la muestra. Estos resultados son los que cabrían esperar ya que la medida de la impedancia nos indica la resistencia que un cuerpo opone al paso de la corriente eléctrica.

El equipo de EI genera un total de 100 variables eléctricas (50 valores de módulo y 50 valores de fase). Debido al elevado número de variables generadas, es necesario emplear técnicas estadísticas multivariantes que permitan procesar toda la información generada y correlacionarla con los parámetros que se desea predecir. Es por ello, que la información obtenida por el equipo de EI se analizó mediante la técnica de modelos de mínimos cuadrados parciales (PLS). Mediante esta herramienta estadística se elaboraron modelos predictivos que permitieran determinar el contenido lipídico real de la leche en función de su respuesta eléctrica. Se elaboraron modelos para los dos sistemas de medida estudiados (FRA y AVISA). Los valores en estos análisis PLS para cada uno de estos sistemas se muestran en las figuras 3 y 4.

El análisis PLS con el sistema FRA-electrodo de aguja mostró valores de R^2 más bajos que el obtenido para el sistema AVISA-electrodo doble. Se puede observar también como el alto valor obtenido de R^2 , superior a 0.9, para el sistema AVISA puede considerarse especialmente satisfactorio. De igual modo, el valor obtenido para el error de predicción

(RMSEP) para el sistema AVISA-electrodo doble fue sustancialmente mejor que en el caso del sistema FRA, lo que nos indicaría que este sistema es más adecuado para la determinación del contenido lipídico de la leche.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que el sistema de espectroscopía de impedancia desarrollado por el grupo de investigación de la UPV es una herramienta útil para cuantificar el contenido en grasa de la leche, siendo este sistema especialmente adecuado cuando se emplea un sensor de medida con una mayor separación entre electrodos. Éste método podría presentarse como una alternativa viable a los procedimientos tradicionales de análisis en el laboratorio para la cuantificación del contenido en grasa. Esto es debido a que el sistema desarrollado en la UPV es de fácil uso y permite una respuesta rápida a un bajo coste, lo que supondría importantes beneficios para la industria láctea.

5. REFERENCIAS

- A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- Alcañiz Fillol, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ámbito agroalimentario. Doctoral Thesis, Universitat Politècnica de València pp 295 (<http://hdl.handle.net/10251/11303>).
- BOE (1977). Orden de 31 de enero de 1977 por la que se establecen los Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas, Cereales y Derivados, Productos Lácteos y Productos Derivados de la Uva.
- ISO (2008). Norma ISO 2446:2008 (IDF 226: 2008): “Leche – Determinación del contenido de grasa”.
- Masot Peris, R. (2010). Desarrollo de un sistema de medida basado en espectroscopía de impedancia para la determinación de parámetros fisicoquímicos en alimentos. Doctoral Thesis. Universitat Politècnica de València (2010), pp 214 (<http://riunet.upv.es/handle/10251/8502>).

FIGURAS

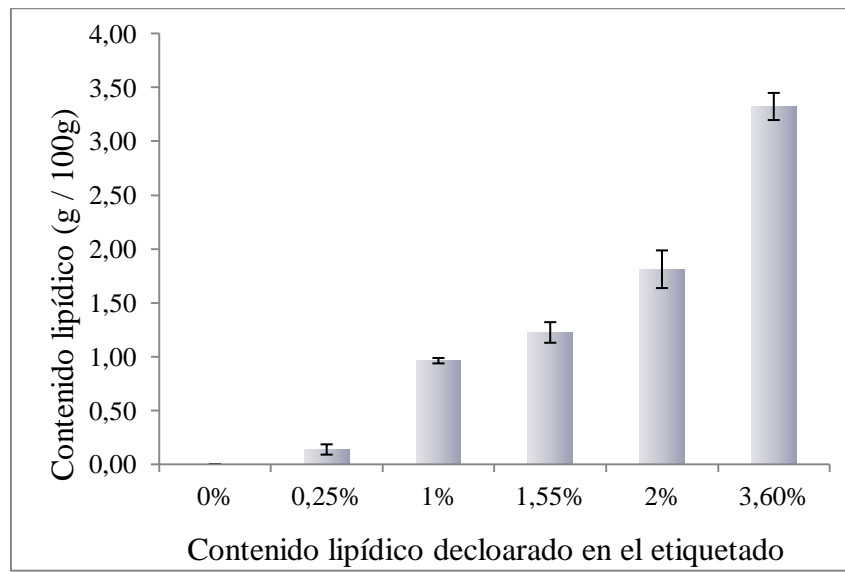


Figura 1. Contenido graso para los diferentes tipos de muestras evaluadas.

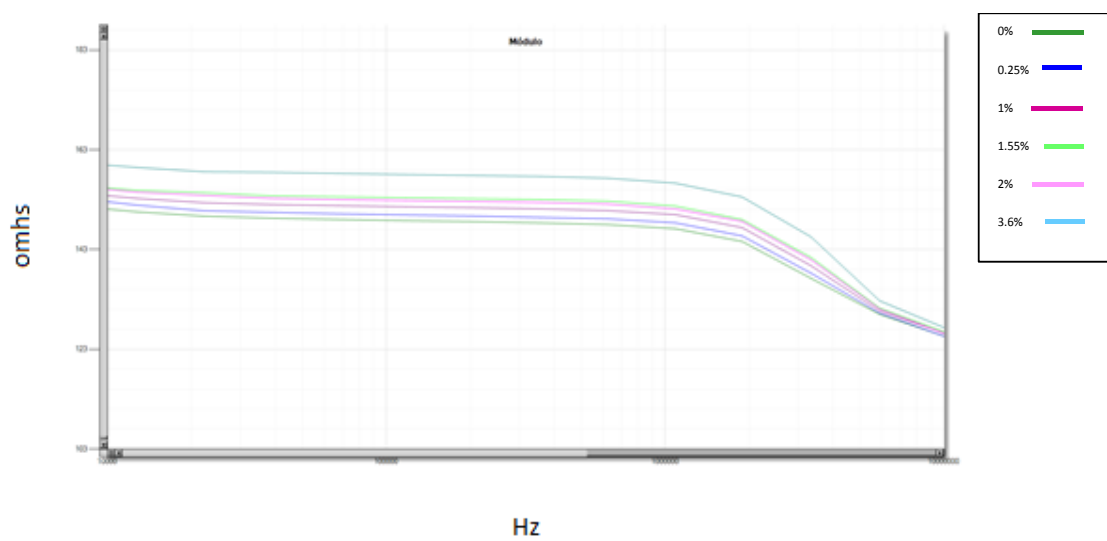


Figura 2. Valores de módulo (ohms) de impedancias en las muestras de leche fresca.

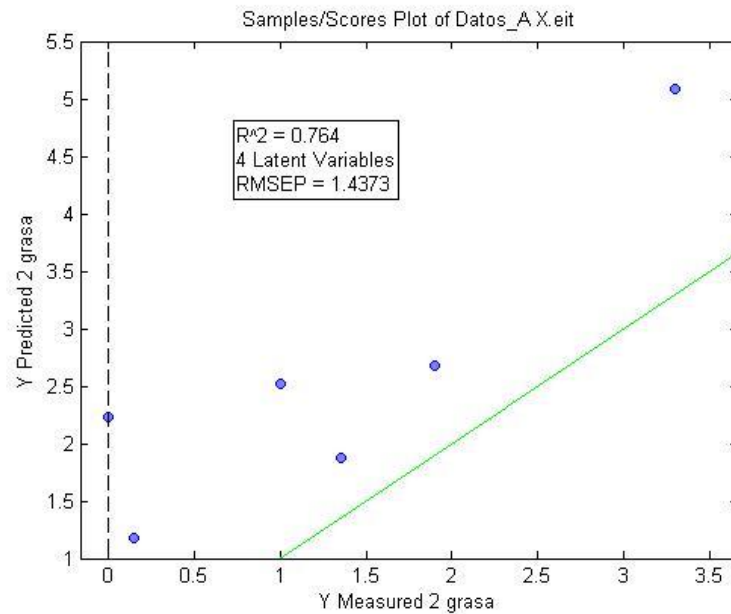


Figura 3. Análisis PLS para la predicción del contenido de grasa a partir de los valores de impedancia generados por el sistema FRA y electrodo de aguja.

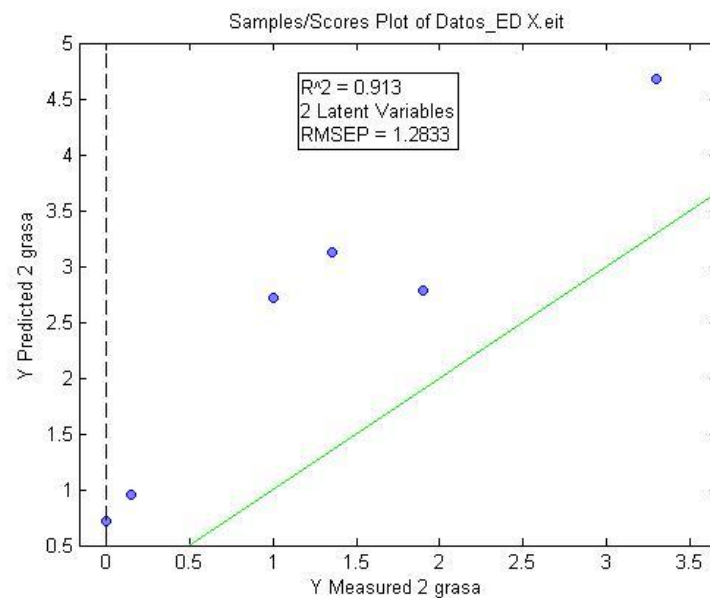


Figura 4. Análisis PLS para la predicción del contenido de grasa a partir de los valores de impedancia generados por el sistema AVISA y electrodo doble.

INFLUENCIA DEL CUCHILLO Y TIPO DE LAVADO EN LA TRANSFERENCIA DE LA CONTAMINACIÓN POR *Escherichia coli* Y *Listeria innocua*

E. Doménech⁽¹⁾, S. Botella⁽²⁾, MA. Ferrús⁽²⁾, I. Escribe⁽¹⁾

⁽¹⁾Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

⁽²⁾Departamento de Biotecnología. Centro Avanzado de Microbiología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

INTRODUCCIÓN

La contaminación cruzada se define como la transferencia, directa o indirecta, de las bacterias o virus de un producto contaminado a un producto no contaminado. Este efecto se ve favorecido por la adhesión de los microorganismos en general a las superficies, que a su vez está influenciado por varios factores que dependen de la estructura y características fisiológicas de la célula, naturaleza y temperatura del fluido en el cual está suspendido y las propiedades físicas y químicas del material en contacto, como son la geometría, porosidad, rugosidad, composición e hidrofobicidad (Foschino et al., 2003; Dawson et al., 2006).

En la actualidad, los alimentos preparados y consumidos en el hogar constituyen alrededor del 87% de los brotes transmitidos por los alimentos, de los cuales un 25% se relaciona con prácticas de higiene deficientes (Martinez, 2008). Los brotes transmitidos por alimentos están estrechamente relacionados con casos de contaminación cruzada que implican las prácticas de higiene deficientes, equipos contaminados, la contaminación a través de los manipuladores de alimentos, procesamiento o almacenamiento inadecuados (Carrasco et al., 2011). En el mismo sentido, varios autores han señalado que la contaminación cruzada de patógenos bacterianos y virales en los hogares y en los establecimientos de servicio de alimentos, son uno de los principales factores causantes de enfermedades transmitidas por alimentos esporádicos y epidémicos (Pérez-Rodríguez et al., 2008).

Estudios recientes demuestran que diversas bacterias, entre las que se incluye *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, sobreviven durante horas o días, tanto en manos, esponjas, paños, como en utensilios, tras el contacto inicial con los microorganismos. En este sentido, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la transferencia de ambas bacterias a dos tipos de cuchillo y analizar la efectividad del lavado a chorro de agua y con estropajo y jabón.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Cepa bacteriana. Para la realización del presente estudio se empleó una cepa de *Escherichia coli* 515 y una cepa de *Listeria innocua*, ambas procedentes de la colección del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia. Para su mantenimiento se utilizó Endo Agar para *E. coli* y Palcam Agar para *L. innocua*.

- Preparación de los inóculos. El inóculo de cada cepa bacteriana se preparó realizando una emulsión en 10mL de Caldo nutritivo para *E. coli* y en caldo Fraser para *L. innocua* en cultivo de noche el día previo al análisis. Se incubó a 37°C durante menos de 24h. La concentración del inóculo se valoró por recuento en Endo Agar y Plate Count Agar para *E. coli* y en Palcam Agar y Plate Count Agar para *L. innocua*. Se sembró por duplicado, mediante alícuotas de 0,1mL en cada placa, procedente de las diluciones decimales seriadas realizadas a los inóculos en tubos de 9mL de agua destilada estéril. Se utilizaron dos medios de cultivo diferentes para valorar la concentración del inóculo, ya que se quería observar que el medio no interfería en el resultado del recuento.

- Determinación de *E. coli* y *L. innocua* en la pechuga de pollo inoculada. La inoculación se realizó en un recipiente con 990mL de PBS y 10mL de inóculo a los que se le añadió los trozos de pechuga cortados de 10g cada uno. Tras mantenerlos en inmersión durante 10 minutos, se siguió el protocolo utilizado en el laboratorio para el recuento de en alimentos. Se tomaron 10g de pechuga de pollo inoculada y se homogenizó con 90mL de Agua de Peptona estéril en una bolsa de Stomacher durante 1minuto. Se utilizó 1mL de la solución homogeneizada para preparar diluciones decimales seriadas en tubos de 9mL de agua destilada estéril, y se sembraron por triplicado 0,1mL de las diluciones en placas de Endo Agar para el recuento de *E. coli* y en Palcam Agar para *L. innocua*. La lectura de los recuentos se realizó tras el periodo de incubación a 37°C±1°C durante 24h±2h.

- Escenarios ensayados. Se han estudiado tres escenarios distintos:

a) Sin lavado. Se realizó un primer experimento en el que se cortó la pechuga con dos tipos de cuchillo: liso (C1) y de sierra (C2) para determinar la transferencia directa de la pechuga a ambos utensilios. Dichos cuchillos se introdujeron en una bolsa de Stomacher con 90mL de Agua de Peptona estéril para analizar la carga. Las bolsas de Stomacher se homogeneizaron durante 1minuto y posteriormente se procedió al análisis de diluciones decimales seriadas en tubos de 9mL de agua destilada estéril. De cada una de estas diluciones, se sembraron por duplicado 0,1mL en placas de Endo Agar y Palcam Agar. Transcurrido el periodo de

incubación a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h}\pm 2\text{h}$ se procedió a la lectura. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

b) Lavado de los cuchillos bajo chorro de agua. La metodología empleada en este escenario es la misma que la descrita en el apartado anterior, salvo que una vez terminado el proceso de cortado de la pechuga, los cuchillos se sometieron a un lavado con agua.

c) Lavado de los cuchillos con jabón y estropajo. En este caso los cuchillos son analizados después de ser lavados con estropajo y jabón.

- Análisis estadístico. El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa Statgraphics Centurión XVI, a través del análisis ANOVA simple para determinar el nivel de significación de los resultados obtenidos. Se utilizó la caja-bigotes para comparar las pautas de variabilidad existentes entre los distintos conjuntos de datos obtenidos de los análisis llevados a cabo en las diferentes pruebas.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los valores de transferencia de *L. innocua* de la pechuga al cuchillo liso y al de sierra en los tres escenarios estudiados. Como es lógico pensar el caso más desfavorable es cuando el cuchillo no se lava. En el cuchillo liso, destaca que se produce una elevada reducción de la contaminación en las experiencias de lavado con agua y lavado con estropajo y jabón, pudiendo concluir que tienen prácticamente la misma eficacia ambos tipos de lavado. Esto puede deberse al hecho de que el filo sea una superficie lisa, lo que facilita el arrastre de los microorganismos.

En relación a la transferencia de la pechuga al cuchillo de sierra, se observa que en la experiencia sin lavado se retiene una cantidad de microorganismos muy cercana a 2×10^3 UFC/g. Tras el lavado con agua, los valores máximos son de 2×10^2 UFC/g, mientras que en la experiencia con lavado del cuchillo liso, los valores estaban por debajo de 10^2 UFC/g. Por lo tanto, se puede afirmar que cuando la cuchilla es dentada, el lavado es menos eficaz. Por último, cuando se comparan el lavado con agua y con estropajo y jabón, el resultado indica que en ambos casos se da una reducción de la contaminación, siendo del orden de una y dos unidades logarítmicas respectivamente, y por lo tanto, la eficacia de ambos tratamientos es muy semejante, siendo estadísticamente dos grupos homogéneos.

La tabla 1 muestra los porcentajes de transferencia del *L. innocua* de la pechuga a los dos tipos de cuchillo, teniendo en cuenta los distintos escenarios estudiados. En ambos tipos

de cuchillo los valores de transferencia son parecidos, aunque se observa que el cuchillo liso arrastra mejor la carga pero también la cede más fácilmente con el lavado, en cambio el cuchillo con sierra arrastra menos de la pechuga pero en cambio retiene más, siendo menos efectivo el lavado con agua. En ambos casos, el lavado con estropajo y jabón es totalmente efectivo.

La figura 2 muestra los resultados de la transferencia de *E. coli* de la pechuga al cuchillo y la efectividad de los lavados. En la experiencia con el cuchillo liso al tratarse de una superficie totalmente lisa, los microorganismos se arrastran mejor y el lavado con agua es igual de efectivo que el lavado con jabón, no habiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos (p-valor=0,2174).

Los resultados con el cuchillo de sierra indican que los microorganismos se adhieren mejor y es más difícil eliminarlos, lo que indica que se necesita la ayuda de un estropajo que permita el arrastre para que el lavado sea efectivo. De hecho, no existen diferencias significativas entre el cuchillo sin tratar y el lavado a chorro de agua (p-valor=0,5012).

La tabla 2 muestra los coeficientes de transferencia de la pechuga contaminada con *E. coli* a los distintos tipos de cuchillos. Como puede observarse con este tipo de bacteria, el lavado con agua si es efectivo con el cuchillo liso. Por otra parte, se repite la pauta de que el cuchillo de sierra arrastra menos carga, pero presenta el inconveniente que también la retiene más y se debe realizar un lavado más exhaustivo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el lavado constituye un paso esencial para garantizar la seguridad del consumidor y reducir en dos unidades logarítmicas la carga que pudiera estar presente en las superficies de contacto debido a pequeñas desviaciones en el control de la cadena alimentaria. Como es lógico esperar, el proceso de lavado con estropajo y jabón es el más efectivo, ya que se reduce prácticamente la totalidad de microorganismos existentes en todos los casos estudiados.

La diferencia entre ambas bacterias ha sido muy poca, quizás destacar unos coeficientes de transferencia un poco mayores en el caso de *L. innocua*. Por otra parte, el cuchillo liso permite un mejor lavado, pero también presenta un mayor coeficiente de transferencia al cortar un producto contaminado, en este caso pechuga. Mientras que en el cuchillo de sierra se contamina menos con el corte, pero retiene mejor la carga dificultando su lavado.

El estudio ha demostrado que el consumidor tiene un papel esencial en la reducción de la contaminación cruzada y que no se deben escatimar esfuerzos en su formación y sensibilización, ya que no sólo deben realizar tareas de limpieza, sino que éstas además deben efectuarse de manera correcta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado dentro del marco del proyecto (PAID-06-10-2287) financiado por la Universidad Politécnica de Valencia a la cual los autores agradecen su apoyo.

BIBLIOGRAFÍA

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., García-Gimeno, R.M^a., 2011. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45, 545-556.

Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C., Simmons, L., 2006. Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella typhimurium* from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.

Foschino, R., Picozzi, C., Civardi A., Bandini, M., Faroldi, P., 2003. Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *Journal of Food Engineering* 60 (2003), 375-381.

Martínez, EV. Varela, MC. Cevallos, C. Hernández-Pezzi, G. Torres, A. Ordóñez P. 2008. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). *Boletín epidemiológico*, Vol. 16 (21), 241-252.

Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M^a., Zurera, G., 2008. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19, 131-144.

TABLAS Y FIGURAS

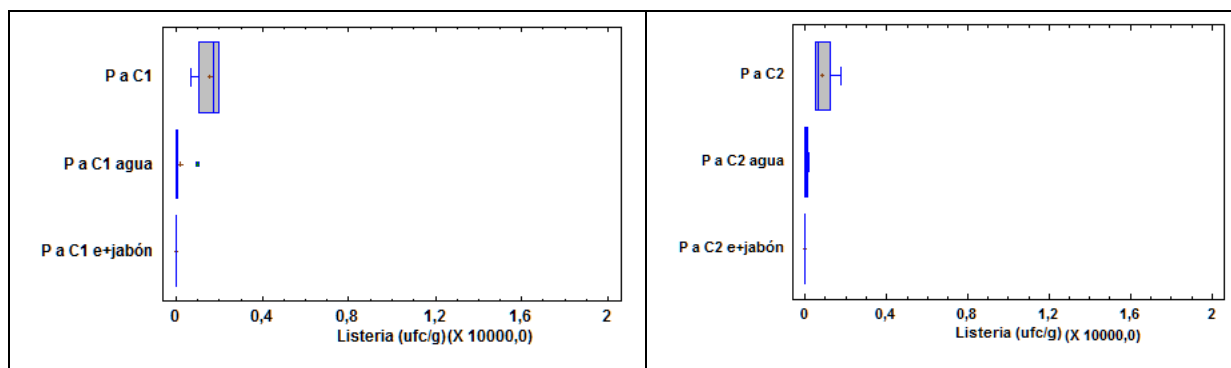


Figura 1: Gráfico de cajas y bigotes sobre la transferencia de *L. innocua* de la pechuga al cuchillo liso y sierra y la reducción con los distintos tipos de lavado.

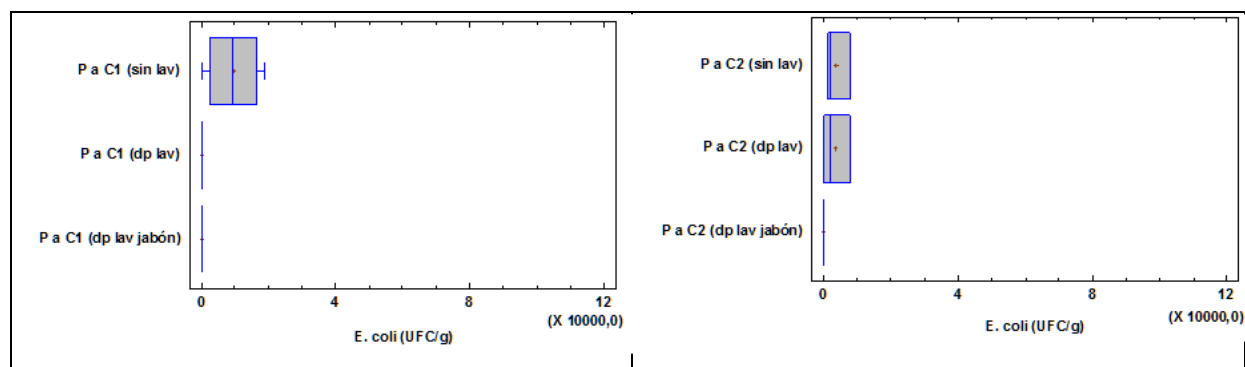


Figura 2: Gráfico de cajas y bigotes sobre la transferencia de *E. coli* de la pechuga al cuchillo liso y sierra y la reducción con los distintos tipos de lavado.

Tabla 1: Porcentajes medios \pm el error estándar de los coeficientes de transferencia de *L. innocua* presente en la pechuga al cuchillo liso (C1) y al cuchillo sierra (C2).

Cuchillo	Sin Lavado	Lavado con agua	Lavado con jabón
Liso	66,78 \pm 7,16	31,73 \pm 24,38	0
Sierra	61,50 \pm 7,16	34,07 \pm 16,35	0

Tabla 2: Porcentajes medios \pm el error estándar de los coeficientes de transferencia de la pechuga contaminada con *E. coli* al cuchillo liso (C1) y al cuchillo sierra (C2).

Cuchillo	Sin Lavado	Lavado con agua	Lavado con jabón
Liso	68,62% \pm 5,59	0	0
Sierra	60,12% \pm 5,03	57,12 \pm 7,87	0

ANÁLISIS DE ANTRANILATO DE METILO EN MIELES ESPAÑOLAS DE NARANJO

M. Juan-Borrás; E. Doménech; A. Periche; I. Escriche

⁽¹⁾Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

INTRODUCCIÓN

La miel monofloral de naranjo es muy apreciada por los consumidores por su alta calidad y sus excelentes cualidades organolépticas. Su sabor característico es debido a la presencia de sustancias aromáticas (Kadar y col. 2011), entre las que destaca el antranilato de metilo ó 2-aminobenzoico (AM), presente únicamente en el néctar del azahar. Por esta razón, se propone como un compuesto indicador para distinguir la miel de naranjo de otros tipos de mieles y complementar con él la información proporcionada por el análisis polínico.

El análisis melisopalínológico o polínico, consistente en evaluar el porcentaje de polen de una determinada especie botánica presente en una miel, es el procedimiento de elección utilizado para la clasificación de mieles monoflorales. La regulación de la Comunidad Valenciana establece que la miel de naranjo debe contener un porcentaje de polen de *Citrus* spp no inferior al 10% (DOGV 2002). El principal problema que tiene la miel de azahar es que la producción de polen y néctar en el género citrus en ocasiones no es simultánea, es decir puede haber producción de néctar en la flor cuando aún no ha madurado la antera que produce el polen. En otras ocasiones las variedades son estériles, de manera que aunque la abeja liba el néctar de la flor del azahar, no se impregna de su polen y por lo tanto los recuentos de polen en estas mieles pueden llegar a ser muy bajos. Estas mieles muy pobres en polen de citrus son muchas veces, injustamente rechazadas, aun cuando por sus características sensoriales no haya duda de que se podrían clasificar como mies de azahar. Todo esto perjudica económicamente al productor de miel de naranjo y al sector de la miel.

Este hecho hace que sea muy interesante, desde el punto de vista industrial, poder llegar a diferenciar sin lugar a dudas y de manera rápida la miel de azahar del resto de mieles. En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar y correlacionar el contenido de antranilato de metilo y de polen en mieles de naranjo españolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de miel

En el presente trabajo se analizaron 27 muestras de miel de azahar del levante español proporcionadas directamente por apicultores.

Análisis melisopalinológico

El análisis melisopalinológico o polínico se llevó a cabo por personal experto del laboratorio de Control de Calidad de la miel del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universidad Politécnica de Valencia. Se siguió el procedimiento recomendado en los métodos de la Comisión Internacional (Bogdanov, (2002). El recuento del polen ($\times 400$ – 1200 aumentos) se realizó en un microscopio óptico (Zeiss Axio Imager, Göttingen, Germany) acoplado al software DpxView LE image y a una cámara digital DeltaPix. Se calculaba el porcentaje final del polen dominante (Saenz-Laín & Gómez-Ferreras, 2000) para garantizar la clasificación de las muestras como miel de naranjo.

Análisis de antranilato de metilo

El análisis del contenido de antranilato de metilo (AM) se llevó a cabo según Sesta et al. (2008) utilizando un LC Agilent 1120 Compact LC (Agilent Technologies, USA). Un HPLC Alliance 2695, con un 2996 photodiode array detector (Waters, USA) fue usado para corroborar los espectros de absorbancia. La Figura 1 muestra como ejemplo un espectro UV (máximo a 218 nm y 2 picos menos intensos a 245 and 334 nm) y un cromatograma (HPLC) de miel con el pico de AM identificado. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis fisicoquímicos y color

5-hydroxymethylfurfural (HMF) por HPLC y la humedad y la conductividad eléctrica se determinaron según “Harmonized Methods of the European Honey Commission” (Bogdanov, et al., 2002). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis estadístico

El ANOVA se realizó con el programa Statgraphics Centurion for Windows, utilizando el método de comparaciones múltiples LSD ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

Caracterización de las mieles

La Tabla 1 muestra los porcentajes de polen de *Citrus* spp, el contenido en antranilato de metilo (mg/kg), así como los valores correspondientes a la caracterización fisicoquímica: HMF, conductividad, humedad y color, en cada una de las muestras de miel analizadas.

El porcentaje de polen osciló entre 1 y 88 % con un valor promedio de 34 ± 21 . Del mismo modo, para el antranilato de metilo la dispersión encontrada fue muy amplia, con un valor mínimo de 0.5 y máximo de 4, siendo el valor medio de 2.11 ± 0.86 .

El HMF mostró un valor promedio relativamente bajo (5.8 mg / kg) con un mínimo de 0.7 mg/kg, aunque también se observó algún valor inesperadamente alto (16.5 y 25 mg/kg), probablemente debido a puntuales malas prácticas apícolas. Es de señalar que ninguna muestra supera el límite permitido de 40 mg/kg (Commission Decision, 2002), lo cual es lógico ya que se trata de mieles crudas.

Puesto que todas las muestras son miel de cítricos, la conductividad era bastante baja en relación a otras mieles monoflorales (Bogdanov et al., 2004), con un valor medio de 217 ± 7 mS.cm⁻¹.

Con relación a la humedad, los valores fueron los habituales para este tipo de miel, con un valor medio de 16.30 ± 0.15 . Solo 4 muestras excedieron el valor de 17.5 mg/kg exigido por la Marca de Calidad CV para la miel de azahar de Comunidad Valenciana (DOGV, 2002). Por el contrario, con relación al color, más de la mitad de las muestras superaron el valor de 30 mm en la escala Pfund, límite máximo admitido para comercializar una miel de azahar bajo dicha Marca de Calidad.

Correlación entre el contenido de polen y el antranilato de metilo

Trabajos anteriores publicados afirmaban la existencia de una posible correlación entre los niveles de antranilato de metilo y el porcentaje de polen de mieles de naranjo (Serra-Bonvehí, 1988). Para corroborar la posible dependencia lineal entre ambas variables, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (95,0%), obteniendo un valor de 0.347. Aunque el análisis resultó significativo ya que el valor P fue 0.002, inferior a 0.05, no se puede considerar que exista una correlación lineal entre ambas variables ya que el valor de la correlación está lejos de 1.

Una vez probada la no existencia de relación cuantitativa se intentó evaluar la posible correlación cualitativa realizando un análisis de contingencias. Para este propósito, las muestras se clasificaron atendiendo al criterio de cumplimiento del nivel mínimo de polen de

Citrus spp y/o del nivel de antranilato de metilo. En este sentido, se ha considerado que las muestras cumplieran con el polen si su contenido era igual o superior a 10%, (DOGV de 2002 y Persano Oddo et al, 1995), y que cumplieran con el AM si su valor era igual o superior a 2 mg/kg (criterios comerciales de acuerdo a la industria española y Sesta et al, 2008). Cada celda de la Tabla 1 representa el porcentaje de muestras que satisfacen el criterio de la fila (porcentaje de polen), el de la columna (nivel de antranilato de metilo) o ambos. En este sentido, el 84.2% de las muestras cumplía con el requisito del polen (38.2 % de las muestras cumplieran con ambos criterios: con el porcentaje de polen y además con el nivel requerido de AM y el 46,1 % de las muestras cumplieran solo con el requerimiento para el polen, pero no para el AM). Del mismo modo, el 42.1% cumplía el requisito para el AM (38.2 % cumple además el requisito del polen y 3.9% no cumplía con el polen). Por último, el 11,8 % de las muestras no cumple ni con el criterio del porcentaje de polen ni con el del AM.

CONCLUSIÓN

El análisis estadístico de los datos mostró que no existe una correlación lineal entre el nivel de antranilato de metilo y el porcentaje de polen en las mieles analizadas. Más del 80% de las muestras cumplieran con el porcentaje de polen requerido (10% de polen de *Citrus* spp) para la aceptación de una miel como miel de azahar según el requerimiento de la marca de calidad CV. Sin embargo, atendiendo a criterios comerciales (10% de polen de naranjo y 2 mg/kg de antranilato de metilo), únicamente un tercio de las muestras analizadas lo cumplirían.

BIBLIOGRAFÍA

Bogdanov, S. (2002). Harmonized methods of the International Honey Commission. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld, CH 3003 Bern, Switzerland.

Commission Decision 2002/657/EC of 12 August (2002). Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, OJEC L221, 8-36. Brussels, Belgium.

DOGV (Valencian Region Regulation) No. 4167 (2002). Reglamento de la Marca de Calidad CV para miel de azahar y romero, in: Diario Oficial de la Generalitat Valenciana. Area de publicaciones de la Presidencia de la Generalitat Publishing.

Kadar, M., Juan-Borrás, M., Carot, J.M., Domenech, E., Escriche, I. (2011). Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey, J. Sci. Food Agric. 91, 2768-2776.

Persano Oddo L., Piazza M.G., Sabatini A.G., Accorti M. (1995). Characterization of unifloral honeys, *Apidologie* 26, 453-465.

Saenz-Laín, C. and Gómez-Ferreras, C. (2000). Mielles españolas. Características e identificación mediante el análisis del polen. Multi-Prensa, Madrid, España.

Serra-Bonvehí, J. (1988). Determinación de antranilato de metilo en la miel de cítricos (*Citrus sp.*) del Levante Español, y su influencia en la actividad diastásica de la miel, *Alimentaria* 197, 37–40.

Sesta, G., Piana, M.L., Persano-Oddo, L., Lusco, L., Belligoli, P. (2008). Methyl anthranilate in *Citrus* honey. Analytical method and suitability as a chemical marker, *Apidologie* 39, 334-342.

TABLAS Y FIGURAS

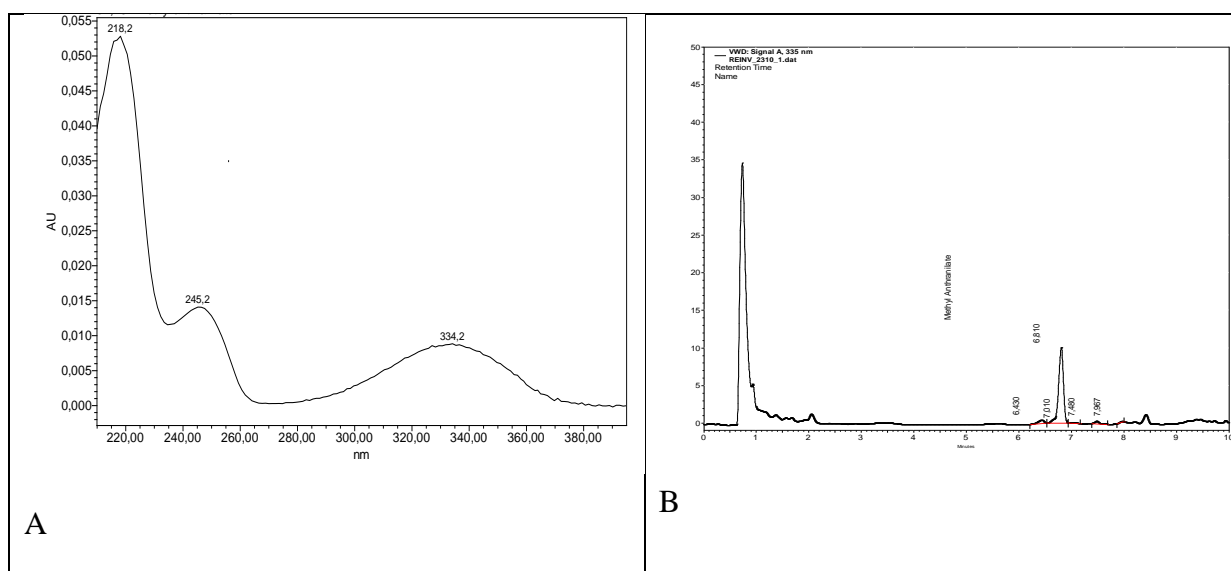


Figura 1. Espectro UV de metil antranilato obtenido usando un detector “photodiode array (A) y Cromatograma de miel con metil antranilato identificado (B).

Tabla 1. Porcentaje de polen de *Citrus spp.* Pollen y Metil antranilato (mg/kg), conductividad, humedad y color en las muestras de miel analizadas. Los valores se expresan como media de tres repeticiones y su desviación estándar.

Muestras	%Polen <i>Citrus spp.</i>	MA (mg/kg)	HMF (mg/kg)	Conductividad (mS.cm ⁻¹)	Humedad (mg/100g)	Color Pfund
B01	48	1.90 (0.06)	5.1 (0.3)	264 (5)	15.40 (0.11)	36
B02	42	3.20 (0.05)	1.1 (0.2)	183 (3)	15.50 (0.10)	28
B03	73	2.10 (0.01)	4.0 (0.2)	241 (4)	16.20 (0.03)	37
B04	48	1.20 (0.01)	3.7 (0.1)	243 (4)	17.90 (0.03)	27
B05	36	1.30 (0.02)	1.7 (0.3)	167 (3)	15.50 (0.01)	17
B06	1	0.50 (0.02)	11.8 (0.5)	283 (5)	16.80 (0.11)	37
B07	5	1.30 (0.01)	7.6 (0.3)	248 (5)	16.20 (0.03)	32
B08	30	0.90 (0.01)	9.4 (0.5)	271(5)	15.80 (0.07)	43
B09	27	1.50 (0.03)	3.8 (0.4)	208 (4)	16.30 (0.08)	35
B10	63	3.80 (0.01)	1.7 (0.8)	167 (3)	18.60 (0.23)	20
B11	57	4.00 (0.01)	1.5 (0.3)	172 (3)	17.80 (0.18)	20
B12	33	2.20 (0.01)	1.5 (0.4)	194 (4)	17.20 (0.07)	22
B13	42	2.20 (0.21)	2.4 (0.1)	198 (4)	16.70 (0.01)	26
B14	46	2.50 (0.01)	3.2 (0.4)	189 (3)	16.60 (0.01)	19
B15	12	1.90 (0.02)	16.5 (0.9)	205 (4)	16.60 (0.04)	33
B16	36	2.10 (0.02)	7.9 (0.2)	202 (4)	16.50 (0.06)	25
B17	43	2.20 (0.01)	5.4 (0.1)	185 (3)	17.30 (0.15)	22
B18	88	1.30 (0.03)	25.0 (0.8)	212 (4)	16.30 (0.04)	35
B19	53	3.80 (0.02)	3.8 (0.1)	208 (4)	15.40 (0.01)	24
B20	8	1.10 (0.11)	5.6 (0.3)	215 (4)	16.01 (0.02)	33
B33	19	1.90 (0.05)	8.7 (0.6)	210 (4)	14.80 (0.06)	39
B21	11	2.90 (0.17)	7.6 (0.4)	228 (4)	15.80 (0.04)	37
B22	35	2.10 (0.21)	6.8 (0.4)	209 (4)	13.80 (0.07)	37
B23	17	1.90 (0.06)	4.6 (0.2)	266 (5)	16.60 (0.09)	40
B24	10	2.40 (0.10)	0.7 (0.1)	169 (3)	17.80 (0.02)	20
B25	42	1.90 (0.19)	4.9 (0.1)	233 (4)	18.60 (0.13)	32
B26	14	2.20 (0.25)	4.8 (0.6)	255 (5)	15.40 (0.18)	40
B27	12	2.70 (0.21)	0.9 (0.1)	220 (4)	15.60 (0.01)	37
Average	34 (21)	2.11 (0.86)	5.8 (5.2)	217 (7)	16.30 (0.15)	31 (2)

Tabla 2. Tabla de contingencias para los criterios: Apto polen (las muestras cumplen con un mínimo de 10% de polen de *Citrus* spp) y Apto (AM) (las muestras cumplen con un mínimo de 2 mg/kg de antranilato de metilo).

Apto polen 10%	Apto AM con 2mg/kg		
	Cumple	No cumple	Total
Cumple	38.2%	46.1%	84.2%
No cumple	3.9%	11.8%	15.8%
Total	42.1%	57.9%	100.0%

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* AISLADAS EN EMBUTIDO SECO Y CURADO

E. Doménech⁽¹⁾, A. Jiménez⁽²⁾, MA. Ferrús⁽²⁾, JA. Amoros⁽³⁾, I. Escriche⁽¹⁾

⁽¹⁾Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

⁽²⁾Departamento de Biotecnología. Centro Avanzado de Microbiología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

⁽³⁾Departamento de Salud de Xàtiva-Ontinyent. Centro de Salud Pública de Xàtiva Plaça de la Seu, 2. 46800 Xàtiva, Valencia

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* son patógenos que no sólo afectan a la salud de las personas, sino que también causan enfermedades en los animales. Esta situación origina la necesidad de realizar tratamientos con antibióticos en el sector primario. Por otra parte, es sabido que el uso inadecuado de estos fármacos en alimentación animal, es una de las principales causas que originan resistencia antimicrobiana.

Las bacterias resistentes pueden extenderse a través de muchas vías. Cuando la resistencia antimicrobiana ocurre en bacterias zoonóticas presentes en animales y en el alimento, puede también comprometer la eficacia del tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas en seres humanos y ser el origen de un problema en su tratamiento clínico. En este sentido, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la sensibilidad antimicrobiana de diferentes cepas de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* aisladas en productos lácteos y derivados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron un total de 28 cepas, 8 de *Salmonella enterica* y 20 de *Listeria monocytogenes* aisladas en embutidos secos curados. Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, obtenidas de muestras del Control Oficial de los Productos Alimenticios en la Comunidad Valenciana entre los años 2007 y 2011.

La resistencia a antibióticos se realizó mediante el método disco-placa, según el protocolo del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La susceptibilidad de las cepas se determinó a los siguientes antibióticos: amikacina (AK, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), amoxicilina/clavulánico (AMC, 20/10 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1,25/ 23,75 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg), cloranfenicol (C, 30 µg),

gentamicina (GN, 10 µg), ácido nalidíxico (NA, 30 µg), cefalotina (KF, 30 µg) y tetraciclina (TE, 30 µg). Además, sólo para *Salmonella* se analizó: ceftriaxona (CRO, 30 µg) y kanamicina (K, 30 µg), y sólo para *L. monocytogenes*, eritromicina (E, 15 µg) y vancomicina (VA, 5 µg).

RESULTADOS

Los análisis realizados sobre las cepas de *Salmonella* y *Listeria* aisladas en chorizo seco curado, indicaron que el porcentaje de resistencia fue muy superior en las cepas de *Salmonella spp* (41%) datos que concuerdan con los obtenidos por Miranda et al, 2009, para chorizo mientras que en las de *L. monocytogenes* se presentó multiresistencia en un 13%, figura 1.

Los resultados mostraron que todas las cepas, estudiadas de ambas bacterias, fueron sensibles a gentamicina, y ciprofloxacino, no suponiendo por lo tanto ningún riesgo clínico para el consumidor, figura 2. Además, las cepas de *Salmonella spp* fueron sensibles en un 100% a amikacina y resistentes también en un 100% a tetraciclina. Por otra parte, con el resto de antibióticos, los porcentajes de resistencia fueron variando según la sustancia testada: Ácido nalidixico (87%), cloranfenicol (75%), y ampicilina (75%), trimetoprim-sulfametoxazol (62.5%), cefalotina (50%) y amoxicilina/clavulánico (37.5%).

Los resultados con *Listeria* mostraron que sus cepas fueron sensibles en un 100% a cefalotina, cloranfenicol, amoxicilina/clavulánico y ampicilina. Por el contrario, el 100% fue resistente a tetraciclina y se obtuvieron porcentajes mucho más bajos para trimetoprim-sulfametoxazol (20%), amikacina (20%) y tetraciclina (10%).

En relación a los antibióticos analizados sólo para una de las bacterias, figura 3. Únicamente se observó resistencia en una cepa de *Listeria* a eritromicina, lo que representa el 5%.

En este estudio se han encontrado doce cepas multiresistentes (resistencia a tres o más antibióticos), lo que supone el 42.8% de las muestras, ocho de ellas del género *Salmonella*, lo que indica que todas las cepas en estudio mostraron multiresistencia y otras 4 de *Listeria monocytogenes*, tabla 1. Estas cifras en conjunto son muy similares a las obtenidas en 2001 por White et al, que obtuvo un 51% de multiresistencia en carne picada.

Teniendo en cuenta el patrón resistente, 11 de las 12 muestras multiresistentes, fueron resistentes a tetraciclina, resultado acorde con los obtenidos por otros autores en los que la resistencia de las cepas aisladas fue sustancialmente mayor para aquellas sustancias que se

han utilizado durante largos periodos en clínica (Miranda et al, 2009). Observando sólo *L. monocytogenes*, los resultados mostraron que todas las cepas multiresistentes fueron resistentes simultáneamente al ácido nalidíxico, amikacina y trimetoprim-sulfametoxazol, Granier et al, 2011 también observaron multirresistencia en *Listeria monocytogenes* de orígenes ambientales y alimentos. Por su parte Harakh et al, 2009 observaron un aumento en la resistencia a gentamicina, trimetoprim sulfametoxazol, tetraciclina, y eritromicina, antibióticos también utilizados en el presente estudio, con resultados similares.

En *Salmonella* se observó que el único patrón que estaba en todas las cepas multiresistentes fue tetraciclina (8). No obstante, es de destacar que el ácido nalidíxico se dio en 7 y cloranfenicol y ampicilina en 6 de ellas, el aumento de multirresistencias durante las últimas décadas ha sido un hecho constatado tanto por organismos como la CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) como por numerosos autores, Threlfall, 2002, Caleja et al, 2011.

CONCLUSIÓN

La sensibilidad de las cepas de *Salmonella spp* y *L. monocytogenes* a la mayoría de los antibióticos, concuerdan en algunos casos con las restricciones de la utilización de algunos de estos antibióticos en ganadería, como es en el caso de ceftriaxona y con la insistencia de utilizar buenas prácticas ganaderas.

Este trabajo ha confirmado la aparición de cepas de *Salmonella spp* y *L. monocytogenes* resistentes a antibióticos utilizados durante décadas como tratamientos de elección en clínica, lo que puede suponer un problema de salud pública. Por otra parte, los resultados han puesto de manifiesto la existencia de multirresistencia en muchos de los casos, lo que aumenta más si cabe el riesgo para los consumidores.

Por todo ello y con la obligación de todos los países miembros de la Unión Europea, a través de su directiva 2003/99/EC, de detectar y monitorizar la resistencia antimicrobiana de determinados agentes zoonóticos como *Salmonella spp* y *L. monocytogenes*, se pone en evidencia la necesidad de seguir estudiando cuales son las dosis que causan resistencia antimicrobiana y de trabajar en la mejora de las buenas prácticas a lo largo de toda la cadena alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su apoyo al Área de Seguridad Alimentaria de la Dirección General de Salud Pública de la Conserjería de Sanidad de la Generalitat Valenciana por su colaboración. Sin embargo las opiniones expresadas en este trabajo no necesariamente reflejan la posición o la política de la Conserjería de Sanidad.

BIBLIOGRAFÍA

Granier, S.A., Moubareck, C., Colaneri, C., Lemire, A, Roussel, S., Dao, T-T., Courvalin, P., and A. Brisabois. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Food and the Environment in France over a 10- Year Period. 2011. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(8): 2788-2790

Harakh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E. and A. Alwan. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. 2009. *Science of total Environment* 407: 4022-4027

Miranda, J:M, Mondragón, A.C., Martinez, B., Guardon, M, y J.A. Rodriguez. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. 2009. *J. Food Prot.* 72 (5): 966-971

Threlfall, J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. 2002. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:141-148

White, D.G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers S., Friedman, S., Chen, S., Mc Dermott, P. F., Mc Dermott, S., Wagner D.D. and J. Meng. The Isolation of Antibiotic-Resistant *Salmonella* from Retail Ground Meats. 2001. *The New England Journal of Medicine.* 345 (16):1149-1154

TABLAS Y FIGURAS

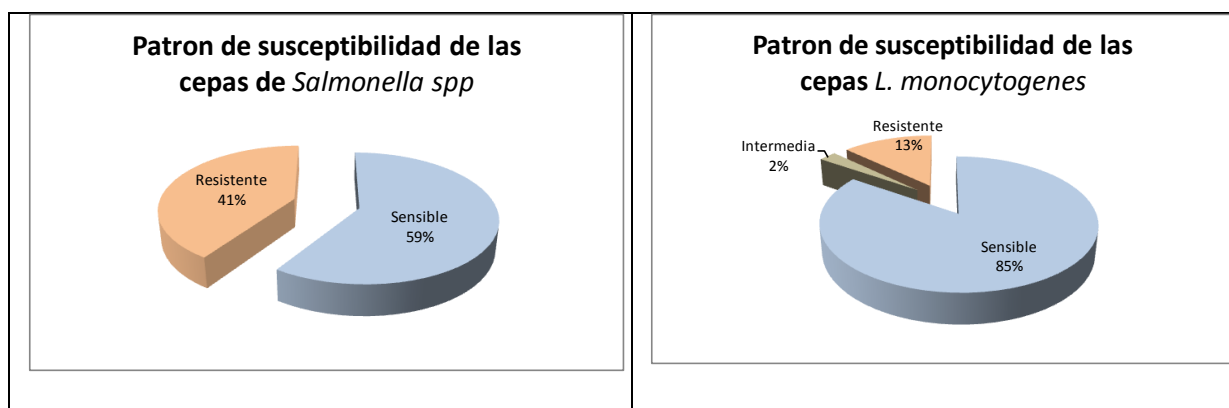


Figura 1: Porcentaje de cepas susceptibles de *Salmonella spp* y *L. monocytogenes* aisladas en chorizo seco curado.

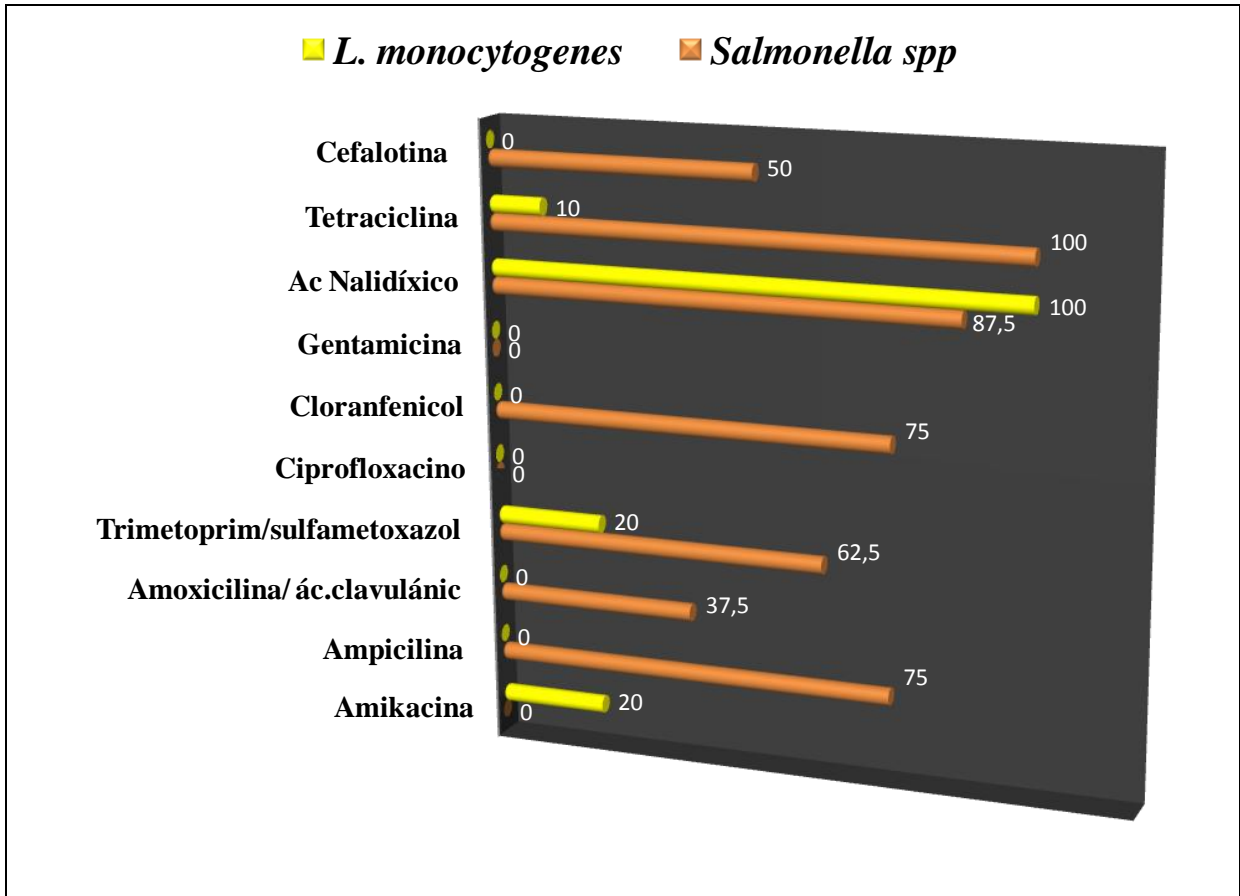


Figura 2: Porcentaje de resistencias para los antibióticos probados tanto en *Salmonella spp* como *L. monocytogenes*.

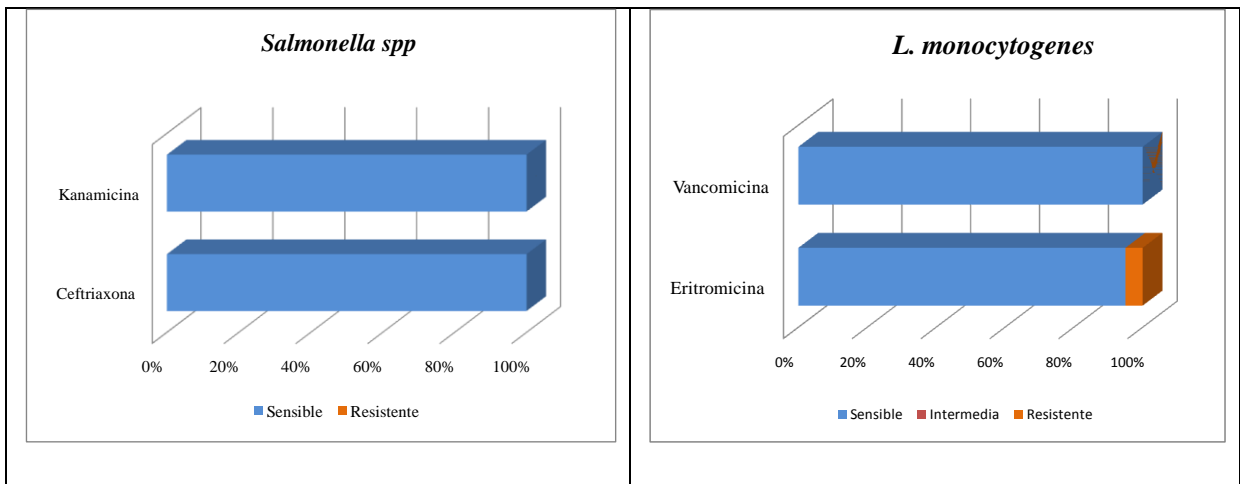


Figura 3: Porcentaje de resistencias para los antibióticos probados en una sola de las bacterias.

Tabla 1: Patrón de resistencia de las cepas multiresistentes de *Salmonella* y *Listeria*

Microorganismo	Nº de cepas resistentes	Nº de resistencias	Patrón de resistencia
<i>Salmonella spp</i>	2	7	AMP, AMC, SXT, C, NA, TE, KF
<i>Salmonella spp</i>	2	3	NA, TE, KF
<i>Salmonella spp</i>	3	5	AMP, SXT, C, NA, TE
<i>Salmonella spp</i>	1	4	AMP, AMC, C, TE
<i>L. monocytogenes</i>	1	4	SXT, TE, NA, AK
<i>L. monocytogenes</i>	1	5	SXT, TE, NA, AK, E
<i>L. monocytogenes</i>	2	3	SXT, NA, AK,

INFLUENCIA DE LA VARIEDAD DE MIEL, DEL APICULTOR Y DEL AÑO DE RECOLECCIÓN EN EL CONTENIDO DE HUMEDAD DE MIELES ESPAÑOLAS

M. Juan-Borrás⁽¹⁾, E. Domenech⁽¹⁾, A. Conchado⁽²⁾, I. Escriche⁽¹⁾

(1)Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

(2)Departamento de Estadística Aplicada, Investigación Operativa y Calidad. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

INTRODUCCIÓN

La miel es una disolución acuosa concentrada de azúcares y otros constituyentes minoritarios como: enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, entre otros. La cantidad de agua presente en la miel es un factor decisivo para su conservación, ya que un exceso de agua favorece la fermentación. La variedad botánica de la que proceden los néctares y mielatos, así como de las prácticas apícolas y las condiciones climáticas son factores que pueden motivar cierta variabilidad en el contenido de humedad de las mieles.

Una miel con un alto contenido en agua pierde valor comercial, de ahí que sea un parámetro legislado, permitiéndose un contenido máximo del 20% (Directive 2001/110/EC; Real Decreto 1049/2003). Las Marcas de Calidad aparecidas en el sector apícola con el fin de proporcionar productos con un carácter distintivo son más restrictivas en lo que respecta a este parámetro de calidad. Por ejemplo, la Marca de Calidad de la Comunidad (CV) para la miel cruda de naranjo y de romero, establece que no se puede superar 17.5g de agua por 100g en miel (DOGV N° 4167, 2002). En el caso de las Denominaciones de Origen Protegida (DOP) para la miel de la Alcarria y para la miel de Granada se fijan contenidos máximos de 18g/100g.

Por todo ello, el contenido de humedad es un parámetro de calidad esencial en las mieles frescas y por ello debe ser controlado por las empresas antes de permitir su entrada en el proceso. En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la influencia de la variedad de miel, del apicultor y del año de recolección en el contenido de humedad de mieles españolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia prima

El presente estudio se realizó con 11 tipo de mieles españolas (10 monoflorales y 1 milflores) proporcionadas por 98 apicultores entre los años 2006 y 2010. Un total de 1631 muestras pertenecientes a diferentes variedades fueron analizadas. En todas las muestras se realizó el análisis melisopalinológico (polínico) para clasificarlas correctamente según su variedad (DOGV, 2002, Ohe, et al., 2004).

Análisis melisopalinológico

La determinación del origen botánico de las muestras se realizó a partir del sedimento de polen y su posterior conteo en microscopio (Zeiss Axio Imager, Göttingen, Germany) de las diferentes estructuras de los pólenes (especies florales), expresado el resultado en porcentaje Sainz-Laín & Gómez-Ferreras (2000).

Determinación analítica de humedad

La determinación de la humedad se realizó según el método oficial español (Real Decreto 1049/2003) utilizando un refractómetro a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Abbe, Japon acoplado a un baño termostático Atago, Japon). A partir del índice de refracción obtenido por espectrofotométrica y consultando la tabla de Chataway se obtenía el valor de la humedad en g/100 g.

Análisis estadístico

El tratamiento de los datos se llevó a cabo aplicando diferentes programas estadísticos y considerando como factores: “tipo de miel”, “año de recolección” y “apicultor”. Con la finalidad de identificar posibles grupos de tipos de miel en función del contenido de humedad, se aplicó un análisis de correspondencia utilizando el software SPAD (version 6.0). Debido a los requerimientos del análisis, los valores de humedad se codificaron como categóricos (entre paréntesis se indica el número de muestras perteneciente a cada grupo): <16% (260), 16-17% (358), 17-18% (317), 18-19% (270), 19-20% (191), >20% (235). Los tipos de miel se proyectaron sobre el biplot con la finalidad de relacionar este factor con los rangos de humedades. PASW Statistics 18, y Answer Tree 3.0 fue usado para la obtención del árbol de decisiones, con el algoritmo CHAID (Chi-Square Automatic Interaction Detection) (Kass, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis descriptivo

En la Tabla 1, junto a los diferentes tipos de mieles analizadas, se indica la variedad botánica a la que pertenece el polen mayoritario presente en ellas, el número de muestras de cada variedad y el porcentaje que representan esas muestras respecto al total. Además, esta tabla muestra el análisis descriptivo (media y desviación standard) así como los valores mínimos y máximos de humedad obtenidos para cada tipo de miel. Asimismo, en la Tabla 1 se indica el resultado del análisis de la varianza para los factores “tipo de miel” y “año”, incluyendo el F-ratio y los grupos homogéneos.

Los valores de humedad siguieron una distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov ($p\text{-value} > 0.05$). Para el factor “tipo de miel”, el ANOVA demostró la existencia de tres grupos homogéneos ($\alpha = 1\%$). Ciertas variedades de miel como las de romero, naranjo y limonero tenían altos porcentajes de humedad, mostrando valores que oscilaron entre 15.0 y 25 mg/100g, ambos en romero. Contenidos de humedad medio correspondieron a las mieles de tomillo y lavanda, los valores de humedad bajo se encontraron en las mieles de girasol, eucalipto, lavanda stoechas, bosque y retama, con valores que oscilaron entre 13.9 mg/100g en miel de bosque y 22.0 mg/100g en miel de bosque en ambos casos. La miel de milflores (clasificada así por no alcanzar un porcentaje de polen suficiente para poder ser clasificada como perteneciente a una determinada especie botánica) ocupó un lugar intermedio de humedad, con un amplio rango de concentración de humedad que osciló entre 14.8 y 23.1 mg/100g.

Se observa que los diferentes tipos de miel estudiados presentan cierta variabilidad en el contenido de humedad, que se asocia a la estación del año en el que se recolectan. En este sentido, las mieles de primavera (estación del año más lluviosa) como son romero, naranjo y limón, suelen presentar contenidos de humedad algo mayores a las recolectadas en verano (milflores, girasol, eucalipto, entre otras). Es evidente la relación directa que existe entre pluviometría y contenido en humedad de las mieles.

La Figura 1 muestra el resultado del análisis de correspondencias en la que los valores de humedad se exponen codificados por rangos. La proyección en el gráfico de los tipos de miel muestra 3 grupos claramente diferenciados por el primer eje, tal y como se apreciaba en los grupos homogéneos del ANOVA. El primer eje discrimina dos grupos de forma evidente. En el sector izquierdo se muestran las mieles con mayor humedad (naranjo, romero y limón), mientras que las mieles con menor humedad se posicionan en el sector derecho (lavanda

stocheas, eucalipto, girasol, bosque, y retama). El resto de variedades (lavanda, tomillo, milflores) se ubican en la zona central del gráfico, con valores intermedios de este parámetro.

Los valores de humedad de las mieles obtenidas en este estudio, en general cumplen con los requisitos de la Directiva europea (2001/110/EC) y de la normativa española (Real Decreto 1049/2003), aunque en algunas de las muestras se superó el valor límite de 20g/100g. Kadar et al., 2011 y Escriche et al., 2011 reportaron valores semejantes de humedad para mieles de cítricos, observando también que muchas de las mieles de esta variedad no se podrían acoger a la Marca de Calidad CV, por superar el valor límite de humedad en ella permitido. Las mieles de bosque mostraron valores muy bajos de humedad (en comparación a los obtenidos en mieles florales) y amplios rangos de variabilidad. Este mismo comportamiento fue observado por otros autores para mieles de bosque: Terrab, et al., 2004 (16.2-23.6 mg/100g); Soria et al., 2004 (14.5-18.7 mg/100g) y Escriche, et al., 2009 (15.2-16.3 mg/100g).

Influencia del apicultor y año de recolección

La técnica de árbol de decisión fue aplicada para obtener un modelo capaz de analizar la influencia de los factores: “apicultor”, “año de recolección” y “grupo de tipo de miel (Figura 2). Se observa que este último factor es el que más influye en este parámetro de calidad, seguido del año de recolección. Como cabría esperar un mismo grupo de mieles pueden tener valores de humedad variables entre años como consecuencia de las condiciones climatológicas, especialmente la pluviometría. Por ejemplo, dentro de mieles de humedad baja, se observa que entre las campañas 2006, 2007, 2009 y 2010 no existieron diferencias significativas (con un valor promedio de 16.42% entre las 331 muestras analizadas) con excepción del año 2008. Las 87 muestras de miel de este último año (con un valor medio de 17.18%) se diferenciaron significativamente del resto de las mieles del grupo de humedad alta.

Las prácticas apícolas también podrían influir en la variabilidad de la humedad dentro de un mismo tipo de miel, especialmente si éstas no se realizaran convenientemente y el apicultor corta la miel antes de lo recomendable. Sin embargo, este factor ha resultado despreciable en el árbol de decisión.

CONCLUSIÓN

Los diferentes tipos de miel analizados presentan una cierta variabilidad en el contenido de humedad, que se asocia fundamentalmente a la estación del año en la que se

recolectan. En este sentido, las mieles de primavera (estación del año más lluviosa) como son romero, naranjo y limón, suelen presentar contenidos de humedad algo mayores a las recolectadas en verano (milflores, girasol, eucalipto, entre otras). El análisis estadístico aplicado ha demostrado que “el tipo de miel” es el factor que más influye en el contenido de humedad de las mieles, seguido del “año de recolección”. Sin embargo, el factor “apicultor”, no ha resultado significativo.

BIBLIOGRAFÍA

Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey.

DOGV N° 4167 (2002). Reglamento de la Marca de Calidad CV para miel de azahar y romero.

Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., & Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112(2), 329-338.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., & Domenech, E. (2011). Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44 (5), 1504-1513

Kadar, M., Juan-Borrás, M., Carot, J.M., Domenech, E. & Escriche, I. (2011). Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey. *Journal Science Food Agriculture*. 91, 2768-2776.

Kass, G.V. (1980). An exploratory technique for investigating large quantities of categorical data. *Applied Statistics*, 29, 119-127.

Ohe W, Persano-Oddo L, Piana ML, Morlot M and Martin P, Harmonized methods of melissopalynology. *Apidolog* 35:18–25 (2004).

Real Decreto 1049/2003 de 1 de agosto de 2003, por el que se aprueba la Norma de Calidad relativa a la miel destinada al mercado interior. (B.O.E. 186).

Sainz-Laín, C. & Gómez-Ferreras C. (2000). Mielles españolas: Características e identificación mediante el análisis del polen. Mundi-Prensa Publishing, Madrid, Spain (2000).

Soria, A.C., González, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I. & Sanz, J. (2004). Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*, 85 (1), 121-130.

Terrab, A., Recamales, A.F., Hernanz, D. & Heredia, F.J. (2004). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88(4), 537-542.

TABLAS Y FIGURAS
Tabla 1. Tipos de mieles analizadas, valores mínimos y máximos de humedad obtenidos para cada tipo de miel y resultado del ANOVA para los factores “tipo de miel” y “año”, incluyendo el F-ratio y los grupos homogéneos.

Factor miel	Variedad botánica del polen mayoritario	Número de muestras y % respecto al total	Humedad (g/100g miel)	
			Mean (SD)	Min-Max
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	216 (13.2%)	19.9 (2.1) ^c	15.0-25.0
Naranja	<i>Citrus</i> spp	231 (14.2%)	19.7 (1.3) ^c	15.5-23.3
Limonero	<i>Citrus limon</i> sp	111 (6.8%)	19.5 (1.6) ^c	16.2-22.9
Tomillo	<i>Thymus</i> spp	34 (2.1%)	18.3 (1.5) ^b	15.0-21.6
Lavanda	<i>Lavandula</i> spp	27 (1.7%)	18.0 (2.2) ^{ab}	15.7-23.2
Milflores	-	605 (37.1%)	17.7 (1.8) ^{ab}	14.8-23.1
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	135 (8.3%)	16.7 (1.3) ^a	14.6-21.2
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i> spp	76.64 (4.7%)	16.6 (0.8) ^a	15.1-19.8
Lavanda stoechas	<i>Lavandula stoechas</i>	14 (0.9%)	16.5 (1.0) ^a	15.2-18.1
Bosque	<i>mielatos</i>	117 (7.2%)	16.5 (1.4) ^a	13.9-22.0
Retama	<i>Lygos sphaerocarpa</i>	26 (1.6%)	16.4 (0.7) ^a	14.7-17.5
ANOVA F-ratio			47.9***	
Year Factor			Mean (SD)	Min-Max
2006			17.05 (1.45) ^a	13.8-24.0
2007			17.94 (1.33) ^{ab}	14.6-23.6
2008			18.13 (2.03) ^c	13.9-25.0
2009			18.45 (1.91) ^d	15.5-25.2
2010			17.86 (1.73) ^{ab}	14.2-22.1
ANOVA F-ratio			16.76***	

Para cada factor, las distintas letras indican diferencias significativas al 95% (LSD test) *** $p < 0.001$

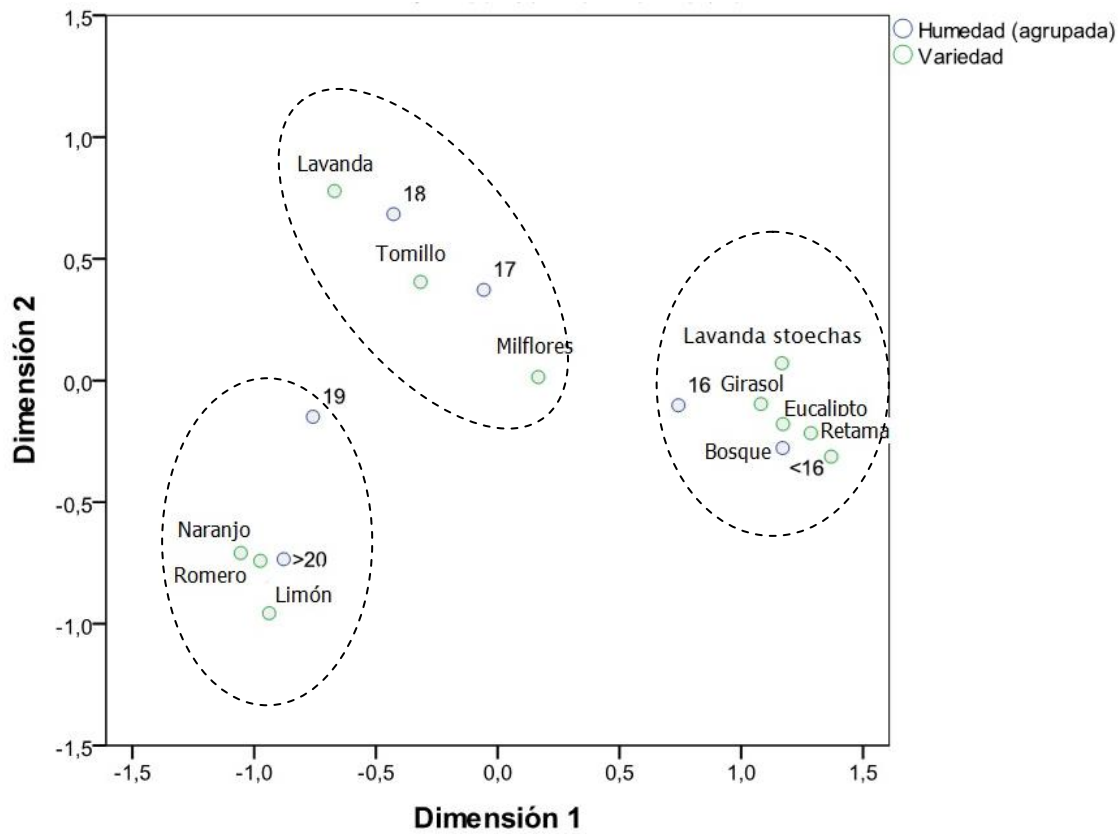


Figura 1. Gráfico de correspondencias para el parámetro humedad (expresada por rangos como variable categórica) con las variedades de miel proyectadas.

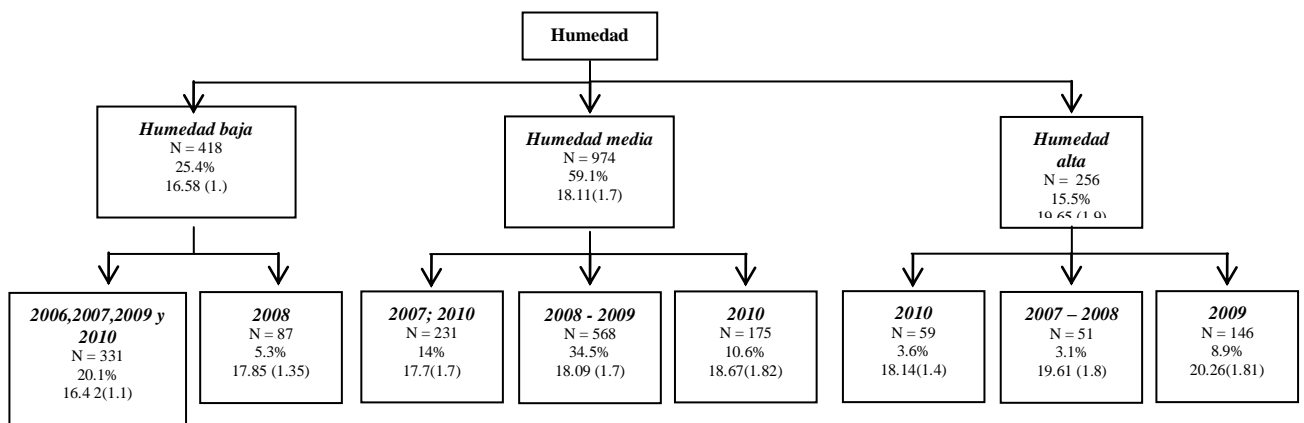


Figura 2. Árbol de decisión para la humedad

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE UM PRODUTO CÁRNEO TRADICIONAL PORTUGUÊS

Samuel Jácome¹, Susana Fonseca^{1,2}, Rita Pinheiro¹, Manuel Rui Alves^{1,2}, Svetoslav Todorov³, Lúcia Noronha⁴, Joana Silva⁴, Gonçalo Almeida⁴, Manuela Pintado⁴, Ana Gomes⁴, Alcina M.M.B. Morais⁴, Paula Teixeira⁴ & Manuela Vaz-Velho¹

¹ Escola Superior de Tecnologia e Gestão – Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Avenida do Atlântico s/n, 4900-348 Viana do Castelo, Portugal;

² REQUIMTE, Universidade do Porto, Portugal;

³ Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil;

⁴ CBQF-Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto

1.RESUMO

A bioconservação de alimentos é uma alternativa interessante para aumentar o tempo de prateleira, garantir a segurança microbiológica e reduzir o uso de aditivos sintéticos, mantendo as características sensoriais e nutricionais dos produtos tradicionais. Após isolamento e seleção das bactérias do ácido láctico com base no seu poder antimicrobiano, procedeu-se à sua aplicação à escala industrial durante o processo de fabrico de "alheira", um enchido tradicional Português. O objetivo foi estudar a influência de três condições processuais nos atributos sensoriais da "alheira" armazenada a temperaturas de refrigeração (5°C) e em atmosfera modificada (20%CO₂, 80%N₂). As condições envolveram a utilização de: (1) estirpe autoctone *Lactobacillus sakei* ST153ch, (2) mistura de *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus acidilactici*, e (3) solução de ringer (solução de diluição). A concentração final dos inóculos de bactérias do ácido láctico foi 10⁹ UFC/g. A adição ocorreu na etapa de mistura das carnes. O produto foi submetido a condições idênticas de cura, fumação, embalagem e temperatura de armazenamento.

Um painel de 8 provadores treinados determinou 11 atributos, sendo 3 relativos ao aspeto, 2 ao cheiro, 2 à textura e 4 ao sabor. Utilizou-se uma escala de 13 pontos de intensidade, com âncoras verbais e referências de intensidade para uniformizar a valorização de cada atributo. Realizaram-se 4 amostragens ao longo do tempo de armazenamento (5, 40, 60 e 120 dias). Não foram encontradas interações entre os fatores tempo e condição. Da análise global surgiram diferenças significativas apenas nos atributos “cheiro estranho” e “sabor característico”. Relativamente ao “cheiro estranho” a amostra inoculada com a cultura comercial foi a mais semelhante quando comparada com o produto comercial e no “sabor

característico” foi a amostra com a solução de ringer. O painel não detetou diferenças significativas em mais nenhum atributo o que parece demonstrar que a influência das estirpes em termos organolépticos pode ser considerada irrelevante.

2.INTRODUÇÃO

Numa época em que as fronteiras políticas e económicas estão desvanecidas, elementos que diferenciam e identificam um produto ganham especial importância junto dos produtores e consumidores.

A definição de produto tradicional não é fácil nem clara, sendo alvo de várias interpretações de acordo com diferentes autores. De acordo com Ribeiro (1996) produtos tradicionais são produtos únicos que resultam das matérias-primas e dos conhecimentos aplicados, dos usos, das práticas de produção, de distribuição, de consumo e das denominações de produto local, tradicional, artesanal ou regional.

A Alheira é um enchido tradicional português, cozido, curado e levemente fumado. A sua origem remonta a finais do século XV. É um enchido constituído por uma mistura de carne de vaca, frango, porco, pão e condimentos. Apresenta uma cor castanho-clara e uma forma de ferradura de secção cilíndrica, com cerca de 20 a 25 cm de comprimento. Tem uma vida útil de 60 dias quando embalado em atmosfera modificada e necessita de regeneração antes de ser consumido. Apresenta um sabor leve a fumo, destacando-se o sabor a alho, azeite e uma ligeira acidez típica. Ao longo dos séculos foi comum o uso de microrganismos e dos seus produtos metabólicos na conservação de alimentos. As bactérias ácido-lácticas foram empiricamente e de forma artesanal utilizadas na fermentação de leite, carne e legumes no sentido de se obterem produtos com maior tempo de vida útil.

A bioconservação ou biocontrolo, através da introdução de substâncias naturais, é uma tecnologia que cria condições desfavoráveis para o desenvolvimento *in situ* de microrganismos patogénicos permitindo garantir a segurança microbiológica, e simultaneamente reduzir a utilização de aditivos químicos, mantendo as características nutricionais e organolépticas dos alimentos (Fonseca *et al.*, 2012; Jácome *et al.*, 2013; Vaz-Velho *et al.*, 2013). Vários autores têm desenvolvido estudos que demonstram mecanismos de inativação produzidos por bactérias do ácido láctico (Todorov *et al.*, 2010), (Todorov *et al.*, 2013) e estudos *in vivo* que demonstram a inativação de microrganismos patogénicos em produtos tradicionais à base de carne (Albano *et al.*, 2007; Albano *et al.*, 2009; Jácome *et al.*, 2013; Vaz-Velho *et al.*, 2013).

Este estudo teve como objetivo perceber o impacto da adição de duas estirpes, uma autóctone (*Lactobacillus sakei* ST153ch); e outra comercial (mistura de *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus acidilactici*); bem como apenas solução de ringer (solução de diluição), nos atributos sensoriais da Alheira armazenada a 5°C e em atmosfera modificada (20% CO₂, 80% N₂).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das amostras

Depois dos estudos de isolamento e seleção das culturas com base no seu poder antimicrobiano procedeu-se à sua aplicação à escala industrial. As amostras foram desenvolvidas segundo a formulação da empresa promotora Minhofumeiro – Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda. Foram separados 3 lotes de 10 kg de massa de alheira e foi incorporado num deles 500 mL de solução de ringer e em cada um dos outros 500 mL da cultura comercial BLC35 (Chr. Hansen) e 500 mL da cultura autóctone (*Lactobacillus sakei* ST153ch) cada uma delas com uma concentração de 10⁹ UFC/g. Depois da incorporação da solução e das culturas na mistura de carnes prosseguiu-se o normal processo de fabrico, nas suas várias etapas até ao produto final embalado em atmosfera modificada (20% CO₂, 80% N₂). O produto foi submetido a condições idênticas de cura, fumagem, embalagem e temperatura de armazenamento. Após o embalamento foi feita a expedição para as unidades laboratoriais e mantido refrigerado a 5°C até análise.

3.2. Análise sensorial

Foram desenvolvidas sessões prévias para discussão com o painel de provadores os atributos sensoriais de maior relevo, da sua definição, escala, dos limites e das âncoras verbais. Determinaram-se 11 atributos/descriptores, 3 de aspeto, 2 de cheiro, 2 de textura e 4 de sabor. Foi definida uma escala de pontuação estruturada de 13 pontos de intensidade (1- intensidade mínima e 13- intensidade máxima), âncoras ou limites e referências de intensidade no sentido de uniformizar a valorização de cada atributo. Posteriormente os resultados dos 11 atributos foram convertidos numa escala de 0 a 100.

Foi ainda definido um atributo geral de “conformidade” utilizando uma escala hedónica de 5 pontos que permitiu perceber qual a opinião do provador quanto a possíveis defeitos não expressos nos atributos, atribuindo uma pontuação de 1 a 3 consoante a gravidade decrescente do defeito e 4 ou 5 se o produto apresentava uma conformidade, respetivamente, boa ou muito boa. As amostras foram analisadas ao longo do tempo de

armazenamento em refrigerado (4 amostragens: 5, 40, 60 e 120 dias; Temp. 4-6°C) por um painel de 8 provadores treinados. Em cada análise foi apresentada uma amostra padrão, que correspondia ao produto comercial refrigerado e com o mesmo tempo de fabrico, no sentido de minimizar o erro de avaliação e dispersão do painel. Atribuiu-se uma avaliação de referência para cada atributo cujo valor correspondia ao valor médio da escala (7) exceto para o atributo “Cheiro Estranho” que correspondia ao valor mínimo (1). Todas as amostras foram codificadas, apresentadas de forma aleatória solicitando-se ao painel que as valorizasse comparando-as com a amostra padrão. Foram definidos duplicados no sentido de apurar o erro de cada provador e do painel como um todo. Todas as análises foram realizadas em cabine individual no Laboratório de Análise Sensorial, equipado de acordo com a norma portuguesa para o efeito (NP4258:1993).

3.3 Análise estatística

O conjunto de dados compreendeu 12 variáveis dependentes ou atributos: “Ligação massa”, “Cor Característica”, “Brilho”, “Cheiro Característico”, “Cheiro Estranho”, “Dureza da Massa na Boca”, “Adesividade na Boca”, “Sabor Característico”, “Sabor Ácido”, “Sabor Picante”, “Sabor Amargo”, “Conformidade”; 8 provadores; 4 tempos de análise e 3 condições processuais.

Os dados foram analisados a dois fatores (tempo e condição) através de análise de variância ANOVA utilizando o *software* Statistica (version7, Statsoft, Inc).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do tempo de armazenamento o produto sofreu variações no atributo “conformidade” para todas as condições, ou seja o produto sofre uma alteração significativa ao longo do tempo de armazenamento. Na tabela 1 é possível visualizar a média e o desvio padrão da avaliação do painel para o atributo “Conformidade”, bem como o nível de significância do teste estatístico (ANOVA) ao fator tempo para as 3 condições.

TABELAS
Tabela 1. Média, desvio padrão e nível de significância (*p-value*) da valorização do painel para o atributo “Conformidade”, para as várias condições e tempos de análise.

	BLC35		Ringer		ST153	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
5 Dias	4,3	0,4	4,7	0,4	4,3	0,4
40 Dias	3,9	0,6	3,9	0,6	3,6	0,5
60 Dias	3,1	0,4	3,6	0,5	2,7	0,5
120 Dias	2,8	0,9	2,5	0,9	2,5	0,8
<i>p-value</i>	0,000*		0,000*		0,000*	

*efeito significativo do fator tempo ($p < 0,05$)

Relativamente à estabilidade sensorial do produto a alheira com a adição do *L. sakei* ST153ch foi a condição que apresentou menos variações significativas quando comparada com a amostra padrão e na globalidade dos tempos de análise (Tabela 2). O inóculo ST153 apenas fez variar a “conformidade” e o “sabor característico”. Já na alheira em que foi adicionada a cultura comercial BLC35 os atributos “sabor característico”, “sabor ácido”, “sabor picante” e “conformidade” apresentaram diferenças significativas (Tabela 1 e Tabela 2). A alheira em que se adicionou a solução de Ringer apresentou diferenças significativas no “sabor ácido”, “sabor picante” e na “conformidade”.

Tabela 2. Nível de significância (*p-value*) do teste estatístico ANOVA ao fator tempo para cada atributo e condição analisada.

	BLC35	Ringer	ST153
	<i>p-value</i>		
Lig. Massa	0,833	0,963	0,964
Cor Caract.	0,377	0,283	0,695
Brilho	0,134	0,459	0,192
Ch. Caract.	0,594	0,266	0,301
Ch. Estranho	0,234	0,245	0,669
Dureza Boca	0,340	0,139	0,146
Adesi. Boca	0,146	0,646	0,121
Sab. Carat.	0,003*	0,642	0,044*
Sab. Ácido	0,026*	0,039*	0,072
Sab. Picante	0,034*	0,042*	0,560
Sab. Amargo	0,478	0,206	0,453

*efeito significativo do fator tempo no respetivo atributo ($p < 0,05$)

Uma vez que não foram encontradas interações entre o fator tempo e condição os dados foram analisados globalmente no sentido de se apurarem os atributos que melhor definem as diferenças entre as 3 condições (Tabela 3).

Tabela 3. Média, desvio padrão da valorização do painel de provadores e nível de significância (*p-value*) com o teste estatístico ANOVA para cada atributo e condição não distinguido os tempos de análise.

	BLC35		Ringer		ST153		<i>p-value</i>
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Lig. Massa	48,2	10,5	50,2	10,5	49,4	6,7	0,692
Cor Caract.	49,3	2,1	49,7	1,5	50,6	4,7	0,259
Brilho	48,8	3,5	48,8	4,1	49,7	4,5	0,557
Ch. Caract.	48,6	5,2	48,4	6,9	45,6	12,5	0,310
Ch. Estranho	1,1	3,5	1,7	5,4	8,9	17,3	0,007*
Dureza Boca	50,8	9,6	50,2	13,1	60,0	9,9	0,955
Adesi. Boca	51,3	8,9	50,6	13,3	55,4	9,7	0,169
Sab. Caract.	45,2	8,2	47,7	7,6	41,6	11,5	0,035*
Sab. Ácido	59,5	11,3	59,8	12,5	62,8	16,5	0,560
Sab. Picante	56,4	11,9	54,4	7,3	55,2	11,1	0,719
Sab. Amargo	53,2	6,2	53,5	8,4	54,6	9,6	0,770
Conformidade	3,5	0,9	3,6	1,0	3,3	0,9	0,272

*efeito significativo do fator condição no respectivo atributo ($p < 0,05$)

Foram detetadas diferenças significativas nos atributos “cheiro estranho” e “sabor característico” quando comparadas as 3 condições. No atributo “cheiro estranho” a amostra que maior semelhança apresentou com o produto comercial (mais próximo de zero) foi a alheira inoculada com a cultura comercial BLC35 e no atributo “sabor característico” foi a alheira inoculada com a solução de Ringer (mais próximo de 50, valor de referência da amostra padrão), no entanto os resultados foram, no geral, bastante positivos uma vez que o painel não detetou diferenças significativas em mais nenhum atributo o que parece demonstrar que a influência sensorial das estirpes e do meio de inoculação não é muito acentuada.

5.CONCLUSÃO

A alheira com a adição da solução de Ringer apresentou melhor conformidade global. Das 3 condições analisadas, a alheira inoculada com *L. sakei* ST153ch foi a mais estável ao longo do tempo de armazenamento. Foram detetadas diferenças significativas nos atributos

“cheiro estranho” e “sabor característico” quando *comparadas* as 3 condições. Apesar da validade do produto comercial ser de 60 dias as análises foram prolongadas até 120 dias o que influenciou notoriamente o atributo “conformidade”. O painel não detetou diferenças significativas em mais nenhum atributo o que parece demonstrar que a influência das estirpes em termos sensoriais pode ser considerada não significativa.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade do Governo de Portugal pelo financiamento do projeto nº13338 Biofumados: Tradição vs. Qualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T. and Teixeira, P., 2007, Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays, *Meat Science*, 76, 796-800.

Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., Magalhães, R., Hogg, T. and Teixeira, P., 2009, Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage, *Food Control*, 20(8), 764-770.

Fonseca, S.; Jácome, S.; Pinheiro, R.; Alves, M.R.; Noronha, L.; Silva, J.; Almeida, G.; Todorov, S.D.; Pintado, M.; Gomes, A.; Morais A.M.M.B.; Vaz-Velho, M.; Teixeira, P. (2013), Application of nisin and chitosan as antimicrobial agents in traditional cured and smoked “Alheira”, pp-88-91. *In*: “Worldwide Research Efforts in the Fighting against Microbial Pathogens: From Basic Research to Technological Developments”. (Ed. A. Mendez-Vilas; Pub. BrownWalker Press. Florida, USA. ISBN-10:1-61233-636-1, ISBN-13: 978-1-61233-636-7)

Jácome, S.L., Todorov, S., Fonseca, S., Pinheiro, R., Monteiro, V., Santos, J., Fernandes, P., Noronha, L., Almeida, G., Gomes, A., Pintado, M., Silva, C. L. M. , Morais A., Silva, J., Teixeira, P. , Vaz-Velho, M., 2013, Bioconservación de alimentos tradicionales por adición de bacterias acidolácticas y de sus bacteriocinas. *In*: Estrategias innovadoras para desarrollar alimentos más saludables. *Foodsm-Hop Technology Book*. Edt. Elena Fulladosa, Maria Dolors Guàrdia. IRTA - Tecnología Alimentaria, Barcelona, Espanha. ISBN 13: 978-84-940022-3-6.

Ribeiro, M., Martins, C., 1996, La certificación como estrategia de valorización de productos agroalimentarios tradicionales: la alheira, un embutido tradicional de Trás-os-Montes. *Agricultura y Sociedad*; 80(81), 313-34.

Todorov, S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M. and Dicks, L.M.T., 2010, Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from *Beloura* and *Chouriço*, traditional pork products from Portugal, *Meat Science*, 84(3), 334-343.

Todorov, S.D., Vaz-Velho, M., Franco B.D.G.M. and Holzapfel W.H., 2013, Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from *Salpicão*, a fermented meat product from North-West of Portugal, Food Control, 30, 111-121.

Vaz-Velho, M., Jácome, S., Noronha, L., Todorov, S., Fonseca, S., Pinheiro, R., Morais, A., Silva, J., Teixeira, P., 2013, Comparison of antilisterial effects of two strains of lactic acid bacteria during processing and storage of a Portuguese salami-like product “alheira”. Chemical Engineering Transactions, 32, 1807-1812.

AVALIAÇÃO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO E DE POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS ESPÉCIES *ASTROCARYUM VULGARE* MART. (TUCUMÃ) E *ENDOPLEURA UCHI* HUBER (UXI) NATIVAS DA REGIÃO AMAZÔNICA: PROTEÍNA E FENOL

Bittencourt, A.¹; Baeta, D. S.¹; Barbosa, V. F.¹; Leite, K. M. S. C.¹; Toro, M. J. U.²; Oliveira, O. M. M. F.¹

¹Instituto de Química, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brasil. ²Centro de Ciências Naturais e Tecnologia, Universidade do Estado do Pará – UEPA, Pará, Brasil.

Introdução: A região amazônica, mundialmente conhecida por sua vasta biodiversidade, possui variedades de espécies frutíferas de elevado potencial nutricional e funcional, devido aos diferentes compostos bioativos, cujo estudo é muito valioso. Assim, encontram-se as espécies *Astrocaryum vulgare* Mart. e *Endopleura uchi* Huber, conhecidas como tucumã e uxi, respectivamente, frutos nativo desta região, com propriedades físico-químicas, nutricionais e organolépticas de grande valor para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. **Objetivo:** Avaliar, considerando a importância destes frutos para tal região brasileira, o perfil de separação por cromatografia de exclusão molecular das frações proteicas, fenólicas e o potencial antioxidante dessas espécies em relação ao extrato bruto e frações. **Metodologia:** As frações proteicas e fenólicas foram separadas a partir do extrato bruto destes frutos, diluído em uma proporção de 1:10 (m/v) em solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,0, eluído na mesma solução tampão em coluna cromatográfica de gel Sephadex[®] G-25. Os eluatos foram monitorados por espectrofotometria de UV/Vis a 280 nm. **Resultados e Conclusão:** O cromatograma mostrou a separação de dois picos para o tucumã e três para o uxi, que foram analisados em relação à proteína solúvel, fenol total e flavonoides, indicando a presença de até 0,26 mg.mL⁻¹ de proteínas no primeiro pico de eluição para o tucumã. O conteúdo de fenóis, no segundo pico de eluição, mostrou pequena diferença entre os extratos, 5,96 EAG mg.100g⁻¹ para o tucumã e 5,12 EAG mg.100g⁻¹ para o uxi., já o uxi apresentou um maior teor para flavonoides, 181,76 EQ mg.100g⁻¹. Entre as amostras o extrato bruto de tucumã apresentou o melhor potencial antioxidante, tanto frente ao radical DPPH (IC₅₀ 2,06 mg.mL⁻¹), como para o HOCl/OCl⁻ (IC₅₀ 1,96 mg.mL⁻¹). Este trabalho demonstrou que essas frutas podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos, apresentando efeitos benéficos à saúde humana e potenciais industriais.

Palavras-chave: Tucumã. Uxi. Amazônia. Cromatografia. Proteínas. Compostos fenólicos.

INTRODUÇÃO

A Amazônia é rica em biodiversidade, se destacando pelas condições ambientais (clima e solo) e recursos naturais (fauna e flora), possuem frutas e plantas cujas propriedades fitoterápicas são utilizadas pela indústria farmacêutica e cosmética. Atualmente as frutas comestíveis da Amazônia já chegam a 220 espécies, entre as mais difundidas no país estão o açaí, guaraná, mangaba, pupunha, castanha-do-Pará e cacau, porém ainda não estão sistematizadas (CARVALHO; MUELLER, 2005). A cadeia produtiva da fruticultura na Amazônia no ano de 2010 exportou cerca de US\$ 41,75 milhões, deste total 77% corresponde ao estado do Pará, mostrando que a fruticultura tem participação significativa na economia paraense (SAGRI-PA, 2011). Neste contexto, onde a fruticultura movimenta a economia amazônica e disponibiliza grandes variedades de espécies frutíferas nativas e exóticas dessa região como fonte nutricional e terapêutica, encontram-se as espécies *Astrocaryum vulgare* Mart. e *Endopleura uchi* Huber Cuatrec.. A espécie *Astrocaryum vulgare* Mart. popularmente conhecida como tucumã ou tucumazeiro é comumente encontrado no leste da Amazônia brasileira (SHANLEY; MEDINA, 2005). O tucumã é um vegetal nutritivo, do qual o mesocarpo é considerado uma fonte alimentícia rica em compostos pró-vitamina A (YUYAMA, 2005) e ácidos graxos saturados e poli-insaturados, principalmente ácido oleico, esteárico e linoleico (MORAES; DIAS, 2001), bem como apresenta quantidades relevantes de fibras e vitamina E (CLEMENT; LLERAS; VAN LEEUWEN, 2005). Apesar de suas potencialidades, poucos estudos têm sido realizados para explorar as propriedades do tucumã e gerar tecnologias que possibilitem o seu reaproveitamento de forma sustentável. O fruto é utilizado pelas indústrias alimentícias locais para produção de polpa *in natura*, suco, vinho, sorvete e picolé. Em outras áreas industriais o fruto é utilizado na produção de sabonetes, xampu, hidratantes, loções corporais e cremes faciais, essências e aromatizantes (CLEMENT; LLERAS; VAN LEEUWEN, 2005). O óleo de tucumã é muito usado na culinária amazônica para produção de pratos típicos da região, bem como na produção de sabão, cosméticos e medicamentos fitoterápicos (SHANLEY; MEDINA, 2005). A espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. comumente conhecida como uxi ou uxizeiro é uma das 50 espécies exóticas pertencentes à família *Humiriaceae* constituída por 8 gêneros distintos originários da Amazônia brasileira. É uma espécie tipicamente silvestre da mata alta de terra firme e ocorre nos estados do Pará e Amazonas (SHANLEY; MEDINA, 2005). O uxi como fruto é muito conhecido na região amazônica e utilizado pelas indústrias locais para fabricação de picolés, sorvetes, vinhos, suco e óleo. A polpa do uxi é carnosa, farinácea e oleosa, com sabor e aroma peculiar e muito agradável. É consumida no estado natural ou com

farinha de mandioca, constituindo um importante complemento na alimentação, Além disso, a polpa é também utilizada para fabricação de melados, licores e doces em pasta. A casca do uxi é utilizada para fins medicinais e comercializada em feiras, mercados e farmácias de manipulação na região norte do país, para tratamento de artrite, reumatismo, colesterol, diabetes, redução/eliminação de miomas em mulheres e anti-inflamatório (CORRÊA, 1984 apud POLITI, 2009). O óleo de uxi é comestível e de boa qualidade, utilizado na culinária local e como remédio para dores musculares. A semente do fruto é utilizada para fabricação de biojóias, artesanato, incensos de defumação e amuletos (SHANLEY; MEDINA, 2005).

OBJETIVO

Considerando a importância destes frutos para a Amazônia, esse trabalho teve como objetivos avaliar o perfil de separação por cromatografia de exclusão molecular das frações proteicas, fenólicas e o potencial antioxidante dessas espécies em relação ao extrato bruto e frações.

METODOLOGIA

Os extratos brutos liofilizados de tucumã e uxi foram submetidos à cromatografia em coluna de gel Sephadex G-25 (50 x 1,2 cm), previamente equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 7,0. As amostras foram eluídas com o mesmo tampão, coletando-se frações de 2,0 mL por cada tubo de ensaio. Os eluatos foram monitorados por espectroscopia de UV/VIS, com leitura da absorbância em 280 nm para detecção de proteínas, Antes da eluição da amostra, o perfil de eluição da coluna cromatográfica foi verificado com a eluição do padrão *blue dextran*, com leituras a 620 nm, para determinação do volume “morto” da coluna.

Determinação do conteúdo de proteínas totais: A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). Neste método os íons Cu²⁺, em solução alcalina, complexa com grupos amina de proteínas e peptídeos com três resíduos de aminoácidos (duas ligações peptídicas), resultando em coloração vermelha com absorção máxima a 540 nm.

Dosagem de fenóis: A dosagem de fenóis nos frutos foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência (WANG, et al., 2008). Esse método baseia-se na oxidação dos fenolatos pelo reagente de

Folin- Ciocalteau formando um complexo de coloração azul no meio reacional, com banda de absorção máxima a 750 nm.

Avaliação do conteúdo de flavonoides totais: A determinação de flavonoides totais presentes nos extratos dos frutos foi realizada pelo método descrito por Chang et al (2002), utilizando a técnica de espectroscopia ultravioleta. Esse método baseia-se na utilização de cloreto de alumínio, onde esse cátion forma complexos estáveis com os flavonoides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio batocrômico para maiores comprimentos de onda e maior intensidade de absorção de luz. Apesar dos compostos fenólicos formarem complexos com Al^{+3} , os mesmos possuem banda de absorção em comprimentos menores que os complexos flavonoides, portanto, não interferindo nas análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a seleção da concentração de proteína de extrato bruto dos frutos de tucumã e uxi, a ser eluída na coluna em gel sephadex G-25, foram realizados testes de extração das amostras, em $g.mL^{-1}$ de tampão, na proporção: 1:3, 1:5 e 1:10, determinando-se em cada um o conteúdo de proteínas ($g.mL^{-1}$). Os resultados obtidos para cada fruto podem ser observados na FIGURA 1. Pelos dados apresentados, tanto o tucumã quanto o uxi apresentou melhor extração na proporção 1:10, com concentrações proteicas de 2,55 e 1,43 $mg.mL^{-1}$, respectivamente. Amostras de extratos de tucumã e de uxi, na diluição 1:10, foram eluídas na coluna de gel Sephadex G-25, previamente equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05 $mol.L^{-1}$, pH 7,0, e coletadas frações de 2,0 mL. O perfil de eluição do extrato de tucumã (FIGURA 2) revelou a presença de dois picos. O primeiro, região onde se tem o “volume morto”, corresponde principalmente a presença de proteínas (macromoléculas com massa molecular – MM \gg que 5000) e, o segundo corresponde a presença de moléculas com MM abaixo de 5.000 (podendo conter compostos bioativos). A eluição em sephadex G-25 propiciou uma separação bem definida entre macromoléculas e moléculas menores com MM $<$ 5000. O que possibilita determinação de compostos bioativos, como os fenólicos, sem a interferência de proteínas (dosagem de fenóis pelo método Folin-Ciocalteau). O perfil de eluição de extrato de uxi (FIGURA 3) identificou a presença de três picos. O primeiro corresponde á presença de proteínas, o segundo provavelmente a presença de micromoléculas de baixa MM e o terceiro pico ainda serão testados compostos para a sua possível identificação. Para visualização das frações com maior conteúdo de proteína, os dados das frações 13 a 20 foram analisados graficamente (FIGURA 4), destacando-se a fração 16 que

apresentou maior concentração proteica com $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$. As frações obtidas, tanto para o tucumã, como para o uxi, foram agrupadas como *pool*, que foi denominado de *pool de fenóis* de tucumã ou de uxi, após, determinado o conteúdo de fenóis totais presentes em cada *pool*. O *pool de fenóis* do tucumã apresentou $5,96 \text{ EAG mg.100g}^{-1}$, enquanto que, o do uxi apresentou $5,12 \text{ EAG mg.100g}^{-1}$. Partindo dessas informações, foram realizadas as conversões dos valores até a obtenção do teor de fenóis totais presente no extrato bruto dos frutos. Os resultados obtidos podem ser observados na FIGURA 5. Foi identificado um alto teor de flavonoides no tucumã com $120,12 \text{ EQ mg.100g}^{-1}$ no *pool* do segundo pico e $360,36 \text{ EQ mg.100g}^{-1}$ no extrato bruto. O uxi também apresentou quantidades expressivas desse composto bioativo no segundo pico ($181,76 \text{ EQ mg.100g}^{-1}$), terceiro pico ($188,687 \text{ EQ mg.100g}^{-1}$) e no extrato bruto ($555,65 \text{ EQ mg.100g}^{-1}$). Houve uma diferença significativa entre os teores de flavonoides nos frutos, possivelmente devido a influencia de fatores extrínsecos como condições climáticas, época de plantio e colheita, maturidade e variação do conteúdo da própria fruta, o que pode explicar as diferenças encontradas. Análises das amostras obtidas (frações e extrato bruto) indicaram capacidade antioxidante destes frutos. O extrato bruto de tucumã e uxi apresentaram um baixo IC_{50} , respectivamente, $1,94 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $2,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, o que indica que as duas frutas apresentam uma elevada atividade antioxidante com destaque para o extrato de tucumã. Os valores de IC_{50} de frações de Uxi (Pico 2, Pico 3) e tucumã (Pico 2) apresentaram moderada atividade antioxidante.

CONCLUSÃO

Em geral, este trabalho mostrou que as frutas nativas da Amazônia também podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos, apresentando efeitos benéficos á saúde humana, potenciais industriais e justificando a ampliação dos estudos.

REFERÊNCIAS

- Carvalho, J. E. U.; Mueller, C. H. Comunicado técnico: biometria e rendimento percentual de polpa de frutas nativas da Amazônia. Belém: Embrapa, 2005. 139 p.
- Chang, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.
- Clement, C. R.; Lleras, P. E.; Van Leeuwen. J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Revista Brasileira Agrociências*, v. 9, n. 1/2, p. 67-71, 2005.

Gornall, A. G.; Bardawill, C. S.; David, M. M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, n. 177, p. 751-766, 1949.

Moraes, J. D.; Dias, M. R. P. Elaboração do doce em massa e néctar de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). 2001. 96 f. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém, 2001.

Politi, F. A. S. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). 2009. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

Shanley, P.; Medina, G. Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica. Belém: CIFOR, 2005. v. 1, cap. 2, p. 209-214. 94

Wang, H. et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*, v. 106, p. 888-895, 2008.

Yuyama, L. K. O. et al. Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.): quais os constituintes nutricionais? *Nutrire*, v. 30, p. 225, 2005. Suplemento.

FIGURAS

Figura 1 – Concentração proteica dos extratos brutos de tucumã e uxi nas proporções 1:3; 1:5; 1:10.

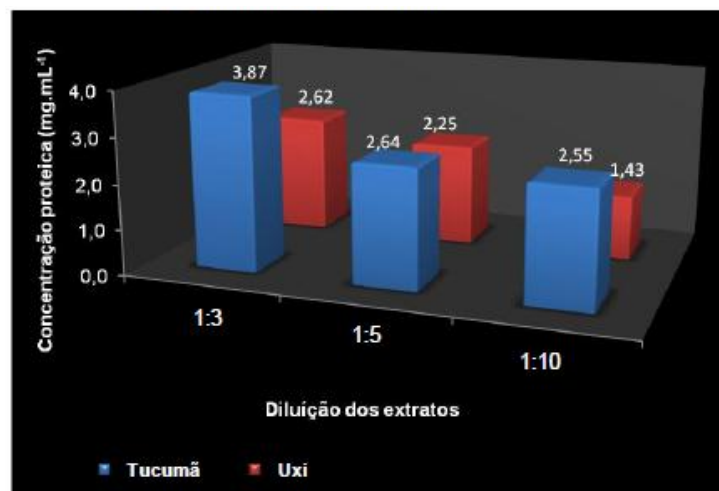


Figura 2 – Separação do extrato de tucumã, extração na proporção 1:10, por cromatografia de exclusão molecular em coluna gel sephadex G-25.

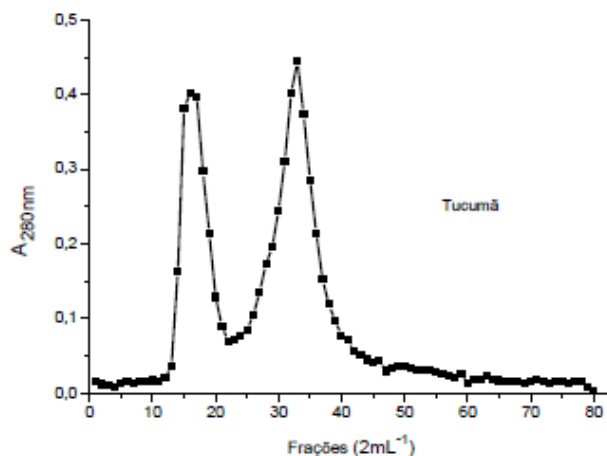


Figura 3 – Separação do extrato de uxi, extração na proporção 1:10, por cromatografia de exclusão molecular em coluna gel sephadex G-25.

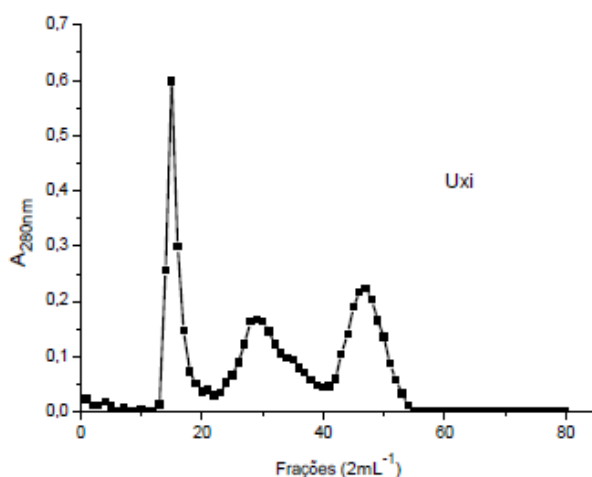


Figura 4 – Concentração de proteínas totais presentes no extrato de tucumã e uxi.

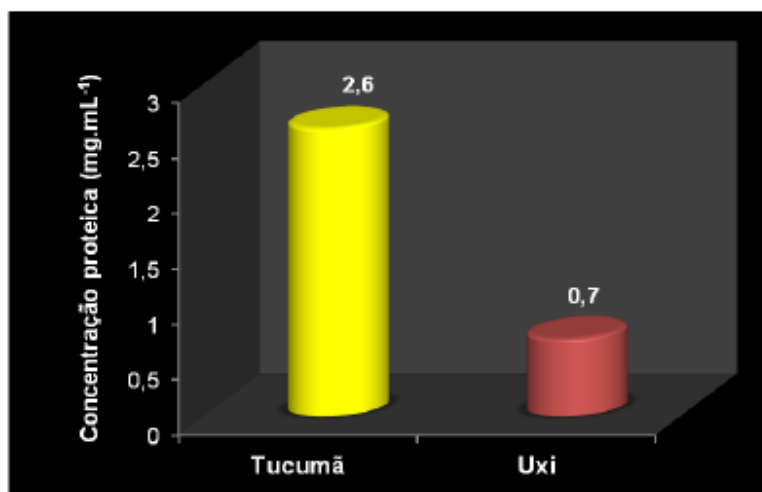
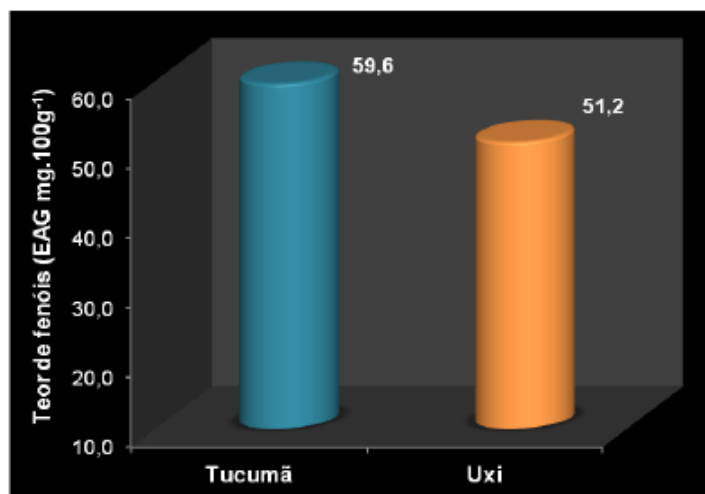


Figura 5 – Concentração de fenóis presentes nos extratos brutos dos frutos de tucumã e uxi.



CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE SUCUUBA (*HIMATANTHUS sucuuba*) FRENTE AO RADICAL DPPH

Barbosa, V. F.¹; Baeta, D. S.¹; Rocha, C. Q.¹; Santos, L. C.¹; Brunetti, I. L.²; Souza, D. R. S.³, Oliveira, O. M. M. F.¹.

¹Instituto de Química, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brasil. ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rodovia Araraquara – Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil. ³Faculdade de Medicina de Rio Preto, FAMERP, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, São Paula, Brasil.

RESUMO

Introdução: Um campo fértil para a pesquisa mundial são os produtos naturais. Os alimentos e as plantas são o alvo de estudo buscando características antioxidantes e farmacológicas. O vegetal sucuuba (*Himatanthus sucuuba*) é conhecido por suas propriedades curativas na medicina popular, principalmente no tratamento de câncer. Os antioxidantes são substâncias capazes de proteger o organismo contra espécies reativas do oxigênio (ERO) produzidas principalmente por neutrófilos com envolvimento da enzima mieloperoxidase (MPO). Frente à alta produção de ERO nos tecidos, a ação dessas ERO podem promover doenças como mal de Alzheimer, arteriosclerose e até mesmo o câncer. **Objetivo:** Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos das folhas da planta *Himatanthus sucuuba* utilizando o ensaio de *scavenger* do radical DPPH. **Metodologia:** Reação de sequestro (*scavenger*) do radical DPPH em meio etanólico observando a queda de absorbância conforme o radical é neutralizado e/ou sequestrado. **Resultados e Conclusão:** O parâmetro de avaliação foi o IC₅₀ (concentração que inibe 50% do radical presente no meio) calculado através de um gráfico de porcentagem de inibição e concentração de amostra em µg.mL⁻¹. Para o extrato bruto obteve-se 0,86 µg.mL⁻¹ (±0,02), extrato aquoso 125,00 µg.mL⁻¹ (±0,03) e extrato acetato de etila 1,63 (±0,05) µg.mL⁻¹. Demonstrando então, que a amostra acetato de etila foi que melhor demonstrou capacidade antioxidante. Pode-se supor que nesta fração deve conter alguns flavonoides e outros compostos químicos com atividade antioxidante.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. DPPH. Sucuuba.

INTRODUÇÃO

Um campo fértil para a pesquisa mundial são os produtos naturais. Os alimentos e as plantas são o alvo de estudo buscando características antioxidantes e farmacológicas. O vegetal sucuuba (*Himatanthus sucuuba*) é conhecido por suas propriedades curativas na medicina popular, principalmente no tratamento de câncer (SILVA et al, 1998; MIRANDA et al, 1999; VILLEGAS et al, 1997). As substâncias mais isoladas nesta planta são monoterpênicos com estrutura química baseada no ciclopentano-[C]-pirano conhecidos como iridoides (SAMPAIO-SANTOS et al., 2001; MIRANDA et al, 1999) demonstraram que a atividade antiinflamatória pode estar ligada a substâncias como cinamato de lupeol e acetato de lupeol encontradas na fração hexânica do látex. Na casca podem ser encontradas saponinas, alcaloides, flavonoides e taninos (REBOUÇAS et al, 2011). Essas substâncias encontradas na sucuuba podem conferir uma característica antioxidante para esse vegetal. Os antioxidantes são substâncias capazes de proteger o organismo contra espécies reativas do oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas do nitrogênio (ERN), produzidas principalmente por neutrófilos com envolvimento da enzima mieloperoxidase (MPO). Os leucócitos polimorfonucleares (LPMN) são as células que fagocitam e destroem microrganismos invasores desempenhando importante papel na defesa do organismo. Eles precisam migrar para os sítios de infecção, induzidos por sinais químicos específicos, reconhecendo, fagocitando e destruindo o patógeno invasor. As alterações metabólicas para a ação microbicida dos LPMN são denominadas como explosão oxidativa ou *oxidative burst* (BABIOR, 2000). Durante a explosão ou surto oxidativo vários sistemas enzimáticos são ativados, dentre eles da enzima MPO, produzindo agentes oxidantes ERO e/ou ERN. A MPO, assim como outras peroxidases, é capaz de catalisar a oxidação de vários compostos orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (CAPEILLEARE-BLANDIN, 1998). Além de participar da defesa do organismo contra agentes infecciosos as ERO podem iniciar e/ou participar no desenvolvimento de algumas doenças. Frente à alta produção de ERO nos tecidos há varias evidências que a ação dessas ERO pode promover várias doenças como mal de Alzheimer, arteriosclerose e até mesmo o câncer (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

OBJETIVO

Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos das folhas da planta *Himatanthus sucuuba* utilizando o ensaio de *scavenger* do radical DPPH.

METODOLOGIA

Preparo das amostras: As amostras foram obtidas através das folhas da planta sucuba. Essas folhas foram coletadas e secadas em estufa à 37 °C durante uma semana. Depois de secas foram trituradas com auxílio do cadinho e pistilo até tornar um pó fino. Esse pó foi colocado em etanol 70% e assim extrair o máximo de substâncias presentes nesse pó das folhas. Esse extrato foi chamado de extrato bruto de sucuba e a partir deste foram realizada nova extração com o solvente orgânico acetato de etila. O produto da extração com o solvente acetato de etila foi chamado de extrato acetato de etila da sucuba. Após as extrações restou uma fração enriquecida que foi chamada de extrato aquoso da sucuba, pois restaram as substâncias mais hidrofílicas. Todos os extratos foram concentrados em rotaevaporador e passados em HPLC para futura caracterização e possível identificação das substâncias ativas. Esses extratos foram obtidos em parceria com o Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química Orgânica IQ/UNESP, Campus de Araraquara, em parceria com a Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos. A Figura 1 ilustra o preparo dos extratos.

Ensaio de inibição do radical DPPH: O DPPH (radical estável) é dissolvido em etanol e utilizado nos ensaios em concentração de 60 µM. O ensaio foi realizado segundo Soares (1997), observando-se o decréscimo da absorbância em 531 nm, após 15 minutos de incubação com a amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas foram coletadas e separadas em dois grupos que seguiram diferentes processos com a finalidade de extrair a maior quantidade de substâncias possível. O primeiro grupo de folhas foi liofilizado e triturado. O segundo grupo de folhas foi seco em estufa à 37 °C e triturado. Após isso foi realizada a extração com etanol 70% de cada grupo e esse extrato foi chamado de extrato bruto de sucuba. O perfil de cada grupo foi traçado em HPLC e constatado que não há diferença entre as substâncias extraídas. Portanto a técnica escolhida foi secar as folhas, pois a trituração é mais fácil e rápida de ser realizada. Após a extração foi realizado a atividade antioxidante frente ao radical DPPH. O parâmetro de avaliação foi o IC₅₀, significando que essa é a concentração que inibe 50% do radical presente no meio. O IC₅₀ é calculado através de um gráfico de porcentagem de inibição e concentração de amostra em µg.mL⁻¹. Para o extrato bruto obteve-se 0,86 ± 0,02 µg.mL⁻¹ (FIGURA 2), para o extrato aquoso 125,00 ± 0,03 µg.mL⁻¹ (FIGURA 3) e extrato acetato de etila 1,63 ±

0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (FIGURA 4). Demonstrando então, que a amostra acetato de etila foi a que melhor demonstrou capacidade antioxidante. Pode-se supor que é nesta fração que alguns flavonoides e outros compostos químicos com atividade antioxidante são concentrados. Em outros trabalhos realizados com diferentes plantas os resultados demonstraram que os flavonoides estão concentrados no extrato acetato de etila e, portanto, possui a melhor atividade antioxidante (ROSA et al, 2010). Rebouças et al (2011) mostraram que na composição de substâncias químicas presentes na casca da *Himatanthus sucuúba* pode ser encontrado saponinas, alcaloides, flavonoides e taninos.

CONCLUSÃO

Vários estudos demonstram que muitos vegetais estão envolvidos com atividade antioxidante e anti-inflamatória e uma das explicações pode ser a autodefesas do organismo contra ERO produzidas pelas células polimorfonucleares (THAMBI et al, 2009; RÓDENAS et al, 2000). Para tanto, a atividade de inibição de ERO pode ser relacionada com a presença e quantidade de fenóis, assim, é interessante o estudo e correlação com a atividade anti-inflamatória da sucuuba. Em continuação, com o objetivo de verificar a eficiência desses extratos de sucuuba para o ser humano, estudos estão sendo realizados: i) frente a ERO produzidas no organismo humano (HOCl, íon radical superóxido, radical hidrófila, peróxido de hidrogênio, monóxido de nitrogênio, entre outros); ii) frente a sistemas celulares (*ex vivo*) para verificar a eficiência de proteção contra ERO; e iii) identificação do tipo de substâncias constituintes dos extratos objeto de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babior, B. M. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*, v. 50, p. 267-269, 2000.
- Capeilleare-Blandin, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochemistry Journal*, v. 336, n. 2, p. 395-404, 1998.
- Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v. 43, p. 61-68, 1997.
- Miranda, A. L. P.; Silva, J. R. A.; Rezende, C. M.; Neves, J. S.; Parrini, S.; C.; Pinheiro, M. L. B.; Cordeiro, M. C.; Tamborini, E.; Pinto, A. C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. *Planta Medica*, v. 66, p. 284-286, 1999.
- Rebouças, S. O.; Grivicich, I.; Santos, M. S.; Rodriguez, P.; Gomes, M. D.; Oliveira, S. Q.; Silva, J.; Ferraz, A. B. F. Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus*

articulares bark, on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 926-929, 2011.

Ródenas, J.; Carbonell, T.; Mitjavila, M. T. Different roles for nitrogen monoxide and peroxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radical Bio Med* v. 28, p. 374-380, 2000.

Rosa, E. A.; Silva, B. C.; Silva, F. M.; Tanaka, C. M. A.; Peralta, R. M., Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Ferreira, H. D.; Silva, C. C. Flavonoidas e atividade antioxidante em *Palicourea rígida* Kunth, Rubiaceae. *Rev. Bras. Farmacogen. (Braz. J. Pharmacogen)*, v. 20, n. 4, p. 484-488, Ago/Set 2010.

Sampaio-Santos, M.; Isabel And Kaplan, M.; Auxiliadora, C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of Brazilian Chemical Society*. v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.

Silva, J. R. A; Pessoni, R. A. B.; Vieira, C. C. J.; Rezende, C. M.; Miranda, A. L. P.; Pinto, A. C. Composição e atividade antiinflamatória e analgésica do látex de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia, Resumos... Brasil, 1998.

Soares, J. R.; Dinis, T. C.; Cunha, A. P.; Almeida, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, v. 26, p. 469-478, 1997.

Thambi, P. T.; Kuzhivelil, B.; Sabu, M. C.; Jolly, C. I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. *Indian J Pharm Sci*, v.68, p.352-355, 2006.

Villegas, L. F.; Fernández, I. D.; Maldonado, H.; Torres, R.; Zavaleta, A.; Vaisberg, A. J.; Hammond, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. *Journal Ethnopharmacology*, v. 55, p. 193-200, 1997.

FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do preparo dos extratos de sucúúba.

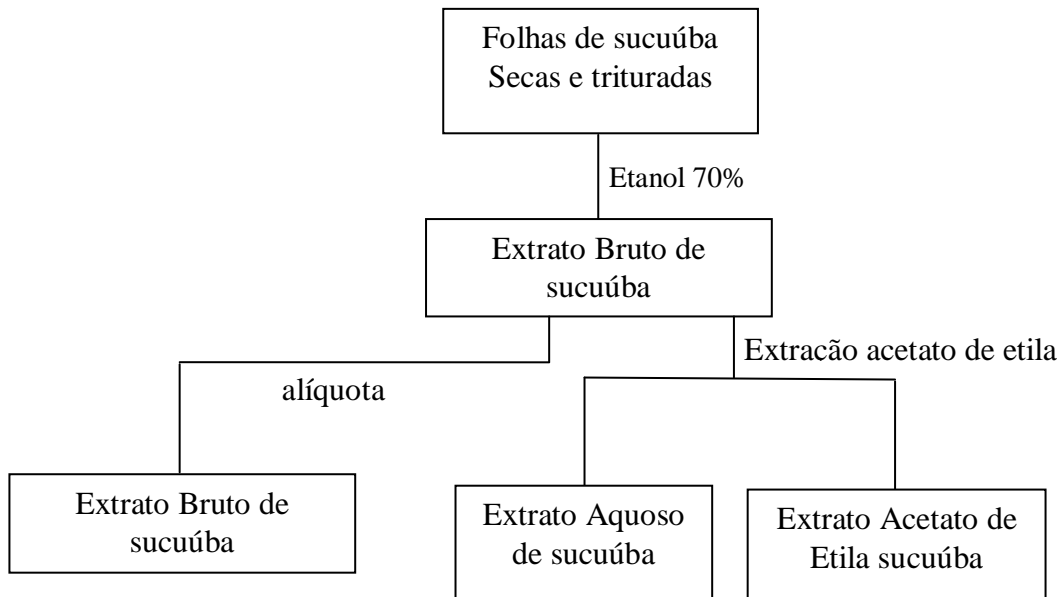


Figura 2 – Gráfico de porcentagem de inibição de DPPH por $\mu\text{g/mL}$ de extrato bruto de sucúúba.

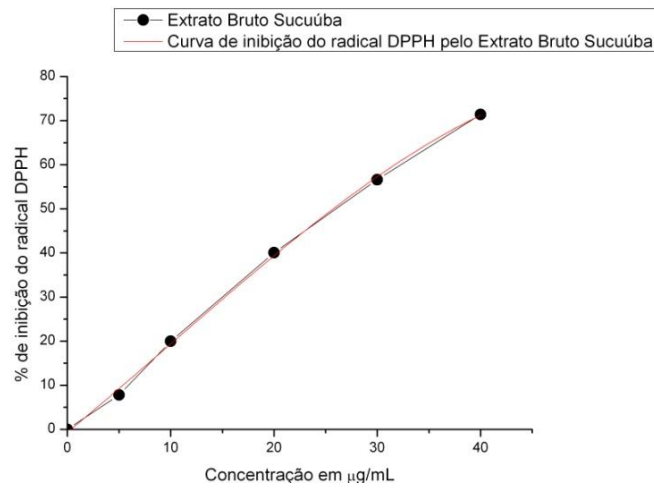


Figura 3 – Gráfico de porcentagem de inibição de DPPH por $\mu\text{g/mL}$ de extrato aquoso de sucúba.

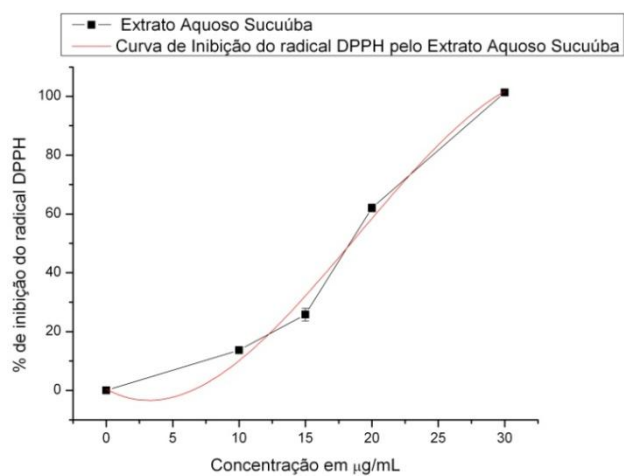
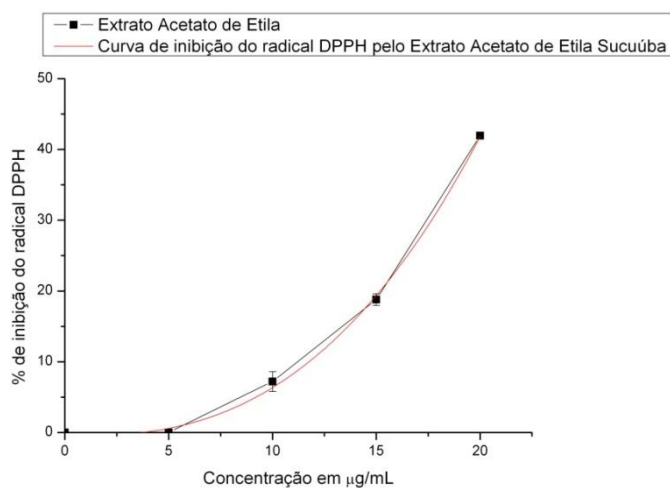


Figura 4 – Gráfico de porcentagem de inibição de DPPH por $\mu\text{g/mL}$ de extrato acetato de etila de sucúba.



PURIFICAÇÃO DE PECTINAMETILESTERASE DE GOIABA, CULTIVAR PALUMA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) E ESTUDOS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PARÂMETROS CINÉTICOS, TERMOESTABILIDADE E INIBIDORES

Baeta, D. S.^{1,2}; Leite, K. M. S. C.^{2,3}; Tadiotti, A. C.²; Oliveira, O. M. M. F.^{1,2}

¹Instituto de Química, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brasil. ²Predilecta Alimentos LTDA., São Lourenço do Turvo, Matão, São Paulo, Brasil. ³Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Rua Carlos Gomes, 1338, Centro, 14801-340, Araraquara, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Introdução: Segundo dados da FAO (2009) o Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, tendo o Estado de São Paulo como o maior, com destaque para a cultura de goiaba, uma fruta que pode de ser consumida *in natura* ou processada na forma de polpa por possuir elevado teor de pectina, conferindo-lhe boa viscosidade. Durante o processamento industrial e armazenamento desta polpa, poderá ocorrer a desesterificação da pectina pela pectinametilesterase (PME), resultando na perda de qualidade do produto final. Estudos de caracterização cinética, inibidores e de termoestabilidade da PME são importantes para compreensão de sua ação sobre a pectina durante o processamento e estocagem da polpa de goiaba. **Objetivo:** Estudar a PME de goiaba, cultivar Paluma, de interesse da Indústria Predilecta Alimentos LTDA., São Paulo-Brasil. **Metodologia:** Amostras de extrato concentrado de PME, obtidas de polpa de goiaba dessalinizada, foram aplicadas em uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF (HITRAPTM), eluição com solução tampão borato-acetato 50mmol.L⁻¹, pH 8,3, frações coletadas de 5 mL por min., e leituras feitas a 280nm. As frações com atividade enzimática foram reunidas, aplicadas e eluídas com a mesma solução tampão em coluna cromatográfica de filtração em gel Sephadex[®] G-100 (0,25mL.min⁻¹) e alíquotas coletadas foram seguidas a 280nm. **Resultados e Conclusão:** O perfil de eluição apresentou apenas um pico proteico com atividade enzimática, cujas frações foram juntadas para os estudos cinéticos-enzimático. O fator de purificação da PME foi de 8 vezes, pH ótimo igual a 9,0, temperatura ótima maior que 93°C, mostrou ter elevada estabilidade térmica em todas as temperaturas estudadas, principalmente à 98°C e, massa molecular estimada de 4.354 Da. O estudo com inibidores específicos mostrou dados de IC₅₀ (quantidade que dá 50% de inibição) na faixa de 0,56mg.mL⁻¹ à 0,04mg.mL⁻¹, destacando-se o açúcar simples sorbitol, melhor inibidor, com grande potencial de uso em indústria alimentícia.

Palavras-chave: Goiaba. Pectinametilesterase. Parâmetros cinéticos.

INTRODUÇÃO

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO) de 2009, o Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas com uma produção aproximada de 40 milhões de toneladas por ano, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor, onde destaca-se a cultura de goiaba vermelha, colocando o Brasil como o principal produtor mundial desta fruta. A goiaba vermelha tem alto valor nutricional, por possuir um elevado teor de vitamina A, vitaminas do complexo B e vitamina C, além de pectina, proteínas e sais minerais (MEDINA, 1988; GERHARDT et. al., 1997). É consumida *in natura*, mas, também, pode ser processado na forma de polpa utilizada no preparo de doces, como goiabada, sucos na forma de néctares e geleia, devido ao seu elevado teor de pectina, o que lhe confere boa viscosidade (JAGTIANI; CHAN; SAKAI, 1988; MEDINA, 1988). Na indústria de alimentos, a pectina é conhecida primariamente como um agente gelificante, onde a alteração de sua estrutura fina afeta profundamente a sua funcionalidade, principalmente na produção de doces e geleias, onde é amplamente utilizada. Portanto, o estudo acadêmico das enzimas pectinolíticas responsáveis pela alteração estrutural desta biomolécula é de fundamental importância para a indústria de alimentos. A pectina é uma classe de polissacarídeos complexos, sendo principalmente um polímero linear do ácido α -D-galacturônico (GalA), onde os resíduos podem estar metil-esterificados, o que dá um profundo impacto nas propriedades funcionais e aplicabilidade industrial da pectina (GUILLOTIN et al, 2006; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Sabe-se que as enzimas pectinolíticas atuam sobre a pectina degradando-a naturalmente e que dentre elas, encontra-se a pectinametilsterase (PME; E.C.: 3.1.1.11) uma esterase altamente específica e amplamente distribuída entre plantas e microrganismos, que hidrolisa as ligações metil-éster de resíduos GalA, diminuindo o grau de esterificação da molécula (HAGERMAN; AUSTIN, 1986; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Durante o processamento industrial e armazenamento desta polpa, poderá ocorrer a desesterificação da pectina pela PME, resultando na perda de qualidade do produto final. Tal ação catalítica torna a PME uma das mais importantes enzimas no processo de industrialização e preservação de frutas, que envolve a presença de pectina intacta, pois afeta significativamente a estrutura desta molécula e conseqüentemente sua funcionalidade (ALONSO; RODRÍGUEZ; CANET, 1997).

OBJETIVOS

Os estudos prévios realizados por Leite et al. (2006) de purificação parcial da PME de goiaba cultivar Paluma, sugeriram a presença de isoenzimas, o que levou a proposta do presente trabalho em realizar a purificação da PME de goiaba cultivar Paluma, utilizando técnicas de cromatografia em coluna de troca iônica e de filtração em gel, com o isolamento de possíveis isoenzimas e de caracterização dos parâmetros cinéticos, bem como o estudo da estabilidade térmica e de inibidores com uso potencial em indústria alimentícia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e amostragem da fruta: As goiabas, cultivar Paluma, foram fornecidas pela Indústria Predilecta Alimentos LTDA, de São Lourenço do Turvo, Matão-SP, Brasil. Elas foram coletadas aleatoriamente de caixas que seriam utilizadas para o processamento industrial, e trazidas ao laboratório sob refrigeração, tratadas para a obtenção do pó cetônico que foi armazenado a -18 °C para os futuros estudos.

Extração da PME: O pó cetônico de polpa de goiaba foi homogeneizado na presença de solução tampão extrator borato-acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 8,3, contendo 0,20 mol.L⁻¹ de NaCl na razão de 1:3 (m/v). A mistura foi mantida à 4 °C sob agitação constante e depois centrifugada a 17.000 g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi levado a 70% de saturação com a adição de sulfato de amônio (DIXON; WEBB, 1979), sendo então centrifugado novamente na mesma condição anterior. O precipitado foi ressuspenso em solução tampão extrator na razão de 1:1 (m/v), sendo denominado extrato concentrado de PME.

Determinação da unidade de atividade (UA) e atividade específica (AE) da PME concentrada e purificada: A unidade de atividade da PME foi determinada de acordo com o método titrimétrico definido por Kertesz (1955), onde a atividade da PME foi medida pela quantidade de grupos carboxílicos formados pela ação enzimática sobre a pectina (substrato). Os ensaios foram realizados em triplicata para a determinação da velocidade inicial da reação (v_0). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de éster hidrolisado por minuto nas condições de ensaio. A unidade de atividade (UA) foi assim calculada pela relação entre v_0 e o volume de extrato/eluato enzimático utilizado nos ensaios. A atividade específica foi calculada através da razão entre UA e o teor de proteína.

Determinação do teor de proteína: O teor de proteína total da amostra enzimática foi determinado através do método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

Estudos de inibidores de amostras de PME - determinação do IC₅₀ (concentração em mg.mL⁻¹ que causa 50% de inibição): Foram realizados estudos com a PME concentrada na presença dos seguintes inibidores para determinação do IC₅₀: ácido poligacturônico, sacarose, maltose, ácido tânico e frutose (0,10; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00 mg.mL⁻¹) e glicose (0,02; 0,04; 0,08; 0,10; 0,50 mg.mL⁻¹).

Purificação da PME concentrada: Dois mililitros de amostra enzimática de PME concentrada foram aplicados e eluídos através de cromatografia em gel filtração em Sephadex G-25 (1,0 x 8,0 cm) para dessalinização. Em sequência, oito mililitros de amostra de PME dessalinizada foram aplicados e eluídos em cromatografia de troca aniônica Q-Sepharose (HITRAP™ QFF-GE health care) e as frações foram coletadas utilizando-se um coletor de frações, sendo a troca aniônica realizada após o recolhimento da oitava fração, com intuito de se confirmar ou não a ligação da amostra enzimática ao trocador, em um gradiente de solução tampão borato-acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 8,3 salino (NaCl de 0,0 a 2,0 mol.L⁻¹). Cada fração colhida foi monitorada à 280 nm e aquelas com atividade enzimática, foram reunidas e designada como PME₁. Em seguida, dois mililitros desta amostra obtida foi aplicada e eluída (solução tampão borato-acetato 50 mM, pH 8,3) em uma coluna cromatográfica de gel filtração em Sephadex G-100 (1,30 x 41 cm). Alíquotas de 2 mL foram coletadas automaticamente, leituras foram feitas a 280 nm e analisadas quanto a atividade enzimática. As frações com atividade enzimática foram reunidas e estocadas, recebendo a denominação de PME₂ sendo utilizada nos ensaios de caracterização dos parâmetros cinéticos e de estabilidade térmica.

Determinação da massa molecular: A estimativa da massa molecular das amostras, obtidas nos passos de purificação, foi realizada por técnica de cromatografia em coluna, onde a massa molecular da PME de goiaba foi avaliada por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100 (1,30 x 41 cm), previamente calibrada com padrões proteicos de massa molecular conhecida.

Estudos de estabilidade térmica: Para a determinação da estabilidade térmica, amostra de PME foi colocada em tubos de ensaio de tamanho e peso iguais e estocadas em banho-maria variando-se a temperatura (50; 75 e 98 °C) e o tempo de estocagem (1; 10; 20; 30; 40; 50; 60 minutos). Alíquotas foram retiradas em cada tempo de estocagem. A atividade

catalítica residual foi posteriormente determinada nas condições pré-estabelecidas de ensaio (LEITE et al.,2006).

pH ótimo e temperatura ótima: A determinação do pH ótimo foi realizada através da medida da atividade da PME, variando-se os valores de pH do meio reacional (8,0; 8,5; 9,0; 9,5), mantendo-se constantes os demais parâmetros das condições de ensaio pré-estabelecidas. Os ensaios do efeito da temperatura na atividade da PME foram conduzidos variando-a entre 50 e 93 °C no meio reacional e mantendo-se constantes os demais parâmetros nas condições de ensaio pré-estabelecidas. Ensaio de controle da pectina (branco) na ausência da PME₂ foram realizados para cada pH e temperatura estudada e a quantidade de ácido produzida pela demetoxilação espontânea da pectina devido ao efeito do pH e da temperatura, foi subtraído dos valores obtidos quando da presença da PME₂.

Determinação das constantes cinéticas k_M e v_{max} : A velocidade inicial da reação em diferentes concentrações de substrato na presença da PME foi determinada e o valor de k_M e v_{max} através da representação gráfica do duplo recíproco de Lineweaver-Burk foi estimado (DIXON; WEBB, 1979).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Purificação da PME concentrada: A amostra de PME foi dessalinizada e aplicada em coluna cromatográfica de trocador de ânions, os resultados mostraram um perfil cromatográfico apresentando dois picos de proteína, um fora do gradiente salino e outro eluído no gradiente de 0,0 a 2,0 mol.L⁻¹ de NaCl. A PME teve atividade confirmada no pico que não se ligou ao trocador de ânions, sendo denominada PME₁ (FIGURA 1). As frações reunidas foram aplicadas e eluídas em cromatografia de gel filtração Sepadex G-100, que apresentaram apenas um pico de atividade para a PME sendo designado PME₂ (FIGURA 2), com um fator de purificação de 8 vezes e massa molecular estimada de 4.354 Da.

Estudos de estabilidade térmica: O estudo do efeito da temperatura sobre a estabilidade e a ação catalítica da PME é de grande importância para a indústria alimentícia de frutas, sobretudo pela perda de moléculas de pectina viáveis para a formação da massa do doce, devido a desterificação desta pela PME que deve ser inativada no processamento industrial. Em estudos prévios realizados com PME de goiaba (LEITE et al, 2006) foi constatado que, tanto na forma concentrada, como parcialmente purificada, esta possui uma elevada estabilidade térmica o que implicaria na desestruturação da pectina durante o processamento industrial. A PME em estudo (FIGURA 3) também mostrou uma alta

estabilidade térmica à 98 °C, com um aumento significativo da atividade enzimática entre 30 e 40 minutos de estocagem, que não foi observado para a amostra designada PME concentrada, mais foi semelhante para a forma parcialmente purificada (LEITE et al, 2006). Em estudos de PME de outras fontes, há relatos de termoestabilidade elevada como para acerola (ASSIS et. al., 2002). O comportamento térmico da PME em cinco cultivares de tomates usados em sucos e produtos de tomates revelaram que somente uma das cinco variedades conservou atividade catalítica para a PME. Esta observação poderia explicar a perda do *cloud* ocorrida em alguns produtos de tomates durante o período de estocagem. (LARATA, et al., 1995). Com relação à PME de goiaba cultivar Paluma, tanto a PME₂, como a forma concentrada e parcialmente purificada, mostraram-se estáveis ao tratamento térmico.

pH ótimo e temperatura ótima: O efeito do pH na atividade da PME foi realizado variando-se o pH do meio de reação indicando um pH ótimo igual a 9,0, valor que se encontra na faixa entre 8,0 e 9,0 (FIGURA 4) já estabelecido para a PME de goiaba (LEITE et al. 2006). Em geral, o pH varia para a maioria das frutas numa faixa de 7.0-9,0 (ASSIS et al., 2002; AMARAL; ASSIS; OLIVEIRA, 2005). A atividade específica para a PME₂ aumenta com a temperatura estudada, mostrando alta dependência em relação à temperatura no meio de reação (FIGURA 3). Para a PME concentrada e parcialmente purificada de goiaba os valores encontrados foram de 75 e 85 °C, respectivamente (LEITE et al., 2006). A temperatura ótima de outras fontes varia de 50 a 90 °C (KORNER; ZIMMERMANN; BERK, 1980; FACHIN et al., 2002).

Determinação dos parâmetros cinéticos: Através do gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (DIXON; WEBB, 1979) determinou-se para a PME₂ os valores aparentes das constantes cinéticas k_M e v_{max} de 0,12 mg.mL⁻¹ e 1,66 μmoles.min⁻¹, respectivamente. Os valores de k_M comparados com outras fontes de PME de frutas estão em uma faixa de 0,083 a 0,52 mg.mL⁻¹ (ALONSO; RODRÍGUEZ; CANET, 1997).

Estudos de inibidores da PME concentrada, determinação do IC₅₀: O estudo de inibidores para a PME é de fundamental importância para a indústria alimentícia, como um método alternativo para a inibição da atividade enzimática. Realizaram-se então estudos com alguns inibidores clássicos apresentados na literatura (CHANG; MORITA; YAMAMATO, 1965). Os inibidores clássicos testados foram: ácido poligalacturônico, ácido tânico, sacarose. Além destes, também foram testados: a maltose, os monossacarídeos glicose, frutose e sorbitol (FIGURA 5). Estudos com a PME de cenoura, Alonso et al. (2003) mostraram inibição da enzima PME na presença de concentração elevada de ácido poligalacturônico, já

as quatro isoformas da PME de cerejas doces purificadas por Alonso, Rodríguez e Canet (1996) foram inativadas pelo ácido D-galacturônico.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a purificação da PME de goiaba da cultivar Paluma mostrou apenas uma enzima presente no extrato enzimático, uma enzima termoestável, alcalina e com elevada temperatura de atividade. O estudo de inibidores mostrou a maltose como bom inibidor e com potencial uso pela indústria de alimentos, podendo contribuir para a inativação enzimática no processamento industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, J.; Howell, N. L.; Canet, W. Purification and characterization of two pectinmethylesterase from premisimon (*Diospyro kaki*). *J. Sci. Food Agric*, v. 75, p. 352-358, 1997.
- Alonso, J.; Canet, W.; Howell, N.; Alique, R. Purification and characterization of carrot (*Daucus carota* L.) pectinesterase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 83, n. 15, p. 1600-1606, Dec. 2003.
- Alonso, J.; Rodríguez, M. T.; Canet, W. Purification and characterization of four pectinesterases from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 11, p. 3416-3422, Nov. 1996.
- Amaral, S. H.; Assis, S. A.; Oliveira, O. M. M. F. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus simensis*) CV. pera-rio. *J. Food Biochem.*, v. 29, p. 367-380, 2005.
- Assis, S. A.; Martins, A. B. G.; Guaglianoni, D. G.; Oliveira, O. M. M. F. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L). *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 4103-4107, 2002.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Chang, L. W. S.; Morita, L. L.; Yamamoto, H. Y. Papaya pectinesterase inhibition by sucrose. *Journal of Food Science*, v. 30, n. 2, p. 218-222, Mar. 1965.
- Dixon, M.; Webb, E. L. Enzyme kinetic. In: *Enzymes*. New York: Academic Press, New York, 1979.
- Fachin, D.; Van Loey, A. M.; Ly Nguyen, B.; Verlent I.; Indrawati, I.; Hendrickx, M. E. Comparative study of the inactivation kinetics of pectinmethylesterase in tomato juice and purified form. *Biotech. Prog.*, v. 18, p. 739-744, 2002.
- Gerhardt, L. B. D. et al. Physicol-chemical characteristics of fruits on four cultivars and three clones of guava trees in Portulucena, RS. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 32, p. 185-192, 1997.

Guillotin, S. E.; Van Loey, A.; Boulenger, P.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 85-91, 2007

Hagerman, A. E.; Austin, P. J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J. Agric. Food Chem.*, v. 34, p. 440-444, 1986.

Jagtiani, J.; Chan, H. T.; Sakai, W. S. *Tropical Fruit processing*. New York: Academic Press, 1988.

Kertesz, Z. I. Pectic Enzymes In: Colowick, S. P.; Kaplan, N. O. (Eds). *Methods of enzymology*. New York: Academic press, 1955.

Korner, B.; Zimmermann, G.; Berk, Z. Orange pectinesterase: purification, properties and effect on cloud stability. *J. Food Sci.*, v. 45, p. 1203-1206, 1980.

Larata, B.; Fasanaro, G.; Sio, F.; Castaldo, D.; Palmieri, A.; Giovane, A. Thermal inactivation of pectin methylesterase in tomato pure: implications on cloud stability. *Process Biochemistry*, v. 30, p. 251-259, 1995.

Leite, K. M. S. C.; Tadiotti, A. C.; Baldochi, D.; Oliveira, M. M. F. Partial purification, heat stability and kinetic characterization of the pectinmethylesterase from brazilian guava, Paluma cultivars. *Food Chemistry*, v. 94, p. 565-572, 2006.

Medina, J. C. *Goiaba: cultura - Série de frutas tropicais nº6 goiaba*. 2ª ed. Campinas: ITAL, 1988.

Willats, W. G. T.; Knox, P.; Mikkelsen, D. Pectin; new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, p. 97-104, 2006.

FIGURAS

Figura 1 - Perfil de eluição de PME de goiaba - Cromatografia em Q-Sepharose.

Proteína (○) e Atividade específica PME (●) (n=3).

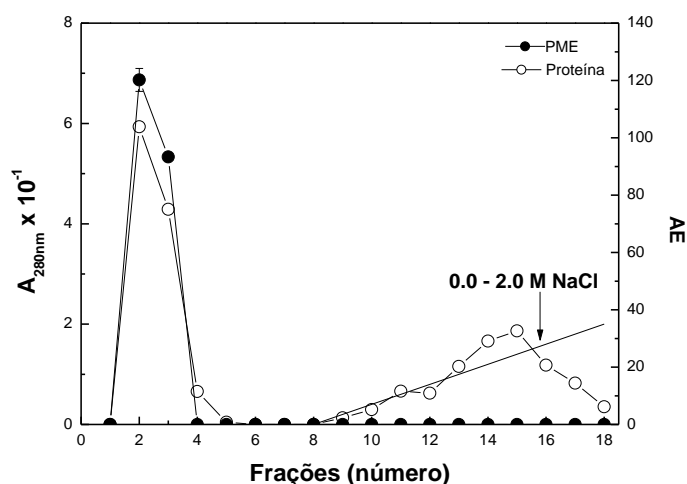


Figura 2 - Perfil de eluição de PME de goiaba - Cromatografia em Sephadex G-100.

Proteína (○) e Atividade específica PME (●) (n=3).

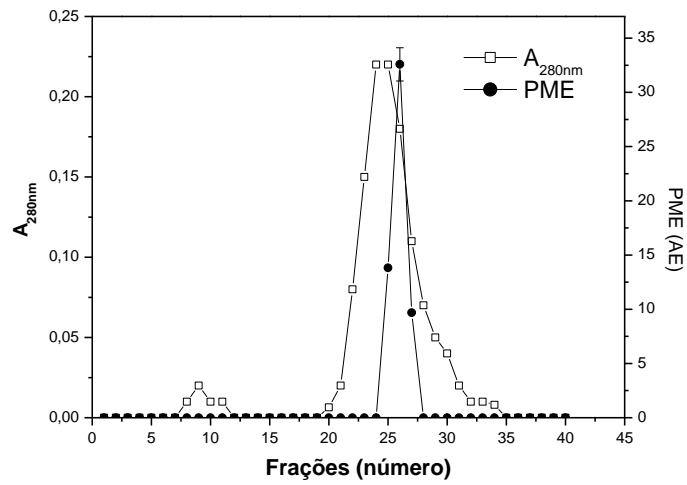


Figura 3 - Estabilidade térmica da PME₂

Estocagem em temperatura a 50°C (■), 75°C (○) e 98°C (◇) (n=3).

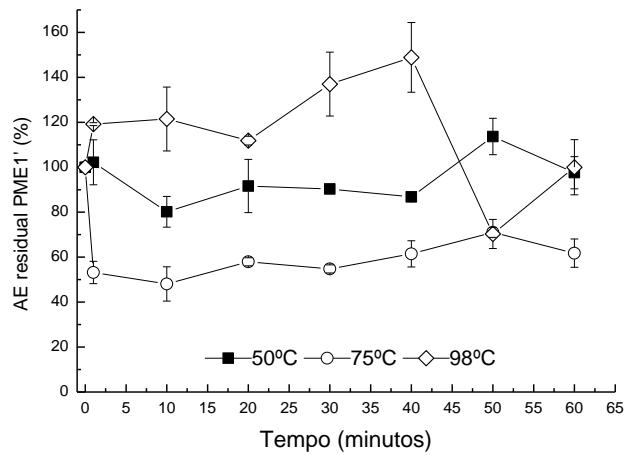


Figura 4 - Efeito do pH e da temperatura na atividade da PME₂.

Todas as reações foram seguidas em temperatura entre 50-93 °C e pH entre 8.0-9.5. (n=3).

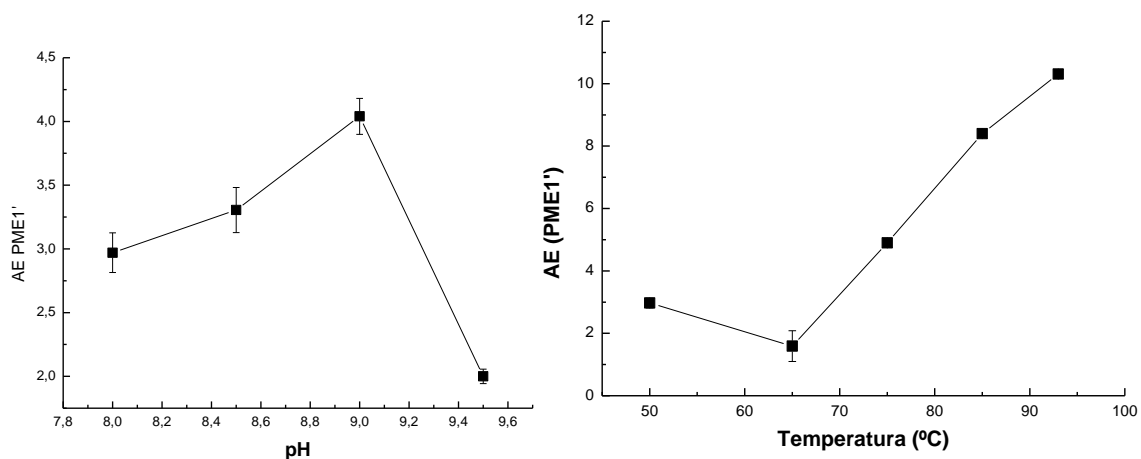
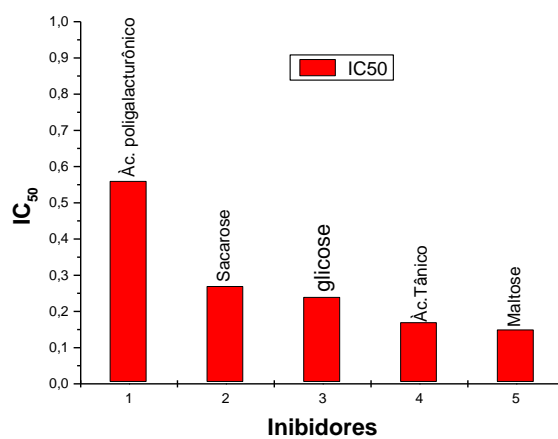


Figura 5 - IC₅₀ dos inibidores estudados com a PME concentrada de goiaba



EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN POLEN APÍCOLA COMO SUSTRATO PARA FERMENTACIÓN

Claudia Salazar-González¹, Carlos Zuluaga, Consuelo Díaz-Moreno, Carolina Gutiérrez-Cortés

¹Claudia Salazar: cysalazarg@unal.edu.co, estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos - Ingeniera Química, Universidad Nacional de Colombia.

Carlos Zuluaga: cmzuluagad@unal.edu.co, estudiante de Doctorado en Ingeniería - Ingeniería Química – Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia.

Consuelo Díaz-Moreno: amcdiazmo@unal.edu.co, Profesora Asociada, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA, Universidad Nacional de Colombia.

Carolina Gutiérrez-Cortés: cgutierrezco@unal.edu.co, estudiante de Doctorado en Biotecnología – Microbióloga Industrial, Universidad Nacional de Colombia.

INTRODUCCIÓN

El polen apícola es obtenido por las abejas obreras en su actividad de pecoreo, en la que recolectan néctar y polen. El resultado de la aglutinación del polen floral con adición de secreciones salivares y néctar da origen al polen apícola (Campos M. 2008). Este contiene proteínas, fibra, humedad, compuestos minoritarios como minerales, vitaminas y algunos compuestos bioactivos (Campos M. 2008; Bogdanov 2011), que se encuentran principalmente al interior del polen, recubiertos por la intina y la exina (Ríos 2004), capas protectoras del polen.

La intina es una capa porosa compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, pectinas y algunos polisacáridos (Kovacik, Plitzko et al. 2009; Atkin, Barrier et al. 2011) y la exina, una de las paredes más complejas en las plantas (Domínguez E. 1999), está compuesta por diversas sustancias orgánicas e inorgánicas, entre las que se encuentra la esporopolenina, polímero que le da la resistencia química al polen por su estructura (Kovacik, Plitzko et al. 2009). La esporopolenina es una red compleja, en la que se han encontrado grupos funcionales como fenoles, ácido ferúlico, ácido p-cumárico (Wehling K. 1989), algunos ésteres y derivados de carotenoides (Domínguez E. 1999; Thomasson, Baldwin et al. 2010), ácidos grasos, ésteres y éteres (Barrier S. 2010). Ésta es resistente a procesos de degradación física, biológica, tratamientos con ácidos y base fuertes y acetólisis, entre otros (Domínguez E. 1999; Thomasson, Baldwin et al. 2010; Atkin, Barrier et al. 2011). Sin embargo se ha encontrado que hay un cambio en la estructura al efectuarse el proceso de conversión de polen apícola a pan de abejas mediante una fermentación en fase sólida (Fuenmayor 2009).

El polen comercializado por los apicultores es necesario someterlo a un proceso de acondicionamiento como materia prima para el proceso de fermentación en fase sólida,

debido a que presenta una alta carga microbiana (Loper G.M. 1980; García García D. 2006), la cual genera competencia por el sustrato con los microorganismos de interés. Para disminuir la carga generalmente se utilizan tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos se utilizan principalmente para evitar contaminación, inactivar enzimas y esporas de microorganismos (Bevilacqua and Corbo 2011), con el fin de aumentar la vida útil y calidad del alimento (Gil, Pereira et al. 2006), ya que muchos microorganismos no sobreviven a altas temperaturas (Caplice and Fitzgerald 1999). Igualmente se aplica en procesos fermentativos (Farnworth 2008). Sin embargo es importante tener en cuenta que el efecto combinado de la temperatura y el tiempo de exposición generan degradación de algunos compuestos como antioxidantes, compuestos volátiles y vitaminas (Bevilacqua and Corbo 2011), y procesos de degradación ocasionados por las reacciones de Maillard (Laroche, Fine et al. 2005).

Para evaluar la efectividad de los tratamientos térmicos se utiliza la esterilidad comercial, parámetro de calidad que verifica la ausencia de microorganismos patógenos o no patógenos que causen alteraciones en los alimentos en condiciones normales de almacenamiento (Alimentaria).

El objetivo del presente trabajo es seleccionar el tratamiento térmico más eficiente para disminuir la carga microbiana presente en el polen, con el fin de adecuar el polen apícola como materia prima para un proceso de fermentación en fase sólida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Polen: El polen húmedo fue suministrado por el apiario Los Cerezos, recolectado en páramo altoandino. Se recolectó y almacenó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), las muestras se mantuvieron en congelación (-18°C) hasta la utilización. Las muestras de polen seco fueron obtenidas por secado con aire caliente a 55°C por 5 horas. El polen fresco y seco fue tamizado, utilizando un juego de tamices de 5, 7, 10, 12, 18, 30 y fondos. Las fracciones seleccionadas para los ensayos fueron las de los tamices 10, 12 y 18.

Preparación de las muestras: Los ensayos se realizaron con polen fresco, polen seco y las relaciones de polen:agua 2:1, 1:1 y 1:2; se utilizó agua potable. Se prepararon cuatro (4) muestras de cada condición con aproximadamente 20g cada uno, de los cuales tres (3) se utilizaron para el análisis de esterilidad comercial y uno (1) para analizar la actividad de agua.

Tratamientos térmicos: Los tratamientos realizados con calor húmedo fueron: 70°C*15min, 70°C*30min, 80°C*15min y 80°C*30min, realizados en un baño termostático Gerber. Los

tratamientos de esterilización fueron: 110°C*36min, 115°C*12min y 121°C*15min (de Castro, Montaña et al. 1998; John, Nampoothiri et al. 2006) realizados en una autoclave Tuttnauer.

Esterilidad comercial: La prueba de esterilidad comercial se realizó de acuerdo a lo estipulado en la Norma Técnica Colombiana NTC 4433 y al INVIMA (INVIMA 1998). Después de obtener las muestras del tratamiento térmico, fueron llevadas a incubación a 37°C y 55°C durante 10 días. Al finalizar el periodo de incubación se pesaron 2g de cada una de las muestras en cada uno de 6 tubos con 10ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion), de los cuales 3 se incubaron en aerobiosis y 3 en anaerobiosis en las mismas condiciones a las que fueron incubados inicialmente (37 y 55°C). Después de 72 horas se realizan láminas, que se dividen en campos y se realiza un conteo de células bacterianas en cada uno de los campos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El polen utilizado en los ensayos fue sometido a un análisis microbiológico previo, con el fin de evaluar la carga microbiana inicial y verificar la efectividad de los procesos térmicos. Los resultados se muestran a continuación:

De acuerdo a un estudio realizado en el 2006 (García García D. 2006) en la Universidad Nacional se encontraron diferentes tipos de bacterias y hongos en el tracto digestivo de las abejas, lo cual indica que parte del contenido microbiológico presente en el polen es aportado por las abejas en el proceso de recolección, donde le adicionan secreciones salivares para su transporte a la colmena (Loper G.M. 1980). Los hongos se encuentran generalmente en el suelo y las plantas que las abejas visitan en su proceso de pecoreo (García García D. 2006), por tanto la presencia de microorganismos en el polen es justificada, sin embargo debe tenerse en cuenta los límites permitidos para su comercialización como alimento de consumo directo.

Actualmente, en Colombia no se cuenta con estándares de calidad del polen. Por lo tanto en la Tabla 2 se presentan los límites microbiológicos establecidos por normatividad internacional:

Comparando los resultados obtenidos con los límites microbiológicos de otros países (Tabla 2) se observa que el polen del apiario cumple con los valores para *Salmonella* para polen fresco y seco, con mohos y levaduras para el polen seco, sin embargo para los otros análisis se encuentra por encima de los límites permitidos, lo que indica que deben mejorarse

las Buenas Prácticas Apícolas (BPA) en el proceso de recolección del polen por parte de los apicultores, y en el proceso de poscosecha y beneficio (tamizado, secado y almacenamiento).

Las muestras de polen, al tener alta carga microbiana inicial, genera competencia con los microorganismos de interés en la fermentación en fase sólida (Fuenmayor 2009), por tanto se realizaron los tratamientos térmicos y una prueba de esterilidad comercial para verificar su efectividad. Igualmente se determinó la actividad de agua en los distintos tratamientos y relaciones de polen. Los resultados se muestran a continuación:

Se realizaron los tratamientos para evaluar el comportamiento del sustrato respecto a la temperatura. Se observó que los tratamientos con calor húmedo iguales o menores a 80°C no lograron reducir la carga microbiana, resultados acordes con lo reportado por Fuenmayor (Fuenmayor 2009), que realizó tratamientos con calor seco y no redujeron la carga microbiana.

De acuerdo a Montville al disminuir la temperatura de esterilización y aumentar el tiempo se logra el mismo efecto que al tener una alta temperatura con un menor tiempo de exposición, sin embargo el tratamiento a 110°Cx36min no resultó igual de efectivo que el realizado a 121°Cx15min o 115°Cx12min, lo que indica que al disminuir la temperatura, el tratamiento no es eficiente en la destrucción bacteriana, a pesar de aumentar el tiempo de exposición.

En el tratamiento de 115°Cx12min, la relación 1:2 y el polen seco presentaron resultados no satisfactorios a pesar que en las otras relaciones la prueba fue satisfactoria, esto puede ser ocasionado por contaminación en el proceso de secado, en el horno, las mallas, los tamices, la manipulación o el contenido de agua en la matriz. Laroche ha reportado estudios en los que se demuestra que baja actividades de agua generan una mayor resistencia de los microorganismos a la destrucción, especialmente en el rango 0.2-0.5, valores acorde con la actividad de agua reportada para el polen seco. Esto se debe a que el agua está en contacto con las proteínas de las células y al aplicar temperatura las moléculas de agua empiezan a vibrar y afectan la estructura tridimensional de las proteínas llevando a su desnaturalización. Al existir una menor cantidad de agua no existe tanta vibración y la estructura se mantiene (Laroche, Fine et al. 2005). Igualmente Ray reporta que a mayor actividad de agua los microorganismos son más susceptibles al daño por calor (Ray 2004), por tanto el polen seco (con baja a_w) presenta mayor resistencia a la destrucción microbiana. Otro factor de resistencia es la composición de la matriz alimenticia, de acuerdo a Ray (Ray 2004) a mayor cantidad de carbohidratos, proteínas y lípidos hay más protección para los microorganismos

contra los daños por el calor, y el polen es una matriz con un alto contenido de dichos nutrientes.

El tratamiento de 121°Cx15min fue el que reportó pruebas satisfactorias en todas las relaciones de polen-agua, es decir, no hay crecimiento de microorganismos, ni aerobios ni anaerobios, resultados acordes con los reportados por Fuenmayor en 2009 (Fuenmayor 2009), por tanto será el tratamiento recomendado para la fermentación en fase sólida.

CONCLUSIONES

El tratamiento que presentó pruebas satisfactorias para la prueba de esterilidad comercial fue el realizado a 121°Cx15minutos. Por tanto será el utilizado para la adecuación del polen como materia prima para el proceso de fermentación en fase sólida.

AGRADECIMIENTOS

Al “Programa Estratégico en Alternativas para la Generación de Valor en Productos Apícolas en Colombia a través de la Innovación y el Desarrollo Tecnológico” financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación –Colciencias-, al Instituto de Ciencia y Tecnología de alimentos -ICTA- de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y al apiario Los Cerezos, por facilitar los recursos para esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Alimentaria, C. N. d. T. y. S. Normativas Aplicables a Alimentos Conservados mediante Tratamiento Térmico y Envase Hermético mantenidos a Temperatura Ambiente a lo largo de su vida útil: 4.

Atkin, S. L., S. Barrier, et al. (2011). "UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed)." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 102(3): 209-217.

Barrier S., L. A., Boasman A.J., Boa A.N., Lorch M., Atkin S.L., Mackenzie G. (2010). "Access to a primary aminosporepollenin solid support from plant spores." *The Royal Society of Chemistry* 12: 234-240.

Bevilacqua, A. and M. R. Corbo (2011). "Characterization of a Wild Strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Heat Resistance and Implications for Tomato Juice." *Journal Of Food Science* 76(2): M130-M136.

Bogdanov, S. (2011). "The Pollen Book, Chapter 1. Pollen Collection, Harvest, Composition, Quality." *Bee Product Science*: 12.

- Campos M., B. S., Bicudo de Almeida-Muradian L., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio C., Ferreira F. (2008). "Pollen composition and standardisation of analytical methods." *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2): 156-163.
- Caplice, E. and G. F. Fitzgerald (1999). "Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation." *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2): 131-149.
- de Castro, A., A. Montaña, et al. (1998). "Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic." *International Journal of Food Microbiology* 39(3): 205-211.
- Domínguez E., M. J. A., Quesada M.A., Heredia A. (1999). "Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation." *Sex Plant Reproduction* 12: 171-179.
- Farnworth, E. R. (2008). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Boca Ratón, CRC/Taylor y Francis.
- Fuenmayor, C. A. (2009). *Aplicación de Bioprocesos en Polen de Abejas para el Desarrollo de un Suplemento Nutricional Proteico*. Ingeniería. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia: 225.
- García García D., R. M. M. A., Sánchez Nieves J. (2006). "Contenido Microbiológico Cultivable del Tracto Intestinal y Polen Almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)." *Acta Biológica Colombiana* 11(1): 123 - 129.
- Gil, M. M., P. M. Pereira, et al. (2006). "Integrated approach on heat transfer and inactivation kinetics of microorganisms on the surface of foods during heat treatments—software development." *Journal of Food Engineering* 76(1): 95-103.
- INVIMA (1998). *Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. . h. M. Holguin M, Rubio B, Vargas M, Muñoz A, Diaz G. , Bogotá - Colombia.
- John, R. P., K. M. Nampoothiri, et al. (2006). "Solid-state fermentation for l-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*." *Process Biochemistry* 41(4): 759-763.
- Kovacik, L., J. M. Plitzko, et al. (2009). "Electron tomography of structures in the wall of hazel pollen grains." *Journal of Structural Biology* 166(3): 263-271.
- Laroche, C., F. Fine, et al. (2005). "Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders." *International Journal of Food Microbiology* 97(3): 307-315.
- Loper G.M., S. L. N., Thompson M.J., Gilliam M. (1980). "Biochemistry and Microbiology of Bee-collected Almond (*Prunus Dulcis*) Pollen and Bee Bread." *Apidologie* 11(1): 63-73.
- Maria G. R. Campos, S. B., Ligia Bicudo de Almeida-Muradian, Teresa Szczesna, Yanina Mancebo, Christian Frigerio, Francisco Ferreira (2008). "Pollen composition and standardisation of analytical methods." *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2): 156-163.
- Prado, J. V. (2005). *Caracterización físico-química y microbiológica del polen de abejas de cinco departamentos de Honduras*. Honduras, Zamorano. Ingeniería Agroindustrial en el Grado Académico de Licenciatura: 93.
- Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology*, CRC Press LLC.
- Ríos, C. A. D. R. (2004). "Polen-Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud Humana y Microbiología." 13.

Thomasson, M. J., D. J. Baldwin, et al. (2010). "Electrochemistry and charge transport in sporopollenin particle arrays." *Electrochemistry Communications* 12(10): 1428-1431.

Wehling K., N. C., Boon J.J, Willemse M.T., Wiermann R. (1989). "p-Coumaric acid- a monomer in the sporopollenin skeleton." *Planta* 179: 376-380.

Tabla 3. Contenido microbiológico del polen fresco y seco– apiario Los Cerezos.

	Aerobios mesófilos UFC/g	Mohos y levaduras UFC/g	Coliformes totales NMP	Coliformes fecales NMP	Recuento <i>S. aureus</i> UFC/g	Presencia <i>Salmonella</i> sp.	Esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor
Fresco	7,9 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵	43	<3	<10	Ausencia	<10
Seco	6,0 x 10 ³	3,8 x 10 ⁴	9	<3	<10	Ausencia	<10

Tabla 4. Límites microbiológicos establecidos para el polen apícola.

Microorganismo	Cuba (Ríos 2004)	Argentina (Prado 2005; Fuenmayor 2009)	México (Prado 2005; Fuenmayor 2009)	El Salvador (Prado 2005)	Brasil (Prado 2005)	Unión Europea (Maria G. R. Campos 2008)
Aerobios (UFC/g)	10.000		10.000			<10.000
Coliformes (NMP/g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	
<i>E. coli</i> (Presencia/g)	Ausencia		Ausencia			Ausencia
<i>Salmonella</i> (/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia			Ausencia
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Ausencia		Ausencia			Ausencia
Levaduras y mohos (UFC/g)	300	100	300	300	100	<50.000

Tabla 5. Esterilidad comercial y actividad de agua (a_w) en los diferentes tratamientos térmicos.

Esterilidad comercial			
Condición	Polen: Agua	Resultado	a_w
Fresco	-	No Satisfactorio	-
70°C - 15min	-	No Satisfactorio	-
70°C - 30min	-	No Satisfactorio	-
80°C - 15min	-	No Satisfactorio	-
80°C - 30min	-	No Satisfactorio	-
110°C - 36min	Fresco	No Satisfactorio	0.721
110°C - 36min	2:1	No Satisfactorio	0.887
110°C - 36min	1:1	No Satisfactorio	0.951
110°C - 36min	1:2	No Satisfactorio	0.981
110°C - 36min	Seco	No Satisfactorio	0.402
115°C - 12min	Fresco	Satisfactorio	0.720
115°C - 12min	2:1	Satisfactorio	0.886
115°C - 12min	1:1	Satisfactorio	0.942
115°C - 12min	1:2	No Satisfactorio	0.963
115°C - 12min	Seco	No Satisfactorio	0.459
121°C - 15min	Fresco	Satisfactorio	0.758
121°C - 15min	2:1	Satisfactorio	0.878
121°C - 15min	1:1	Satisfactorio	0.920
121°C - 15min	1:2	Satisfactorio	0.966
121°C - 15min	Seco	Satisfactorio	0.403

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE *TAGETES FILIFOLIA* LAG. “ANÍS DE LA SIERRA” COMO FUENTE DE ACEITE ESENCIAL PARA USO AGROINDUSTRIAL

Barrena Gurbillón, Miguel Angel. Doctor en Ciencias e Ingeniería. Profesor Principal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM). mabg_98@hotmail.com

Gamarra Torres, Oscar Andrés. Maestro en Ecología y Gestión Ambiental. Profesor Principal de la UNTRM. osgat77@yahoo.com

Maicelo Quintana, Jorge Luis. Ingeniero Zootecnista. Director Ejecutivo del Instituto de Investigación INDES-CES de la UNTRM. jomaqt@hotmail.com

LINTRODUCCIÓN

La diversidad vegetal en el Perú tiene más de 18650 taxones de plantas vasculares con producción de semillas, que incluyen a las gimnospermas como angiospermas (Ulloa Ulloa y otros, 2004). Además de poseer esta gran riqueza vegetal es considerado un centro de diversidad y domesticación de gran número de recursos genéticos vegetales (Quezada y otros, 2005); por lo que el país tiene la oportunidad de convertir la biodiversidad en elemento de desarrollo económico y social a través de su valoración, uso sostenible y conservación.

T. filifolia Lag. es conocida en el Perú como “anís de la sierra”, “anisillo”, “anisqueua”. Es una especie pequeña, herbácea, anual, fragante de la sierra peruana donde crece de manera espontánea, con hojas compuestas y capítulos pequeños amarillentos; usado como condimento por su contenido en esencias cuyo olor hace recordar al “anís”. Posee propiedades carminativas y antiespasmódicas por lo que se prepara en infusiones aromáticas (Mostacero y otros, 2002). Las poblaciones locales no cultivan esta hierba, sólo la recolectan del campo en épocas de lluvia donde se encuentra en abundancia. Actualmente en el Perú no existen estudios referidos a la fenología y crecimiento de esta especie, menos aún información sobre su contenido de aceites esenciales.

La fenología estudia las fases de desarrollo de las plantas, como la germinación, floración, fructificación y senescencia; las que pueden ser afectadas por las condiciones ambientales (Larcher, 1986). Crecimiento vegetativo describe las actividades asociadas con la producción y expansión de las hojas, la formación de meristemos laterales, apicales y el crecimiento de algunos de ellos en forma ramificada, así como la expansión del sistema radical (Milthorpe y Moorby, 1982).

El aceite esencial es el constituyente odorífero de una planta, existe en las glándulas o entre las células en forma líquida y es inmiscible con el agua. Ocurren en muchas especies de la familia de las *Umbeliferae* (apio, comino, perejil, anís), de *Rutaceae* (limón, naranja, lima,

mandarina), de *Labiatae* (lavanda, romero, timol, orégano), de *Mirtaceae* (eucalipto, clavo), *Piperaceae* (pimiento, matico), entre otras (Lock, 1994).

Industrialmente se utilizan varios procesos para obtener aceites esenciales; el arrastre de la esencia con vapor es uno de los clásicos. Las plantas cortadas se sitúan en calderas con un doble fondo perforado y los vapores de esencia y de agua se condensan en un tubo refrigerante; el aceite esencial flota en el condensado (Primo, 1995).

Con respecto al cultivo se ha reportado que *T. filifolia* Lag. con una densidad de siembra de 20x20 sin roturar el suelo produjo la mayor cantidad de biomasa. Con las densidades de siembra de 15x15 (64 plantas), 20x20 (36 plantas) y 25x25 (25 plantas) evaluadas, reportaron que la densidad de 64 plantas por metro cuadrado y sin roturar permiten la mayor producción de biomasa por planta (36 g) y por metro cuadrado (1295 kg) (Serrato y otros, 2003).

Para *T. filifolia* Lag. se reportó que a los 100 días de su desarrollo vegetativo se obtuvo 1,68 mL de aceite esencial por cada 100 g de materia vegetal; en esta etapa la semilla comienza a madurar y el follaje aún está verde (Serrato y otros, 2003).

En México se emplea como saborizante anisado de cañas de maíz para masticar, en la preparación de curados de pulque (bebida no destilada de agaves), elaboración de mezcal y de licor de anís (con alcohol de caña de azúcar). Además, es empleado como esencia de anís (aceite puro obtenido por destilación rudimentaria) para saborizar cualquier bebida. Su aceite esencial tiene potencial como aromatizador ambiental, descongestionante de vías respiratorias y biocida (Serrato y Barajas, 2006). Tiene efecto ovicida contra el nemátodo *Melodogyne incognita* (Loaiza y otros, 1996), controla la mosquita blanca (*Bemisia* sp. y *Trialurodes* sp.) y moscas adultas de *Trialurodes vaporariorum* en invernadero. Aplicado a plantas de melón lograron completa repelencia a *Bemisia tabaci* además de controlar el pulgón (Serrato y otros, 2003).

La información generada a través de esta investigación permitirá determinar el potencial de “anís de la sierra” para su uso agroindustrial, brindar las posibilidades de masificación de su cultivo y mejorar la economía del poblador rural.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas de *Tagetes filifolia* Lag. evaluadas en el presente estudio fueron cultivadas en parcelas del campo experimental de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), Chachapoyas, Perú.

2.1. Cultivo y producción de *Tagetes filifolia* Lag.

Las semillas fueron extraídas de plantas seleccionadas por su tamaño, porte y ramificación; que estaban en su ambiente natural en la Ciudad Universitaria de la UNTRM y alrededores. Se instalaron 09 parcelas experimentales de 1 m² cada una, tres de cada densidad. Después de un riego pesado se realizó la siembra directa de aproximadamente 10 semillas por punto, con las densidades: 25, 36 y 64 plantas/m². A partir de la siembra, el riego fue diario en los primeros 15 días, luego interdiaria por 30 días y finalmente cada 02 ó 03 días. El desahije de las plantas de *Tagetes filifolia* se hizo cuando tenían una altura aproximada de 5 centímetros y se retiró manualmente las malezas de las parcelas.

2.2. Recolección de datos de *Tagetes filifolia* Lag.

Fenología: Se eligieron dos parcelas y se marcó el 10% de las plantas de cada una, escogidas al azar registrando su evolución durante 5 meses, cada 15 días. Se evaluó: emergencia de plántulas de semilla, crecimiento vegetativo, floración, fructificación y senescencia. En todos los casos se registraron el inicio, plenitud y fin de cada etapa en cada planta que representó la unidad experimental.

Crecimiento: Su evaluación se realizó cada 30 días hasta el final del ciclo de cultivo. El muestreo se realizó al azar, utilizando tres plantas con competencia perfecta en cada época. Se registró los datos de altura de las plantas evaluadas.

Extracción de aceite esencial: Para el equipo de extracción de aceite esencial por arrastre con vapor, se empleó como calderín un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, el vapor fue conducido al fondo del balón Engler de 500 mL que contenía las plantas de *Tagetes filifolia* Lag. sin raíces; de éste balón salió una corriente de vapor de agua y aceite esencial, que fue condensada en el tubo refrigerante y recibido en una probeta de 100 mL, en la cual el aceite esencial flotaba sobre el agua. El contenido de la probeta se trasvasó a un embudo de decantación de 250 mL al que se adicionó salmuera saturada.

2.3. Diseño del experimento

Para las tres variables independientes (Tabla 1), se utilizó el diseño estadístico de Box-Behnken (Greasham & Inamine, 1989), para obtener el mejor valor de cada variable tendiente a conseguir el mayor rendimiento de aceite esencial

Tabla 1. Variables independientes a evaluar con el diseño de Box-Behnken.

Valor	Etapa fenológica (días) X1	Densidad de siembra (plantas/m ²) X2	Tiempo de extracción (min) X3
Alta (+)	140	64	70
Media (0)	130	36	50
Baja (-)	120	25	30

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 2. Fenología de *Tagetes filifolia* Lag. cultivadas en la UNTRM.

Estado Fenológico	Etapa (días)*		
	Inicial	Plenitud	Término
Emergencia de la plántula	14,0 (0,7)	23,0 (2,4)	32,0 (1,4)
Crecimiento vegetativo	40,0 (4,1)	61,0 (4,1)	78,0 (10,6)
Floración	12,0 (2,5)	20,0 (2,1)	22,0 (2,8)
Fructificación	10,0 (3,5)	17,0 (2,7)	18,0 (1,4)
Senescencia	10,0 (1,0)	14,0 (2,2)	7,0 (1,4)

* Se muestran los promedios y desviación estándar

Las primeras plantas de *Tagetes filifolia* Lag. germinaron a partir del día 14; la germinación se extendió hasta el día 32. La germinación no fue uniforme, se presume que esto se deba a la alta variabilidad que tiene la planta, a pesar que se seleccionó semillas que tuvieron un buen tamaño, no dobladas y negras; descartándose para la siembra aquellas semillas que presentaron color marrón, blanco o pardo. El *Tagetes filifolia* Lag. crece de manera silvestre durante la temporada de lluvias en la sierra. Para el presente trabajo de investigación se lo cultivó en parcelas sin fertilizante y se le aplicó riego por aspersión. Puede ser que por no estar en su temporada natural de desarrollo se demoró un poco más en su crecimiento.

La Tabla 3, muestra que los valores de altura de planta siguen un crecimiento exponencial; evidenciado por los valores de altura en función de la edad de la planta.

Tabla 3. Altura de la planta (cm) de *Tagetes filifolia* Lag. cultivadas en el campo experimental de la UNTRM, en función de su edad.

Planta	Edad de la planta (días)				
	30	60	90	120	150
1	3,5*	8,0	22,2	27,3	35,6
2	2,1	4,8	13,3	16,4	31,0
3	3,3	7,6	21,0	25,8	27,0
×	3,0	6,8	18,8	23,2	31,2
σ	0,8	1,7	4,8	5,9	4,3

* Se muestran los promedios y desviación estándar de la altura (cm) de la planta según su edad.

En la Tabla 4 se aprecia que las plantas de *Tagetes filifolia* Lag. crecieron hasta los 120 días, pero su masa se incrementó; excepto para las plantas cultivadas con una densidad de siembra de 64 plantas/m² en las que se presentó una disminución de la masa. Algunas plantas tuvieron sus tallos erguidos y otras tallos casi rastreros, ambas con buen desarrollo de follaje. Al cabo de cada uno de los tiempos experimentales fijados, se procedió a cosechar las plantas de mayor altura y mayor follaje de la parcela correspondiente; dejando las otras para que se sigan desarrollando, esto explica porque para las densidades de siembra de 36 y 64 plantas/m² la altura promedio disminuyó.

Tabla 4. Altura y peso promedio de plantas de *Tagetes filifolia* Lag. en el momento de su cosecha.

Densidad (Plantas/m ²)	120 días		130 días		140 días	
	Alt. Prom. (cm)	Peso Prom. (g)	Alt. Prom. (cm)	Peso Prom. (g)	Alt. Prom. (cm)	Peso Prom. (g)
25	24,68	14,31	25,46	16,44	21,20	17,78
36	25,88	7,84	20,70	14,75	19,84	13,12
64	26,23	12,06	22,43	11,65	19,85	10,93

Con plantas de *Tagetes filifolia* Lag. cultivadas durante 140 días, densidad de siembra de 64 plantas/m² y un tiempo de extracción de aceite esencial por arrastre con vapor de 50 minutos, se ha logrado el mayor rendimiento de aceite esencial (4,363 mL/ 1000 g de plantas). Sin embargo, este valor es cuatro veces menor al reportado de 1,68 mL/100 g de materia vegetal de 100 días de desarrollo vegetativo (Serrato y otros, 2003). Esta diferencia pudo deberse a que a pesar de haber empleado una salmuera saturada para incrementar la separación del aceite esencial del agua, la fase acuosa residual quedaba turbia y con un intenso olor a anís pero ya no flotaba más aceite esencial.

De los resultados mostrados en la Tabla 5, se puede asegurar que el tiempo de extracción de 30 minutos es insuficiente para lograr extraer todo el aceite esencial contenido en las plantas de *Tagetes filifolia* Lag. “anís de la sierra”. Para los mismos días a la cosecha y la misma densidad de siembra, el tiempo de extracción del aceite esencial de 50 minutos es el más adecuado. Prolongando la extracción hasta los 70 minutos, se logra un incremento entre 0,92 a 1,11% en el volumen de aceite extraído, lo cual no es significativo.

Con el software estadístico Statgraphics Plus for Windows ver. 5.1. se obtuvo que con plantas de *Tagetes filifolia* Lag. cultivadas durante 127,1 días, con una densidad de siembra de 56,3 plantas/m² y con un tiempo de extracción de aceite esencial por arrastre con vapor de 50,6 minutos, se puede lograr el máximo rendimiento que llegaría a 4,2 mL de aceite esencial por cada 1000 g de plantas de “anís de la sierra”. Este valor es ligeramente menor al obtenido experimentalmente.

Tabla 5. Producción de aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. y su rendimiento.

Nº de Experimento	Días (X1:A)	Plantas/m ² (X2:B)	Tiempo de extracción (X3:C)	Peso de plantas (g)	Volumen de aceite (mL)	Rendimiento (mL/1000 g)
1	140	64	70	659,1	0,50	0,759
2	140	64	50	779,2	3,40	4,363
3	140	36	70	406,4	1,00	2,461
4	130	64	70	525,3	2,00	3,807
5	140	64	30	779,2	1,60	2,053
6	140	25	70	908,0	3,00	3,304
7	120	64	70	544,8	1,30	2,386
8	140	36	50	1018,0	3,50	3,438
9	130	36	50	884,9	3,40	3,842
10	130	25	30	876,5	0,50	0,570
11	120	25	50	572,4	1,40	2,446
12	140	36	30	1018,0	2,50	2,456
13	120	36	70	345,2	1,20	3,476
14	130	25	70	876,5	2,70	3,080
15	120	25	30	572,4	0,30	0,524

IV. CONCLUSIONES

La germinación de las semillas de *Tagetes filifolia* Lag. “anís de la sierra” no fue uniforme debido a la variabilidad que presenta esta planta.

Las plantas de *Tagetes filifolia* Lag. alcanzaron la plenitud de la emergencia a los 23 días de sembradas, el crecimiento vegetativo a los 61 días, la floración 20 días después, la fructificación 17 días después y la senescencia 14 días después.

Con plantas de *Tagetes filifolia* Lag. cultivadas durante 140 días, con densidad de siembra de 64 plantas/m² y extracción de aceite esencial por arrastre con vapor durante 50 minutos, se ha logrado el mayor rendimiento (4,363 mL/1000 g de plantas).

El aceite esencial obtenido tiene aroma muy agradable y fuerte por lo que se constituye en un excelente aditivo para la agroindustria regional.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Greasham, R. & Inamine, E. 1989. Nutritional improvement of processes. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, ed. N. Solomon & A. Demain, American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
- Larcher, W. 1986. Ecofisiología Vegetal. Edit. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. Sao Paulo – Brasil.
- Loaiza, J.; A., Esquivel; I., Rodríguez y P., Chavarria. 1996. Potencial ovicida de extractos de *Tagetes filifolia* contra *Meloidogyne incognita*. Libro de Resúmenes X Congreso Nacional Agronómico y III Congreso de Fitopatología. Costa Rica.
- Lock, O. 1994. Investigación fotoquímica. 2da. Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Milthorpe., F.I. y J., Moorby. 1982. Introducción a la fisiología de los cultivos. Edit. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires - Argentina.
- Mostacero, J.; F., Mejía y O., Gamarra. 2002. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Vol II. Edit. Normas Legales. Trujillo – Perú.
- Primo, E. 1995. Química Orgánica Básica y Aplicada. De la molécula a la industria. Tomo II. Edit. Editorial Reverté, S.A. Barcelona – España.
- Quezada, F.; W., Roca; M.T., Szauer; J.J., Gómez y R. López (Eds). 2005. Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad. Capacidades locales y mercados potenciales. Edit. Corporación Andina de Fomento Corporación Andina de Fomento. Caracas - Venezuela.
- Serrato C., M.A.; B., Reyes T.; L., Ortega A.; A., Domingo G.; N., Gómez S.; F., López M.; M., Sánchez; L., Carvajal V.; O., Jiménez R.; A., Morgado G.; E., Pérez M.; J., Quiroz M. y C., Vallejo G. 2003. Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.): Recurso Genético Mexicano para controlar la Mosquita Blanca (*Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.). Revista del Jardín Botánico Nacional 24(1-2): 65-70.
- Serrato C., M.A. y J.S., Barajas P. 2006. Poblaciones silvestres de *Tagetes filifolia* Lag. en el centro-sur de México. Rev. Fitotec. Mex. 29(número especial 2): 7-12.
- Ulloa Ulloa, C.; J. Zarucchi y B. León. 2004. Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993--2003. Arnaldoa, Ed. Especial (noviembre 2004): 1-242.

CINÉTICA DE SECADO DE LÚCUMA (*Pouteria Lucuma*)

Barrena Gurbillón, Miguel Angel. Doctor en Ciencias e Ingeniería. Profesor Principal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM). mabg_98@hotmail.com

Gamarra Torres, Oscar Andrés. Maestro en Ecología y Gestión Ambiental. Profesor Principal de la UNTRM. osgat77@yahoo.com

I. INTRODUCCIÓN

La lúcuma es un frutal oriundo de Sudamérica, se produce en Colombia, Ecuador, norte de Chile y Perú; que es el principal productor a nivel mundial con una participación de 88 % (MINAG-OIA, 2003; Villanueva, 2002). Por su exótico sabor es demandada por la más refinada gastronomía internacional. Por ello, la lúcuma ha mostrado durante el año 2005, un notable crecimiento en sus exportaciones alcanzando los US\$ 146621, lo cual ha representado para su sector, un aumento del 76 % en comparación con el mismo periodo (enero - noviembre) observado durante el 2003 en el cual se logró US\$ 83140 (Aduanas, 2005).

Actualmente se cultiva entre los 0 y 2800 msnm. Se adapta a climas subtropicales con temperaturas bajas mayores a 12 °C. Tolera suelos salinos y períodos secos. El fruto se consume fresco o procesado, como harina o pulpa. Su pulpa es suave, de textura harinosa, aroma muy agradable, color amarillo-naranja. Aparte de su agradable sabor, tiene la ventaja de ser un fruto resistente, ya sea como harina o pulpa congelada, resiste en condiciones de transporte y almacenaje óptimo, largos periodos sin perder sus características originales (Villanueva, 2002).

La producción de lúcuma se destina principalmente a la agroindustria para la producción de harina y pulpa de lúcuma. Para el mercado internacional se destina aproximadamente el 1% de la producción de lúcuma. La mayor producción de lúcuma se concentra de noviembre a abril en los valles de la costa y en los valles interandinos de julio a agosto. Existe un gran potencial gracias al clima propicio con que cuenta el Perú para la producción de este fruto nativo (MINAG-OIA, 2003).

Para reducir el contenido de humedad de diversos materiales, se debe evaluar las diferentes condiciones de velocidad y temperatura del aire empleado, y el tiempo requerido para lograr el grado de secado deseado (Ocón y Tojo, 1980). La velocidad del aire de secado influye sobre esta operación. A mayor velocidad, menor tiempo de secado; sin embargo, para una muestra dada, a cualquier velocidad del aire la humedad crítica (Y_c) y la humedad de equilibrio (Y_{eq}) no variarán (Vernon, 2000).

El secador de bandejas es cerrado y aislado, donde los sólidos se colocan sobre bandejas perforadas. La transmisión de calor es directa del aire caliente a los sólidos (Perry y Chilton, 1982). El funcionamiento satisfactorio de los secadores de bandejas depende de mantener una temperatura constante y una velocidad de aire uniforme entre 1 a 10 m/s, sobre todo el material que se esté secando para mejorar el coeficiente de transferencia de calor en la superficie (Vernon, 2000; Perry y Chilton, 1982).

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la velocidad del aire de secado, paralelo a la muestra, a tres temperaturas diferentes, sobre la conservación del color de la pulpa de lúcuma seca similar a la fresca. Para ello se seleccionó como temperaturas de trabajo del aire de 40, 50 y 60°C y las velocidades de 2,5; 3,0 y 3,5 m/s.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó tres temperaturas (40, 50 y 60°C) del aire de secado con las velocidades: 2,5; 3,0 y 3,5 m/s. Al inicio de cada corrida experimental se verificó la temperatura y la velocidad del aire de acuerdo a lo planificado para esta investigación. Enseguida se pesó el soporte junto con las tres bandejas de malla metálica (SB).

Se empleó frutos de lúcuma en su estado de madurez fisiológica, los que fueron pelados y se les retiró las pepas. La pulpa fue cortada en rodajas de 0,3 cm de espesor y se colocaron en cada una de las bandejas del secador con flujo de aire caliente, del Laboratorio de Ingeniería de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Para secar la pulpa de lúcuma se empleó una corriente de aire forzado por un soplador de velocidad regulable para fijar cada una de las velocidades de trabajo, las que se midieron con un anemómetro digital en la boca de salida del aire después de haber pasado por la cámara de secado. El aire pasó a través de un ducto que tiene cuatro resistencias eléctricas de 2000 W cada una, donde se calentó hasta las temperaturas de trabajo de esta investigación (40, 50 y 60°C), la que se midió en la cámara de secado, se reguló y estabilizó mediante un sensor-controlador electrónico de temperatura. El aire caliente ingresó a la cámara de secado que contenía tres bandejas de malla metálica con las rodajas de pulpa de lúcuma. El soporte de las bandejas se colgó de una balanza de triple brazo ubicada sobre la cámara de secado, para medir la masa del conjunto (estructura, bandejas y rodajas de lúcuma) cada 5 minutos. Al final de este tiempo, las tres bandejas con las rodajas de lúcuma se colocaron en la estufa a 90 °C, hasta peso constante, para determinar el peso seco de la lúcuma (S).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

El rendimiento promedio de los frutos de lúcumas maduros fue de 73,13% de pulpa, 11,66% de pepa y 15,21% de cáscara. Con el analizador de humedad (ADAM AMB50) a 111°C durante 28 minutos y 42 segundos se determinó que la humedad de la lúcumas fue 59,11 % (en base seca). Este valor equivale a 56,21% en base húmeda.

El peso de las rodajas de lúcumas cada 5 minutos se calculó con la fórmula: $P_2 = P_1 - SB$. Humedad residual de las rodajas de lúcumas cada 5 minutos: $Y = (P_2 - S)/S$. Variación de la humedad con el tiempo: $-dY/dt = (Y_i - Y_{i+1})/(t_i - t_{i+1})$. La humedad residual promedio (Y_m) se calculó con la fórmula: $Y_m = (Y_i + Y_{i+1})/2$.

Todas las corridas experimentales se realizaron hasta que la humedad residual tenía una variación mínima y se estandarizó como punto final de la operación del secador cuando esta humedad alcanzaba el valor de 0,04 g agua/g lúcumas seca, que viene a ser la humedad de equilibrio, lo cual se aprecia mejor en las Figuras 2 y 3.

Los resultados de las corridas experimentales de secado de rodajas de lúcumas con aire a 40 °C y velocidades de 2,5, 3,0 y 3,5 m/s se muestran en la Figura 1. La humedad crítica (Y_c) fue 0,40 g agua/g lúcumas seca y la humedad de equilibrio (Y_{eq}) fue 0,04 g agua/g lúcumas seca, valores que no variaron a pesar de haber empleado diferentes velocidades del aire de secado. El tiempo crítico disminuyó conforme aumentó la velocidad del aire de secado. En la Figura 2 se muestran los resultados a 50°C con las tres velocidades ensayadas, la humedad crítica fue 0,48 g agua/g lúcumas seca. Los resultados a 60 °C y velocidades de 2,5, 3,0 y 3,5 m/s se muestran en la Figura 3, donde se aprecia que la humedad crítica fue 0,51 g agua/g lúcumas seca. El tiempo crítico mantuvo la misma tendencia que en las Figuras 1 y 2.

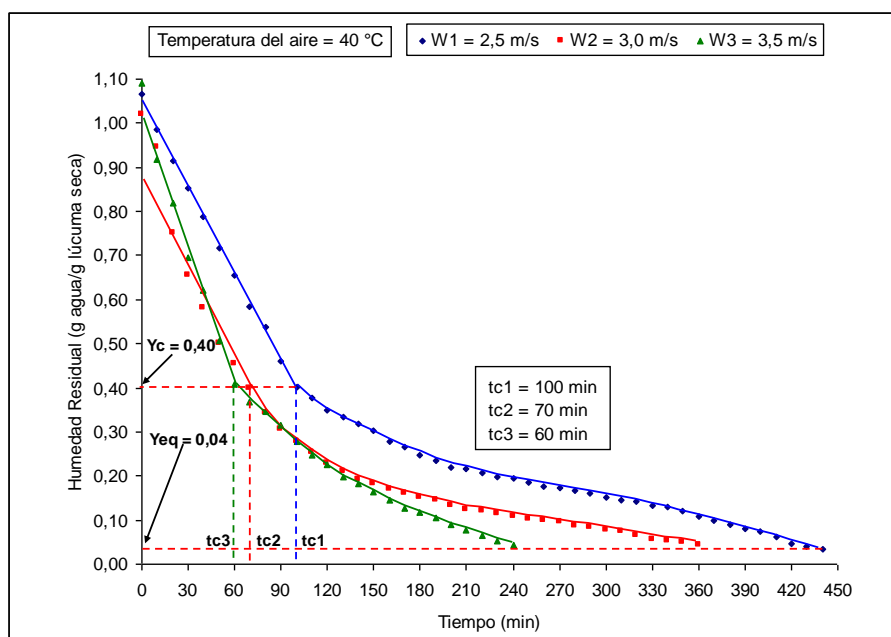


Figura 1. Humedad residual en función del tiempo (T1 = 40 °C; W1 = 2,5 m/s; W2 = 3,0 m/s; W3 = 3,5 m/s)

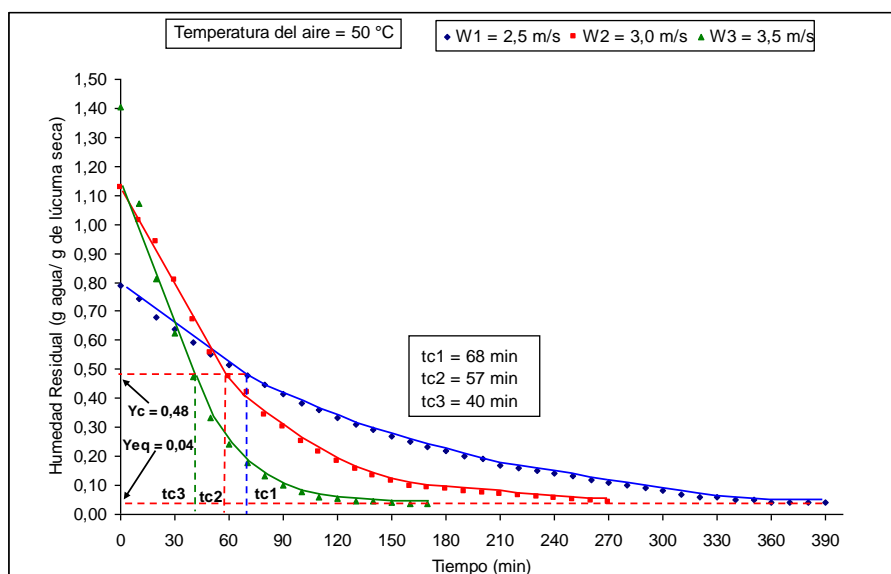


Figura 2. Humedad residual en función del tiempo (T2 = 50 °C; W1 = 2,5 m/s; W2 = 3,0 m/s; W3 = 3,5 m/s).

Al inicio del secado, la muestra se coloca en la cámara del secador a una temperatura menor a la de esta cámara; debido a ello, los datos iniciales tienden a generar una curva por lo que se desprecian. Esta primera etapa del secado es un período de inducción en el que se calienta el producto, adaptándose el material a las condiciones del secado y como su duración

es muy corta con respecto al tiempo total de secado, no se toma en cuenta para el diseño de secadores industriales (Ibarz y otros, 2000). La característica que muestran las curvas de secado, cuando se grafica la humedad residual vs tiempo, es una sección recta que corresponde a la etapa de secado a velocidad constante y una sección curva que corresponde al secado a velocidad decreciente. Cuando termina la recta y se inicia la curva, se lee en la gráfica el tiempo crítico (t_c) y la humedad crítica (Y_c). Al final la curva tiene un comportamiento asintótico con el eje de las abscisas (tiempo) y se lee en la gráfica la humedad de equilibrio (Y_{eq}).

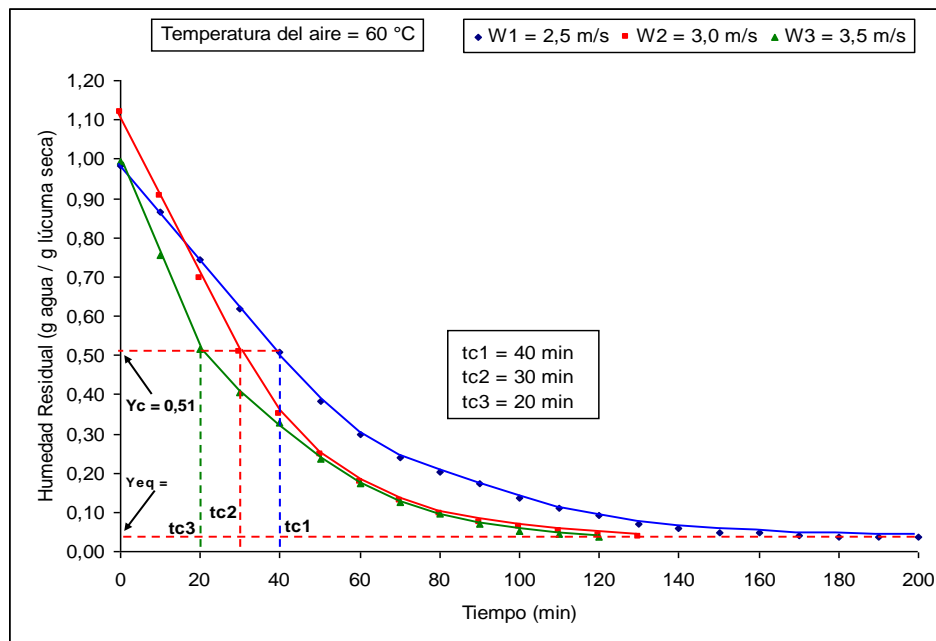


Figura 3. Humedad residual en función del tiempo ($T_3 = 60\text{ °C}$; $W_1 = 2,5\text{ m/s}$; $W_2 = 3,0\text{ m/s}$; $W_3 = 3,5\text{ m/s}$)

En las Figuras 1 a la 3, el tramo recto horizontal es el período de velocidad constante de secado, y está asociado a la eliminación del agua no ligada al producto, en el que el agua se comporta como si el sólido no estuviera presente. Al inicio, la superficie del producto se encuentra muy húmeda, el agua eliminada en la superficie es compensada por el flujo de agua desde el interior del sólido. El periodo de velocidad constante continúa mientras el agua evaporada en la superficie pueda ser compensada por la que se encuentra en el interior. El periodo de velocidad decreciente se da cuando la velocidad de secado empieza a disminuir; en esta etapa, la velocidad de secado está gobernada por el flujo interno del agua y vapor, se representa por la línea que baja hasta cortar el eje de las abscisas. Este período se puede

dividir en dos partes: la primera se da cuando los puntos húmedos en la superficie disminuyen continuamente hasta que la superficie está completamente seca, luego ocurre una inflexión que representa la segunda parte de este periodo donde el plano de evaporación se traslada al interior del sólido. El calor requerido para eliminar la humedad es transferido a través del sólido hasta la superficie de evaporación, y el vapor de agua producido se mueve a través del sólido en la corriente de aire que va hacia la superficie. A veces no hay diferencias remarcables entre estas dos partes del periodo de velocidad decreciente (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

En base a las Figuras 1 hasta la 3, se puede asegurar que a mayor velocidad del aire de secado, menor tiempo de secado; en consecuencia también menor tiempo crítico; y para cada una de las humedades crítica (Y_c) y de equilibrio (Y_{eq}) no varían con el incremento de la velocidad, como se observa en las Figuras 1 a la 3. Esto concuerda con lo encontrado por Vernon (2000).

Se puede deducir que a mayor temperatura del aire de secado, sin que influya la velocidad del aire, la humedad crítica aumenta mientras que la humedad de equilibrio se mantiene constante. Esto se debe a que a mayor temperatura, la humedad superficial es retirada más rápido de lo que migra del interior del cuerpo hacia su superficie.

Las curvas de secado tienen función lineal y exponencial en el periodo de velocidad constante y decreciente, respectivamente; para cada una de las temperaturas ensayadas y los diferentes valores de velocidad del aire evaluados, similar a lo encontrado por Vega y Lemus (2006).

A mayor velocidad del aire de secado, a temperatura constante, se observó que el color de la pulpa de lúcuma seca es más similar a la pulpa fresca; por lo que es recomendable secar la pulpa de lúcuma con aire a la temperatura de 50 °C y velocidad de 3,5 m/s , que dará un tiempo crítico de 40 minutos (Figura 2), la humedad crítica de 0,48 g agua/g lúcuma seca, la humedad de equilibrio de 0,04 g agua/g lúcuma seca y la velocidad de secado fue de 0,020 g agua/g lúcuma seca.minuto (Figura 4); estos son los parámetros cinéticos del secado de lúcuma que se pueden emplear para diseñar un secador de bandejas industrial para secar lúcuma en rodajas, con el propósito de dar un valor agregado a la producción de lúcuma y aprovechar la demanda insatisfecha de harina de lúcuma para exportación.. A estas condiciones de trabajo, a los 85 minutos de operación del secador de bandejas, la pulpa de lúcuma habrá bajado su humedad promedio de 56,21 % (en base húmeda) hasta la humedad de 10 % en base húmeda, que es el valor adecuado para molerla y obtener harina de lúcuma. Con la temperatura de 60 °C a la misma velocidad, la pulpa de lúcuma tiende a oscurecerse.

La Figura 4 corresponde a la gráfica de velocidad de secado (dY/dt) vs humedad residual promedio (Y_m), para la temperatura de 50°C . Puede observarse que los valores de los parámetros cinéticos t_c , Y_c y Y_{eq} leídos de la Figura 2, concuerdan con los leídos en la Figura 4.

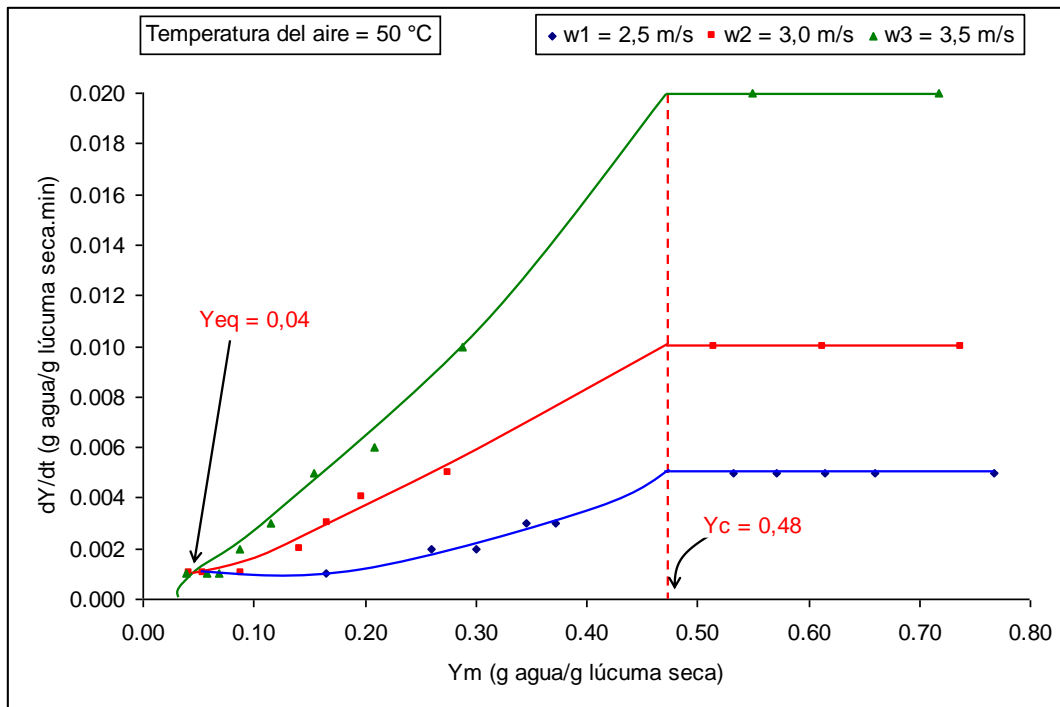


Figura 4. Variación de la humedad con el tiempo en función de la humedad residual promedio ($T_2 = 50^\circ\text{C}$; $W = 2,5; 3,0$ y $3,5 \text{ m/s}$)

IV. CONCLUSIONES

Las condiciones a las cuales se conserva el color de la pulpa seca similar a la fresca y que permitirán obtener una harina de lúcuma de calidad son las siguientes: se debe secar la pulpa en un secador de bandejas con aire a una temperatura de 50°C y velocidad de $3,5 \text{ m/s}$; que dará un tiempo crítico de secado de 40 minutos, humedad crítica de $0,48 \text{ g agua/g lúcuma seca}$, humedad de equilibrio de $0,04 \text{ g agua/g lúcuma seca}$ y velocidad de secado de $0,020 \text{ g agua/g lúcuma seca.minuto}$; estos son los parámetros cinéticos del secado de lúcuma en el secador de bandejas.

Será suficiente secar la pulpa de lúcuma durante 85 minutos en el secador de bandejas, con aire a 50°C y $3,5 \text{ m/s}$, para que la humedad en base húmeda de la pulpa baje hasta 10% , lo que facilitará su molienda y empaque seguro como harina de lúcuma.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aduanas (1995-2005). Exportaciones de Lúcumas.

Geankoplis, C.J. 1993. Transport Process and Unit Operations. Prentice-Hall, Inc. USA.

Ibarz R., A. y Barbosa-Cánovas, G.V. 2005. Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

Ibarz R., A., Barbosa-Cánovas, G.V., Garza G., S. y Gimeno A., V. 2000. Métodos Experimentales en la Ingeniería Alimentaria. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza, España.

Instruction Manual Tray Drier UOP8. Issue 11. March 1997. Armfield Limited.

Minag-Oia. (1997 – 2003). Cultivos según departamento. Ministerio de Agricultura Oficina de Información Agraria.

Ocón G., J. y G. Tojo B. 1980. Problemas de Ingeniería Química. Tomo II. Editorial Aguilar S.A. 5ta. Reimpresión. España.

Perry, J. y C. Chilton. 1982. Manual del Ingeniero Químico. Editorial McGraw-Hill. 2da. Edición. Bogotá.

Vega, A.A. y R.A. Lemus. 2006. Modelado de la Cinética de Secado de la Papaya Chilena (*Vasconcellea pubescens*). *Inf. tecnol.* [online]. Vol.17, no.3 [citado 29 Junio 2008], p.23-31. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642006000300005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0718-0764.

Vernon C., J. 2000. Laboratorio de Operaciones Unitarias. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.

Villanueva M., C.M. 2002. Cultivo comercial de la lúcumas en Perú y el mercado internacional. Lima, Perú.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALISO (*Alnus Acuminata*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA

Edwin Baldeon^{1,2}, Guadalupe Hernandez¹, Samuel Verdú¹, Miguel Alcañiz³, Rafa Masot³, José M. Barat¹, Raúl Grau¹

¹Departamento de Tecnología de Alimentos. Grupo CUINA. Universidad Politécnica de Valencia, España

²Departamento de Ingeniería de Alimentos y Productos Agropecuarios. Universidad de la Molina, Perú

³Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Centro Mixto Universitat Politècnica de València e Universidad de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España

INTRODUCCIÓN.

Las frutas y verduras son la fuente principal de antioxidantes como el ascorbato (vitamina C), los tocoferoles (vitamina E), los carotenoides (vitamina A) y los flavonoides en la dieta humana (Gomez-Cabrera y Viña, 2003). En el Perú existen diversas plantas utilizadas como medicina natural por sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Chirinos et al., 2011). Entre estas Aliso (*Alnus acuminata*) es considerado como antioxidantes natural (Rehecho et al., 2011). Aliso es una especie arbórea que pertenece a la familia de las betuláceas. Extendida por toda Sudamérica en la que recibe diferentes nombres. Tradicionalmente ha sido utilizado como antiinflamatorio y en el tratamiento contra el reumatismo (Salama y Yamile, 2005). Pero es el alto contenido en antioxidantes de estas plantas lo que las hace interesante en la actualidad.

Son diversos los métodos analíticos usados en la evaluación de la capacidad antioxidante debido a que esta propiedad es generada por moléculas de diversos tipos, con diferente estructura y de gran inestabilidad. Entre los métodos más empleados está el ABTS. Esta técnica fue desarrollada por Re et al. (1999). El método se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la reducción de un radical estable preformado de 2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+). Si bien todos estos métodos aportan información válida acerca de la capacidad total antioxidante de sustancias, esta no es suficiente, por lo que técnicas como la voltametría podrían incrementarla (Shlomit C. et al., 2000).

En los últimos años, considerables esfuerzos se han invertido en la innovación y desarrollo de instrumentos analíticos no destructivos de bajo costo tales como las lenguas

electrónicas. Las lenguas electrónicas se pueden definir como sistemas basados en múltiples sensores de baja selectividad o sensibilidad cruzada. La respuesta de la matriz de sensores presenta una huella digital electrónica característica de cada especie en la muestra. La suma de todas estas huellas digitales puede llevar al reconocimiento de un patrón. El reconocimiento cualitativo y cuantitativo de estos patrones se puede lograr por medio de herramienta estadística multivalentes apropiadas tale como redes neuronales, PCA, PLS, lógica difusa, etc. (Alcañiz et al., 2012). Así en el presente trabajo se plantea establecer un modelo matemático de predicción, mediante la técnica de la lengua electrónica basado en la voltametría diferencial de pulsos, para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras de extractos de Aliso (*Alnus acuminata*) y como planta de referencia té verde enrollado y deshidratado (Té de Vietnam: Che Tuyet) adquirido en supermercado de Valencia, España.

MATERIAL Y MÉTODOS.

La materia prima utilizada en el presente trabajo fue Aliso (*Alnus acuminata*) adquirido en un mercado local de Huancayo (Junin, Perú) y como planta de referencia té verde enrollado y deshidratado (Té de Vietnam: Che Tuyet) adquirido en supermercado de Valencia, España. En el caso del Aliso, las hojas fueron lavadas y secadas por aire caliente a 60°C por espacio de tres horas hasta peso constante y molida a un tamaño de partícula similar al de té comercial con la finalidad de que estas se puedan tomar como infusión. Para su conservación, las hojas fueron empaquetadas y envasadas a vacío. Tres gramos de muestra (aliso o té) se sometieron a extracción en 300 ml de agua doblemente destilada a 85°C por tiempo de 5 min (Pérez, 2012). El extracto obtenido fue filtrado y enfriado. Una vez obtenidos los extractos se realizaron diluciones desde 2,5% hasta 20% sobre una solución electrolítica. La solución electrolítica utilizada fue una mezcla de fosfato de potasio y dihidrógeno fosfato de potasio 0.01 M, ajustada a pH 7.4.

Para determinar la capacidad antioxidante de las diluciones se utilizó como método de referencia el método químico ABTS desarrollado por Re et al. (1999) y Awika et al. (2003) y modificado durante la realización del trabajo con la finalidad de ajustarlo a la solución electrolítica utilizada.

Las medidas voltamétricas se realizaron mediante la Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV) formada por tres sensores; uno denominado electrodo de referencia (RE) (Ag/AgCl) y las otras dos denominadas lenguas de trabajo (WE). Esta lengua está formada por sublenguas

en las que en cada una se sitúan 4 electrodos de metal, una con metales nobles (Ir, Rh, Pt, Au) y otra con metales no nobles (Ag, Co, Cu, Ni).

Las medidas voltamétricas fueron realizadas mediante la voltametría diferencial de pulsos siguiendo un tren de pulsos tipo escalera desde +900 a -850 mV, con una amplitud de 20 ms y número de 22 pulsos. Para cada uno de los pulsos el equipo realizó 45 medidas, lo que hizo un total de 990 medidas, las cuales se realizaron hasta que la desviación estándar del promedio de éstas (en las muestras a medir), para 5 repeticiones, fuese menor de 2.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de aliso y té mediante voltametría primero se tuvo que obtener el modelo matemático de predicción. Para ello se utilizó el patrón trolox dado que este es el reactivo de referencia en el método ABTS. Se prepararon concentraciones de trolox desde 0,1 hasta 0,5 mM utilizando como solvente la solución electrolítica (en los extractos de plantas desde 2,5 hasta 20%). Estas soluciones fueron medidas por LEV de acuerdo al patrón de pulsos. Se realizaron cinco replicas por solución con una desviación inferior a dos. La experiencia fue repetida por triplicado en días diferentes y preparando los reactivos cada vez con la finalidad de obtener un modelo robusto. Finalmente mediante el método de análisis multivariante de regresión PLS se obtuvo el modelo de predicción el cual fue aplicado a los extractos de las plantas a testar.

2.4. Análisis estadístico.

Para evaluar la capacidad de las lenguas electrónicas como método para cuantificar la capacidad antioxidante se llevaron a cabo varios análisis multivariantes mediante el programa Matlab (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) y su aplicación estadística PLS Toolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, USA). La bondad del modelo y de la predicción de los extractos de aliso se evaluó a partir de los valores del coeficiente de regresión (R^2), desviación BIAS y el error por el cálculo de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE). El modelo de cross-validación usado fue el denominado “Venetians Blind”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez realizados todos los ensayos de voltametría diferencial de pulsos se recogieron los datos obtenidos y se procedió a su análisis estadístico. En la figura 1 se muestra, a modo de ejemplo, la evolución temporal de la señal de corriente (voltagrama) generada en los electrodos empleados para cada uno de los pulsos de corriente utilizados en la obtención del modelo matemático de predicción utilizando las disoluciones patrón trolox.

Una vez realizadas las medidas voltamétricas sobre las disoluciones del patrón trolox dos tercios de las lecturas se usaron para la obtención del modelo matemático de predicción y autotestado por cross-validación cruzada. Con la finalidad de evaluar su bondad, se validó dicho modelo utilizando el tercio restante de las lecturas. Como se observa en la figura 2, en la que se muestra la correlación entre los valores concentración de trolox predichos para este último tercio y la concentración real de estos, existió una muy buena correlación al obtener valores altos de R^2 de predicción ($R^2P=0.996$) y muy bajos para la desviación BIAS (Bias $P=0.183$) y el error RMSE de predicción (RMSEP=0.239).

Así una vez obtenido el modelo de predicción este fue empleado para obtener la capacidad antioxidante, expresada como equivalentes trolox (ET), de los extractos de las plantas. Para ello como se ha comentado en materiales y métodos se midió voltaméricamente las diluciones 2.5, 5, 10, 15 y 20% de estas, a fin de evaluar la incidencia del factor concentración sobre las medidas.

Si bien al aumentar la concentración de las diluciones aumentaron también los valores de ET, este incremento no fue proporcional al incremento en concentración de estas. Como se puede observar en la tabla 1, cuando los valores para cada una de las diluciones fueron expresados teniendo en cuenta el factor de dilución (expresado en 100% de extracto) los resultados no fueron los esperados dado que el valor obtenido no fue el mismo para todas ellas. En las diluciones del té verde expresadas al 100% se observó una disminución en los valores obtenidos al incrementar el tanto por cien de extracto, si bien las diferencia para las últimas tres diluciones (10, 15 y 20%) no fueron significativas, tomándose el valor promedio de estas como la capacidad antioxidante del té ($ET = 10.04 \pm 0.31$ mM). De igual forma, en el caso del aliso, las últimas concentraciones (15 y 20%) fueron las que presentaron valores similares, siendo el promedio de estos los establecidos como ET (6.84 ± 0.68 mM).

Con la finalidad de comprobar los valores obtenidos mediante el modelo de predicción y en base a como se ha explicado en materiales y métodos se evaluó la capacidad antioxidante de estos extractos mediante el método químico de referencia ABTS. Los resultados obtenidos por ABTS fueron de 16.81 ± 0.42 y 10.09 ± 0.22 mM para los extractos té verde y aliso respectivamente, valores cercanos a los reportados por Chirinos et al. (2011) y Campos (2010) para aliso. Si bien los resultados mostraron como el té verde es el extracto que presenta mayor actividad antioxidante, como el modelo matemático había predicho, los valores obtenidos por ambos métodos no fueron los mismos para ninguno de los dos extractos estudiados, siendo en todos los casos menores los generados por el modelo matemático (tabla 1).

A fin de cuantificar la calidad de la predicción se realizó un ajuste de regresión PLS entre los valores predichos por el modelo matemático y los valores obtenidos por el método ABTS (figura 3). Como se observa, si bien los valores de R^2 de predicción fueron superiores a 0.90 para los extractos, los valores de RMSEP y de Bias fueron cercanos a la unidad, indicando que la correlación entre ambos métodos mostraron una desviación. Estos resultados podrían ser debidos a la influencia que pueden estar ejerciendo las sustancias presentes en los extractos que dificultarían la reacción electroquímica entre el electrodo y los componentes reactivos de las disoluciones.

Dado que tanto las muestras de té verde como las de aliso tuvieron un comportamiento voltamétrico que pudo estar influido por las sustancias presentes en la disolución, se realizó un estudio estadístico adicional en el que se creó un modelo matemático de predicción, utilizando en este caso el té como patrón en vez del reactivo trolox. Una vez obtenido el modelo matemático este fue aplicado para predecir la capacidad antioxidante de nuevas muestras de té así como las de aliso. Los resultados obtenidos mostraron como los valores de ABTS fueron predichos con mucha exactitud siendo los indicadores de la bondad del modelo de predicción muy buenos. En la Tabla 2 se muestran los valores predichos para cada una de las diluciones testadas, así como el valor calculado teniendo en cuenta el factor de dilución (100% extracto). En este caso los valores fueron muy similares a los obtenidos por el método ABTS para todas las diluciones, si bien la dilución de 2.5% presentó resultados anómalos (dilución muy baja que no presentaría suficiente compuesto activo).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación de las lenguas electrónicas voltamétricas de pulsos han permitido mostrar cómo estas son capaces de determinar la capacidad antioxidante total de extractos de plantas peruanas.

El modelo matemático de predicción obtenido a partir del patrón trolox ha sido capaz de predecir parcialmente la capacidad antioxidante de los extractos de plantas. En cambio la utilización del té verde como patrón ha generado un modelo matemático capaz de determinar la capacidad antioxidante total tanto del propio té como del aliso, lo cual muestra como la técnica de voltametría de pulsos es una técnica apta para dicha determinación si bien son necesarios sucesivos estudios que profundicen en las reacciones que se dan en los electrodos con la finalidad de evaluar la respuesta de estos a los diferentes compuestos que forman los extractos a estudio y así definir los patrones óptimos para cada estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcañiz, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el campo agroalimentario. Tesis doctoral. UPV
- Alcañiz, M.; Vivancos, J.; Masot, R.; Ibañez, J. Raga, M. Soto, J. and Martínez-Máñez, R. (2012). Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 111: 122–128
- Campos, D. (2010) “Biotecnología Industrial y Valoración de los recursos genéticos”. Curso: Bioseguridad y Biotecnología moderna. [en línea] Dirección URL <<http://www.lacbiosafety.org/wp-content/uploads/2011/12/David-Campos-Biotecnolog%C3%ADa-Industrial-y-Valoraci%C3%B3n-de-RRGG.pdf>> [Consultada: 30 de enero. 2013].
- Gómez-Cabrera, M.C.; Viña, J. (2003). Ejercicio físico, entrenamiento y estrés oxidativo. Importancia de los nutrientes antioxidantes. *Alimentación, nutrición y salud*. Vol. 10, 71-81.
- Chirinos, R.; Huamán, M.; Betalleluz-Pallardel, I.; Pedreschi, R. and Campos, D. (2011).. Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*. 128: 711–716.
- Pérez, E. (2012). Aplicación de la lengua electrónica en la evaluación de la capacidad antioxidante. Tesina del Master en Gestión y Seguridad alimentaria. UPV.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pan-nala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*. 26. 9/10. 1231-1237.
- Rehecho, S.; Uriarte-Pueyoa, I.; Calvo, J.; Vivas, L. and Calvo, M. (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 75–85
- Salama, A. and Yamile I. (2005). Actividad antiinflamatoria de d-amirona y 4'.7-dimetoxiapigenina aislados de *Alnus acuminata*. *Rev. Col. Qim. Far.* 34 (2). 117-121.
- Shlomit C.; Matthew A. R.; Mordechai C. (2000). the use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 6, 860–870.

FIGURAS

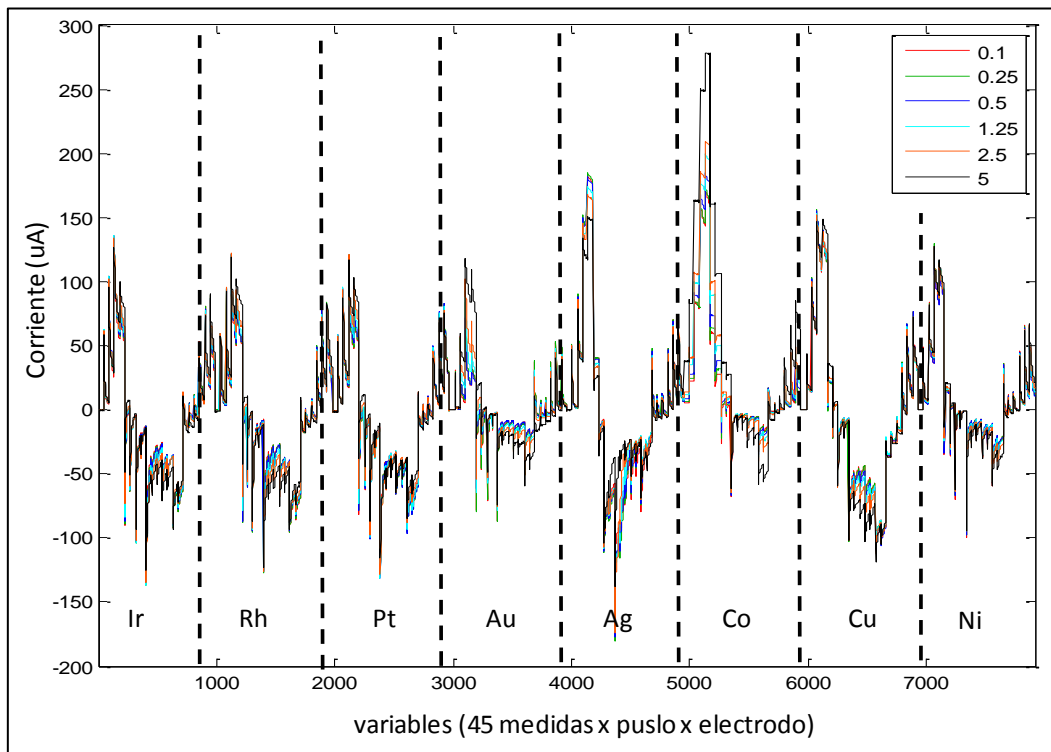


Figura 1. Evolución temporal de la señal de corriente de todos los electrodos para las disoluciones de trolox.

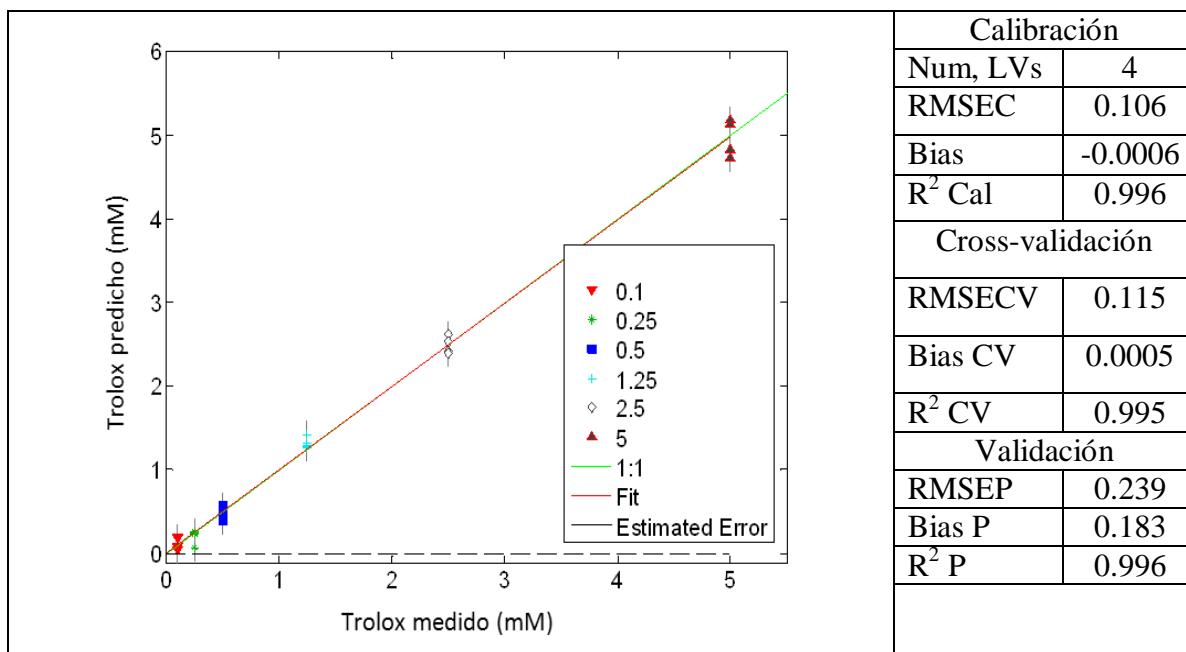


Figura 2. Correlación PLS entre los valores de concentración de trolox predichos mediante el modelo matemático.

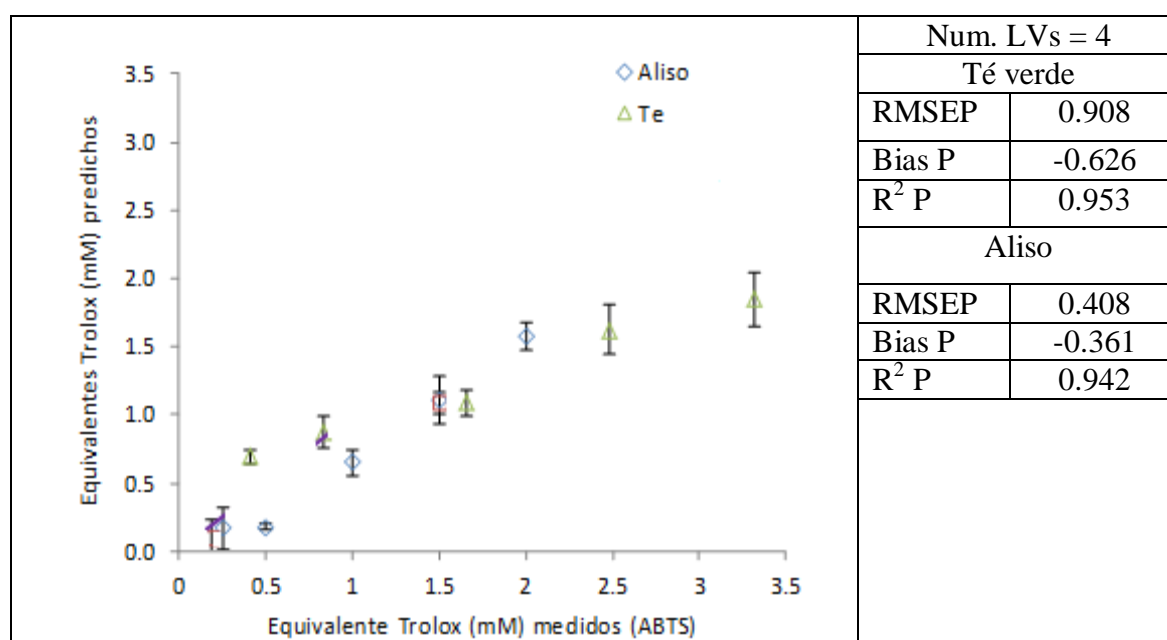


Figura 3. Correlación PLS entre los valores de concentración en equivalentes trolox (mM)

TABLAS

Tabla 1. Equivalentes Trolox (mM) y desviaciones estándar (DS) predichos obtenidos para cada una de las diluciones testadas así como su expresión en la disolución madre (100%), utilizando el modelo de predicción obtenido a partir de Trolox.

Dilución (X)	Té verde (mM)±DS		Aliso (mM)±DS	
	X	100%	X	100%
2.5%	0.60±0.05	23.83±1.93	0.18±0.13	7.05±5.29
5%	0.81±0.11	16.29±2.10	0.17±0.02	3.45±0.34
10%	1.03±0.07	10.33±3.61	0.61±0.08	6.09±0.84
15%	1.51±0.16	10.08±2.10	1.05±0.16	7.01±1.10
20%	1.74±0.17	9.71±0.72	1.48±0.09	7.41±0.44
Promedio*		10.04 ± 0.31		6.84 ± 0.68

*Promedio realizado teniendo en cuenta las diluciones 10, 15 y 20% para el té y las de 15 y 20% aliso.

Tabla 2: Equivalentes Trolox (mM) y desviaciones estándar (DS) predichos obtenidos para cada una de las diluciones testadas así como su expresión en la disolución madre (100%). utilizando el modelo de predicción obtenido a partir de té verde.

Dilución (X)	Té verde (mM)±DS		Aliso (mM) ±DS	
	X	100%	X	100%
2.50%	0.36±0.07	14.47±2.95	0.38±0.11	15.25±4.25
5%	0.76±0.11	15.23±2.27	0.48±0.11	9.69±2.23
10%	1.53±0.23	15.25±2.26	0.86±0.09	8.56±0.91
15%	2.48±0.10	16.52±0.66	1.56±0.13	10.38±0.88
20%	2.74±0.25	13.69±1.23	2,12±0.08	10.58±0.40
Promedio*		15.03±0.89		9.80±0.91

*Promedio realizado sin tener en cuenta el valor de la dilución 2.5% para el Aliso.

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE HARINA DE SALVIA EN LA PANIFICACIÓN.

Samuel Verdú¹, Esteban Fuentes¹, Eugenio Ivorra², Joel Girón¹, Antonio Sanchez², José M. Barat¹, Raúl Grau¹

¹Departamento de Tecnología de Alimentos. Grupo CUINA. Universidad Politécnica de Valencia

²Departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática. Universidad Politécnica de Valencia

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el desarrollo tecnológico y los cambios de costumbres alimenticias de los consumidores han dado como resultado la generación por parte de la industria de una gran variedad en la oferta de productos derivados del trigo tales como el pan. Se ofrece al consumidor en multitud de presentaciones y formulaciones en las cuales se han añadido nuevos ingredientes con el objetivo de mejorar diferentes aspectos nutricionales o efectos fisiológicos. Productos como la Salvia que está siendo usada para la elaboración de productos para celíacos debido a que mejora la retención de gas sin aportar gluten (Langman et al., 2006; Salvador-Vega et al., 2010) son un ejemplo de ellos. Esta tendencia ha hecho necesaria una evolución por parte de la industria en cuanto al desarrollo de nuevos ingredientes y fórmulas, así como la aplicación de nuevas tecnologías a la mejora de procesos y control de calidad.

En el desarrollo de dichas mejoras es fundamental la comprensión de los fenómenos que suceden en el proceso de panificación, ya que van a determinar no sólo la calidad del producto final, sino también el correcto desarrollo diario de los procesos de fabricación. En particular, es fundamental el conocimiento del comportamiento de las materias primas en las diferentes operaciones que forman el proceso y/o frente a cambios en la formulación. Por lo tanto la información referente a los componentes de las harinas y las propiedades físicas de las masas son cruciales para la perfecta elaboración del producto.

Dentro de los campos de investigación en panificación la fase de fermentación es una de las más estudiadas. Los estudios van encaminados a profundizar en el conocimiento de esta fase para así poder obtener modelos y relaciones en base a los cuales poder optimizar y mejorar el proceso (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003). Dichos estudios se vienen desarrollando en base a diversas tecnologías (Lassoued et al., 2007). Ejemplo de ellas son la microscopía (Jekle et al, 2011, Upadhyay et al 2012, Bache y Donald, 1998), resonancia magnética (van Duynhoven et al., 2003), métodos basados en el análisis de imagen en 2D

(Pour-Damanab et al, 2011) y 3D (Eron Steger and Kiriakos N. Kutulakos 2008). Gracias a la aplicación de dichas tecnologías se ha podido mejorar la comprensión de fenómenos fundamentales de la fermentación, tales como la cinética de crecimiento de burbujas y su relación con el volumen total de la masa, así como el desarrollo de esta a lo largo del tiempo. Los conocimientos obtenidos permiten avanzar a su vez dentro del campo de los nuevos ingredientes y su repercusión en cuanto al proceso se refiere. El conocimiento del efecto de determinadas sustancias sobre los factores que gobiernan el proceso de fermentación resulta muy útil y crucial a la hora de facilitar el desarrollo de nuevos productos.

En el presente trabajo se planteó evaluar el efecto de la Salvia en la panificación mediante diversas técnicas de análisis. Se usó un equipo de análisis de imagen 3D, basado en la técnica de luz estructurada para monitorizar la cinética de crecimiento de las masas panarias durante su fermentación y el análisis de segmentación de imagen 2D para caracterizar el pan una vez elaborado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Elaboración de las masas panarias

Para evaluar el efecto de la incorporación de semillas de Salvia a la masa panaria se realizaron 7 formulaciones, una control (C) y seis con incorporación de Salvia en dos concentraciones 2.5 y 5% de sustitución de la harina de trigo por esta. Las semillas fueron incorporados en tres formatos, enteras (E), trituradas como harina (T) y por último hidratadas (H). Las semillas enteras y la harina de semillas no sufrieron ningún tratamiento. En el caso de las semillas hidratadas, se calentaron con el agua de la fórmula panaria hasta 60°C durante 20 minutos, utilizándose tanto las semillas hidratadas como el agua de hidratación en la elaboración

Todas las masas panarias fueron elaboradas en base a la siguiente formulación:

Harina de trigo 56% (parámetros reológicos en la Tabla 1), azúcar granulado 4%, sal 1.5%, agua 35%, aceite de girasol 2%, levadura prensada 2%. Para las masas con Salvia un 2.5 y 5 % del peso de la harina de trigo fue sustituida por esta en sus tres formatos.

La elaboración de la masa se realizó mediante el equipo de cocina (Thermomix® TM31, Vorwerk, Germany). Para ello los componentes líquidos (agua y aceite), azúcar y sal fueron mezclados durante 4 minutos a 37 °C. Posteriormente las levaduras fueron añadidas al conjunto, mezclándose durante 30 segundos a 37 °C. Finalmente la harina fue añadida y

mezclada con el resto de componentes utilizando un programa específico del equipo para amasar mediante el que se obtuvo una masa homogénea.

Proceso de fermentación y horneado

Este proceso fue llevado a cabo en una cámara con humedad y temperatura controladas (KBF720, Binder, Tuttlingen, Germany), en la que se instaló el dispositivo de luz estructurada (SL) para la monitorización del proceso de fermentación. Las condiciones fueron 40°C y 90% de HR. 450 gramos de la masa fueron dispuestos en una capa de 1 cm de espesor aproximadamente en un molde (8x8x30cm) el cual permaneció en el interior de la cámara durante 60 minutos (tiempo que en estudios anteriores había mostrado la máxima subida de la masa control).

Una vez que el proceso de fermentación concluyó, se colocaron los moldes con la masa fermentada en un horno precalentado a 200°C durante 45 minutos.

Monitorización de la fermentación por el método de luz estructurada (SL)

El sistema de visión 3D fue dispuesto específicamente para monitorear la etapa de fermentación. Dicho sistema está compuesto de una luz estructurada generada por un láser lineal rojo (Lasiris SNF 410, Coherent Inc. Santa Clara, California (USA)) y una cámara de captura en blanco y negro con índice de protección de 67 (IP67) y una resolución de (640x480 pixeles) que es capaz de trabajar en red (In-Sight 5100, Cognex, Boston, Massachusetts (USA)). Ambos dispositivos fueron instalados dentro de la cámara de fermentación. El láser se instaló con un ángulo de inclinación β de 0.65 radianes (Figura 1) respecto a la base del molde de fermentación, mientras que la cámara de visión se posicionó verticalmente al molde. La combinación entre la resolución de la cámara y su distancia a la muestra da una resolución que denominamos Z de $1.4 \cdot 10^{-4} \text{m}$ X $2.1 \cdot 10^{-4} \text{m}$. Esta configuración fue establecida para alcanzar el rango de trabajo de 0.1 m en el eje X y de 0.08 m en el eje Z.

El sistema de análisis de imagen 3D utilizado se basa en el registro de la posición del láser en cada captura de imagen durante todo el proceso. Como se muestra en la Figura 1, la cámara y el láser se encuentran a una distancia conocida de la muestra. Del mismo modo el ángulo que forma el láser con respecto a la base donde se coloca la muestra es conocido. En base a ello, la posición del láser con respecto a un punto de referencia dentro de cada imagen determina la información referente al eje Z gracias a una calibración previa.

Los datos correspondientes a las fermentaciones se tomaron con un régimen de captura de la cámara de 1 frame/segundo durante los 60 minutos que duró el proceso. La

línea de laser correspondiente a la interacción con la masa se analizó pixel a pixel, con el fin de obtener información de todo el perfil de esta. A partir de la suma de la información de la posición de cada pixel de la línea laser se obtuvo el área de la masa para cada segundo, con el objetivo de analizar la evolución no sólo de un punto concreto sino de toda la sección transversal de la muestra.

Caracterización del pan elaborado

Análisis de burbujas mediante la técnica 2D de segmentación de imagen.

Con la finalidad de evaluar la influencia de la fermentación sobre el producto terminado se procedió a realizar un análisis del número y tamaño de burbujas que conforman el pan. Para ello y una vez horneado este se procedió a realizar cortes transversales de aproximadamente 1 cm, obteniéndose 3 rebanadas de cada pan. Para la evaluación de las burbujas se utilizó la técnica de inspección de imagen basada en el modelo de segmentación de imagen (Benlloch et al., 1995; Benlloch et al., 1996). Esta se basa en la aplicación de un algoritmo que analiza el histograma utilizando los niveles de grises extraídos a partir de la información de color del espacio RGB (Red, Green and Blue). La técnica incluye una umbrelación global seguida de un proceso de crecimiento con la finalidad de cuantificar, mediante el número de píxeles que han conformado dicho segmento el tamaño de la burbuja. La información del espacio de color RGB se obtuvo escaneando las rebanadas de pan mediante un escáner “i-SENSYS MF9280Cdn” de Canon (Ohta-ku, Tokyo 146-8501, Japan) con una resolución de escaneo de 600 x 600 ppp ópticos (4800 ppp interpolados) (Figura 5). Cada rebanada fue escaneada por ambos lados por lo que de cada pan se obtuvieron 6 imágenes.

Tratamiento estadístico de los resultados

Se realizaron 4 fermentaciones por cada formulación. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics, realizando un Análisis de la Varianza (ANOVA) utilizando un test de comparación simple, con un nivel de significación del 95% ($p < 0.05$) para evaluar las diferencias entre las distintas formulaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Monitorización de las fermentaciones

En la Figura 2 se muestra, a modo de ejemplo, el resultado del procesamiento de toda la información extraída a partir de las capturas de imagen durante la fermentación de una de las masas. Se trata de una representación tridimensional donde se ve la evolución de la

sección transversal de la masa a lo largo del tiempo. La integración de la información de cada pixel de la línea de laser en cada captura permitió representar la evolución de la masa no solo en altura sino también en área.

Una vez obtenida la información de la evolución de las masas para todas las formulaciones, se analizaron en conjunto para determinar variaciones sobre el comportamiento control. La Figura 3 muestra el modelo de crecimiento del área ($\text{m}^2 \cdot 10^{-4}$) perteneciente a la sección transversal de las masas para las formulaciones. La tabla 2 muestra el resumen de los datos obtenidos a partir de los modelos de fermentación de las masas. En ella se expresa el área transversal máxima obtenida.

Como se observa existieron variaciones importantes en el comportamiento del crecimiento de las diferentes formulaciones (Figura 3). Las formulaciones sustituidas con harina de semillas (T) presentaron una mayor subida de la masa, es decir diferencias significativas en el área máxima obtenida, con respecto a la masa control ($C = 10.29 \pm 0.17$ v), siendo mayor a mayor tanto por cien de sustitución ($T2.5\% = 12.85 \pm 0.01$; $T5\% = 13.87 \pm 0.23 \text{ m}^2 \cdot 10^{-4}$). En cambio las formulaciones sustituidas con semillas enteras sin hidratar (E) tuvieron un efecto contrario, menor subida de la masa, no presentando diferencias significativas en el caso de la sustitución de un 2.5% ($10.47 \pm 2.7 \text{ m}^2 \cdot 10^{-4}$), y sí en el caso de una sustitución del 5% ($8.54 \pm 0.23 \text{ m}^2 \cdot 10^{-4}$) la cual presentó la menor subida. Las masas sustituidas con semillas enteras hidratadas (H), si bien en ambos casos las diferencias no fueron significativas el comportamiento observado fue diferente ya que las sustituidas con un 2.5% presentaron un ligero incremento el área máxima ($11.70 \pm 1.19 \text{ m}^2 \cdot 10^{-4}$), mientras que las sustituidas con un 5% fue menor ($10.77 \pm 0.18 \text{ m}^2 \cdot 10^{-4}$).

El incremento en el desarrollo por parte de las masas T pudo ser debido a la mejora de la capacidad de retención de gas que provocan los componentes mucilaginosos de las semillas, los cuales están disponibles desde el inicio de la mezcla. En cambio el efecto de las semillas en las masas E pudo deberse a que las semillas enteras impiden la formación normal de la red de gluten provocando un descenso de la capacidad de retención de gas. En el caso de las masas H, la hidratación previa favorece la salida de parte de los componentes mucilaginosos, lo que incrementaría la capacidad de retención de gas, pero la presencia de semillas enteras influiría en la formación de la red proteica, por lo presentaron un comportamiento intermedio a las anteriores formulas. La influencia en la retención de gas y la formación de la red proteica provoca diferencias en la velocidad de crecimiento, alcanzando el valor de A máximo del C a diferentes tiempos (Tabla. 2)

Caracterización del pan elaborado.

Análisis de burbujas mediante la técnica 2D de segmentación de imagen.

La figura 4 muestra el resultado de una rebanada de pan escaneada además de su imagen segmentada y reconstruida a fin de poderla visualizarla. Es a partir de esta información RGB procedente del escáner con la que se genera la información por agrupación que nos permite determinar el número total de área que representan las burbujas, el promedio teórico del área que representa una burbuja en función del área total de burbujas y el número total de estas, así como el número total de burbujas en función de un rango establecido y el área que representa cada rango.

Los resultados (Tabla. 3) muestran como los panes hechos con E no presentaron diferencias significativas con C en cuanto al tamaño medio de burbuja. En el caso de las H y T, el tamaño fue significativamente menor que en C. Los resultados obtenidos podrían ser debidos al efecto que ejercen los componentes mucilaginosos de las semillas, que al extraerse en gran medida con la hidratación o estar directamente disponibles en el caso de la harina, aumentan la resistencia mecánica de la matriz de la masa y contribuyen a mejorar la capacidad de retención de gas. Esta propiedad también hace que las paredes entre burbujas sean más resistentes y consigan evitar la coalescencia entre burbujas, consiguiendo así un menor tamaño de estas.

CONCLUSIONES

La incorporación de semillas de Salvia produce cambios en el comportamiento de las masas panarias durante la fermentación. El estado previo de las semillas es un factor influyente en la cinética de crecimiento de estas, siendo la incorporación en forma de harina la que mejores resultados presenta. Los componentes aportados por las semillas también producen cambios en la estructura interna del producto terminado, afectando al tamaño y distribución de las burbujas generadas durante el proceso. Así la incorporación de la salvia en forma de harina genera panes con el menor tamaño de burbuja. En base a estos resultados las semillas de Salvia presentan propiedades de interés para su aplicación en el desarrollo y mejora de procesos de producción de pan y productos de bollería, si bien nuevos estudios son necesarios para evaluar su aplicación al proceso con fin de que este sea viable para la industria.

BIBLIOGRAFÍA

- Bache I.C., and Donald A.M. (1998). *J Cer Sci* 28 127-33. *The structure of the gluten network in dough: A study using ESEM.*
- Dobraszczyk, B.J. & Morgenstern, M.P. (2003). *Rheology and the breadmaking process.* *Journal of Cereal Science*, 38(3), 229-245.
- Jekle, M. & Becker, T. (2011). *Dough microstructure: Novel analysis by quantification using confocal laser scanning microscopy.* *Food Research International*, 44(4), 984-991.
- Langman L, Carduza FJ, Irurueta M, Grigioni G, Gallinger CI (2006). *Efecto de la incorporación de semilla de chía (Salvia hispanica) en la dieta de pollos sobre el perfil de aroma de la carne.* Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina, 345-346.
- Lassoued N, Babin P, Della Valle G, Devaux MF, Reguerre AL. (2007). *Granulometry of bread crumb grain: contributions of 2D and 3D image analysis at different scale.*
- Pour-Damanab A.R. S, Jafary A. & Rafiee Sh. (2011). *Monitoring the dynamic density of dough during fermentation using digital imaging method.* *Journal of Food Engineering*, 107(1), 8-13.
- Salvador-Vega L, Gutierrez-Tolentino R, Coronado-Herrera MN, Pérez-González JJ, Ramírez-Vega ML (2010). *Adición de aceite de chía (Salvia hispanica) como fuentes de ácidos grasos omega 3 en chorizo.* En: *Avances en la Investigación de la Alimentación Funcional.* Editado por. Fontecha-Alonso JF. México, 101-108.
- Steger Eron and Kutulakos Kiriakos N. (2008). *A Theory of Refractive and Specular 3D Shape by Light-Path Triangulation.* *Int. J. Computer Vision*, vol. 76, no. 1
- Upadhyay, R., Debjani, G. & Mehra, A. (2012). *Characterization of bread dough: Rheological properties and microstructure Original Research Article.* *Journal of Food Engineering*, 109(1), 104-113.
- van Duynhoven John, Esselink Eddy, van Aalst Henrie, Maliepaard Manuelle, H.Henderson Thijs, Hoekstra Niko. (2003). *Impact of Industrial Dough Processing on Structure: A Rheology, Nuclear Magnetic Resonance, and Electron Microscopy Study.* The Netherlands Pages 419-423.

FIGURAS

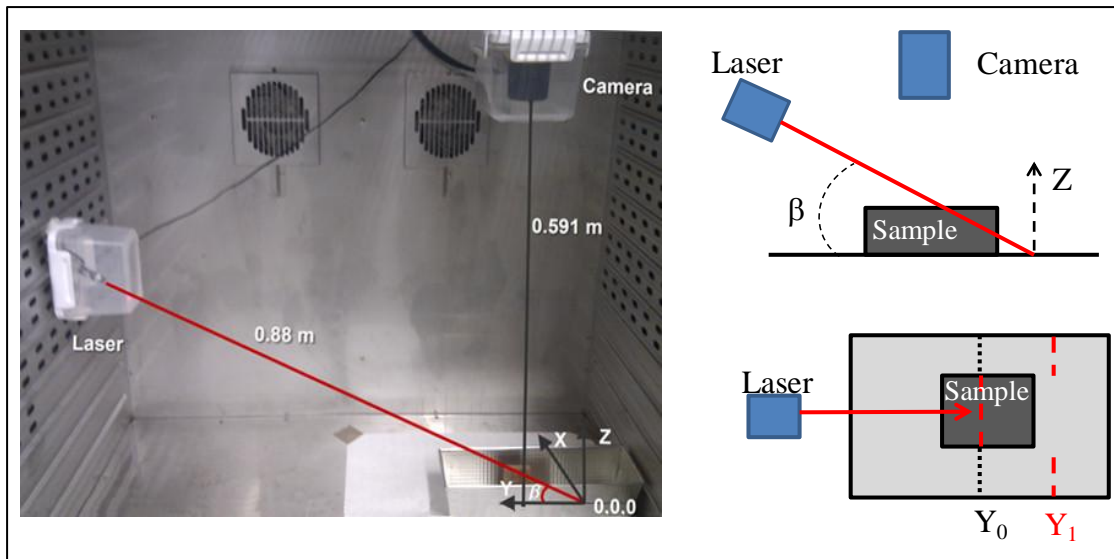


Figura 1. Sistema de visión 3D instalado en la cámara de fermentación y sistema de visión esquemática 3D.

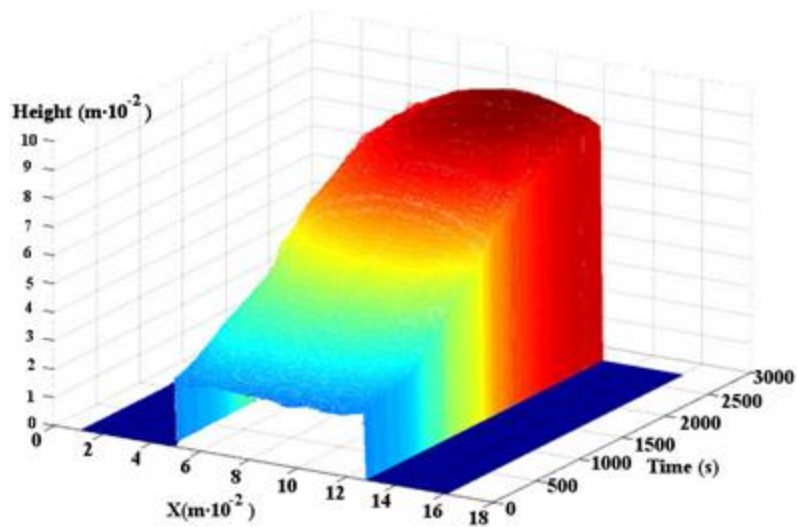


Figura 2. Modelización de los datos obtenidos durante la fermentación del pan.

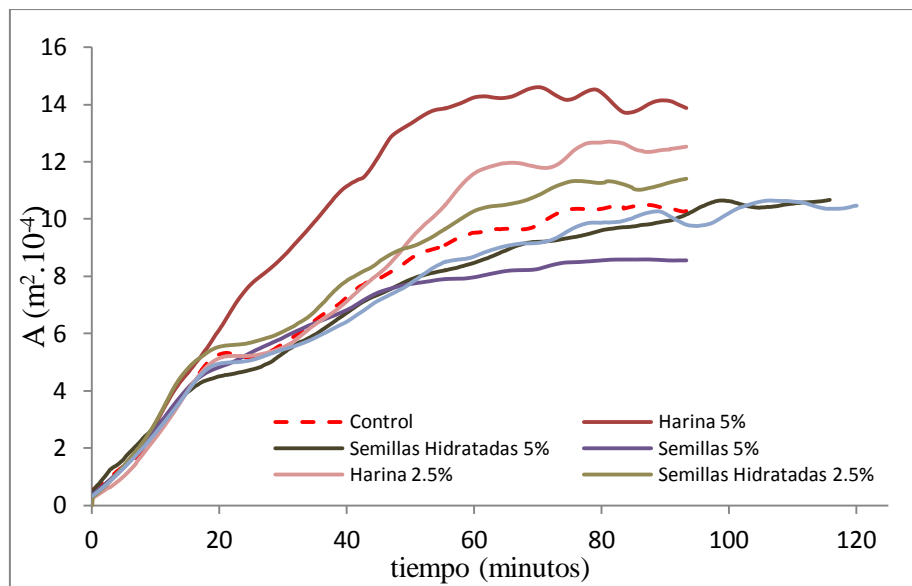


Figura 3. Evolución del área transversal de las masas (A) durante el proceso de fermentación.

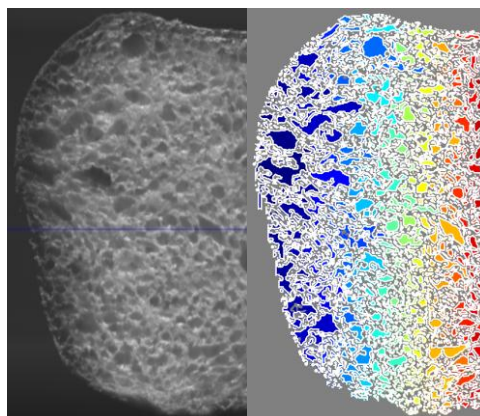


Figura 4. Demostración gráfica de cómo se determina el número y tamaño de burbujas que existen en un sección de pan.

TABLAS

Tabla 1. Promedio y desviación estándar del contenido en humedad y gluten, así como de los parámetros reológicos basados en el alveógrafo de Chopin (P= presión máxima (mm); L= extensibilidad (mm); W= fuerza (J⁴) Así como el número de caída de la harina de trigo utilizada en el estudio.

Parámetros	Promedio
P	97 ± 2
L	104±3
W	373±12
P/L	0.93±0.03
Tiempo de caída	413±6
Humedad	14.28±0.24
Gluten (%)	31.23±0.25
Gluten seco (%)	13.51±0.11

Tabla 2. Resumen de datos de la fermentación de las masas obtenidos mediante el análisis de las imágenes generadas por la técnica de luz estructurada.

Formulación (% de sustitución)	Area (m ² · 10 ⁻⁴)	Tiempo (min) para alcanzar la máxima área del control	% Reducción de tiempo
C	10.29±0.17 ^{ab}	84.0±6.7 ^c	0
E (5%)	8.54±0.23 ^{ab}	*	*
T (5%)	13.87±0.23 ^c	37.6±4.4 ^a	55.2
H (5%)	10.77±0.18 ^{ab}	90.7±12 ^c	-8
E (2.5%)	10.47±2.70 ^a	92.3±2b ^c	-11.7
T (2.5%)	12.85±0.01 ^{bc}	55.8±5.1 ^b	33.6
H (2.5%)	11.70±1.19 ^{bc}	64.0±9.9 ^b	23.8

* no alcanza el área de la formulación control

Tabla 3. Tamaño medio de burbujas para cada una de las formulaciones analizadas.

Formulación (% de sustitución)	Tamaño medio de burbuja (m ² · 10 ⁻⁴)
C	1.36±0.046 ^c
E (5%)	1.25±0.071b ^c
T (5%)	1.117±0.126 ^{ab}
H (5%)	1.06±0.033 ^a
E (2.5%)	1.24±0.153 ^{bc}
T (2.5%)	1.10±0.038 ^{ab}
H (2.5%)	1.19±0.079 ^b

ACEITABILIDADE SENSORIAL EM SALAME COM BAIXO TEOR DE SÓDIO UTILIZANDO KCl e CaCl₂

Almeida, M. A.¹, Kamimura, T., Gonçalves, A.C.R.¹, Pinto, J.S.S.¹, Monte-Villanueva, N.D.², Contreras-Castillo, C.J.¹,

1 – Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Universidade de São Paulo – USP – Piracicaba – SP, Brasil.

Email para correspondência: madalmei@usp.br

2 – Facultad de Ingeniería Agraria, Universidad Católica Sedes Sapientiae. Esq.

Constelaciones y Sol de Oro S/N Urbanización Sol de Oro, Los Olivos – Lima – Peru.

INTRODUÇÃO – A indústria de alimentos enfrenta diferentes desafios que incluem desde satisfazer as necessidades nutricionais básicas das pessoas até cumprir as complexas exigências relacionadas à segurança alimentar e características sensoriais. Atualmente, pesquisadores em ciência e tecnologia de produtos cárneos focalizam parte de suas pesquisas no desenvolvimento de produtos com níveis reduzidos de sódio com boas características sensoriais, que possam ser armazenados por um período convencional sem o aumento da adição de aditivos químicos.

Os produtos fermentados, entre eles o salame, apresentam uma boa conservação e uma elevada vida útil, já que bactérias patogênicas e deteriorantes no produto são inibidas. Contudo, esses produtos constituem uma importante fonte de sódio, devido ao fato que durante a sua elaboração, adiciona-se entre 1,5% e 3,0% de cloreto de sódio (NaCl) e no decorrer da sua produção ocorre a desidratação e aumento da concentração do NaCl, que atinge valores entre 2,5% e 5,0% (CICHOSKI et al, 20011). Deve-se observar que a ingestão de sódio recomendada na dieta diária é de 1,5 g, o que corresponde a 3,75 g de cloreto de sódio (TOLDRÁ, 2007; COZZOLINO, 2005).

Existem atualmente alternativas para a redução do sódio em produtos fermentados, sendo uma das mais viáveis a substituição parcial do cloreto de Sódio (NaCl) por combinações de cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂) e cloreto de cálcio (CaCl₂), porém estes substitutos apresentam restrições, uma vez que podem influenciar na qualidade sensorial dos produtos (IBAÑEZ et al., 1995). As combinações entre NaCl e KCl em blends são de uso comum, porém normalmente não ultrapassam a proporção de 50:50 em função principalmente das alterações sensoriais que produzem (PHELPS, 2006).

No Brasil, a produção e o consumo de embutidos fermentados encontram-se fortemente ligados à tradição dos imigrantes italianos, espanhóis e portugueses e este fato incorporou características mediterrâneas na tecnologia de produção, como a menor acidez.

Nos últimos anos, as indústrias passaram a incorporar culturas iniciadoras (culturas *starters*) para conseguir uma produção mais homogênea, diminuindo assim o aparecimento de salames com “off flavor”, coloração indesejável e, desta forma, refletindo em uma maior rentabilidade. Porém isto resultou na produção de embutidos crus fermentados com uma qualidade sensorial significativamente menor quando comparados com embutidos fermentados europeus (FADDA et al., 2010).

No caso dos salames com baixo teor de sal, existem dificuldades a serem enfrentadas, porque o cloreto de sódio favorece a estabilidade microbiológica desses produtos fermentados, além de contribuir na formação do flavor. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi testar com consumidores habituais de salame níveis de redução/substituição de NaCl por KCl e CaCl₂ em embutidos fermentados como salame tipo italiano.

MATERIAL E MÉTODOS – A elaboração dos embutidos fermentados foi conduzida no Laboratório de Qualidade e Processamento de Carnes da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) – Piracicaba – SP, Brasil. Na formulação utilizaram-se os seguintes ingredientes cárneos: paleta suína (60%), acém bovino (20%) e toucinho (20%). Os ingredientes não-cárneos adicionados foram nitrato de sódio (0,015%), nitrito de sódio (0,015%), eritorbato de sódio (1,0%), dextrose (0,75%), glutamato monossódico (0,02%), pimenta branca (0,20%), noz moscada (0,02%), alho em pó (0,04%), gengibre seco e moído (0,01%), canela em pó (0,01%), cardamomo em pó (0,01%) mostarda moída (0,01%). Os ingredientes foram calculados (%) com base em 100% de matéria-prima carne e a todos os tratamentos adicionou-se cultura starter comercial, levando em consideração as recomendações do fabricante, contendo os seguintes microrganismos: *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus* e todos os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

Para o processamento dos salames, as carnes foram moídas utilizando-se discos com furos de 10, 8 e 5 mm para as carnes suína, toucinho e bovina, respectivamente, seguido do preparo da massa em misturadeira com o tempo de mistura de 5 minutos. A massa obtida foi então embutida em tripa de colágeno reconstituído (35 cm comprimento e 4,5 cm de diâmetro) e submetida à fermentação e a maturação/secagem. Durante a etapa de fermentação, a temperatura foi de 23 a 25°C, com umidade relativa (UR) variando de 85% a 90%, os salames permaneceram nestas condições até o pH atingir 5,0. Posteriormente, as

peças de salame foram secas e maturadas a temperatura de 17°C a 19°C, a 75% de UR por 20 a 25 dias, até a atividade de água ser de 0,90.

Para o teste de aceitação, as amostras de salame correspondente a cada tratamento foram avaliadas quanto à cor, sabor, textura e qualidade global através da escala hedônica de nove pontos (9 = gostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei e 1 = desgostei muitíssimo) e o teor de sal e intenção de compra utilizando-se uma escala estruturada de cinco pontos (5= certamente compraria, 3= talvez compraria, talvez não compraria, 1= certamente não compraria). Adicionalmente, os consumidores foram solicitados a descreverem os atributos dos salames que gostaram ou desgostaram mais. As amostras foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e foram apresentadas aos consumidores de forma monádica sequencial e a ordem de apresentação das amostras ocorreu de acordo a um delineamento em blocos completos casualizados. Análises de pH e Aw foram realizadas para monitorar e padronizar a produção dos salames e para verificar o nível de redução do sódio, foi realizada análise de determinação de teor de sódio no salame acabado, pronto para ser encaminhado a sensorial, conforme a metodologia descrita por Horwitz (2005).

ANÁLISE ESTATÍSTICA – A análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. Quando as diferenças foram detectadas, ao nível de 5%, foi realizado o Teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Statistical Analysis System© (Versão 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO – Os resultados das análises de pH e Aw estão descritos na Figura 1 e Figura 2, respectivamente. Com relação ao pH, verifica-se que os tratamentos em estudo tiveram uma fermentação e secagem/maturação uniforme (Figura 1). O tratamento com 2,5% NaCl, apresentou valores do pH mais altos, se comparado com os demais tratamentos e mostrou pouca variação deste parâmetro ao longo do tempo. Segundo Olesen et al. (2004), o salame com alto teor de sal possui um menor e mais lento desenvolvimento de pH ácido do que os salames de tratamento com menor teor de sal em sua formulação, devido à inibição das bactérias lácticas pelo NaCl.

Os salames são desidratados progressivamente durante o período da sua maturação e as atividades de água (Aw) atingem rapidamente níveis 0,7 a 0,8 (Figura 2), que constituem um obstáculo para a maioria dos microrganismos não envolvidos em fermentações

(LEISTNER, 2000). Na Figura 2, pode-se notar que os tratamentos com 1% NaCl, 1%NaCl+0,25%KCl+0,25%CaCl₂ e 1%NaCl+0,35%KCl+0,15%CaCl₂ apresentaram uma lenta queda da atividade de água e o tratamento com 2,5% NaCl apresentou uma queda mais significativa. A queda da atividade de água está diretamente ligada com o pH. O pH baixo obtido pela atividade microbiana atinge o Ponto Isoelétrico da proteína miosina, conseqüentemente a capacidade de retenção de água diminui, fazendo com que o salame perca água com mais facilidade, devido à desidratação (TOLDRÁ, 2007) e podemos observar que o tratamento com 2,5% NaCl obteve uma maior redução da atividade de água por possuir um teor de sal maior em sua composição, o que contribui para sua desidratação.

A análise sensorial encontra-se descritos na Tabela 2 e com relação aos tratamentos em estudo, não existem diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) para os atributos cor e textura. Sendo assim, a combinação de CaCl₂ + KCl (0,25 + 0,25%) em substituição de NaCl não afetou esses atributos e o tratamento obteve notas mais próximas ao Controle Alto (CA) (2,5% de NaCl) foi o tratamento T1. Sendo a cor, um dos principais fatores decisivos no momento da compra por parte dos consumidores (TERRA, 2003) e essa é produzida pela interação entre os pigmentos da carne (mioglobina) e o composto nitrosomioglobina (resultado da redução dos nitratos a nitritos) que formam o pigmento vermelho característico de produtos curados crus (ORDÓÑEZ et al., 1999) pode-se afirmar que a redução do NaCl não afetou esse mecanismo de formação de cor do ponto de vista da cor sensorial.

Para os atributos qualidade global, sabor e teor de sal, como era de se esperar, houve diferença de maior aceitação ($p \leq 0,05$) do CA com relação aos demais tratamentos e com relação a esses tratamentos, o T1 obteve medias mais próximas ao tratamento CA e nas condições propostas neste ensaio, a adição de 0,25% de KCl + 0,25% de CaCl₂ conseguiu mascarar a redução de NaCl. É interessante notar que na intenção de compra não ocorreu uma rejeição da amostra com 1,0% de NaCl (CB) ou seja, observou – se do ponto de vista sensorial , ser possível elaborar um produto com baixo teor de sódio (com adição inicial de 1,0% de NaCl) sem a adição de substitutos. Com relação aos demais tratamentos observa-se uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o CA e os demais tratamentos, com exceção ao T1 e a média das notas ficou na incerteza com relação a compra (talvez compraria). Isso pode significar que os salames produzidos possuem alguma característica sensorial como, por exemplo, a quantidade de pimenta ou de acidez, que além da quantidade reduzida de sal despertou a sensação de dúvida nos consumidores. Deste modo, testes sensoriais futuros deverão ser realizados para elucidar melhor este atributo.

Pode-se observar também neste ensaio que a adição de 0,25% de KCl + 0,25% de CaCl₂ (T1) como substituto nas condições propostas pelo projeto obtiveram valores maiores de aceitação quando comparados com os obtidos por Campagnol et al., (2012) que realizou um estudo sobre redução de sódio em salames com substituição por KCl e obteve pontuações de 5,2 para o sabor e 4,8 para a textura para o tratamento com redução de 50% de sódio e substituição por KCl. Também com relação ao tratamento T1, o mesmo obteve valores de qualidade global maiores em comparação aos obtidos por Gimeno et al., (1998), que reportaram pontuação de 4,11 para a qualidade global de salames com baixo teor de sódio (formulação 1,00% NaCl, 0,55% KCl, 0,23% MgCl₂, e 0,46% CaCl₂) durante uma avaliação sensorial com consumidores. Então pode-se dizer que nas condições deste ensaio, a combinação de CaCl₂ + KCl (0,25 + 0,25%) produziu salames com baixo teor de sódio com atributos sensoriais mais próximos ao ideal desejado pelos consumidores.

O teor de sódio final, observado em todos os tratamentos (Tabela 3) representa uma redução em torno de 60% de sódio quando comparamos todos os tratamentos com relação ao CA (2,5%) que possui uma concentração de sódio usualmente utilizada na produção de salames no Brasil. O tratamento T1 possui uma redução de 62,5% deixando o percentual final de NaCl em 2,5% no salame após o período de secagem e maturação de 25 dias. Pelo exposto, a redução do teor de NaCl nos produtos fermentados e secos continua a ser um tema de pesquisa importante, porque este tipo de produtos atualmente disponíveis no mercado para consumo, a quantidade de NaCl pode chegar a 6% representando 20-30% da ingestão diária de NaCl (JIMÉNEZ-COLMENERO et al., 2001).

CONCLUSÃO – Nesta pesquisa foi possível concluir que os consumidores habituais de salame aceitam sensorialmente salames com teor reduzido de sódio e que a substituição 0,25% de KCl + 0,25% de CaCl₂ apresenta ser a mais adequada para o desenvolvimento de salames com baixo teor de sódio. Essa pesquisa mostrou também ser viável a elaboração de salames com a adição de 1,0% de NaCl sem a adição de substitutos.

REFERÊNCIAS

- Campagnol, P.C, Dos Santos, B.A., Terra, N.N., Pollonio Ma. Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-sodium fermented sausages. *Meat Science*, 91, 334-338. 2012.
- Cichoski, A. J.; Cansian, R.L.; Oliveira, D.; Gaio, I.; Saggirato, A.G.; Lipid and protein oxidation in the internal part of Italian type salami containing basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 31, 436-442. 2011.
- Cozzolino, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri: Editora Manole Ltda. 878 p. 2005.
- Fadda, S.; López, C.; Vignolo, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as a sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*, 86, 66-79. 2010.
- Horwitz, W. (ed). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, MD, USA, AOAC International, 18th ed, 2005.
- Ibañez, C., Quintanilla, L., Irigoyen, A., Garcia-Jalón, I., Cid, C., Astiasarán, I., Bello, J. Partial replacement of sodium chloride with potassium chloride in dry fermented sausages: influence on carbohydrate fermentation and nitrosation process. *Meat Science*, v40, p. 45 – 53, 1995.
- Gimeno, O., Astiasarán, I., Bello, J. A mixture of potassium, magnesium, and calcium chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4372–4375. 1998.
- Toldrá, F. *Handbook of fermented meat and poultry*. 1 ed. United States: Blackwell Publishing, p. 212. 2007.
- Leinstner, L. Review: basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 55, p. 181-186, 2000.
- Olesen, P.T.; Meyer, A.S.; Stahnke, L.H. Generation of flavour compounds in fermented sausages – the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*. 66, 675 – 687. 2004.
- Terra, N. N. Particularidades na fabricação do salame. XIII Catalogo Brasileiro de Produtos e Serviços/ *Revista Nacional da Carne*, v. 317, p.12-22, 2003.
- Ordóñez, J.A.; Hierro, E.M.; Bruna, J.M.; Hoz, L. de la. Changes in the Components of Dry-fermented Sausages During Ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 39, p. 329–367, 1999.
- Phelps, T., Angus, F., Clegg, S., Kilcast, D., Narain, C. Den Ridder, C. Sensory issues in salt reduction. *Food Qual. Prefer.* v17, p629–634. (Abstract). 2006.

Tabela 1 – Níveis de substituição/redução de NaCl dos diferentes tratamentos

Tratamentos	Quantidade de adição dos sais em %		
	NaCl	KCl	CaCl ₂
T1	1,0	0,25	0,25
T2	1,0	0,35	0,15
CA	2,5	0,0	0,0
CB	1,0	0,0	0,0

Tabela 2. Os valores obtidos para a cor, sabor, textura, qualidade global, teor de sal e intenção de compra para as formulações de salame.

	CA	T1	T2	CB
Cor	7,57 ^a ± 1,25	7,61 ^a ± 1,04	7,07 ^a ± 1,39	7,11 ^a ± 1,32
Sabor	7,34 ^a ± 1,54	6,68 ^b ± 1,47	6,52 ^b ± 1,68	6,64 ^b ± 1,82
Textura	7,11 ^a ± 1,37	6,77 ^a ± 1,64	6,61 ^a ± 1,62	6,86 ^a ± 1,36
Qualglob	7,50 ^a ± 1,21	6,86 ^b ± 1,56	6,39 ^b ± 1,66	6,70 ^b ± 1,77
Teorsal	4,64 ^a ± 1,10	3,43 ^b ± 1,17	3,36 ^b ± 1,14	3,73 ^b ± 1,23
Icompra	4,00 ^a ± 1,10	3,55 ^{ab} ± 1,21	3,11 ^b ± 1,32	3,52 ^{ab} ± 1,07

T1 – 1,0% NaCl + 0,25% KCl + 0,25% CaCl₂; T2 – 1,0% NaCl + 0,35% KCl + 0,15% CaCl₂; CA – 2,5% NaCl; CB – 1,0%

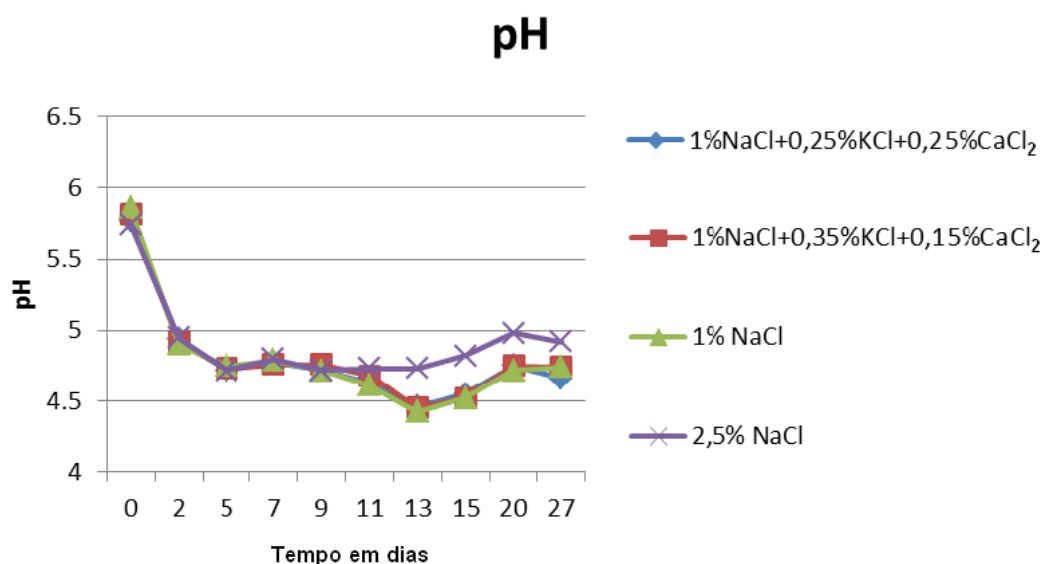


Figura 1 - Avaliação do pH do salame durante a fermentação, secagem/maturação

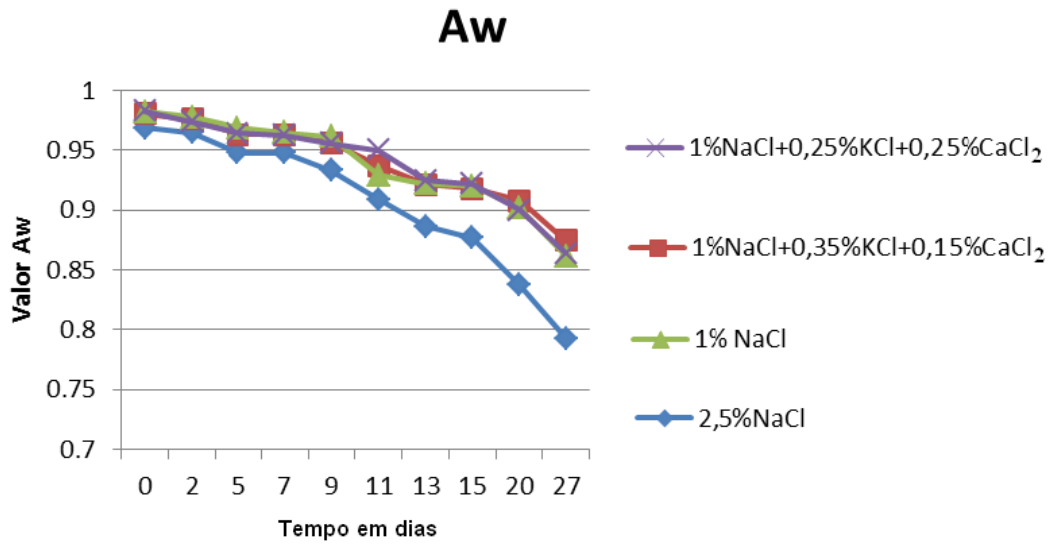


Figura 2 – Avaliação da Aw do salame durante a fermentação, secagem/maturação

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS CHILENAS CULTIVADAS *IN VITRO*.

Gustavo E. Zúñiga., Andrea Tapia., Ruth Paz y Marisol Pizarro.

Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.
Email: gustavo.zuniga@usach.cl

INTRODUCCIÓN.

El deterioro de los alimentos se caracteriza por cualquier cambio que lo hace inaceptable para el consumidor desde el punto de vista sensorial (Gram et al., 2002). Este deterioro puede ser provocado entre otros, por agentes contaminantes como bacterias y hongos y por un deterioro oxidativo. Para prevenir ambos procesos se utilizan en general sustancias químicas de origen sintético, cuyo uso genera controversias debido a problemas en la salud del consumidor (Zang et al., 2010). Debido a esta situación, el uso de antibacterianos y antioxidantes de origen vegetal, ha aumentado con el propósito de disminuir riesgos en los consumidores y de mejorar la vida útil de los alimentos.

En el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad de Santiago de Chile, se trabaja desde hace algunos años en la búsqueda de principios vegetales con propiedades bioactivas, a partir de plantas Chilenas cultivadas *in vitro*. Este es un modelo sustentable que permite obtener extractos altamente reproducibles en término de su composición y actividad y que además, no genera impactos negativos en los ecosistemas. En este trabajo se evaluó extractos de las especies *Quillaja saponaria* (*quillay*), *Crynodendron patagua* (*patagua*) y *Aristotelia chilensis* (*maqui*), en el control de las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, y en el retardo de procesos oxidativos en aceites comestibles.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material Vegetal. El material vegetal usado en este trabajo fue obtenido mediante la propagación *in vitro* de cada una de las especies. Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (1962), suplementados con benzilaminopurina (BAP) y mantenidos en cámaras de crecimiento a 25 °C y fotoperiodo 16/8 luz/oscuridad.

Extractos. A partir de cultivos de 1 mes, se obtuvieron explantes que fueron puestos en etanol 85% en relación 1:10 masa: volumen y sonicados durante 2 horas. Los extractos

obtenidos fueron almacenados en botellas ámbar y mantenidos a temperatura ambiente hasta su uso.

Actividad biológica de los extractos.

Determinación de capacidad antioxidante por estabilización del radical libre DPPH. Se desarrolló según el método de Naik y cols., 2005, se preparó una solución etanólica de DPPH de absorbancia cercana a 0,8 AU a 517 nm, la actividad antioxidante se determinó usando 900 µL de solución de DPPH con 100 µL de extractos etanólicos, se incubó por 4 minutos y se registró la absorbancia 593 nm en espectrofotómetro (espectrofotómetro UV-Vis, Agilent 8453 Palo Alto, CA, EUA). Los resultados se expresaron como nmoles de DPPH consumidos respecto a un blanco analítico utilizando un coeficiente de extinción molar de 1.1123 µM

Determinación del poder reductor (FRAP). Según Benzie y Strain, 1996, se preparó una solución de reactivo FRAP, mezclando buffer acetato de amonio 300 mM (pH 3,6), solución de cloruro de hierro (III) hexahidratado 20 mM y solución de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM en una proporción 10:1:1, la cual se mantuvo a 37 °C. Para la medición se tomaron 900 µL de reactivo FRAP y 20 µL de los extractos etanólicos (1:10 peso:volumen), se incubó por 4 minutos y se registró la absorbancia 593 nm en espectrofotómetro (espectrofotómetro UV-Vis, Agilent 8453 Palo Alto, CA, EUA). Los resultados se expresaron como equivalentes de trolox utilizando un coeficiente de extinción de 0.0007 µM.

Capacidad antioxidante de aceite de canola suplementado con extracto de Maqui.

Para la suplementación de aceites de canola con extractos de maqui se realizó una extracción oleosa de material *in vitro* seco de maqui en aceite de canola comercial. La extracción fue llevada a cabo de la siguiente manera: 50 g de aceite de canola se adicionaron a 0,5 g de polvo seco de maqui *in vitro*. Se homogenizó y calentó a 60°C por 1 hora. El aceite se dejó reposar y decantar el material vegetal adicionado.

Al aceite resultante se analizó la capacidad antioxidante mediante el método del DPPH (Teh y Birch, 2013). A 10 g de aceite se adicionaron 50 ml de hexano y se agitó, luego se extrajo tres veces con 20 ml de metanol. Los extractos metanólicos obtenidos se llevaron a sequedad en un rotaevaporador a 55°C. Al extracto seco se adicionó 1 ml de metanol y se almacenó a 4°C por toda la noche y luego se determinó su capacidad antioxidante expresada en % de consumo del radical DPPH. Los resultados son mostrados en la tabla 2.

Capacidad antibacteriana

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos se realizó a través del método de difusión en pocillos (Nascimento et al., 2000). Se vertió una gruesa capa de agar (específico para el microorganismo en estudio) en placas petri de 100 mm. Posterior a su gelificación se agregaron 100 μ L del inóculo (10⁸), se rastrilló y dejó un par de minutos hasta que se observó que el inóculo fue absorbido por el agar. Luego se procedió a realizar agujeros de 5mm de diámetro en el agar.

En cada uno de los pocillos se aplicaron 20 μ L de los extractos, en las diluciones evaluadas. Las placas se incubaron por el tiempo requerido por el microorganismo en estudio y se procedió a observar la aparición de halos de inhibición.

Los microorganismos utilizados fueron *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar typhi, el agar utilizado fue Agar Mueller-Hinton. El tiempo de incubación fue de 16 hrs. a 37°C.

RESULTADOS

Material Vegetal.

El material vegetal usado se muestra en la Figura 1. Las plántulas de 1 mes fueron usadas para obtener los extractos. El índice de multiplicación fue de 5.

Capacidad antioxidante,

La capacidad antioxidante de los extractos medida, como capacidad antiradicalaria o poder reductor se muestra en la Figura 2. Se observa que el extracto de maqui, presente una actividad antiradicalaria significativamente superior a la actividad de las otras dos especies estudiadas (Fig. 2A). El poder reductor de los extractos mostró menos diferencias entre las especies, siendo el más activo el correspondiente al extracto de maqui (Fig. 2B).

Con el propósito de mostrar su aplicación en alimentos, se determinó el efecto de la adición de extracto seco de maqui en la capacidad antioxidante de aceite de canola (medida como consumo de DPPH, Fig. 3). Se observa que al agregar extracto de maqui (10 mg/g de aceite de canola), la capacidad antioxidante del aceite incremento en un 100%.

Capacidad antibacteriana.

La Fig. 3, muestra que la capacidad antibacteriana depende de la especie de bacteria usada y de la especie productora del extracto. Para *Escherichia coli*, se observó halo de inhibición con los extractos de maqui, quillay y patagua, mientras que para *Salmonella typhi*,

sólo se observó halo de inhibición con los extractos de maqui y patagua. Se observa además, en la Fig. 3, que el extracto de maqui es el que presentó mayor capacidad antibacteriana.

La necesidad de contar con productos bioactivos de especies vegetales, suele generar una sobre explotación de los recursos. El cultivo de tejidos vegetales, representa una promisorio herramienta para la obtención de extractos bioactivos a partir de plantas. En este trabajo de muestra que el cultivo in vitro de especies nativas genera extractos con actividad biológica. De las 3 especies analizadas, el maqui es la que presenta una mayor capacidad antioxidante, esta capacidad puede ser usada en el mejoramiento de la capacidad antioxidante de productos comerciales. El aumento obtenido en la capacidad antioxidante del aceite de canola, es un resultado muy promisorio, pues sugiere que se podría mejorar las propiedades nutraceuticas de este aceite de uso común.

Por otra parte, los 3 extractos mostraron una capacidad antibacteriana diferencial. Particularmente, el maqui, es la especie que presento la actividad inhibidora del crecimiento más alta. Esto es de particular interés, pues se dispone de un extracto antioxidante con propiedades antibacterianas.

CONCLUSIONES.

Se dispone de un sistema de producción de biomasa generadora de extractos con actividad biológica.

El extracto de maqui es la especie que presentó la mayor capacidad antioxidante respecto del quillay y patagua.

Los extractos obtenidos presentan actividad anti *E. coli* y *S. thipy*, siendo el más activo el extracto de maqui.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CORFO 11IDL2-10573 y el aporte de la empresa PRINAL.

REFERENCIAS.

Benzie, I.F.F. y Strain, J.J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70 – 76.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M., (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 79–97.

Murashige T., Skoog F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473-497.

Naik, G.H., Priyandarsini, K.I. y Mohan, H., (2005). Evaluating the antioxidant activity of different plant extracts and herbal formulations. *Res Chem Intermed* 31(1): 145 – 151.

Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P., Silva, G., (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247–256.

Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., Liu, F., (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118, 656-662

FIGURAS

Fig. 1. Material vegetal usado. El material fue obtenido mediante cultivo *in vitro* de cada una de las especies. Plántulas de un mes de cultivo fueron usadas para obtener extractos.



A. chilensis

Q. saponaria

C. patagua

Fig. 2. Capacidad antioxidante de extractos de *A. chilensis*, *C. patagua* y *Q. saponaria* cultivadas *in vitro*. A: Capacidad atrapadora de radicales libres y B: poder reductor. Cada valor corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1 error estándar.

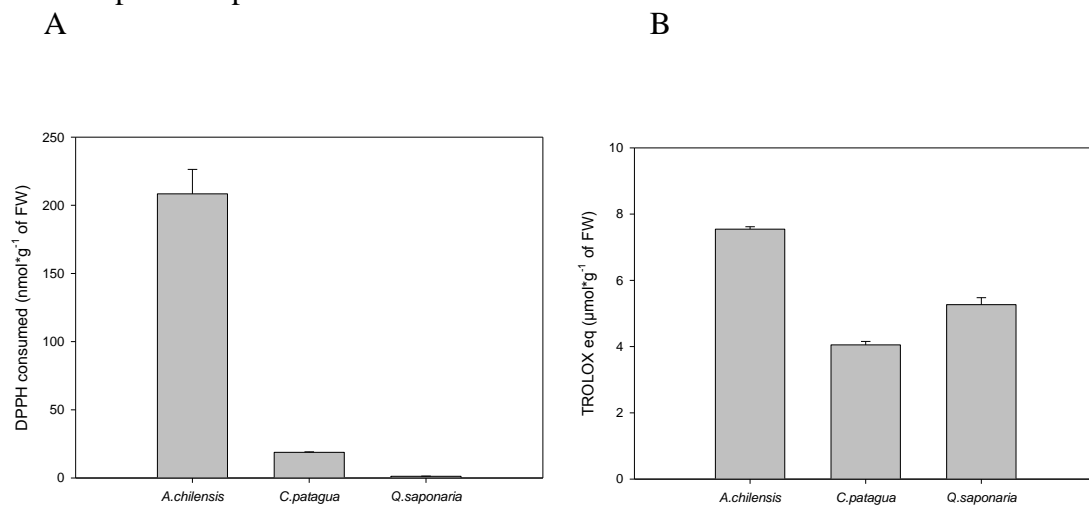


Fig.3. Efecto del maqui en la capacidad antioxidante del aceite de canola. La capacidad antioxidante fue medida mediante el ensayo del DPPH. Cada valor corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1 error estándar.

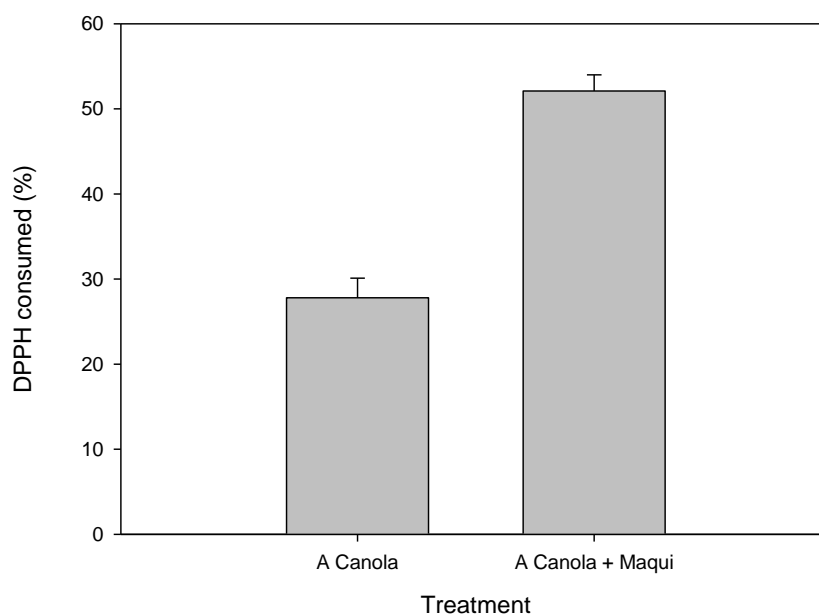
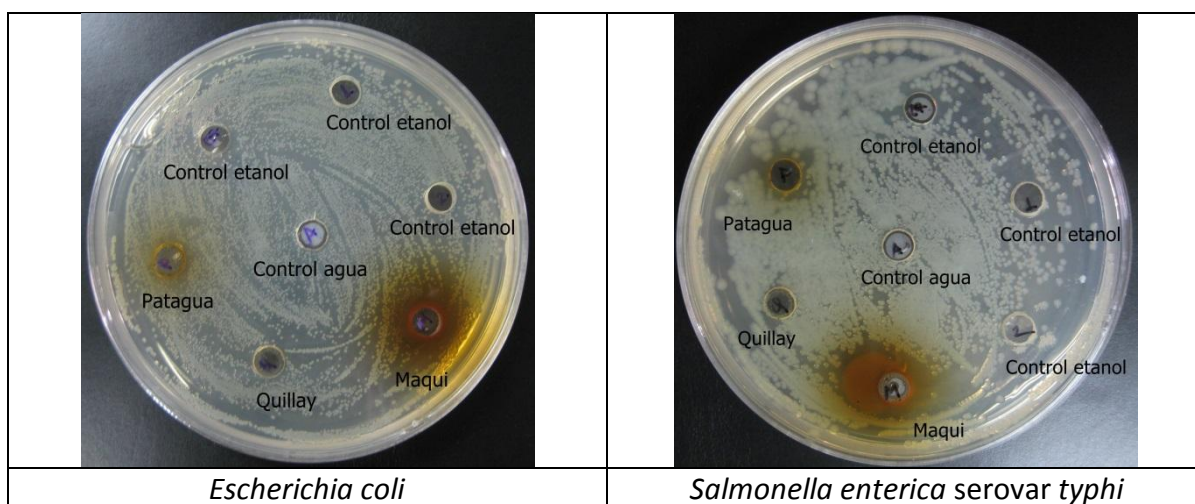


Fig.4. Capacidad antibacteriana de extractos de *A. chilensis*, *C. patagua* y *Q. saponaria* cultivadas in vitro.



BIOCONVERSIÓN DE XILOSA Y GLUCOSA-XILOSA POR *DEBAYOMYCES HANSENI***Lucas Tadeu Silva de Souza^a, Janaína Teles de Faria^b, Attilio Converti^c e Fábio Coelho Sampaio^a**^aDFAR, Federal University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brazil.^bDTA, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.^cDICHEP, University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145, Genoa, Italy.**ABSTRACT**

The purpose of this work was to investigate the effects of xylose concentration (S_x 50.0 to 275.0 gL⁻¹) and glucose/xylose ratio (S_g/S_x 0.09, 0.25 and 0.50) on the fermentative behavior of *Debaryomyces hansenii* UFV-170. The maximum cell productions expressed as cell dry weight were 40.28 gL⁻¹ on pure xylose ($S_x=275.0$ gL⁻¹) and 31.29 gL⁻¹ on the glucose/xylose mixture (S_g 5.0 gL⁻¹/ S_x 50.0 gL⁻¹), respectively. The highest xylitol concentration (130.43 gL⁻¹) was obtained at S_x 190.0 gL⁻¹ corresponding to a xylitol yield ($Y_{Xyt/S}$) of 0.77 gg⁻¹, volumetric productivity (Q_{Xyt}) of 0.54 gL⁻¹h⁻¹ and specific productivity (q_{Xyt}) of 0.16 mmolg⁻¹h⁻¹. High xylose levels ($S_x \geq 187.0$ gL⁻¹) did not increase xylitol accumulation, but stimulated ethanol production. An increase in S_g/S_x ratio from 0.09, 0.25 enhanced xylitol production at S_x 50.0 gL⁻¹, but not at S_x 100.0 gL⁻¹. In the simultaneous presence of glucose and xylose, the maximum xylitol accumulations (36.54 and 57.13 gL⁻¹) was observed for S_g 14.0 gL⁻¹/ S_x 50.0 gL⁻¹ with $Y_{Xyt/S}=0.72$, $Q_{Xyt}=0.36$ and $q_{Xyt}=0.08$. At the selected glucose/xylose ratio, glycerol and ethanol formed as by-products.

Keywords: Xylose. Glucose. Xylitol. Fermentation.**INTRODUCTION**

Xylitol is a five-carbon polyalcohol (pentiol) that, because of a large number of possible applications, is gaining increasing acceptance in the food, odontologic, and medical-pharmaceutical industries (Hyvonen et al. 1982).

Its industrial production is based on the acid hydrolysis of xylan-rich lignocellulosic raw materials, followed by several expensive steps of purification of the released D-xylose and its subsequent catalytic hydrogenation to xylitol using nickel as a catalyst (Hyvonen et al., 1982).

However, bioprocesses using microorganisms for the bioconversion of synthetic xylose solutions or lignocellulosic hydrolysates appear to be very promising in view of possible reduction of costs (Sampaio et al., 2008). However, high monosaccharide levels can lead to osmotic stress to the cell (Erasmus et al., 2003); repress the synthesis of xylose reductase (Jeffries and Jin, 2000), the enzyme allowing xylose to enter the pentose phosphate shunt; and produce ethanol up to inhibitory levels (Inan and Meagher, 2001).

So, in the present study, the effects of xylose concentrations and glucose/xylose ratio on the fermentation by *Debaryomyces hansenii* UFV-170 were evaluated in semi-synthetic media, to assess the influence of these variables on the xylose-to-xylitol bioconversion.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and maintenance

The strain *Debaryomyces hansenii* UFV-170 was used in this work. The stock culture was maintained at -80°C on YPD (10 gL⁻¹ yeast extract, 20 gL⁻¹ peptone and 20 gL⁻¹ D-glucose) containing 40% glycerol. The cells were transferred and grown for 48 h at 30°C on YPD medium supplemented with 15 g L⁻¹ agar.

Inoculum preparation

Loopfuls of cells from the plates were transferred to 125-mL Erlenmeyer flasks with 25 mL of a growth medium containing 3.4 gL⁻¹ KH₂PO₄, 6.8 gL⁻¹ K₂HPO₄, 1.0 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1.1 gL⁻¹ MgSO₄, 5.0 gL⁻¹ yeast extract and 20 gL⁻¹ of D-xylose (pH 6.0). Precultivations were carried at 30°C and 200 rpm. After 20-24 h, cells were collected by centrifugation (4°C, 4,000xg for 5 min) and washed twice with sterile water. The starting inoculum was 8.0 gL⁻¹ cell dry weight. Cells were inoculated into 125-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the same medium used for precultivation with different xylose concentration (S_x 50.0 to 275.0 gL⁻¹) and glucose/xylose ratio (S_g/S_x 0.09, 0.25 and 0.50) with S_x 50.0 and 100 gL⁻¹.

Analytical methods

Aliquots of the culture were centrifuged at 8,000xg (5 min), and the supernatants were used for determination of D-xylose, D-glucose, xylitol, ethanol and glycerol by HPLC System equipped with a refractive index detector and a HPX-87H (300x7.8 mm) column. A 0.01 N H₂SO₄ solution was used as mobile phase (0.7 mL min⁻¹). The optical density

(OD_{600nm}) was related to cell concentration in g dry weight (DW) L⁻¹ (1 OD_{600nm} = 1.6717 g_{DW}L⁻¹).

Kinetic Parameters and Yields

Maximum concentrations of glycerol, ethanol and xylitol were defined as P_{Gly} , P_{Eth} and P_{Xyt} , respectively. Xylitol and ethanol volumetric productivity (Q_{Xyt} and Q_{Eth} , respectively) were calculated by dividing their concentrations by the time required to reach maximum productions. These values were then divided by the cell concentration at the same time to obtain the corresponding specific productivities (q_{Xyt} and q_{Eth} , respectively). The yields of xylitol ($Y_{Xyt/S}$) and ethanol ($Y_{Eth/S}$) were calculated as the ratios of the maximum concentrations of these products to the consumed substrate.

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass production increased with S_x , reaching a maximum value of 40.28 gL⁻¹ for $S_x=106.30$ gL⁻¹ after 240 h of cultivation, with total consumption of xylose (Table 1). Higher values of S_x led to a decrease in the accumulation of biomass, which reached the lowest value (19.75 gL⁻¹) for $S_x=275.16$ g L⁻¹ after 240 h, corresponding also to the lowest consumption of xylose (45%). The same was observed with *Candida guilliermondii* by Meyrial et al. (1991).

Xylitol formation progressively increased with S_x , with a maximum value of 130.43 g L⁻¹ at $S_x=187.60$ g L⁻¹ after 240 h. However, at $S_x=275.16$ g L⁻¹ P_{Xyt} was only 45.50 gL⁻¹, corresponding to 45% of xylose consumption, which could hinder the process of xylitol separation at an industrial level.

Glycerol (compatible solute) and ethanol (incomplete oxidation of the substrate) accumulated in the culture medium as by-products only at very high S_x values (≥ 187.60 g L⁻¹).

The xylitol yield ranged between 0.61 and 0.77 gg⁻¹ for $S_x \leq 187.60$ gL⁻¹ reaching the lowest value ($Y_{Xyt/S}=0.37$ gg⁻¹) at $S_x=275.16$ gL⁻¹. In a similar study with *Candida parapsilosis*, Oh et al. (1998) observed that $Y_{Xyt/S}$ increased with S_x up to a maximum of 0.74 gg⁻¹ at $S_x=170$ gL⁻¹, while *Candida tropicalis* showed greater resistance to xylose ($Y_{Xyt/S}=0.90$ gg⁻¹) within a very large substrate concentration range ($50 < S_x < 250$ gL⁻¹) (Oh and Kim, 1998).

The highest volumetric ($Q_{Xyt}=1.35$ gL⁻¹ h⁻¹) and specific ($q_{Xyt}=0.67$ mmolg⁻¹h⁻¹) productivities were obtained with $S_x=95.71$ and 47.0 gL⁻¹, respectively. The same was observed by Sampaio et al. (2008) under the best microaerobic conditions and with $S_x=53$ g L⁻¹ ($Y_{Xyt/S}=0.76$ gg⁻¹, $Q_{Xyt}=1.0$ gL⁻¹h⁻¹ and $q_{Xyt}=0.22$ mmolg⁻¹h⁻¹).

The highest biomass productions (31.29 e 30.83 gL⁻¹) were obtained at the lowest values of S_g/S_x (S_g/S_x 0.09 and 0.25), while higher ratios did not lead to any increase in biomass accumulation (Table 2). Probably too high osmotic pressure affected the synthesis of biomass. However, Oh and Kim (1998) showed that glucose is mainly consumed for the production of biomass, while most of xylose is addressed to the accumulation of xylitol.

The largest accumulation of xylitol ($P_{Xyt}=57.13$ gL⁻¹) was detected for S_g/S_x 0.09 with S_x 100.0 gL⁻¹ after only 72 h, while at other ratios xylitol accumulation decreased and took longer. Oh and Kim (1998) observed for *C. tropicalis* a maximum xylitol production (P_{Xyt}) of 93.0 gL⁻¹ with S_x 100.0 gL⁻¹ and $S_g=10$ gL⁻¹ (0.10 ratio) and a decrease of P_{Xyt} accompanied by the formation of ethanol at higher S_g values. At S_x 50.0 gL⁻¹, the increase in S_g/S_x up to 0.25 benefited xylitol accumulation.

With S_g/S_x at S_x 50.0 gL⁻¹, xylitol accumulated in greater extent ($P_{Xyt} = 36.64$ gL⁻¹, S_g/S_x 0.25) when compared with cultivation in xylose ($P_{Xyt}=29.22$ gL⁻¹), suggesting that the lower the concentrations of xylose and glucose, the higher the formation of xylitol. The same was not observed for S_g/S_x with S_x 100.0 gL⁻¹ ($P_{Xyt}=27.23-57.13$ gL⁻¹) compared to the cultivation in xylose ($P_{Xyt}=64.31$ gL⁻¹). Walter et al. (2001) observed for *C. tropicalis* ATCC 96745 cultivation in xylose ($S_x=60$ gL⁻¹) and glucose ($S_g=10$ and 20 gL⁻¹), with $S_g/S_x=1/6$ and 1/3, a maximum $Y_{Xyt/S}$ value of 0.57 gL⁻¹, which was lower than that obtained in xylose ($Y_{Xyt/S}=0.61$ gL⁻¹).

Accumulation of ethanol was observed under all values of S_g/S_x , but its highest concentration ($P_{Eth}=21.64$ gL⁻¹) was detected at S_g/S_x 0.50 and S_x 100.0 gL⁻¹, after only 72 h. When compared to cultivation in xylose (Table 1), we conclude that the presence of glucose favored the accumulation of ethanol.

We observed accumulation of glycerol in the culture medium at S_g/S_x with S_x 100.0 gL⁻¹ and S_g/S_x 0.50 with S_x 50.0 gL⁻¹ (Table 2), but no major differences in relation to the cultivation in xylose (Table 1).

The highest values of $Y_{Xyt/S}$ (0.67 and 0.72gg⁻¹) were obtained in the presence of glucose with S_x 50.0 gL⁻¹ when S_g/S_x 0.09 and 0.25, respectively (Table 3). However, Vandeska et al. (1995) observed with *Candida boidinii* NRRL Y-17213 the highest yield in the absence of glucose ($Y_{Xyt/S}=0.64$ gL⁻¹) and the same occurred in other fermentations of this study.

The values of Q_{xyt} and q_{xyt} obtained in the glucose/xylose mixture were lower than those obtained only in xylose (Table 1), except for the culture performed at S_g/S_x 0.09 with S_x 50.0 gL⁻¹, whose productivities were nearly the same. Walter et al. (2001) and Vandeska et al. (1996) observed almost the same results for these parameters.

As far as the production of ethanol is concerned, the highest values of $Y_{Eth/S}$ were obtained for S_x 50.0 gL⁻¹ (S_g/S_x 0.09; $Y_{Eth/S}$ =0.34 gg⁻¹) and S_x 100.0 gL⁻¹ (S_g/S_x 0.25 and 0.50; $Y_{Eth/S}$ =0.38 and 0.35 gg⁻¹, respectively), while those of Q_{Eth} (2.36 and 1.80 gL⁻¹h⁻¹) and q_{Eth} (4.03 and 2.77 mmol g⁻¹h⁻¹) at S_x 100.0 gL⁻¹ with S_g/S_x 0.25 and 0.50, respectively, which means that the presence of glucose stimulated ethanol formation, especially at high S_x values.

CONCLUSIONS

In conclusion, is possible to infer that xylose is likely consumed for the simultaneous productions of biomass, xylitol, glycerol and ethanol. High concentrations of xylose (≥ 187.0 gL⁻¹) hindered the accumulation of xylitol and favored those of ethanol and glycerol, even using large inoculum (8.0 gL⁻¹ of dry biomass), probably due to increased osmotic pressure of xylitol in the culture medium. The desired xylitol accumulation was favored, instead, by low concentrations of glucose (5.0-15.0 gL⁻¹) and xylose (50.0 gL⁻¹). Further work is needed to optimize other significant culture conditions. In addition, experimental planning and mathematical modeling could provide information useful to increase yield and productivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Brazilian agencies CNPq and FAPEMIG for the financial support.

REFERENCES

- Erasmus DJ, van der Merwe GK, van Vuuren HJJ (2003). *FEMS Yeast Research*, 3, 375–399.
- Jeffries TW, Jin, Y-S (2000). *Advances Applied Microbiology*, 47, 221–268.
- Hyvönen L, Koivistoinen P, Voirol F (1982). In *Advances in Food Research*, ed. C.O. Chichester, E.M. Mrak, G. Stewart. Academic Press, New York, v.28/ pp. 373–403.
- Inan M, Meagher MM (2001). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 337–341.
- Meyrial V, Delgenes JP, Molleta R, Navarro JM (1991). *Biotechnology Letters*, 13, 4, 281-286.

Oh D-K, Kim S-Y (1998). *Applied Microbiology Biotechnology*, 50, 419-425.

Oh D-K, Kim S-Y, Kim J-H (1998). *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 440-444.

Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1998). *Bioresource and Technology*, 65, 191-201.

Sampaio FC, Chaves-Alves VM, Converti A, Passos FLM (2008). *Bioresource Technology*, 99, 502-508.

Vandeska E, Kuzmanova S, Jeffries TW (1995). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 513-516.

Walther T, Hensirisak P, Agblevor FA (2001). *Bioresource Technology*, 76, 213-220.

Winkelhausen E, Kuzmanova S (1998). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 1-14.

Table 1 – Main results of xylose fermentations by *Debayomyces hansenii* UFV-170 carried out at different initial substrate concentrations

S_x (gL ⁻¹)	Biomass (gL ⁻¹)	P_{Xyt} (gL ⁻¹)	P_{Eth} (gL ⁻¹)	P_{Gly} (gL ⁻¹)	Xylitol Parameters		
					$Y_{Xyt/S}$ (gg ⁻¹)	Q_{Xyt} (gL ⁻¹ h ⁻¹)	q_{Xyt} (mmolg ⁻¹ h ⁻¹)
47.0	23.91(240/100)*	29.22(240/100)	0	0	0.61	1.22	0.67
95.71	39.50(240/100)	64.84(48/99)	0	0	0.68	1.35	0.60
106.30	40.28(240/100)	64.31(48/88)	0	0	0.68	1.34	0.63
187.60	22.20(240/90)	130.43(240/90)	5.05(72/58)	4.49(72/58)	0.77	0.54	0.16
275.16	19.75(240/45)	45.50(240/45)	4.01(240/45)	15.26(240/45)	0.37	0.20	0.06

*(hours of culture/% xylose consumed)

Table 2 – Main results of xylose/glucose mixture fermentations by *Debayomyces hansenii* UFV-170 carried out at different xylose/glucose ratios

Carbon Source		Ratio	End-Products			
Xylose (gL ⁻¹)	Glucose (gL ⁻¹)	xylose/glucose	Biomass (gL ⁻¹)	P_{Xyt} (gL ⁻¹)	P_{Eth} (gL ⁻¹)	P_{Gly} (gL ⁻¹)
50.31	4.60	0.09	31.29(240/100)*	31.71(24/94)	2.45(6/21)	0
50.73	13.58	0.25	17.62(168/100)	36.64(240/100)	6.87(6/410)	0
52.0	23.21	0.50	15.80(240/100)	13.14(120/100)	12.87(12/51)	1.14(6/47.8)
95.72	8.17	0.09	30.83(240/100)	57.13(72/99.5)	5.07(24/44)	1.30(24/44)
97.23	24.23	0.25	16.67(168/99.5)	26.05(240/100)	14.15(6/31)	3.59(240/100)
103.64	42.10	0.50	20.67(168/98.7)	27.23(240/98.4)	21.64(12/43)	4.13(72/58)

*(hours of culture/% xylose consumed)

Table 3 – Effect of initial xylose and glucose concentrations on the fermentation parameters

Carbon Source		Ratio	Xylitol Parameters			Ethanol Parameters		
Xylose (gL ⁻¹)	Glucose (gL ⁻¹)		$Y_{Xyt/S}$ (gg ⁻¹)	Q_{Xyt} (gL ⁻¹ h ⁻¹)	q_{Xyt} (mmolg ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{Eth/S}$ (g g ⁻¹)	Q_{Eth} (gL ⁻¹ h ⁻¹)	q_{Eth} (mmolg ⁻¹ h ⁻¹)
50.31	4.60	0.09	0.67	1.32	0.70	0.14	0.41	0.89
50.73	13.58	0.25	0.72	0.36	0.08	0.26	1.15	2.06
52.0	23.21	0.50	0.22	0.07	0.06	0.34	1.07	1.67
95.72	8.17	0.09	0.50	0.40	0.28	0.11	0.21	0.37
97.23	24.23	0.25	0.27	0.11	0.05	0.38	2.36	4.03
103.64	42.10	0.50	0.27	0.11	0.04	0.35	1.80	2.77

CONOCIMIENTO LOCAL DE RECURSOS LEÑOSOS Y SU POTENCIAL MULTIPROPÓSITO EN FINCAS CAMPESINAS DE LA ZONA RURAL DE IBAGUÉ (TOLIMA)

Cristina Rocha Rodríguez¹, Jenny Catalina Romero Vargas² & Jairo Mora Delgado³

Investigadores asociados a los Grupos de Investigación de la Universidad del Tolima en Sistemas Agroforestales Pecuarios “SAFP” y BIOECONO: ¹MVZ-Estudiante MsC, girafita@hotmail.com; ²MSC-Biol-Investigadora principal adscrita a la Oficina de Proyección Social, jcromerov@ut.edu.co; ³PhD-MsC-Z-Docente asociado al Departamento de Producción Pecuaria, Universidad del Tolima, jmora@ut.edu.co.

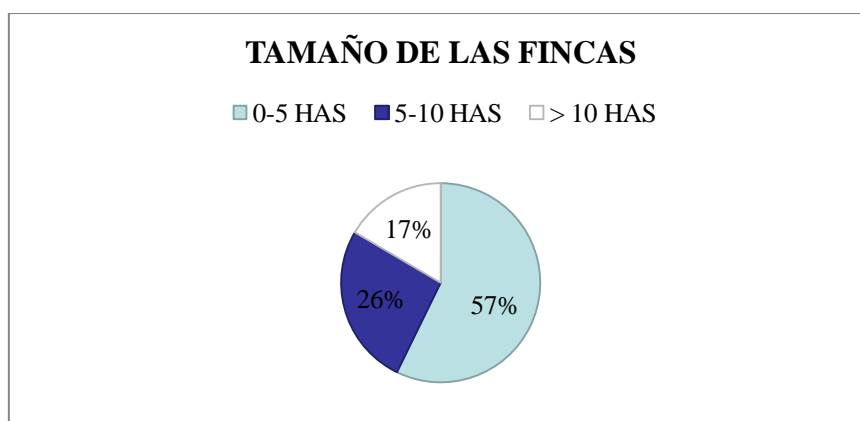
INTRODUCCIÓN

El municipio de Ibagué ubicado en el departamento del Tolima-Colombia, posee una amplia área rural que representa aproximadamente el 97,59% de sus 1.498 Km², cuya población oscila por encima de los 500.000 habitantes, de la cual el 94,03% se ubica en la zona urbana y el 5,97% restante en la zona rural (DANE, 2013). Municipio urbanamente dividido en 13 comunas y ruralmente en 17 corregimientos, 144 veredas y 14 inspecciones (ACR, 2008). No obstante, a pesar de su amplia extensión rural, se desconoce en gran medida la dinámica y el uso de los arreglos productivos y forestales presentes en las fincas. El presente estudio se llevó a cabo en el marco del Proyecto «Análisis socioeconómico y ambiental de productores agropecuarios en tres zonas estratégicas del departamento del Tolima», con el objetivo de recabar información del conocimiento local sobre el uso y el potencial multipropósito de los recursos leñosos en sistemas agropecuarios como fuente alternativa de producción y de sustento de las familias que los integran. Para ello, se aplicaron encuestas semiestructuradas en fincas a 140 productores, distribuidas proporcionalmente en 3 rangos altitudinales, en los 17 corregimientos del municipio. La información colectada se analizó descriptiva y multivariadamente. Se determinó que en la zona rural del municipio de Ibagué prevalece la economía campesina, implementando principalmente cultivos de café asociados a musáceas, como también se evidenció una fuerte participación del componente pecuario sobresaliendo la ganadería bovina, componente usado principalmente para autoconsumo y comercialización local. Del total de fincas analizadas, se encontró que el 62% contienen especies agroforestales y leñosas (arbusivas o arbóreas) con potencial multipropósito como fuente de forraje y madera, frutales, reguladores de sombra entre otros, siendo predominantes: *Thitonia diversifolia*, *Guazuma ulmifolia*, *Gliricidia*

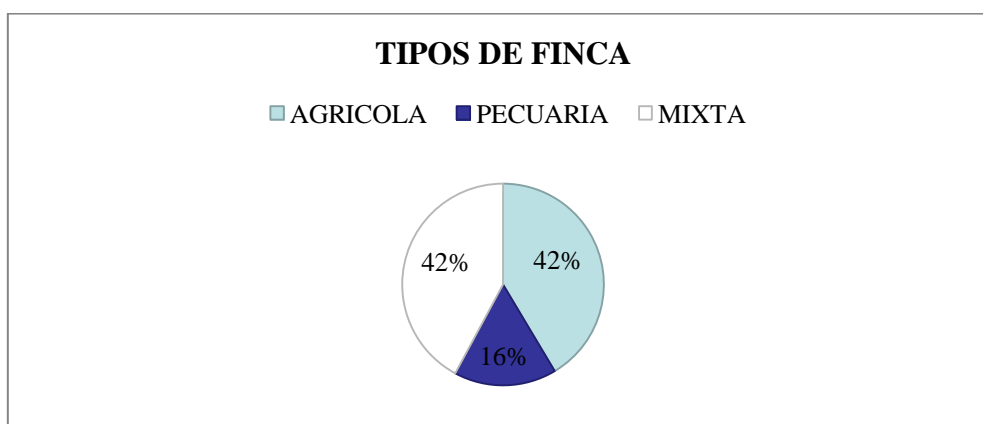
Análisis de datos: la información obtenida fue analizada estadísticamente por medio del programa InfoStat (InfoStat, 2007), realizándosele análisis descriptivos y multivariados.

RESULTADOS:

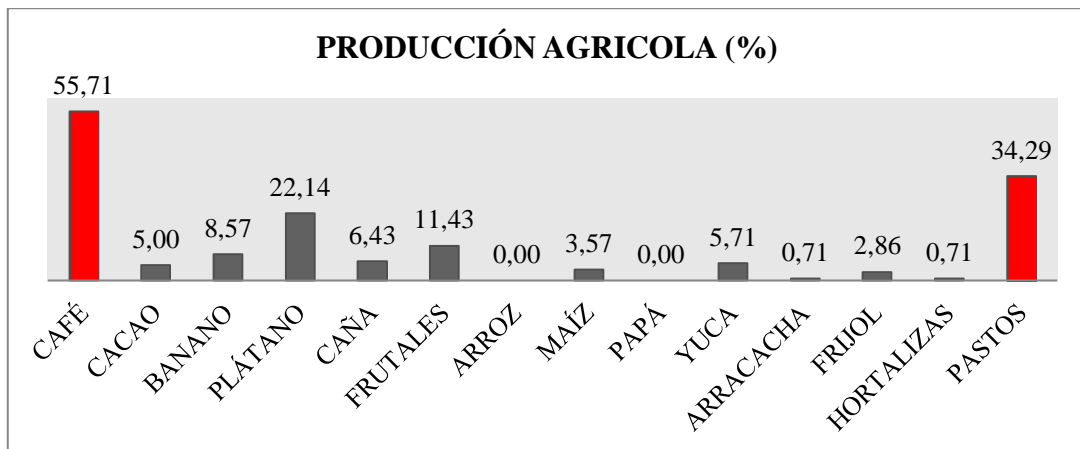
- Del total de fincas seleccionadas y encuestadas, se apreció la predominancia de economías campesinas, cuyos tamaños de finca fueron menores a 10 hectáreas:



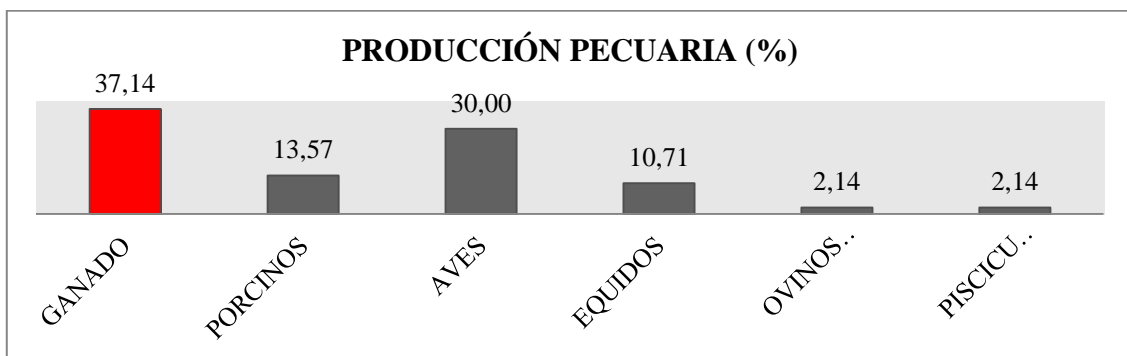
- Los componentes productivos de las fincas se caracterizaron por presentar arreglos agrícolas y mixtos, representando el 84%:



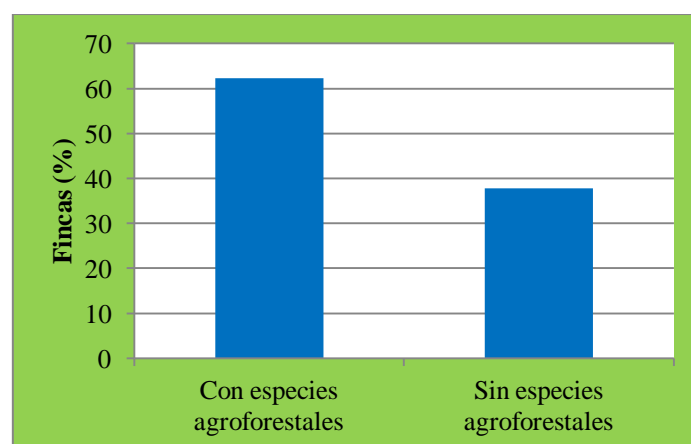
- El componente productivo se caracterizó por el establecimiento agrícola de cultivos de café asociados a musáceas y pastos, presentes en fincas con el 55,71% y 34,29% respectivamente:



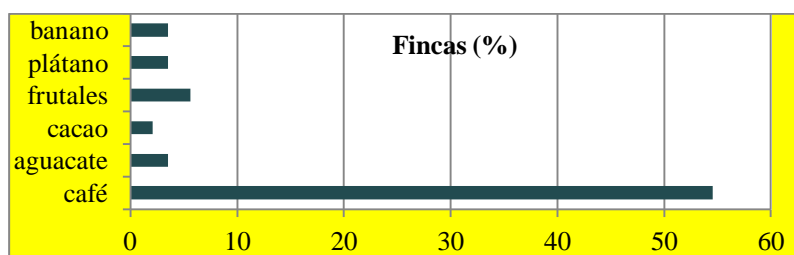
- En la producción pecuaria registrada predomina la ganadería bovina, la avicultura y porcicultura (37%, 14%, 30% y 13,57% respectivamente):



- El 62% de las fincas analizadas manejan alguna especie agroforestal o leñosa:



- Se encontró que la especie agroforestal más común es el Café, presente en más del 55% de las fincas:



- Sólo el 3.5% de los productores encuestados reportaron el tener algún conocimiento sobre el uso de especies leñosas. Algunas especies leñosas (arbustivas y arbóreas) con potencial multipropósito encontradas: *Thitonia diversifolia*, *Guazuma ulmifolia*, *Gliricidia sepium* y *Psidium guajava*:



CONCLUSIONES

Las economías campesinas son las que predominan en la zona rural de municipio de Ibagué, cuya producción agropecuaria se basa principalmente en el cultivo de café y la ganadería bovina.

Las especies leñosas (arbóreas o arbustivas) identificadas presentan gran potencial multipropósito como fuente de forraje, madera, frutales o como reguladores de sombra, entre otros, para brindar productos o servicios, que mejoren en fincas la producción, el sustento económico, la conservación genética de dichos recursos leñosos, la reducción o control de efectos del cambio climático y las deficiencias nutricionales en zonas secas.

El conocimiento por parte de productores sobre el uso multipropósito de especies leñosas es bastante incipiente, dejando un campo de acción amplio para la extensión de conocimientos a productores que les permitan optimizar los recursos leñosos disponibles en las fincas.

AGRADECIMIENTOS: al Centro de Investigaciones de la Universidad del Tolima y a la Comunidad rural de los 17 corregimientos del municipio de Ibagué.

BIBLIOGRAFÍA

Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), 2013. Proyecciones de Población departamentales y municipales 2005-2020». Consultado el 27 de abril de 2013.

Elldis 2001. Methodologies about Livelihoods. The livelihoods framework is a tool to improve our understanding of livelihoods.

Alta Consejería para la Reintegración (ACR), 2008. Diagnóstico Socioeconómico Municipio de Ibagué (Tolima). Bogotá. pv.

CERES-UT 2006. Aproximación a la configuración regional de la provincia Ibagué. Jaime Francisco. Lozano Restrepo y Camilo Clavijo García. 23 p.

SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

M^a Dolores Franco González. Dra. C. Químicas. **Rosana Martínez García. Lda. ADE.** Máster en Gestión de Empresas. Área de Servicios Avanzados de Instrumentos Científicos, SA. www.icsa.es.

INTRODUCCIÓN.

Desde hace algunos años, la industria de los alimentos, y en concreto los laboratorios agroalimentarios deben afrontar nuevos retos en materia de calidad, con el fin de asegurar la validez técnica de sus resultados, y con el objetivo último de garantizar el fomento de la libre comercialización de productos y servicios a nivel internacional. La implantación de sistemas de gestión de calidad constituye una herramienta idónea para alcanzar estos objetivos, y es por ello que en la última década se ha incrementado notablemente su desarrollo en los laboratorios agroalimentarios. En líneas generales, los sistemas de calidad permiten:

- Mejorar y optimizar sus procesos internos.
- Garantizar el cumplimiento de la legislación vigente. En determinados ámbitos se exige de manera reglamentaria la implantación de sistemas de gestión de calidad, por ejemplo el Reglamento Europeo 882/2004 requiere que los laboratorios que participan en el control oficial de alimentos dispongan de un sistema de gestión de calidad.
- Adaptarse a las necesidades y cambios del entorno (clientes, competencia, tecnologías). La propia situación del entorno de los laboratorios conduce en muchos casos a implantar sistemas de gestión de calidad, por ejemplo como herramienta de diferencia competitiva respecto a sus proveedores. Asimismo, puede ser requisito específico de clientes o usuarios el que los laboratorios implanten un sistema de gestión de calidad, o también cambios en los equipamientos y tecnologías empleados en los laboratorios.

Entre toda la variedad de sistemas de gestión de calidad disponibles, los laboratorios deben seleccionar aquel que mejor se ajuste a sus necesidades, para ello deben tenerse en consideración como mínimo los siguientes aspectos:

- Objetivos y expectativas con respecto a la implantación del sistema.
- Influencia del entorno relacionado con el laboratorio, como: clientes, competencia y tecnologías, entre otros.
- Recursos disponibles, teniendo en cuenta los económicos, financieros y humanos disponibles, entre otros.

En el marco de los sistemas de calidad, los sistemas para la gestión de la información del laboratorio, *LIMS (Laboratory Management Information Systems)* constituyen una valiosa herramienta para el control por los laboratorios del desempeño de sus actividades. Estos sistemas controlan informáticamente los procesos, desde la recepción de las muestras hasta la emisión del informe analítico. Asimismo, contempla otras actividades inherentes al trabajo de rutina de los laboratorios, tales como:

- Gestión de clientes y proveedores.
- Gestión de inventarios.
- Control del mantenimiento, verificación y calibración de equipos.
- Gestión de la documentación.
- Control de cumplimiento de especificaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Sistemas de gestión de la calidad. La norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

Para llevar a cabo la implantación de un sistema de gestión de la calidad es necesario:

- Realizar un análisis de requisitos inicial, con el fin de determinar la situación de partida con respecto a los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025.
- Proporcionar formación al personal implicado.
- Definir e implantar la estructura documental del sistema.
- Someter el sistema a evaluación interna y externa.

2. Sistemas de gestión de la información. Laboratory Information Management Systems (LIMS).

Los sistemas de gestión informatizada (*LIMS, Laboratory Information Management Systems*), permiten agilizar el manejo y registro de los datos que se generan diariamente en el laboratorio. La herramienta *NevisLIMS* permite controlar estos procesos desde cualquier dispositivo conectado a internet.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Sistemas de gestión de la calidad. La norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

Las normas internacionales ISO, constituyen la referencia fundamental en la implantación de sistemas de gestión de calidad. En concreto, la norma *UNE-EN ISO/IEC 17025 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los*

laboratorios de ensayo y de calibración, permite garantizar la competencia técnica de las actividades de los laboratorios.

Para la evaluación de la aplicación de las normas, se crean en los distintos países los organismos de acreditación. En España actúa la *Entidad Nacional de Acreditación, ENAC*, entidad privada, independiente y sin ánimo de lucro, cuya función es coordinar y dirigir en el ámbito nacional un sistema de acreditación conforme a criterios y normas internacionales.

Las marcas de acreditación permiten identificar claramente los ensayos acreditados que cuentan con el respaldo de los Acuerdos Multilaterales de Reconocimiento (MLA), suscritos por más de 50 países. Estos acuerdos constituyen un apoyo técnico al comercio internacional, permitiendo que los certificados e informes emitidos por los laboratorios acreditados, y los productos o servicios que amparan, sean aceptados fácilmente en los mercados internacionales, contribuyendo así a la eliminación de barreras técnicas y a la reducción de los costes de evaluación.

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 está específica y exclusivamente dirigida a laboratorios de ensayo y calibración, incluyendo todos los laboratorios a excepción de los clínicos (ej: laboratorios microbiológicos, físicos, químicos, etc.). Además, de definir un sistema organizativo y de gestión, esta norma permite garantizar la competencia técnica de las actividades de los laboratorios, así como la validez y fiabilidad de sus resultados.

La norma consta de dos grandes secciones fundamentales:

- Requisitos de Gestión. Referidos a todos aquellos aspectos relativos a aspectos administrativos del laboratorio, como: tratamiento de no conformidades, compras, auditorías internas, resolución de reclamaciones, gestión de solicitudes de análisis, etc.
- Requisitos Técnicos. Referidos a los aspectos relacionados directamente con la realización de los ensayos, como: equipos, control de calidad, procedimientos normalizados de trabajo o validación de métodos.

Los sistemas de gestión según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 ponen al alcance de los laboratorios, recursos que permiten mejorar su funcionamiento interno, entre ellos cabe destacar los siguientes:

- **Documentación del sistema de gestión de calidad.**

La implantación de un sistema de gestión de calidad implica que los procesos y actividades de los laboratorios deban estar plasmados documentalmente, esto permite que:

- Los procesos estén descritos y detallados, y por tanto que puedan ser repetidos siempre en las mismas condiciones.
- Se facilite la formación y cualificación del personal, a través de la lectura y estudio de los documentos.
- Se establezca una base firme para mejorar los procesos.

- **Gestión de No Conformidades.**

Aun cuando los sistemas de gestión de calidad buscan asegurar que los procesos permanezcan bajo control, es inevitable que ocurran no conformidades, que suponen incumplimientos de requisitos que pueden afectar la calidad de los servicios prestados por los laboratorios.

Con el propósito de gestionar tales no conformidades, los sistemas de calidad incluyen directrices para su tratamiento. Una gestión adecuada no se limita a aplicar un “parche” para la resolución de las no conformidades, sino que tiene como objeto identificar y eliminar su causa, y establecer acciones concretas para evitar que vuelvan a producirse.

- **Cualificación del Personal.**

Los laboratorios definen una serie de requisitos mínimos de educación y experiencia para el personal que debe integrar su equipo humano, no obstante esto no es suficiente, y debe llevarse a cabo una cualificación del personal que permitirá entrenarle en las actividades y funciones específicas que desempeñará.

La cualificación del personal permite:

- evitar errores en el trabajo diario, como por ejemplo errores relativos a la transcripción de datos.
- motivar al personal en la realización de las actividades.
- formar al personal en nuevas actividades

- **Indicadores.**

Los indicadores de medida proporcionan información acerca del funcionamiento de los resultados y procesos del laboratorio, a lo largo de un período determinado (ej. número de incidencias en recepción de muestras, porcentaje de muestras que no cumplen los criterios de control de calidad interno, etc).

El análisis de indicadores permite:

- Identificar oportunidades de mejora.
- Establecer objetivos y metas, en base a la información proporcionada por los resultados de los indicadores.
- Sensibilizar al laboratorio sobre la necesidad de mejorar continuamente los procesos.
- Disponer de información inmediata, y por tanto rápida capacidad de reacción ante posibles desviaciones.

- **Auditorías Internas.**

La implantación de sistemas de gestión de calidad implica que deban realizarse auditorías internas con una periodicidad mínima anual. Las auditorías internas permiten:

- Evaluar el grado en que se cumplen los requisitos del sistema de gestión de calidad, así como su efectividad.
- Detectar oportunidades de mejora.

- **Revisión por la Dirección.**

Una de las herramientas más importantes que proporcionan los sistemas de gestión de calidad es la *Revisión por la Dirección*, que supone la valoración de los datos proporcionados a lo largo de un ejercicio. La evaluación de estos aspectos permite identificar tendencias y resultados globales (Ej.: gran cantidad de no conformidades relativas a averías de equipos, reclamaciones recibidas mayoritariamente de un determinado tipo de cliente, etc.).

A partir de la información derivada de la revisión por la dirección pueden establecerse objetivos y metas, que permitirán mejorar el sistema de calidad.

2. Sistemas de gestión informatizada. Laboratory Information Management Systems (LIMS)

El mundo de la informática de laboratorio evoluciona con rapidez para adaptarse a las necesidades cambiantes de los laboratorios agroalimentarios, que buscan de forma continua la manera de reducir costes, agilizar el tiempo de llegada al mercado y responder a las crecientes exigencias reglamentarias

Los sistemas informatizados para la gestión de la información del laboratorio *LIMS*, *Laboratory Information Management Systems*, suponen una inestimable herramienta para los laboratorios agroalimentarios en el desempeño de sus actividades, permitiendo cumplir

con los requisitos de las normativas de calidad, con una eficiente adopción de los recursos disponibles.

NevisLIMS permite controlar el proceso analítico, desde la recepción de muestras hasta la emisión del informe de resultados, estableciendo una cadena de custodia que gestiona la carga de trabajo, los recursos y el equipamiento implicado en el proceso. Garantizando de este modo la integridad y organización del dato, y ofreciendo una información útil para la toma de decisiones.

NevisLIMS está basado en tecnología Cloud Computing. No requiere disponer de hardware o software específico, permitiendo a los usuarios acceder a su información, desde cualquier ordenador o dispositivo móvil conectado a Internet.

La tecnología *NevisLIMS* se encuentra respaldada por las infraestructuras y aplicaciones de empresas de reconocida solvencia técnica y económica, que permiten garantizar la seguridad de los datos.

CONCLUSIONES.

La implantación de sistemas de gestión de calidad bajo los criterios de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 implica un proceso de autoevaluación, con el objetivo de asegurar la validez técnica de los resultados analíticos. Asimismo, los *LIMS*, *Laboratory Information Management Systems* constituyen una ayuda inestimable en los procesos de gestión, y específicamente *NevisLIMS* que, por sus características diferenciales con respecto a otros sistemas, supone un valor añadido en el control de los procesos de los laboratorios agroalimentarios.

El tándem formado por los sistemas de gestión de la calidad según UNE-EN ISO/IEC 17025 y *NevisLIMS* pone al servicio de los laboratorios una potente herramienta de mejora y competitividad.

BIBLIOGRAFÍA

Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

CGA-ENAC-LEC Rev. Criterios generales de acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración.

Documentación técnica *NevisLIMS*.



EDITORIAL