

9 CIBIA

Congreso Iberoamericano
de Ingeniería de Alimentos

Valencia (España)

13 - 16 enero 2014

Libro de Actas

Vol. 2

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. 2

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

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

- 102 ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA DEL ALGA *BIFURCARIA BIFURCATA* A DIFERENTES TEMPERATURAS 19
S. Arufe, M. Sánchez, F. Chenlo, J. Sineiro, R. Moreira
- 103 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURAS DE TRANSICIONES ENDOTÉRMICAS DE POLÍMEROS DE ALMIDÓN Y COMPLEJOS AMILOSA-LÍPIDO EN MASAS DE CASTAÑA MEDIANTE DMA 27
B. Rama, S. Arufe, M.D. Torres, F. Chenlo, R. Moreira
- 104 COMPORTAMIENTO DE AMASADO Y PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE MASAS DE HARINA DE CASTAÑAS SECADAS EN DIFERENTES CONDICIONES..... 35
B. Rama, S. Arufe, M.D. Torres, F. Chenlo, R. Moreira
- 105 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DENSIDAD DE CARGA EN LA CINÉTICA DE SECADO DE CASTAÑA Y EN PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE SUS HARINAS..... 44
B. Rama, S. Arufe, M.D. Torres, F. Chenlo, R. Moreira
- 106 DISEÑO DE PELICULAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PARA LA INDUSTRIA HORTOFRUTICOLA. 52
R.L. Abarca, B.A. Mellado, F.J. Rodríguez, M.J. Galotto, A. Guarda, B.G. Defilippi, S.A Soto.
- 107 DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE OCRATOXINA A..... 59
A. Ibarz, J. Bochenko, V. Falguera, J. Pagán, S. Garza y A. Garvín
- 109 MODELIZACION DE LA MIGRACION ESPECIFICA DE BPA DESDE FILMS DE POLICARBONATO 65
M.J.Galotto, C. Ramirez, G. Guerrero, A. Torres, J. Romero, A. Guarda
- 110 DESARROLLO DE UN FILM ANTIMICROBIANO FRENTE BOTRYTIS OBTENIDO POR IMPREGNACION CON CO₂ SUPERCRITICO. 73
Guarda, A. Torres, A. López, J. Romero, M.J. Galotto
- 113 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL RECOCIDO Y CICLOS DE CALENTAMIENTO-ENFRIAMIENTO SOBRE LA ESTRUCTURA DE HIELOS DE SOLUCIONES DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES 80
C. Robles, F.L. Moreno, M.X. Quintanilla, Y. Ruiz

- 114 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES COM PODER PREBIÓTICO A PARTIR DE RESÍDUO INDUSTRIAL DE ALCACHOFRA 88
Mariana T. C. Machado, Kaliana S. Eça, Florência C. Menegalli, Miriam D. Hubinger
- 115 ESTUDO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES ÁGUA EM ÓLEO FORMADAS POR SOLUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO E MISTURAS DE ÓLEO DE SOJA TOTALMENTE HIDROGENADO COM ÓLEO DE SOJA 96
 L.Consoli, M. T. C. Machado, M.D.Hubinger
- 116 APLICAÇÃO DA TÉCNICA SPRAY CHILLING PARA MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO COMO COMPOSTO FENÓLICO MODELO 104
 L.Consoli, R. Grimaldi, M. T. C. Machado, M.D.Hubinger
- 117 FILMES DE PECTINA ADITIVADOS DE EXTRATOS DE FRUTAS 112
Kaliana S. Eça, Mariana T. C. Machado, Miriam D. Hubinger, Florência C. Menegalli
- 118 DIGESTIBILIDAD DE EMULSIONES DEL TIPO ACEITE EN AGUA ELABORADAS POR HOMOGENIZACIÓN A ULTRA ALTA PRESIÓN: CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN BIOACCESIBLE DE ÁCIDOS GRASOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN 120
 J. Sánchez, C. Fernández-Ávila, B. Juan, A.J. Trujillo
- 120 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS SÃO ADEQUADOS PARA EXTRAÇÃO DE BIXINA DE URUCUM 128
 Guilherme P. Almeida, Lizzy P. Alcântara, Valéria P. R. Minim; Luis A. Minim
- 121 PELICULAS BI-CAPA CON ACTIVIDAD INSECTICIDA FRENTE A *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) 135
Arancibia, M., Rabossi, A, Bochicchio, P.A, Moreno, S, López-Caballero, M.E, Gómez-Guillén, M.C, Montero, P.
- 122 CONTROL ANTI-FÚNGICO EN PLÁTANO (*MUSA ACUMINATA*) MEDIANTE PELÍCULAS ACTIVAS..... 141
Arancibia, M., López-Caballero, M.E,Gómez-Guillén, M.C, Montero, P.
- 123 APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A PARTIR DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS EN EL DESARROLLO Y CONSERVACION DE PRODUCTOS..... 146
Arancibia, M., Alemán, A, González, F, López-Caballero, M.E, Gómez-Guillén, M.C, Montero, P.
- 124 DESARROLLO DE PELICULAS ACTIVAS A PARTIR DE RESIDUOS DE LANGOSTINO (*PENAEUS VANNAMEI*)..... 153
Arancibia, M., Alemán, A, López-Caballero, M.E,Gómez-Guillén, M.C, Montero, P.

- 125 EXTRACCIÓN SUPERCÉRICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS DESDE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE CONTACTORES DE MEMBRANA: EFECTO DE LAS VARIABLES OPERACIONALES Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA. 159
W.E. Silva, E.X. Morales, Mendoza, M. Cotoras, J.R. Romero
- 126 EFECTO DE LA COCCIÓN Y EL ESTADO DE MADUREZ SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOS EN VARIEDADES DE PLÁTANO..... 168
Jhon Larry Moreno, Moralba Domínguez, Jorge Luis Luna, Dominique Dufour
- 129 BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE 10 VARIEDADES DE NOGAL..... 180
 Fernando Figueroa, Javier Marhuenda, Begoña Cerdá, Pilar Zafrilla, Juana Mulero.
- 130 EFECTO DE LA BIODISPONIBILIDAD “IN VITRO” EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES FRUTOS ROJOS 188
 Pilar Zafrilla, Javier Marhuenda , M^a Dolores Alemán, Alfonso Perez, Gabriel Caravaca, Fernando Figueroa, Juana Mulero
- 131 EFECTO DE LA BIODISPONIBILIDAD “IN VITRO” EN LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES Y ANTOCIANOS DE DIFERENTES FRUTOS ROJOS 194
 Pilar Zafrilla, Javier Marhuenda, M^a Dolores Alemán, Alfonso Perez, Gabriel Caravaca, Fernando Figueroa, Juana Mulero
- 132 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICAS EN LA CONCENTRACIÓN EN FENOLES TOTALES DE 10 VARIEDADES DE NOGAL 202
 Fernando Figueroa, Javier Marhuenda, Begoña Cerdá, Pilar Zafrilla, Juana Mulero.
- 133 EVALUACIÓN DE SACIEDAD Y ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE UNA BARRA ALIMENTICIA ADICIONADA DE β -GLUCANOS Y GLUCOMANANO ORIENTADA A CONSUMIDORES ESCOLARES 207
 Ximena López, Juan P. Vivanco, Danilo Segovia, Paula Berríos, Nataly Espinoza, Marcela Alviña
- 134 INCORPORACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES CHILENOS EN MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES PARA EL ENVASADO ACTIVO DE ALIMENTOS 216
López de Dicastillo, Carol; Galotto, Maria José; Torres, Alejandra; Guarda, Abel
- 137 HARINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* W.) Y SU INFLUENCIA SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS Y FÍSICOQUÍMICAS EN PANETÓN 224
 Beatriz Valcárcel Yamani, Suzana Caetano Da Silva Lannes

- 138 CHOCOLATE COM BENEFÍCIOS NUTRICIONAIS COMPLEMENTARES: AVALIAÇÃO DE FLUXO 231
 Vanessa Matsumura, Orquídea Vasconcelos dos Santos, Suzana Caetano da Silva Lannes
- 140 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A BIOACESSIBILIDADE DE FERRO E ZINCO EM FEIJÃO-CAUPI 239
 Elenilda de Jesus Pereira; Lucia Maria Jaeger de Carvalho; Daniela Soares Viana; Joyce Tavares Miranda; Roberto Eugênio Pereira Figueiredo; Sidinéa Cordeiro de Freitas; José Luiz Viana de Carvalho; Juliana de Oliveira Santos; Epaminondas Silva Simas; Maurisrael de Moura Rocha; Kaesel Jackson Damasceno e Silva
- 141 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO USO DE ENZIMAS COMERCIAIS NA CLARIFICAÇÃO DE POLPA DE CAGAITA (*EUGENIA DYSENTERICA* DC.). 246
 Flávio de Souza Neves Cardoso, Lucia Maria Jaeger de Carvalho, Monica Freiman de Souza Ramos, Maria Gabriela Bello Koblitz, Gisela Maria Dellamora Ortiz
- 142 CAROTENOIDES EM *TALINUM PANICULATUM* CRUA E COZIDA POR IMERSÃO EM ÁGUA E REFOGADA..... 255
 Déborah Alves Gondim, Patrícia Barros Gomes, Pedro Henrique Fernandes do Monte, Guilherme Silva Cruz, Ana Claudia de Macedo Vieira, Lucia Maria Jaeger de Carvalho
- 143 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM GÉIS DE AÇAÍ..... 260
Lucia Maria Jaeger de Carvalho, Amanda Soares Pinto, Juliana Alves da Silva, Pedro Henrique Fernandes do Monte, Roberto Eugenio Pereira Figueiredo, Daniele Osório Pacheco, Jacqueline Carvalho-Peixoto, Mirian Moura e Mônica Freiman de Souza Ramos.
- 144 INTEGRACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CRIOCONCENTRACIÓN EN PLACA Y BLOQUE APLICADAS A SOLUCIONES DE SACAROSA 266
Moreno F. L., Raventos M., Hernández E., Golfo R., Robles C., Ruiz Y.
- 145 COMPARATIVA TÉCNICA, ENERGÉTICA Y ECONÓMICA DE TRES SISTEMAS DE CONCENTRACIÓN EN UNA INDUSTRIA DE ZUMOS: CASO ESTUDIO 273
 Moreno F. L., Raventos M., Hernández E., Golfo R. y Ruiz Y.
- 146 MODELO CONCEPTUAL DE LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES EN MUESTRAS DE ZANAHORIA 278
 Angiorama, Marina, Roda, Fernando, Patti, Miguel, Salvia, Romina, Ybalo, Carolina Y Lima, Julio
- 147 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP. EM CORTES DE FRANGOS PROCEDENTES DO MAIOR EXPORTADOR MUNDIAL DE CARNE DE AVES – BRASIL..... 284
 Brizio, A.P.D.R; Fagundes, G. A

- 150 MODELAMIENTO POR LÓGICA DIFUSA DE LA PREFERENCIA Y ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE CORAZONES DE ALCAHOFA (*Cynara scolymus* L.) MARINADAS EN CONSERVA 288
Víctor Vásquez-Villalobos, Julia Vásquez Angulo, Eduardo Méndez Reyna
- 157 DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA COMO BIOFUNGICIDAS PARA O CONTROLE DOS FUNGOS *ASPERGILLUS FLAVUS* E *ASPERGILLUS PARASITICUS*. 296
Vera Aparecida de Oliveira Tiera, Juliana do Santos Gabriel, Ricchard Hallan Viegas de Souza, Marcio José Tiera, Mirelle Takaki, Amanda Manchini Dias
- 158 OBTENCIÓN DE NUEVOS TIPOS DE MELÓN CHARENTAIS PARA EL MERCADO MEDIANTE EL DESARROLLO DE LÍNEAS DE INTROGRESIÓN..... 304
C. Esteras, C. Roig, A.Monforte,B. Picó
- 159 EL AROMA DEL MELÓN: NUEVAS ESTRATEGIAS DE MEJORA DE LA CALIDAD..... 312
 Picó, B.; Esteras, C.; Ruiz, JJ.; Ruiz-Beviá, F.
- 161 INFLUENCIA DE ULTRASONIDOS Y MICROONDAS EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN INFUSIONES DE HOJA DE ESTEVIA..... 319
 Ángela Periche, Marisa Castelló, Ana Heredia, Isabel Escriche, Ana Andrés
- 162 CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DULCES SALUDABLES FORMULADAS CON ISOMALTULOSA Y OLIGOFRACTOSA..... 326
 Ángela Periche, Marisa Castelló, Ana Heredia, Eva Doménech, Isabel Escriche, Ana Andrés
- 163 EFECTO DEL MATERIAL DE ENVASADO EN LA HUMEDAD, ACTIVIDAD DE AGUA, COLOR Y TEXTURA DE ESPUMAS DULCES SALUDABLES FORMULADAS CON ISOMALTULOSA Y OLIGOFRACTOSA..... 334
 Ángela Periche, Marisa Castelló, Ana Heredia, Isabel Escriche, Ana Andrés
- 164 EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE SALVADO DE ARROZ EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y MICROESTRUCTURALES DE FILMS BIODEGRADABLES BASADOS EN DIFERENTES ALMIDONES 341
Cano, A., Jiménez, A.,Cháfer, M., Chiralt, A., González, C.
- 165 APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES EN QUESO TRONCHÓN: EFECTO ANTIFÚNGICO Y CALIDAD SENSORIAL..... 351
Cano, A. ,Cháfer, M., Chiralt, A., Molina, P., Santamarina, P., Borrás, M., Beltran, M.C., Rosello, J., González, C.
- 166 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE RECHEIOS PREPARADOS COM POLPA DE MURICI (*Byrsonima verbascifolia*, Rich)..... 361
 Alline Aurea do Amaral, Suzana Caetano da Silva Lannes

- 169 EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS POST-COSECHA (ESCALDADO Y SONICACIÓN) SOBRE LOS PARÁMETROS DE COLOR Y COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN FRUTOS DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICON L.*)..... 370
 Jurado- Soto G, Ochoa-Velasco C, Luna-Guevara, J.J, Ruiz-López I, Hernández-Carranza P, Luna-Guevara, M. L
- 170 EFEITO DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM DE POTÊNCIA NA SALGA ÚMIDA DE CARNE BOVINA..... 377
 Gisandro Reis de Carvalho, Javier Telis-Romero
- 172 PREPARACIÓN DE PRODUCTOS ENRIQUECIDOS EN GLUCOSILDIANHIDRIDOS DE FRUCTOSA (GLUCOSIL-DAFS) POR CAMELIZACIÓN DE PALATINOSA® 385
Loyda Atencio-Genes, Elena Suárez-Pereira, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández
- 173 HIDROLISADOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE COM ALCALASE LIVRE E IMOBILIZADA: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO .392
 Pessato, T. B.; Tavano, O. L.; Netto, F. M.
- 175 DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE PECTINMETILESTERASA 400
A. Ibarz, V. Falguera y A. Garvín
- 180 EFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIOXIDANTE POR EL USO COMBINADO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y STEVIA REBAUDIANA..... 406
 Criado, M.N., Belda-Galbis, C.M., Martínez, A., Rodrigo, D
- 181 EVALUACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD Y EL COSTE DE LOS ALIMENTOS SIN GLUTEN 412
 Salvo, C., Carbonell-Capella, J. M., Esteve M. J., Frígola, A.
- 182 COMPUESTOS FENÓLICOS EN DIFERENTES PRODUCTOS DERIVADOS DE *STEVIA REBAUDIANA* 419
Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Esteve M. J., Frígola, A
- 183 RESGATE DA DIETA MEDITERÂNEA EM RESTAURANTES 425
 Lessa, K.,Carbonell-Capella, J. M. Esteve M. J., Frígola, A.
- 184 SEPARATION AND QUANTIFICATION OF STEVIOL GLYCOSIDE IN DIFFERENT STEVIA SAMPLES USING HPLC..... 434
 Buniowska, M., Carbonell-Capella, J., Znamirowska, A., Esteve, M.J., Frigola, A.
- 186 SEPARACIÓN DE BUTANOL A PARTIR DE MEZCLAS ABE MEDIANTE PERVAPORACIÓN CON GAS DE ARRASTRE UTILIZANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS IÓNICAS SOPORTADAS ESTABILIZADAS POR GELIFICACIÓN..... 438
Plaza, A., Merlet, G., Romero, J.

- 187 EFECTOS DE LAS CONDICIONES FLUIDODINÁMICAS Y DE LA HIDROFOBICIDAD EN LA EXTRACCIÓN CON MEMBRANAS UTILIZANDO GAS DENSO 445
Plaza, A., Cabezas, R., Romero, J.
- 188 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BIOCONSERVANTES COMERCIALES EN LA VIDA DE ÚTIL DE YOGURT ALTERADO CON *Candida intermedia* Y *Mucor Circinelloides*. 452
María Ximena Quintanilla-Carvajal , J. M. Rodríguez-Bernal , Johanna Serna-Jiménez, María Angélica Uribe-Bohorquez, Juanita Cardona-Gómez y Bernadette Klotz-Cerebrío.
- 189 CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA DE PULPA DE BOROJÓ (*Borojoa Patinoi* Cuatrecasas) MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA A DIFERENTES ACTIVIDADES DE AGUA (a_w)..... 459
Rodríguez-Bernal, J. M., Perea-Flores, M. J., Flores- Andrade, E., Gutiérrez-López , G., y Quintanilla-Carvajal, M. X.
- 190 EFECTO DE LA FUENTE DE HIERRO SOBRE EL COLOR DE HARINA DE BANANO FORTIFICADO SECADO POR ESTUFA..... 465
Oscar E. Romo C., Gustavo Adolfo Camelo-Méndez, María Ximena Quintanilla-Carvajal
- 191 EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE MMT EN LA ABSORCIÓN DE HUMEDAD Y EN LA PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA DE PELÍCULAS DE HARINA DE ARROZ Y HARINA DE PLÁTANO. 471
Rodríguez-Marín, M.L., González-Soto, R.A., Bello-Pérez, L.A.
- 192 PELÍCULAS DE ALMIDÓN DE PAPA DOBLEMENTE MODIFICADO: EVALUACIÓN REOLÓGICA DE LAS SOLUCIONES FILMOGÉNICAS Y SUS PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE BARRERA. 476
González-Soto, Rosalía A., Núñez-Santiago, Carmen, Gutiérrez-Meráz, Felipe y Bello-Pérez, Luis A.
- 194 INACTIVACIÓN Y DAÑO SUBLETAL DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE ALTAS PRESIONES HIDRÓSTATICAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE *STEVIA* 481
C. M. Belda-Galbis, M. Sanz-Puig, A. Martínez, D. Rodrigo
- 195 DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES A BASE DE RECORTES DE PAVO Y POLLO..... 487
Carlos Fraguela, Indira Franco, Anya Fernández, Hania Muñoz
- 196 USO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICO E NO TÉRMICO (ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA) PARA LA INACTIVACIÓN DE ENZIMAS BACTERIANAS METALOPROTEASAS PRESENTES EN LA DEGRADACIÓN DE LECHE 497
Pinto Junior, W. R, Pereira, P.R., Silva, J. M, Del Aguila, E. M., Silva, J. T, Paschoalin, V. M. F And Rosenthal, A.

- 197 EVALUACIÓN DE SOYA GENETICAMENTE MODIFICADA POR Q-PCR EN EL PROCESAMIENTO DE LECHE DE SOYA 505
 Matos, A., Torrezan, R., Del Aguila, E.M., Oliveira, E.M.M. e Paschoalin, V.M.F.
- 198 REUTILIZACIÓN DE RESÍDUO DE SOYA (*Glycine max*) COMO FUENTE DE PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) 512
 Cyntia S. Freitas; Patrícia R. Pereira; Eduardo M. Del Aguila; Vânia M. F. Paschoalin; Joab T. Silva
- 202 AVALIAÇÃO DO TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SORO DE TOFU CONCENTRADO POR CRIOCONCENTRAÇÃO 518
 MSc. Silvia Benedetti; Eng.Lara Alexandre Fogaça; Dra.Elane Schwinden Prudêncio; MSc. José Marcos Gontijo Mandarino; Quim. Rodrigo Santos Leite; Dr.José Carlos Cunha Petrus
- 203 USO DE MEMBRANAS CERÂMICAS MICROPOROSAS NA EMULSIFICAÇÃO ÓLEO/ÁGUA 526
 Eng. Vanessa Zanatta; Eng. Frederico Marques Penha; Eng. Guilherme Zin; Dr. Marco Di Luccio; Dr. José Carlos Cunha Petrus
- 204 EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN COLOR-COMPOSICIÓN EN CULTIVARES DE JAMAICA MEDIANTE TÉCNICAS DE VISIÓN ARTIFICIAL..... 534
 Camelo-Méndez GA, Quintanilla-Carvajal M.X., Vanegas-Espinoza PE, Heredia FJ, Del Villar-Martínez AA
- 207 INFLUENCIA DE LA DESHIDRATACIÓN EN LA CALIDAD DE DIFERENTES VARIEDADES DE PIMIENTO. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO..... 540
Casa, Francisco; Acurio, Liliana; Igual, Marta; Martínez-Navarrete, Nuria; Camacho, María del Mar
- 208 SECAGEM DE FEIJÃO CARIOCA EM SECADOR ROTATIVO 549
 William Borges Dias, Gustavo Araújo Teixeira, José Roberto Delalibera Finzer
- 209 EFECTO DE DIFERENTES PROCESOS DE SECADO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN LA PULPA DE COPOAZÚ (*Theobroma grandiflorum*) 557
 Lina Guio, Daniel Duarte, Liz Muriel Piragauta, María Ximena Quintanilla y Luis Eduardo Díaz
- 210 VALORIZACIÓN DE UN SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA PESQUERA PARA LA FABRICACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE 562
 Joaquín Gómez-Estaca, Pilar Montero y M. Carmen Gómez-Guillén

- 211 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HIDROLASA DE SALES BILIARES EN ESPECIES DE *L. FERMENTUM* COMO POTENCIAL HIPOCOLESTEROLÉMICO 570
Stephania Aragón Rojas, Luis Eduardo Díaz, María Clementina Cueto Vigil
- 212 EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE EL CONTENIDO DE BETACAROTENO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, Y COLOR DE LA PULPA DE UCHUVA (*PHYSALIS PERUVIANA* L.)..... 577
Jéssica López, Antonio Vega-Gálvez, María José Torres-Ossandón, Margarita Miranda M., María José Galotto, Puente-Díaz, L.
- 213 ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE MIGRACION DE TIMOL DESDE NANOCOMPOSITOS DE PELBD UTILIZADOS COMO ENVASES PARA ALIMENTOS 586
A. Torres, M. Ríos, M.J. Galotto, A. Guarda

CIBIA9

Actas Comunicaciones

ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA DEL ALGA *BIFURCARIA BIFURCATA* A DIFERENTES TEMPERATURAS

S. Arufe, M. Sánchez, F. Chenlo, J. Sineiro, R. Moreira

Departamento de Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela, Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n, E-15782 Santiago de Compostela, España.

INTRODUCCIÓN

Las algas pardas son utilizadas en Occidente como materias primas para la obtención de alginatos, fucoidanos y otros productos. Estos polisacáridos centran la atención de diversos campos de investigación para desarrollar nuevos medicamentos (Jiang et al., 2011). Las algas poseen altos contenidos de polisacáridos, proteínas y minerales (Rupérez y Saura-Calixto, 2001). De hecho, son alimentos tradicionales en países orientales (especialmente Japón, Corea y China). Su consumo directo en todo el mundo está incrementándose en los últimos años así como su empleo como materias primas de componentes de alimentos funcionales por sus propiedades nutricionales (Shahidi, 2009).

Las algas frescas poseen una alta actividad de agua por lo que son productos altamente perecederos. La conservación de las algas por medio de la reducción de la actividad de agua mediante métodos forzados (habitualmente se realiza por convección natural solar) está sin estudiar suficientemente requiriéndose, por ello, el conocimiento de las condiciones de equilibrio higroscópico. Estos datos de equilibrio (aquellos relacionados con procesos de desorción de agua) son necesarios para la determinación de puntos de finalización de procesos de deshidratación (Moreira et al., 2008). Por otra parte, es también de interés la determinación de las isothermas de adsorción de agua con el fin de evaluar las humedades de equilibrio que alcanza un alimento previamente deshidratado en un ambiente de almacenamiento más húmedo y para determinar cambios químico-estructurales en la matriz del producto por el procesado (Torres et al., 2012).

En este trabajo se estudian las propiedades de equilibrio higrométrico del alga perenne *Bifurcaria bifurcata* que es abundante en la costa atlántica europea, particularmente en Galicia, y que es una potencial fuente de alto interés de componentes funcionales y atractivas características nutricionales (Gómez-Ordóñez, 2010). Así, los objetivos son la determinación de las isothermas de desorción y adsorción de agua a diferentes temperaturas y la aplicación de modelos matemáticos propuestos en la literatura para la correlación de los datos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento

Las muestras utilizadas en los ensayos, algas de la especie *Bifurcaria bifurcata* fueron suministradas por la cofradía de pescadores de Corcubión (A Coruña, España) en julio de 2013. Las algas fueron en primer lugar lavadas con abundante agua para eliminar arenas y posibles organismos adheridos. Para los experimentos de desorción de agua las algas se cortaron en cilindros de menos de 30 mm de longitud. Las muestras para los ensayos de adsorción de agua se obtuvieron después de un secado convectivo con aire caliente empleando una estufa a 40°C durante 5 días hasta peso constante. El contenido de humedad inicial de las algas frescas y deshidratadas fue, respectivamente, de $0,84 \pm 0,05$ y $0,07 \pm 0,03$ kg de agua/kg base húmeda) determinado a partir del sólido seco de las muestras que se obtuvo después de secar a 70°C y 10 kPa en una estufa de vacío (Heraeus vacutherm VT6025) (AOAC, 1995) hasta peso constante.

Las muestras (aprox. 1 g para desorción y 0,5 g para adsorción) se introdujeron en diferentes frascos cerrados con atmósferas de humedad relativa constante generadas por disoluciones saturadas de sales. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada sal empleada (LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NH₄NO₃, NaCl y KCl). El conjunto de disoluciones de sales utilizadas barrió el intervalo de actividad de agua en un amplio rango (0,10 a 0,93). Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes temperaturas (5, 25, 40 y 55°C) introduciendo los sistemas en diferentes cámaras climatizadas (5, 25 °C, $\pm 1^\circ\text{C}$) o en estufas (40 y 55°C, $\pm 0,5^\circ\text{C}$) cubriendo, de este modo, el rango habitualmente utilizado en las operaciones de almacenamiento y de secado de alimentos. Con el fin de evitar la pudrición de las muestras a actividades de agua superiores a 0,7 se introdujeron pequeñas cantidades de fungicida (timol). Las muestras se pesaron (balanza Denver SI234, precisión $\pm 0,0001$ g) semanalmente hasta lograr variaciones inferiores a $\pm 0,0005$ g, momento en el que se consideró alcanzado el equilibrio higrométrico. La humedad final de equilibrio se determinó mediante el método gravimétrico ya mencionado (AOAC, 1995).

Modelización matemática

Los modelos para la correlación de los datos experimentales del equilibrio (contenido de humedad, X_e (kg agua/kg sólido seco (s.s.))-actividad de agua, a_w (-)) que conforman las isothermas de sorción de agua fueron de 2 parámetros, concretamente, el modelo BET (Brunauer et al., 1938) (en el rango de a_w de 0,1 a 0,5), Ec. (1), y el modelo de Halsey (Halsey, 1948) (en todo el rango experimental de a_w), Ec. (2).

$$X_e = \frac{X_m C a_w}{(1 - a_w)(1 + (C - 1) a_w)} \quad (1)$$

$$X_e = \left(\frac{-A}{T \ln a_w} \right)^{\left(\frac{1}{B} \right)} \quad (2)$$

donde X_m (humedad de monocapa, kg agua/(kg s.s.) y C (-) son los parámetros de ajuste del modelo BET y A ((kg agua K/(kg s.s.)) y B (-) los correspondientes al modelo de Halsey y T (K) la temperatura.

La evaluación de los parámetros de los modelos empleados se ha llevado a cabo mediante análisis de regresión de mínimos cuadrados empleando el programa informático TablecurveTM, AISN Software. La calidad del ajuste fue determinada mediante el análisis del correspondiente coeficiente de correlación (r^2), el error cuadrático de la media (SSE), Ec. (3), y la raíz del error cuadrático medio (RMSE), Ec. (4).

$$SSE = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{ei} - X_{ci})^2}{N} \quad (3)$$

$$RMSE = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (X_{ei} - X_{ci})^2}{N} \right]^{0,5} \quad (4)$$

donde X_{ei} y X_{ci} son las humedades de equilibrio experimentales y calculadas a través del modelo y N el número de datos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1 y 2 muestran los datos experimentales de equilibrio contenido de humedad frente a la actividad de agua, para los procesos de desorción y adsorción de agua del alga *Bifurcaria bifurcata*, respectivamente. En ambas figuras se puede ver que la humedad de equilibrio aumenta, a cada temperatura constante, al aumentar la actividad de agua. Este aumento es particularmente relevante a actividades de agua superiores a 0,5. Este comportamiento de las isothermas de sorción corresponde al tipo III de la clasificación de Brunauer (Brunauer, 1945).

En relación al efecto de la temperatura se pueden observar dos tramos diferenciados según la actividad de agua. A valores inferiores a 0,55-0,65 las humedades de equilibrio disminuyen al aumentar la temperatura y este comportamiento se invierte en el rango de actividades de agua superiores provocando el cruce de los valores de humedad de equilibrio. Este comportamiento ya ha sido descrito en la literatura para diversos alimentos con altos contenidos de polisacáridos y es causado por la solubilización de estos componentes en presencia de alta humedad (Moreira et al., 2009). Particularmente, estos resultados fueron observados por otros autores que estudiaron otras algas *Gelidium* (Ait Mohamed, 2005) y *Gracilaria* (Lemus et al., 2008).

Los ensayos de adsorción-desorción a la misma temperatura permitieron la determinación experimental de ciclos de histéresis. En el rango de actividades de agua inferiores a 0,5 no se apreciaron significativas diferencias entre los datos de equilibrio de adsorción-desorción dando como resultado la ausencia de ciclo. En el rango de actividades de agua elevadas y a temperaturas superiores a 40°C se observó que los contenidos de humedad fueron más elevados para el equilibrio de adsorción que de desorción. A 25°C no se observaron diferencias significativas entre isothermas de sorción y a 5°C, el comportamiento se invirtió. La causa de las diferentes características de los ciclos de histéresis está ligada a la solubilización de los polisacáridos en agua dependiente de la temperatura y por cambios estructurales promovidos térmicamente.

Las isothermas de sorción, en el rango de actividades de agua de 0,1 a 0,5, se modelizaron mediante el modelo de BET, Figs. 1 y 2. Los parámetros se muestran en la Tabla 1 junto con los parámetros estadísticos que indican una satisfactoria calidad de ajuste ($r^2 > 0,96$, $SSE < 18,8 \cdot 10^{-5}$ y $RMSE < 0,013$). En este rango de actividad de agua, atendiendo al valor del parámetro C (> 1), las isothermas de sorción son de tipo II según la clasificación de Brunauer. La humedad de la monocapa, X_m , disminuyó linealmente con la temperatura (desde 0,07 a 0,03 kg agua/(kg s.s.)) para adsorción y desorción. Considerando X_m como el contenido de humedad óptimo que minimiza los procesos de deterioro del alimento, una humedad relativa de 20% es adecuada para el almacenamiento a 5°C y aumenta a 40% a 25°C. Tal y como se comentó, la ausencia de ciclos de histéresis a bajas actividades de agua provoca que las condiciones de almacenamiento de muestras tras procesos de desorción o de adsorción sean similares.

Las isothermas de sorción, en todo el rango de actividades de agua ensayado se modelizaron con el modelo de Halsey, Figs. 1 y 2. Los parámetros del modelo se muestran en la Tabla 2 junto con los parámetros estadísticos que indican una aceptable calidad de ajuste (r^2

> 0,96, SSE < 273,5 10⁻⁵ y RMSE < 0,052). Los parámetros del modelo de Halsey para las isothermas de desorción y de adsorción variaron del mismo modo con la temperatura; el parámetro A disminuyó y el parámetro 1/B aumentó. Se puede observar que este último parámetro mostró una dependencia similar para las isothermas de adsorción y desorción de agua.

Con el fin de generar un modelo válido para todo el rango de actividades de agua y de temperaturas de ensayo para los equilibrios de adsorción y desorción, se correlacionaron los parámetros del modelo de Halsey con la temperatura dando lugar a un modelo de 4 parámetros, Ec. (5):

$$X_e = \left(\frac{-\left(E + \frac{F}{(T - 273.1)} \right)}{T \ln a_w} \right)^{(G+H(T-273.1))} \quad (5)$$

donde E (kg agua K/kg s.s.), F (kg agua K²/kg s.s.), G (-) y H (K⁻¹) son los parámetros de ajuste que se recogen en la Tabla 3. Los parámetros estadísticos (r² > 0,92, SSE < 0,011 y RMSE < 0,111) se pueden considerar aceptables teniendo en cuenta la utilidad de la ecuación para estimar conjuntamente datos de equilibrio para cualquier temperatura y actividad de agua en el intervalo estudiado.

CONCLUSIONES

Las isothermas de adsorción y desorción del alga *Bifurcaria bifurcata* mostraron características en todo el rango de actividades de agua ensayado correspondientes al tipo III. Al aumentar la temperatura, a actividades de agua intermedias (0,55-0,65) se cruzan las isothermas de sorción provocado por la solubilización de los polisacáridos. Este fenómeno dio lugar a la aparición de ciclos de histéresis dependientes de la temperatura. El modelo BET, aplicado a actividades de agua inferiores a 0,5 permitió la determinación de la humedad de la monocapa que disminuyó linealmente con la temperatura desde 0,07 a 0,03 kg agua/(kg s.s.). El modelo de Halsey modelizó satisfactoriamente los resultados experimentales y la correlación de sus parámetros con la temperatura permitió el establecimiento de un modelo de estimación de la humedad de equilibrio en función de la temperatura y de la actividad de agua conjuntamente.

BIBLIOGRAFÍA

Ait Mohamed, L., Kouhila, M., Lahsasni, S., Jamali, A., Idliman, A., Rhazi, M., Aghfir, M., Mahrouz, M. (2005). Equilibrium moisture content and heat of sorption of *Gelidium sesquipedale*. J. Stored Prod. Res., 41, 199-209.

AOAC (1995), *Official Methods of Analysis*, 16th edition; Association of Official Analytical Chemists, 37, 1-10.

Brunauer, S. (1945). The adsorption of gases and vapors. Nueva York: Princeton University Press.

Brunauer, S., Emmett, P. H., Teller, E. (1938). Adsorption of gases and liquids in multimolecular layers. J. Amer. Chem. Soc., 60, 309-319.

Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A., Rupérez, P. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. Food Res. Inter., 43, 2289-2293.

Halsey, G. (1948). Physical adsorption on non-uniform surfaces. J. Chem. Phys., 16, 931-937.

Jiang, Z., Okimura, T., Yamaguchi, K., Oda, T. (2011). Nitric Oxide, 25, 407-415.

Lemus, R. A., Pérez, M., Andrés, A., Roco, T., Tello, C. M., Vega, A. (2008). Kinetic study of dehydration and desorption isotherms of red alga *Gracilaria*. LWT- Food Sci. Technol., 41, 1592-1599.

Moreira, R., Chenlo, F., Torres, M. D., Vallejo, N. (2008). Thermodynamic analysis of experimental sorption isotherms of loquat and quince fruits. J. Food Eng., 88, 514-521.

Moreira, R., Chenlo, F., Torres, M. D. (2009). Simplified algorithm for the prediction of water sorption isotherms of fruits, vegetables and legumes based on chemical composition. J. Food Eng., 94, 334-343.

Rupérez, P., Saura-Calixto, F. (2001). Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. Euro. Food Res. Technol., 212, 349-354.

Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. Trends Food Sci. Technol., 20, 376-387.

Torres, M. D., Moreira, R., Chenlo, F., Vázquez M. J. (2012). Water adsorption isotherms of carboxymethyl cellulose, guar, locust bean, tragacanth and xanthan gums. Carboh. Pol., 89, 592-598.

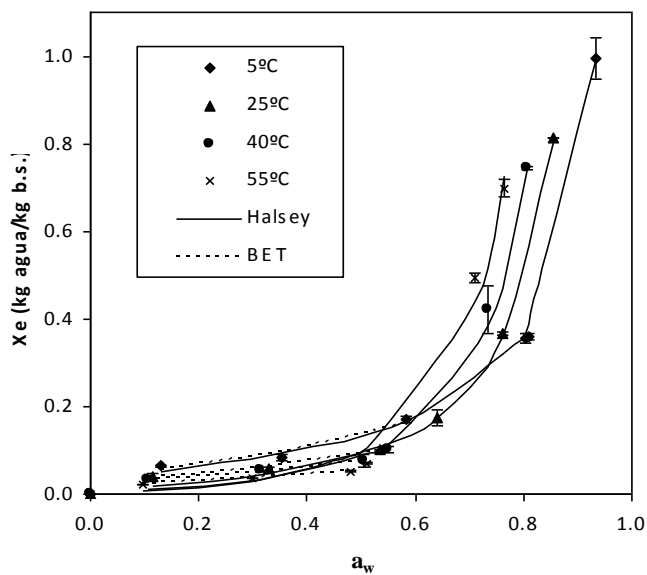


Figura. 1. Isothermas de desorción de agua del alga *Bifurcaria bifurcata* a diferentes temperaturas

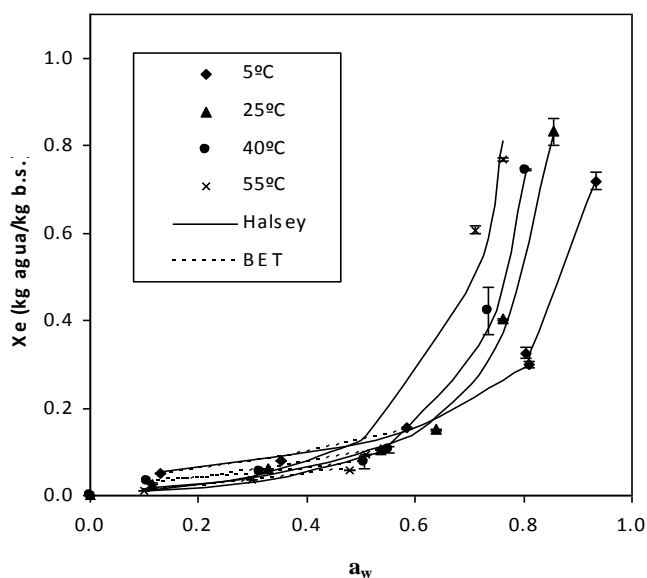


Figura. 2. Isothermas de adsorción de agua del alga *Bifurcaria bifurcata* a diferentes temperaturas

Tabla 1. Parámetros de ajuste del modelo BET, Ec. (1), (a_w 0,1-0,5) y estadísticos para las isotermas de desorción y adsorción de agua a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	X_m (kg agua/kg s.s.)	C (-)	R^2	SSE 10^5	RMSE
Desorción					
5	0,07	13,40	0,96	11,2	0,010
25	0,05	16,59	0,98	2,1	0,005
40	0,04	25,11	0,99	0,2	0,001
55	0,03	15,90	0,99	4,8	0,007
Adsorción					
5	0,07	10,29	0,97	3,4	0,005
25	0,06	5,31	0,99	0,1	0,001
40	0,05	31,82	0,98	1,8	0,004
55	0,04	2,74	0,96	18,8	0,013

Tabla 2. Parámetros de ajuste del modelo Halsey, Ec. (2), y estadísticos para las isotermas de desorción y adsorción de agua a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	A (kg agua K/kg s.s.)	1/B (-)	R^2	SSE 10^5	RMSE
Desorción					
5	3822	0,87	0,99	6,2	0,008
25	958	1,45	0,99	15,4	0,012
40	702	1,84	0,99	45,1	0,021
55	674	2,11	0,97	107,3	0,032
Adsorción					
5	5174	0,76	0,99	15,8	0,013
25	984	1,45	0,99	37,7	0,019
40	1189	1,56	0,98	175,4	0,041
55	836	1,96	0,96	273,5	0,052

Tabla 3. Parámetros de ajuste de la Ec. (5) y estadísticos para las isotermas de desorción y adsorción de agua.

	E (kg agua K/kg s.s.)	F (kg agua K ² /kg s.s.)	G (-)	H (K ⁻¹)	R^2	SSE	RMSE
Desorción	192	24083	0,753	0,024	0,94	0,007	0,082
Adsorción	379	17936	0,753	0,024	0,92	0,011	0,111

DETERMINACIÓN DE TEMPERATURAS DE TRANSICIONES ENDOTÉRMICAS DE POLÍMEROS DE ALMIDÓN Y COMPLEJOS AMILOSA-LÍPIDO EN MASAS DE CASTAÑA MEDIANTE DMA

B. Rama, S. Arufe, M.D. Torres, F. Chenlo, R. Moreira

Departamento de Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela,
Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n, E-15782 Santiago de Compostela, España.

INTRODUCCIÓN

El almidón, principal componente de la castaña, es un compuesto heterogéneo constituido principalmente por amilosa y amilopectina. La gelatinización del almidón, los procesos experimentados por sus polímeros constituyentes así como otros fenómenos relacionados afectan al comportamiento reológico-mecánico de las masas de harina de castaña durante el procesado y a la calidad del producto final de panificación.

Existen numerosas referencias bibliográficas en donde, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), se determinan temperaturas de transiciones endotérmicas de polímeros y complejos relacionados con el almidón (Russel, 1987, Liu *et al.*, 2006,). Estos autores, para sistemas de almidón de maíz, observaron un punto de inflexión, en torno a los 70°C, a altos contenido de humedad (> al 60% en base seca), correspondiente a la gelatinización del almidón. Este punto de inflexión se referencia ampliamente en la bibliografía como pico G (Donovan, 1979, Evans y Haisman, 1982, Russel, 1987). Al disminuir el contenido de agua se observa un segundo pico (pico M₁), próximo a G, asociado a la fusión de los cristales de amilopectina (Russel, 1987). Otro punto, denominado pico M₂, fue detectado para sistemas de almidón de diferente naturaleza en un rango de temperaturas entre 90°C y 130°C (Biliaderis *et al.*, 1985). Dicho pico está relacionado con el contenido de lípidos del sistema ya que desaparece para muestras que no contienen grasas siendo su presencia más acusada en muestras con mayor contenido en este componente (Liu *et al.*, 2006). Para sistemas con más de un 80% de amilosa se observó un cuarto pico, denominado M₃, que fue asociado al proceso de fusión de la amilosa (Liu *et al.*, 2006).

El seguimiento de dichas transiciones de polímeros y complejos relacionados con el almidón puede también llevarse a cabo mediante análisis mecánico dinámico (DMA), aunque su uso no está tan extendido como la técnica DSC, evaluando la tendencia de los valores del módulo de almacenamiento del sistema (G') con la temperatura.

En este trabajo se estudian las diferentes transiciones de polímeros y complejos relacionados con el almidón en masas de harina castaña mediante la técnica DMA realizando

una comparación con estudios previos realizados por otros autores empleando la técnica DSC para otros sistemas de alto contenido en almidón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Castañas (*Castanea Sativa Mill*) obtenidas en un mercado local (Galicia, España) fueron seleccionadas en función de su madurez y tamaño, descascaradas y peladas cuidadosamente y, finalmente, cortadas en cubos de un volumen medio de aproximadamente 6 mm^3 mediante un desintegrador de laboratorio (Waring, Modelo HGBTWT, EEUU).

Las muestras de castaña fueron secadas, en un secadero de aire convectivo (Angelantoni challenge 250, Italia) con una velocidad de aire de 2 m/s y una humedad relativa del 30%, bajo diferentes condiciones de temperatura (45°C, 65°C y 85°C) y densidad de carga de muestra (Baja (BDC), $2,63 \pm 0,26 \text{ kg/m}^2$ y Alta (ADC), $6,13 \pm 0,10 \text{ kg/m}^2$) obteniéndose 6 sistemas de castaña seca (ADC 45, ADC 65, ADC 85, BDC 45, BDC 65 y BDC 85) en función de las condiciones empleadas. Una vez secadas fueron molidas en un molino ultracentrífugo (ZM200 Retsch GmbH, Alemania) con un tamiz interno de 200 μm .

El contenido de almidón total (AT, % g almidón/g harina seca), medido como la cantidad de almidón presente en la harina sin gelatinización previa, y el almidón dañado (AD, % g almidón dañado/g harina) de los sistemas se determinó mediante métodos enzimáticos específicos, AOAC 996.11 (1995) y AACC 76-31.01 (1995), respectivamente.

La preparación de las masas se realizó en una amasadora de laboratorio (Mixolab[®], Chopin Technologies, Francia) siguiendo el protocolo Chopin S (temperatura: 30°C, tiempo: 30 min, velocidad de giro: 80 rpm, consistencia objetivo de la masa: $1,11 \pm 0,07 \text{ Nm}$ (Rosell *et al.*, 2007)) mediante la adición de agua a los diferentes sistemas, determinándose así la absorción de agua.

Los estudios DMA de las masas se llevaron a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado (MCR 301, Anton Paar Physica, Austria) equipado con una cámara de alto rendimiento (CTD 450, Anton Paar Physica, Austria). Se empleó una geometría plato-plato (50 mm, 2 mm de separación, “gap”) en un rango de temperaturas de 30 a 180 °C con una velocidad de calentamiento de 4°C/min bajo una deformación de 0,1% dentro del régimen de viscoelasticidad lineal de las muestras.

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). El test de Fischer se empleó para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se realizó un análisis mediante el test comparativo de Duncan para establecer las diferencias estadísticas entre las medias de cada experimento (IMB SPSS Statistics, IBM, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la temperatura a la que tienen lugar diferentes procesos en las muestras de almidón estudiadas. La temperatura de inicio de gelatinización T_0 varió en un más amplio rango (46,8-62,5°C) que la de finalización, T_1 (73,7-79,5°C), Tabla 1. Las temperaturas más bajas fueron determinadas en el sistema BDC 85. La existencia de diferencias significativas en T_0 y T_1 para sistemas secados a la misma temperatura, indicó que dichos parámetros no son función de la temperatura de secado. Concretamente, el parámetro más influyente en T_0 fue la absorción de agua de las masas. Las masas de castaña elaboradas a partir de castañas secadas a baja densidad de carga de partícula mostraron una relación inversa entre la absorción de agua y la temperatura de inicio de gelatinización de las mismas, Figura 1. Este comportamiento no es tan claro en las masas preparadas a partir de castañas secadas a alta densidad de carga donde existe una mayor heterogeneidad en el contenido de humedad de las muestras.

Las curvas de valores de G' frente a la temperatura durante el barrido térmico para masas de castañas secadas a alta densidad de carga (Figura 2) y baja densidad de carga (Figura 3) mostraron diferentes puntos críticos (P_1 , P_2 , P_3 , P_4 y P_5). De forma cualitativa se observó que los sistemas de castaña ADC 45 y BDC 65 presentaron un cambio de mayor a menor pendiente en el punto P_1 (valores entre 86,1 y 89,6°C, Tabla 1) justo después de la gelatinización (T_1), cambio que no fue observado en el sistema ADC 65, y que fue opuesto en los sistemas BDC 45, ADC 85 y BDC 85. Este resultado relativo al cambio de pendiente de G' puede estar relacionado con la cantidad de almidón dañado, ya que los sistemas ADC 45 y BDC 65 presentaron el menor porcentaje, sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 2). En la Tabla 2 se recogen los contenidos de almidón total y dañado de las muestras. Una menor cantidad de almidón dañado indica que en esos sistemas existen más cristales de amilopectina sin fundir, disponibles para ser hidratados y fundidos al aumentar la temperatura. De este modo, se explica que los valores de G' disminuyan de manera más lenta dando lugar a menores pendientes. Este fenómeno de ralentización en la disminución de G' termina en el punto P_2 (104,9 a 107,6°C) a partir del cual se produce un descenso pronunciado en los valores de G' . Por tanto, en el rango de temperaturas asociadas a los puntos P_1 y P_2 podría tener lugar transiciones asociadas a los cristales de amilopectina por lo que, según lo

comentado anteriormente, se estaría definiendo el rango de temperaturas del pico M_1 observado por otros autores para las muestras de almidón de maíz mediante DSC donde se identifican fusiones no en equilibrio de los cristales (Liu *et al.*, 2006), junto con simultáneamente fenómenos de eliminación de agua de la muestra dado las temperaturas que concierne. Así, este descenso brusco de los valores de G' a partir de P_2 puede estar relacionado con fenómenos de eliminación de agua así como el deslizamiento de la muestra entre los platos (Brouillet Fourmann *et al.*, 2003). Los fenómenos físicos que tienen lugar alrededor del punto P_3 (114,2-117,4 °C) son difícilmente identificables por este método debido a dicho deslizamiento.

El aumento de los valores de G' a partir de 115 °C podría ser explicado teniendo en cuenta que el sistema ya ha sufrido profundas transformaciones, su contenido en agua es sensiblemente inferior y el deslizamiento de los platos ya no tiene lugar.

En torno a los 127 °C se encuentra el punto P_4 (Tabla 1). Diferentes autores mediante estudios de DSC (Shogren, 1992, Ciesla y Eliasson, 2007) determinaron, en ese mismo rango de temperaturas y para sistemas con hidrataciones iniciales semejantes a las empleadas en este trabajo (46-68% en base harina), el denominado pico M_2 asociado a la fusión de complejos amilosa-lípido.

El punto P_5 se encuentra en un rango de 153 °C a 160 °C. Previamente, otros autores (Liu *et al.*, 2006) determinaron un pico mediante estudios de DSC en torno a los 155 °C para sistemas con alto contenido en amilosa que definieron como punto de fusión de la amilosa (M_3). Mediante estudios de DSC este pico fue sólo obtenido para sistemas con alto contenido en amilosa (> 80%). Sin embargo, el punto P_5 obtenido mediante DMA, en sistemas de bajo contenido de amilosa (16,2-20,0%) como los estudiados indica que mediante esta técnica se puede obtener información de forma más sensible que mediante DSC acerca de transiciones de compuestos derivados del almidón a alta temperatura.

CONCLUSIONES

El parámetro más influyente en la temperatura de inicio de gelatinización para masas de harina de castaña es la absorción de agua, mostrando una relación inversa entre sí. Los puntos P_1 (86,1-89,6°C) y P_2 (104,9-107,6°C) definen el rango de temperaturas del pico endotérmico M_1 asociado a la fusión de los cristales de amilopectina, y que fue observado por otros autores mediante DSC. Las transiciones que tienen lugar a temperaturas cercanas a las asociadas al punto P_3 son de difícil determinación mediante DMA debido a fenómenos de

superficie por deslizamiento entre la muestra y los platos del reómetro provocados por la evaporación de agua. El punto P₄ (127 °C) se identificó con el pico M₂ obtenido por otros autores y definido como la fusión de complejos amilosa-lípido. El punto P₅ (153-160 °C) representa la transición de los cristales de amilosa a alta temperatura por comparación con fuentes bibliográficas.

BIBLIOGRAFÍA

AACC. (1995). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemistry*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.

AOAC, (1995). *Official methods of analysis of AOAC International*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA.

Biliaderis, C.G., Page, C.M., Maurice, T.J., Juliano, B.O. (1985). *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry*, 34, 6-14.

Brouillet Fourmann, S., Carrot, C., Mignard, N. (2003). *Rheological Acta*, 42, 110-117.

Ciesla, K., Eliasson, A.C. (2007). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 265, 399-405.

Donovan, J. (1979). *Biopolymers*, 18, 263-275.

Evans, I.D., Haisman, D.R. (1982). *Starch*, 34, 224-231.

Liu, H., Yu, L., Fengwei, X., Chen, L. (2006). *Carbohydrate Polymers*, 65, 357-363.

Rosell, C.M., Collar, C., Haros, M. (2007). *Food Hydrocolloids* 21, 454-462.

Russel, L.P. (1987). *Journal of Cereal Science*, 6, 133-145.

Shogren, R.L. (1992). *Carbohydrate Polymers*, 19, 93-90.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación parcial del Ministerio de Economía y Competitividad de España y del FEDER por el proyecto (CTQ2010-15309).

Tabla 1. Temperaturas de transiciones de polímeros de almidón y complejos amilosa-lípido en masas de castañas secadas a diferentes temperaturas y densidades de carga *

Punto	ADC 45	BDC 45	ADC 65	BDC 65	ADC 85	BDC 85
T ₀ (°C)	57,60±1,70 ^{b,c}	55,73±0,47 ^b	58,67±1,36 ^{b,c}	62,50±2,55 ^c	62,17±3,10 ^c	46,82±0,89 ^a
T ₁ (°C)	79,52±0,59 ^d	76,33±0,47 ^{b,c}	77,70±1,41 ^{a,b}	76,20±0,41 ^d	77,98±0,01 ^{c,d}	73,67±0,10 ^a
P ₁ (°C)	87,35±0,64 ^a	86,11±1,71 ^a	86,35±1,19 ^a	88,52±2,50 ^a	89,59±1,18 ^a	86,75±0,00 ^a
P ₂ (°C)	105,20±0,00 ^{a,b}	107,60±0,85 ^{a,b}	106,35±0,78 ^{a,b}	106,60±0,28 ^{a,b}	105,10±0,28 ^a	104,85±0,35 ^a
P ₃ (°C)	115,30±0,99 ^a	117,40±1,41 ^a	118,05±0,78 ^a	114,15±1,48 ^{a,b}	116,85±0,64 ^a	116,50±2,12 ^a
P ₄ (°C)	127,15±0,49	127,30	-	127,70	-	-
P ₅ (°C)	153,50±0,71 ^a	158,95±0,78 ^{b,c}	153,90±0,71 ^{a,b}	157,25±1,90 ^{a,b,c}	158,90±1,13 ^{b,c}	159,35±0,92 ^c

*Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Los valores en las filas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre ellos, $p \leq 0,05$. Los datos que no presentan desviaciones típicas no pudieron ser determinados por duplicado.

Tabla 2. Contenido en almidón total (AT) y dañado (AD) de los sistemas estudiados (% w/w, base seca) *

Sistema	AT	AD
ADC 45	49,24±2,31 ^{a,b}	4,39±0,32 ^a
BDC 45	61,65±10,14 ^b	7,95±0,14 ^b
ADC 65	44,04±9,45 ^{a,b}	6,05±1,75 ^{a,b}
BDC 65	51,49±6,56 ^b	4,41±0,07 ^a
ADC 85	45,50±5,21 ^{a,b}	7,63±0,07 ^b
BDC 85	31,64±3,05 ^a	11,33±1,6 ^{c,b}

*Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Los valores en las columnas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre sí, $p \leq 0,05$.

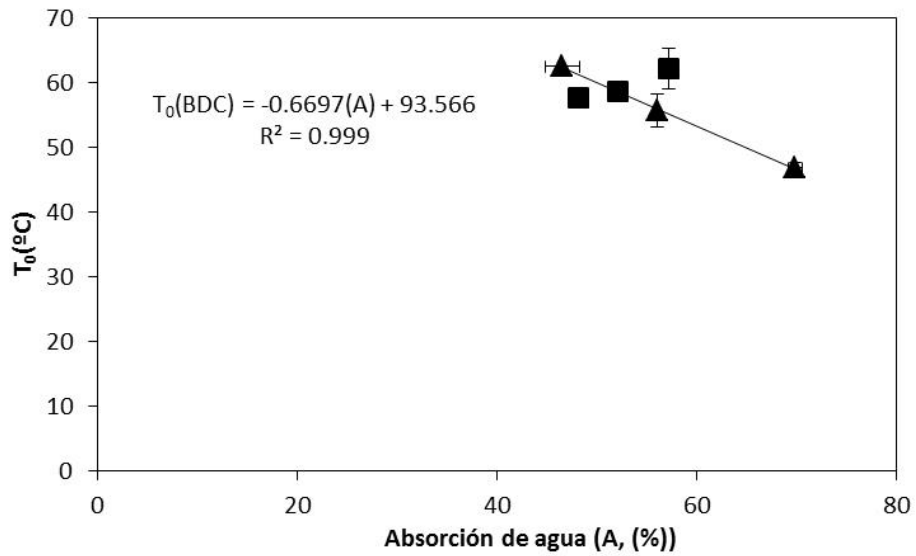


Figura 1. Temperaturas de inicio de gelatinización, T_0 , de almidón de castaña frente a absorción de agua (BDC (▲) ADC (□))

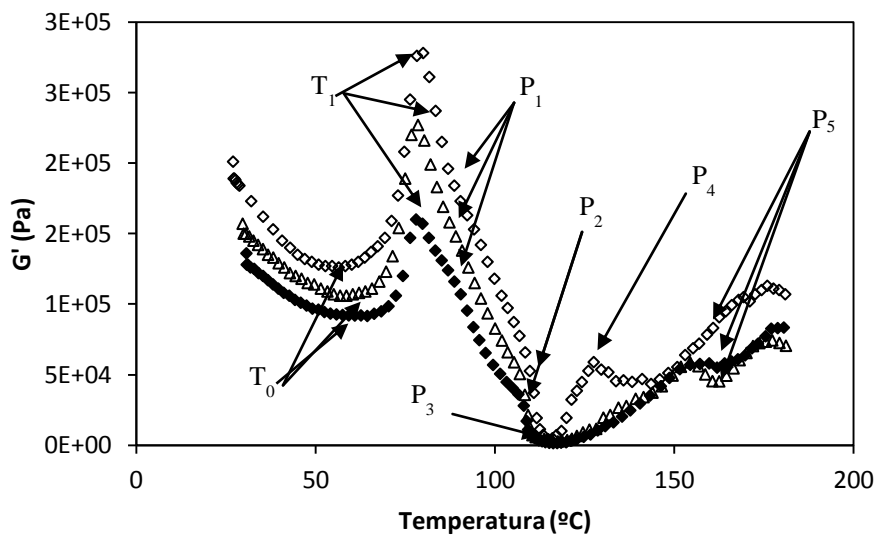


Figura 2. Barrido térmico del módulo elástico, G' , de masas de castaña. Muestras secadas a alta densidad de carga y distintas temperaturas: ADC 85 (◆), ADC 65(Δ), ADC 45(◇)

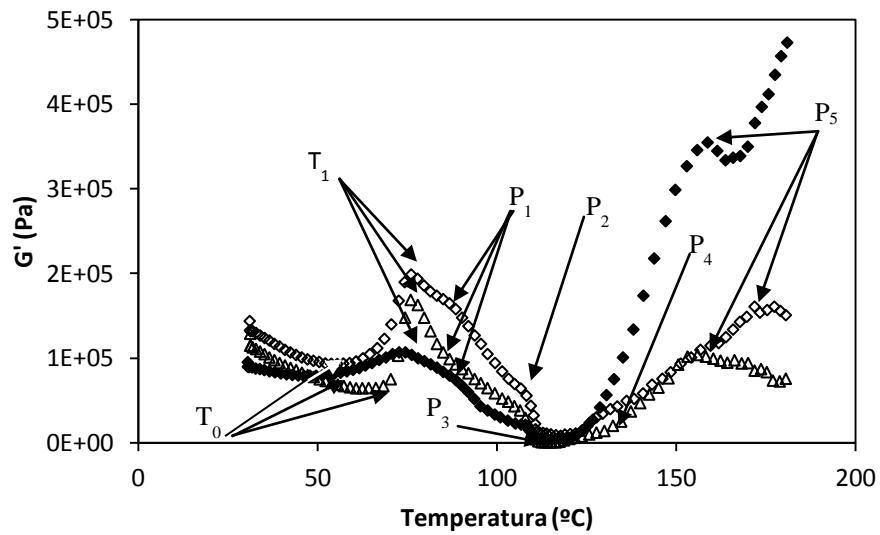


Figura 3. Barrido térmico del módulo elástico, G' , de masas de castaña. Muestras secadas a baja densidad de carga y distintas temperaturas: BDC 85 (◆), BDC 65(Δ), BDC 45(◇)

COMPORTAMIENTO DE AMASADO Y PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE MASAS DE HARINA DE CASTAÑAS SECADAS EN DIFERENTES CONDICIONES

B. Rama, S. Arufe, M.D. Torres, F. Chenlo, R. Moreira

Departamento de Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela,
Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n, E-15782 Santiago de Compostela, España.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la demanda de productos libres de gluten en los últimos años motiva la búsqueda para la introducción en el mercado de nuevos productos obtenidos de materias primas, como la castaña, caracterizadas por la ausencia de dicho compuesto en su composición.

En el caso de las masas de harina de castaña, su comportamiento durante el amasado y las propiedades viscoelásticas, de especial importancia en el procesado del producto final, están afectados por las condiciones en las que se procesa la materia prima, destacando las empleadas durante la operación de secado (temperatura, densidad de carga de muestra, etc.).

El estudio del comportamiento de las masas se lleva a cabo mediante ensayos en amasadoras de laboratorio a partir de los que se determinan parámetros como el tiempo de desarrollo, estabilidad de las masas o la cantidad de agua a añadir a las harinas para que las masas alcancen la consistencia objetivo previamente establecida (Rosell *et al.*, 2007). También las características químicas, como el contenido en almidón dañado, afectan de manera determinante a esta etapa. Un estudio muy común para el análisis de las propiedades viscoelásticas son los ensayos de fluencia y recuperación, un método reológico estático en el que se aplica una tensión a una muestra con el objetivo de medir su deformación a lo largo del tiempo (Van Bockstaele *et al.*, 2011). Los materiales viscoelásticos muestran una respuesta no lineal y, debido a su capacidad para recuperar su estructura mediante el almacenamiento de energía, muestran una deformación permanente menor a la total aplicada (Steffe, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Castañas (*Castanea Sativa Mill*) adquiridas en un mercado local (Galicia, España) fueron seleccionadas, peladas y posteriormente cortadas en cubos de un volumen medio de unos 6 mm³ mediante un desintegrador de laboratorio (Waring, Modelo HGBTWT, EEUU).

Las muestras de castaña fueron secadas en un secadero de aire convectivo (Angelantoni challenge 250, Italia) con una velocidad de aire de 2 m/s y una humedad relativa del 30%, bajo diferentes condiciones de temperatura (45°C, 65°C y 85°C) y densidad de carga de muestra (Baja (BDC), 2,63±0,26 kg/m² y Alta (ADC), 6,13±0,10 kg/m²), obteniéndose así 6 sistemas de castaña diferentes (ADC 45, ADC 65, ADC 85, BDC 45, BDC 65 y BDC 85). Una vez secadas fueron molidas en un molino ultracentrífugo (ZM200 Retsch GmbH, Alemania) con un tamiz interno de 200 µm. El contenido de almidón dañado (AD, % (g almidón dañado/g harina)) se determinó mediante método enzimático AACC 76-31.01 (1995).

Los ensayos de amasado se realizaron en una amasadora de laboratorio (Mixolab[®], Chopin Technologies, Francia) siguiendo el protocolo Chopin S (30°C, 30 min, 80 rpm y consistencia objetivo 1,11±0,07 Nm) (Rosell *et al.*, 2007) aplicado a las masas resultantes de la mezcla de agua y harina de castaña.

Los estudios de fluencia y recuperación se llevaron a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado (MCR 301, Anton Paar Physica, Austria) empleando una geometría plato-plato (50 mm, 2 mm *gap*) a una temperatura constante de 30 °C. La etapa de fluencia se llevó a cabo mediante la aplicación de una fuerza normal, σ , a la muestra de 50 Pa durante 60 segundos. La etapa de recuperación transcurrió después de retirar dicha fuerza normal durante 180 segundos.

Los datos experimentales de fluencia y recuperación se analizaron en función de la deformación de fluencia $J(t)$ (Pa⁻¹) = γ/σ (γ : deformación) (Steffe, 1996) y correlacionados mediante el modelo de Burgers (Burgers, 1935) usando las siguientes expresiones para las etapas de fluencia y recuperación, respectivamente.

$$J(t) = J_0 + J_m \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_f}\right) \right) + \frac{t}{\eta_0} \quad [1]$$

$$J(t) = J_{max} + J_0 + J_m \left(1 - \exp\left(\frac{-(t-60)}{\lambda_r}\right) \right) \quad [2]$$

donde $J(t)$ es la deformación de fluencia en un instante dado, J_0 la deformación de fluencia en el instante inicial, J_m la deformación de fluencia viscoelástica o de retardo, $J_{m\acute{a}x}$ la deformación de fluencia máxima, t el tiempo, λ_f y λ_r el tiempo de retardo de la fase de fluencia y recuperación, respectivamente y η_0 es la viscosidad a velocidad de cizalla cero. Además se calcularon dos parámetros adicionales, la deformación recuperada ($J_r = J_0 + J_m$) y el cociente $J_r/J_{m\acute{a}x}$, que aporta información sobre la proporción elástica de las masas. La calidad del ajuste se evaluó en función del coeficiente de correlación (r^2).

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). El test de Fischer se empleó para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$). Se realizó un análisis mediante el test comparativo de Duncan para establecer las diferencias estadísticas entre las medias de cada experimento (IMB SPSS Statistics, IBM, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio del comportamiento del amasado indicó que las harinas con mayor contenido de almidón dañado (ente 4,4 y 11,3% w/w), Tabla 1, necesitaron una mayor cantidad de agua (entre 46,6 y 69,9 %) para alcanzar la consistencia objetivo (1,11 Nm), Tabla 2. Se encontraron relaciones lineales entre estos dos parámetros en función de la densidad de carga empleada durante el secado, Figura 1. Los tiempos de desarrollo fueron cortos (entre 0,5 y 0,6 min) y no mostraron diferencias significativas con la densidad de carga, aunque a alta temperatura de secado (85 °C) este tiempo aumentó, Tabla 2. La densidad de carga de muestra durante el secado no modificó de manera significativa los tiempos de estabilidad (entre 0,4 y 0,7 min) de las masas de castaña (Tabla 2) secada a la misma temperatura, en cambio, la estabilidad de las masas de castaña secada a 45 y 85 °C fueron significativamente superiores a los obtenidos para los sistemas de castaña secada a 65 °C. Todos los tiempos evaluados son inferiores a los encontrados por otros autores para masas de harina libre de gluten (Torbica *et al.*, 2010).

Las curvas de fluencia y recuperación de las masas cuyas harinas fueron previamente secadas en condiciones de baja densidad de carga, Fig. 2, y alta densidad de carga, Fig. 3, mostraron la misma forma poniendo de manifiesto que la proporción viscosa no recuperable fue mayor que la elástica recuperable, siendo éste un comportamiento característico de un sistema polimérico débilmente reticulado (Moreira *et al.*, 2010). Durante la etapa de fluencia, la deformación de fluencia aumenta, posteriormente, en la etapa de recuperación, se produce un descenso brusco en la deformación hasta casi alcanzar el estado estacionario. Las formas de las curvas son semejantes a las obtenidas anteriormente por otros autores para sistemas libres de gluten (Lazaridou *et al.*, 2007). Los valores concuerdan con los obtenidos para masas de harinas de castaña elaboradas bajo diferentes condiciones a las aquí ensayadas (Moreira *et al.*, 2013). No obstante, los valores de $J(t)$ son inferiores a los obtenidos para masas de harinas de arroz (Lazaridou *et al.*, 2007) y de harina de trigo (Lefebvre, 2009).

Los datos de las etapas de fluencia y recuperación modelados a través del modelo de Burgers (Ecs. 1 y 2) se presentan en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Los valores de

deformación de fluencia instantánea (J_0) para la etapa de fluencia mostraron diferencias significativas entre sí, variando de $7,04 \cdot 10^{-6}$ a $11,90 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}^{-1}$. Los valores de fluencia viscoelástica en la misma etapa no variaron significativamente ($5,04\text{-}5,07 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}^{-1}$) excepto para el sistema BDC 45 (J_m : $6,88 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}^{-1}$). El efecto de la densidad de carga de muestra durante el secado no muestra una tendencia general ya que las masas de castaña secada a 45 y 85 °C aumentan su deformación de fluencia instantánea (J_0) al disminuir la densidad de carga de partícula mientras que el comportamiento de las masas de castaña secada a 65 °C es el inverso. Dicho fenómeno puede deberse a diferencias en el contenido de almidón dañado, Tabla 1, de los sistemas. En las masas de castaña secada a 45 y 85 °C el contenido en almidón dañado aumenta al disminuir la densidad de carga de partícula mientras que dicho parámetro para sistemas secados a 65 °C disminuye con la densidad de carga. El mismo comportamiento fue observado para la fluencia viscolástica (J_m). El tiempo de retardo de la fase de fluencia (λ_c) varió significativamente para los diferentes sistemas estudiados. La modificación de la densidad de carga durante el secado no afectó de manera determinante a λ_c , pero los valores disminuyeron significativamente para los sistemas de castaña secada a alta temperatura (85°C). La disminución de la densidad de carga durante el secado provocó una menor viscosidad a velocidad de cizalla cero (η_0) de las masas. Para sistemas de castaña secada a baja densidad de carga η_0 aumentó de forma significativa con la temperatura de secado, tendencia no observada para masas de castaña secada a alta densidad de carga.

En la etapa de recuperación los valores de deformación de fluencia máxima ($J_{m\acute{a}x}$) de los diferentes sistemas aumentaron al disminuir la densidad de carga durante el secado, comportamiento inverso al observado para la deformación de fluencia en el instante inicial (J_0) (Tabla 3). Ambos parámetros mostraron una relación lineal con la temperatura de secado en los sistemas secados a baja densidad de carga de partícula, Figura 4. Las masas de castaña secada a alta densidad de carga no mostraron dicho comportamiento. La fluencia viscoelástica mostró una tendencia similar a la de la etapa de fluencia. La modificación de la densidad de carga durante el secado no afectó de manera determinante al tiempo de retardo de la fase de recuperación (λ_r), sin embargo sus valores disminuyeron de forma significativa para los sistemas de castaña secada a más alta temperatura (85°C) al igual que λ_c . El cociente $J_r/J_{m\acute{a}x}$, Tabla 4, mostró siempre valores superiores al 75% indicativo de una alta proporción elástica de las masas, estando en concordancia con lo observado en anteriores estudios (Moreira *et al.*, 2013). $J_r/J_{m\acute{a}x}$ aumentó linealmente con el contenido en almidón dañado de las masas de castaña secada a baja densidad de carga, con lo que mayores contenidos de almidón dañado

provocan aumentos en la componente elástica de las masas. Como en el caso de J_0 , $J_{m\acute{a}x}$ y λ_r dicha tendencia no fue observada para masas de castaña secada a alta densidad de carga.

CONCLUSIONES

El almidón dañado y la absorción de agua de las harinas de castaña guardan una relación lineal diferente en función de la densidad de carga durante el secado de la materia prima. Los tiempos de desarrollo y estabilidad de las masas son independientes de la densidad de carga durante el secado de la castaña, sin embargo varían en función de la temperatura empleada en este proceso. La cantidad de almidón dañado de los sistemas puede afectar de manera significativa a determinados parámetros viscoelásticos (J_0 , J_m) siendo estos independientes de la temperatura y la densidad de carga de muestra empleada durante el secado. La disminución de la densidad de carga durante el secado provoca una menor η_0 de las masas. Para sistemas de castaña secada a baja densidad de carga η_0 aumenta de forma significativa con la temperatura. Un mayor contenido en almidón dañado causa un aumento de la proporción elástica de masas de castaña secada a baja densidad de carga de partícula.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. (1995). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemistry*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.
- Burgers, J.M. (1935). *First Report on Viscosity and Plasticity*. Nordemann Publishing Company, Nueva York.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C.G. (2007). *Journal of Food Engineering*, 79, 1033-1047.
- Lefebvre, J. (2009). *Journal of Cereal Science*, 49, 262-271.
- Moreira, R., Chenlo, F., Torres, M.D., Prieto, D.M. (2010). *Journal of Food Engineering*, 100, 270-277.
- Moreira, R., Chenlo, F., Torres, M.D., Rama, B. (2013). *Food and Bioproducts Processing*, 91, 7-13.
- Rosell, C.M., Collar, C., Haros, M. (2007). *Food Hydrocolloids*, 21, 454-462.
- Steffe, J.F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Freeman Press, Londres
- Torbica, A., Hadnadev, M., Dapcevic, T. (2010). *Food Hydrocolloids*, 24, 626-632.
- Van Bockstaele, F., De Leyn, I., Eeckhout, M., Dewettinck, K. (2011). *Journal of Food Engineering*, 107, 50-59.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación parcial del Ministerio de Economía y Competitividad de España y del FEDER por el proyecto (CTQ2010-15309).

Tabla 1. Contenido de almidón dañado de los sistemas analizados (% w/w)*

Sistema	AD
ADC 45	4,39±0,32 ^a
BDC 45	7,95±0,14 ^b
ADC 65	6,05±1,75 ^{a,b}
BDC 65	4,41±0,07 ^a
ADC 85	7,63±0,07 ^b
BDC 85	11,33±1,6 ^c

*Los datos se presentan como valor medio ± desviación estándar. Los valores en las columnas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre sí, $p \leq 0,05$.

Tabla 2. Parámetros de etapa de amasado de los sistemas estudiados

Parámetro	ADC 45	ADC 65	ADC 85	BDC 45	BDC 65	BDC 85
Absorción de agua (%)	48,3±0,2 ^a	52,2±0,1 ^b	57,5±0,5 ^c	56,1±0,1 ^c	46,6±1,7 ^a	69,9±0,7 ^d
Consistencia de la masa (Nm)	1,11 ^a	1,10 ^a	1,09 ^a	1,07 ^a	1,06 ^a	1,17 ^a
Tiempo de desarrollo (min)	0,50 ^a	0,50 ^a	0,57 ^{a,b}	0,50 ^a	0,50 ^a	0,58 ^b
Estabilidad (min)	0,72 ^{b,c}	0,52 ^{a,b}	0,65 ^b	0,72 ^{b,c}	0,43 ^a	0,70 ^{b,c}

*Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Los que no presentan desviación estándar son aquellos con desviaciones de ±0,02. Los valores en filas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre sí, $p \leq 0,05$.

Tabla 3. Parámetros del modelo de Burgers para la etapa de fluencia, Ec. 1*

Parámetro	ADC 45	ADC 65	ADC 85	BDC 45	BDC 65	BDC 85
$J_0 \cdot 10^6 (\text{Pa}^{-1})$	8,98±0,18 ^{a,b}	9,88±0,07 ^b	8,18±0,01 ^{a,b}	11,90±0,35 ^c	7,04±0,05 ^a	11,80±1,84 ^c
$J_m \cdot 10^6 (\text{Pa}^{-1})$	4,57±0,30 ^a	5,07±0,37 ^a	4,11±0,24 ^a	6,88±0,52 ^b	4,04±0,09 ^a	6,08±0,19 ^b
λ_c (s)	4,4±1,4 ^{a,b}	4,7±0,7 ^{a,b}	2,6±0,3 ^a	5,2±0,7 ^{a,b}	6,3±0,3 ^b	2,6±0,8 ^a
$\eta_0 \cdot 10^{-6} (\text{Pa} \cdot \text{s})$	9,79±0,79 ^c	8,33±0,45 ^{b,c}	10,10±0,52 ^c	5,96±0,73 ^a	6,75±0,11 ^{a,b}	8,73±1,65 ^c
r^2	0,971	0,974	0,965	0,981	0,990	0,952

*Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Los valores en las filas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre sí, $p \leq 0,05$.

Tabla 4. Parámetros del modelo de Burgers para la etapa de recuperación, Ec. 2*

Parámetro	ADC 45	ADC 65	ADC 85	BDC 45	BDC 65	BDC 85
$J_{máx} \cdot 10^5 (Pa^{-1})$	2,21±0,05 ^{a,b}	2,28±0,49 ^{b,c}	2,14±0,03 ^a	2,46±0,35 ^d	2,34±0,07 ^c	2,23±0,0 ^{a,b,c}
$J_0 \cdot 10^5 (Pa^{-1})$	1,37±0,05 ^{c,d}	1,31±0,04 ^{b,c}	1,44±3,54 ^d	1,13±0,03 ^a	1,25±0,01 ^b	1,35±0,01 ^{b,c} _d
$J_m \cdot 10^6 (Pa^{-1})$	5,24±0,78 ^{a,b}	6,08±0,72 ^b	4,00±0,05 ^a	8,16±0,48 ^c	5,47±0,04 ^a _b	5,34±0,61 ^{a,b}
$\lambda_r (s)$	37,6±1,4 ^{b,c}	38,4±1,1 ^c	29,3±1,2 ^{a,b}	37,5±1,1 ^{b,c}	40,2±0,4 ^c	27,3±5,1 ^a
$J_r/J_{máx} (\%)$	85,66±1,25 _b	84,07±0,80 _b	85,75±0,06 _b	79,06±0,58 _a	76,75±0,35 _a	84,26±2,41 ^b
r^2	0,939	0,941	0,907	0,951	0,958	0,895

*Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Los valores en las filas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre sí, $p \leq 0,05$.

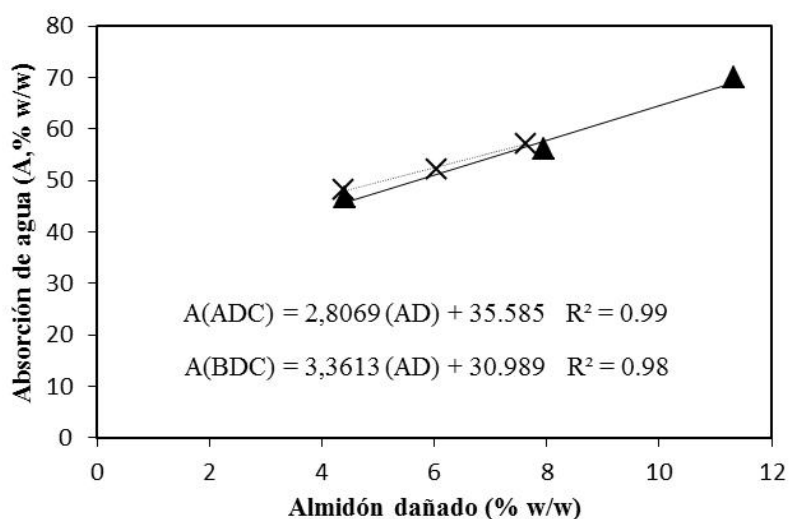


Figura 1. Datos experimentales de absorción de agua vs almidón dañado para masas de harina de castaña seca a alta (X) y baja (▲) densidad de carga

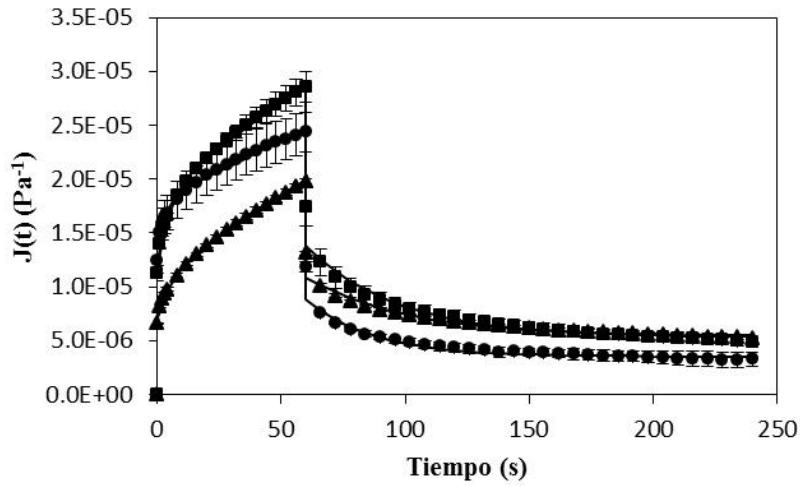


Figura 2. Datos experimentales de fluencia y recuperación de masas de harina de castaña seca a baja densidad de carga y 45°C (\square), 65°C (\blacktriangle) o 85°C (\bullet). Modelización (—), Ecs. (1) y (2)

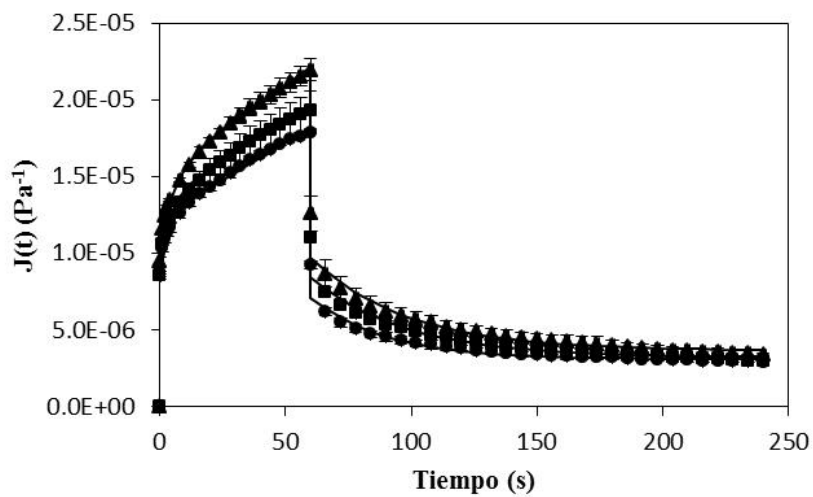


Figura 3. Datos experimentales de fluencia y recuperación de masas de harina de castaña seca a alta densidad de carga y 45°C (\square), 65°C (\blacktriangle) o 85°C (\bullet). Modelización (—), Ecs. (1) y (2).

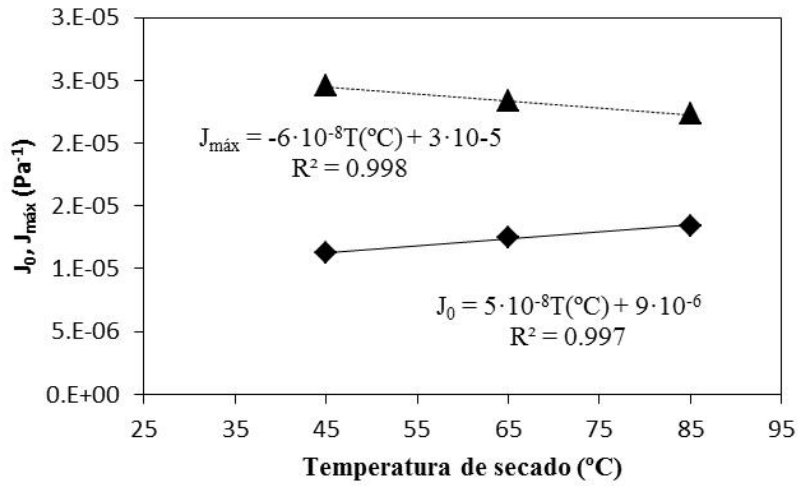


Figura 4. Variación la deformación de fluencia en el instante inicial (J_0 ,♦) y la deformación de fluencia viscoelástica (J_m ,▲) con la temperatura de secado para masas de harina de castaña secadas a baja densidad de carga.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y DENSIDAD DE CARGA EN LA CINÉTICA DE SECADO DE CASTAÑA Y EN PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE SUS HARINAS

B. Rama, S. Arufe, M.D. Torres, F. Chenlo, R. Moreira

Departamento de Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela,
Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n, E-15782 Santiago de Compostela, España.

INTRODUCCIÓN

Las condiciones de operación y las cinéticas del secado para la obtención de harinas y particularmente en las harinas libres de gluten como la de castaña, son factores clave para la consecución de sistemas con propiedades fisicoquímicas adecuadas para el desarrollo de nuevos productos. Las cinéticas dependen de diversos factores como la temperatura, la humedad relativa y la velocidad del aire de secado y la forma, el tamaño y la densidad de carga de las muestras. Así como las cinéticas de secado de castañas enteras a diferentes temperaturas de secado han sido determinadas previamente (Moreira *et al.*, 2005), el secado en capas de partículas de castaña no ha sido objeto de estudio sistemático. Por otro lado, en materiales con alto contenido en almidón como estas harinas de castaña, es importante hacer un seguimiento de la relación amilosa/amilopectina durante el secado, ya que puede constituir un factor determinante de la aptitud tecnológica de sus masas. Por último, el color de la harina es fundamental para la aceptación por el consumidor del producto final.

El objetivo de este estudio es determinar la influencia de la temperatura de secado en las cinéticas de secado de capas de partícula de castaña a dos densidades de carga diferentes, manteniendo constantes las demás variables que influyen en la cinética de secado. El modelo de Page fue aplicado para modelizar las cinéticas experimentales obtenidas. Finalmente, fueron estudiadas las propiedades fisicoquímicas mencionadas anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secado

Castañas frescas (*Castanea Sativa* Mill) fueron compradas en un mercado local (Galicia, España). Manualmente seleccionadas, peladas y cortadas en cubos de un volumen medio de aproximadamente 6 mm^3 , las partículas de castaña fueron secadas en un secadero de bandejas de aire convectivo (Angelantoni Challenge 250, Italia) a diferentes temperaturas de secado (45, 65 y 85°C) y a diferentes densidades de carga de muestra (baja: $2,63 \pm 0,26 \text{ kg/m}^2$

y alta: $6,13 \pm 0,10 \text{ kg/m}^2$), manteniendo constantes las condiciones del aire de secado (velocidad (2 m/s) y humedad relativa (30%)). El ratio de humedad (MR) de las partículas de castaña fue calculado empleando la ecuación

$$MR = \frac{(M - M_e)}{(M_0 - M_e)} \quad (1) \text{ donde } M$$

es el contenido de humedad a cada instante (kg agua/kg base seca, (b.s.)), M_0 es el contenido de humedad inicial y M_e es la humedad de equilibrio de la muestra cuyo valor fue obtenido de la bibliografía (Vázquez *et al.*, 2001). Las curvas experimentales fueron ajustadas por el modelo de Page (Page, 1949),

$$MR = e^{-kt^n} \quad (2) \text{ donde } t$$

es el tiempo de secado (h), k es la constante de velocidad de secado (h^{-1}) y n es un parámetro del modelo. Una vez secadas hasta un MR inferior a 0,2, las partículas de castaña fueron molidas en un molino ultracentrífugo (ZM200 Retsch GmbH, Alemania) con un tamiz interior de 200 μm . Todas las harinas ensayadas (tamaño promedio: 36-47 μm) fueron etiquetadas según la nomenclatura XDC YY, donde X corresponde a alta (A) o baja (B) densidad de carga (DC) e YY muestra la temperatura de secado empleada en cada caso.

Caracterización del almidón

El almidón total (AT, % g almidón/g harina seca) y el almidón dañado (AD, % g almidón dañado/g harina seca) de los diferentes sistemas fue determinado con los kits comerciales “Total Starch Assay Kit” (AACC, método 76.13, 2000) y “Starch Damage Kit” (AACC, método 76-31.01, 1995), respectivamente. El contenido de amilosa fue obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito por (McGrance *et al.*, 1998).

Caracterización colorimétrica

La caracterización colorimétrica de las harinas fue realizada empleando un colorímetro de superficie Minolta CR-400 (Minolta, Japón), empleando un blanco estándar como referencia. Se evaluaron los 3 parámetros de color (L^* , a^* and b^*) según CIElab (CIE, 1986), donde L^* define el brillo, a^* el pardeamiento y b^* el amarilleamiento. La diferencia total de color (ΔE^*) fue calculada en comparación con los datos bibliográficos de harina de castaña comercial (Torres *et al.*, 2013), mediante la ecuación

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad (3)$$

Estas variaciones pueden ser clasificadas como “diferentes” ($1,5 < \Delta E^* < 3,0$) o como “muy diferentes” ($\Delta E^* > 3,0$) (Drlange, 1994),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secado

En la Figura 1 se muestran las cinéticas de secado a diferentes temperaturas y densidades de carga de partículas de castaña. Tal y como era de esperar, a una densidad de carga constante, la temperatura aceleró la velocidad de deshidratación. Este efecto es más acusado en sistemas de ADC. Así, para alcanzar un MR de 0,2, fueron necesarios 130, 160 y 180 min a 45, 65 y 85°C, respectivamente. Para alcanzar la misma humedad de las partículas de castaña a BDC son tan solo necesarios 55, 60 y 70 min, respectivamente, a las temperaturas indicadas. Estos resultados muestran que la densidad de carga es una variable determinante en el tiempo necesario para la deshidratación del producto. En castañas secadas a BDC, la transferencia de agua del interior de las partículas hacia el aire está controlada principalmente por la resistencia en el interior de la partícula. A ADC, la mayoría de las partículas no están en contacto directo con el aire de secado (tan solo las capas externas se pueden considerar a tal efecto) si no que el contacto preferente es entre partículas. Así, la resistencia interna gobernante en condiciones de BDC se ve acompañada por la resistencia asociada al paso del agua a través del lecho de partículas. Este fenómeno también se ve favorecido porque el aire intersticial del lecho es más húmedo que el aire de secado externo y se encuentra a una temperatura inferior por la mayor resistencia a la transmisión de calor. Estos factores simultáneos, globalmente, provocan que la velocidad de secado disminuya. La existencia de los diferentes mecanismos de transferencia de propiedad descritos hace que, desde un punto de vista práctico, la modelización del secado de lechos de partículas se realice mayoritariamente mediante modelos empíricos sencillos. En este caso, se ha aplicado el conocido modelo de Page, Ec. (2), cuyos parámetros se recogen en la Tabla 1. El estudio de Aghbashlo *et al.* (2009) de secado de capas de láminas de patata de 5mm de espesor mostró valores del parámetro n similares a los determinados para las partículas de castaña. Hacıhafızoglu *et al.* (2008) encontraron que, para el secado multicapa de arroz bajo condiciones de velocidad y temperatura del aire de secado similares a las empleadas en este estudio, los valores del parámetro n fueron del orden de la mitad de los recogidos en la Tabla 1.

Los parámetros de ajuste mostraron diferentes tendencias con la temperatura y la densidad de carga. Así, el parámetro k aumentó con la temperatura de modo significativo independientemente de la densidad de carga, aunque los valores fueron notablemente inferiores en los ensayos a ADC a temperatura constante. Por su parte, el exponente n varió en un estrecho intervalo (1,23-1,34), lo que pone de manifiesto que este parámetro no depende

de las condiciones de operación si no que depende de las características físicas y geométricas del producto a deshidratar. De este modo, se determinó el valor medio del exponente para todas las condiciones ensayadas y se recalculó el parámetro k (Tabla 1). El parámetro k se correlacionó siguiendo una relación Arrheniusiana con la temperatura:

$$\ln k = A + \frac{B}{T} \quad (4)$$

siendo T (K) la temperatura absoluta de secado. Los parámetros de ajuste, A y B , para alta y baja densidad de carga se recogen en la Tabla 2. En la Fig.1 se muestra la modelización de las cinéticas de secado con el modelo de Page con dependencia de la temperatura, pudiéndose observar una satisfactoria reproducción de los datos experimentales.

Caracterización del almidón

La Tabla 3 muestra las propiedades del almidón de los diferentes sistemas ensayados. Es necesario remarcar que el almidón total corresponde a la cantidad de almidón no gelatinizado presente en la muestra en el momento de la determinación. La cantidad de AT en las harinas de castaña secadas a BDC disminuyó al aumentar la temperatura de secado (61.54-31.64 %w/w b.s.), lo que indica que a temperaturas altas, los procesos de gelatinización del almidón fueron promovidos térmicamente. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por (Correia and Beirão da Costa, 2009). Sin embargo, este comportamiento no fue observado para las muestras secadas a ADC. A pesar de que el contenido medio de humedad permanece elevado (disminuyendo la temperatura de gelatinización del almidón) durante un periodo de tiempo mayor en comparación con las muestras secadas a BDC, una ADC evita el calentamiento del seno de las partículas por encima de la temperatura de gelatinización. El almidón dañado, que es la fracción de almidón dañado mecánicamente (pelado, cortado, trituración y molienda) y térmicamente (secado y molienda) durante el proceso de producción de las harinas, varió entre el 4,09 y el 11,33%, Tabla 3. A pesar de que la temperatura no muestra un efecto significativo, se puede observar la tendencia de una mayor cantidad de almidón dañado en las harinas secadas a alta temperatura. Una explicación a este resultado es que las operaciones mecánicas pueden modificar la proporción de AD e interferir el análisis del efecto térmico. El contenido en amilosa de las distintas harinas ensayadas varió entre el 16,43 y el 19,45%. Estos valores son inferiores a los obtenidos en la bibliografía para otras harinas libres de gluten como la de maíz (24,4%) o arroz (22,8%) (Sabaratnam *et al.*, 2013; Vilaplana *et al.*, 2012).

Caracterización colorimétrica

En la Figuras 2a y 2b se muestra la variación de los parámetros colorimétricos en función de la temperatura y de la densidad de carga. El color predominante en las harinas fue el amarillo. En comparación con la harina de castaña comercial, las harinas ensayadas mostraron menores valores de brillo, amarilleamiento y pardeamiento (Torres *et al.*, 2013). Los valores de ΔE^* mostraron que todas las harinas se pueden considerar como “muy diferentes” en comparación con la harina comercial debido, principalmente, a su menor tono amarillo y mayor blancura. Este factor puede ser considerado como positivo en cuanto a la aceptación por el consumidor del producto final (Lamsal y Faubion, 2009). Los parámetros de color de las harinas de castaña estudiadas mostraron diferencias significativas entre sí según las condiciones de secado empleadas. Así, el parámetro L^* varió de forma significativa de 72,92 a 80,42, al igual que los parámetros b^* (7,16-8,35), a^* (-0,41-0,30) y ΔE^* (10,99-15,68). La mayor ΔE^* fue observada a la mayor temperatura de secado ensayada, 85°C y a BDC. Concretamente, se observó una disminución muy acentuada del brillo de la harina al aumentar la temperatura para las partículas de castaña secadas a BDC. Sin embargo, las harinas adquirieron una tendencia a un mayor pardeamiento (mayores valores de a^*) al aumentar la temperatura de 45 a 85°C. Este comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta que durante el secado pueden tener lugar reacciones de pardeamiento no enzimáticas (reacciones de Maillard), que se ven favorecidas por los tratamientos térmicos. La proporción amarilla (b^*) no presentó diferencias significativas entre las diferentes temperaturas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que las condiciones de la etapa de secado en capas de las partículas de castaña modifican diferentes propiedades fisicoquímicas de sus harinas. El análisis químico del almidón revela que ambas variables estudiadas, la temperatura de secado y la densidad de carga de partículas, modifican las cantidades de almidón total y de almidón dañado, pero no el contenido de amilosa. La temperatura de secado disminuye el brillo y aumenta el pardeamiento de las harinas, mientras que la densidad de carga disminuye el impacto térmico en el color de las harinas. Las cinéticas de secado se modelizan satisfactoriamente mediante la ecuación de Page, correlacionándose los parámetros del modelo con la temperatura de secado en función de la densidad de carga. Como conclusión general, las harinas de castaña estudiadas muestran una aptitud tecnológica aceptable en comparación con las características de harinas de castaña comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC, (1995). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemistry*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.
- AACC, (2000). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemistry*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.
- Aghbashlo, M., Kianmehr, M.H., Arabhosseini, A. (2009). Modeling of thin-layer drying of potato slices in length of continuous band dryer. *Energy Conversion and Management*, 50, 1348–1355.
- CIE, (1986). *Commision Internationale de l'Eclairage Proceedings*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Correia, P., Beirão da Costa, M.L. (2009). Potentialities of chestnut for starch production. *Acta Horticulturae*, 866-870.
- Drlange (1994). *Colour Review*. Drlange Application Report No. 8.0 e. Drlange, Denver.
- Hacıhafızoglu, O., Cihan, A., Kahveci, K. (2008). Mathematical modelling of drying of thin layer rough rice. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 268–275.
- Lamsal, B.P., Faubion, J.M. (2009). Effect of an enzyme preparation on wheat flour and dough color, mixing, and test baking. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 1461-1467.
- McGrance, S.J., Cornell, H.J., Rix, C.J. (1998). A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. *Starch*, 4, 158-163.
- Moreira, R., Chenlo, F., Chaguri, L., Vazquez, G. (2005). Mathematical modelling of the drying kinetics of chestnut (*Castanea Sativa Mill.*). Influence of the natural shells. *Food and Bioproducts Processing*, 83, 306–314.
- Page, G.E. (1949). Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers. M.S. thesis, Department of Mechanical Engineering, Purdue University, Purdue, USA.
- Sabaratnam, S., Vasanthan, T., Hoover, R., Bressler, D. (2013). The susceptibility of large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley and corn starches toward amylolysis at sub-gelatinization temperatures. *Food Research International*, 2, 771-782.
- Torres, M.D., Fradinho, P., Raymundo, A., Sousa, I. (2013). Thermorheological and textural behaviour of gluten-free gels obtained from chestnut and rice flours. *Food Bioprocess Technology* (en prensa, DOI: 10.1007/s11947-013-1132-6).
- Vázquez, G., Chenlo, F. and Moreira, R. (2001). Modeling of desorption isotherms of chestnut: Influence of temperature and evaluation of isosteric heats. *Drying Technology*, 19, 1189–1199.
- Vilaplana, F., Hasjim, J., Gilbert, R.G. (2012). Amylose content in starches: Toward optimal definition and validating experimental methods. *Carbohydrate Polymers*, 88, 103-111.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación parcial del Ministerio de Economía y Competitividad de España y del FEDER por el proyecto (CTQ2010-15309).

Tabla 1. Parámetros (k, n) del modelo de Page, Ec. (2), y parámetro k con n constante

Sistema	Ec. (2)			n constante		
	k	n	R ²	k	n	R ²
ADC 45	0,37±1,28	1,28±0,01	0,999	0,37±0,09	1,28	0,999
BDC 45	1,30±0,15	1,23±0,13	0,998	1,33±0,10		0,998
ADC 65	0,45±0,11	1,28±0,02	0,997	0,45±0,11		0,998
BDC 65	1,46±0,10	1,29±0,03	0,999	1,45±0,12		0,999
ADC 85	0,58±0,07	1,28±0,01	0,999	0,58±0,07		0,999
BDC 85	1,83±0,13	1,34±0,06	0,999	1,69±0,06		0,999

Tabla 2. Parámetros de la Ec. (4) para diferentes densidades de carga durante el secado

Densidad de carga	A	B
BDC	2,37	-668.22
ADC	2,98	-1268.60

Tabla 3. Contenido de almidón total, dañado y amilosa de muestras de castaña (% , b. s.)*

Sistema	Almidón total	Almidón dañado	Amilosa
ADC 45	49,24±2,31 ^{a,b}	4,39±0,32 ^a	19,45±0,33 ^{b,c}
BDC 45	61,65±10,14 ^b	7,95±0,14 ^b	16,83±0,18 ^a
ADC 65	44,04±9,45 ^{a,b}	6,05±1,75 ^{a,b}	19,95±1,36 ^c
BDC 65	51,49±6,56 ^b	4,41±0,07 ^a	19,10±0,34 ^{b,c}
ADC 85	45,50±5,21 ^{a,b}	7,63±0,07 ^b	16,16±0,24 ^a
BDC 85	31,64±3,05 ^a	11,33±1,6 ^{c,b}	18,57±0,24 ^b

*Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Los valores en las columnas con diferentes letras en los superíndices son significativamente diferentes entre sí, p ≤ 0,05.

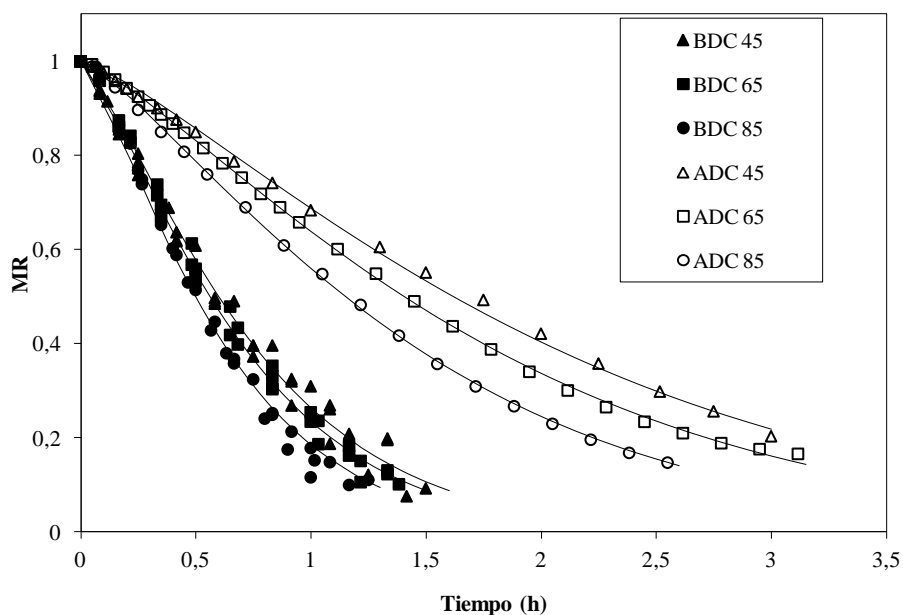
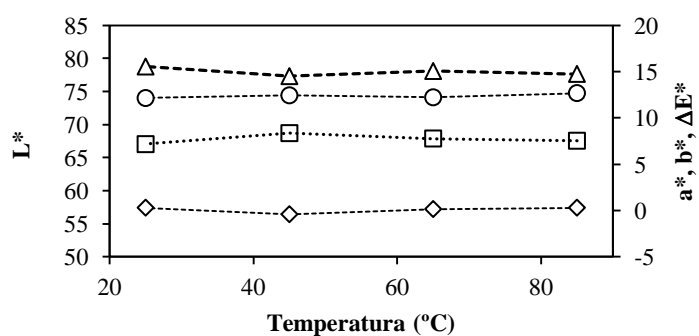
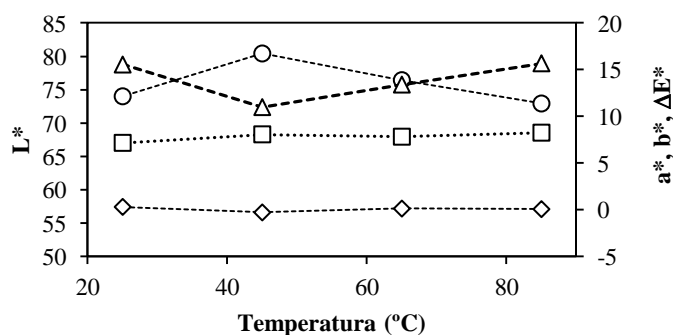


Figura 1. Datos experimentales de las cinéticas de secado. Las líneas corresponden a la correlación según el modelo de Page, Ec. (2) y Ec. (4)



(a)



(b)

Figura 2. Parámetros colorimétricos L^* (○), a^* (◇), b^* (□) y ΔE^* (Δ) en función de la temperatura de secado, para sistemas a (a) ADC y (b) BDC.

DISEÑO DE PELICULAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PARA LA INDUSTRIA HORTOFRUTICOLA.

R.L. Abarca¹, B.A. Mellado¹, F.J. Rodríguez¹, M.J. Galotto¹, A. Guarda¹, B.G. Defilippi², S.A Soto².

¹: Universidad de Santiago de Chile. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, LABEN Chile, Obispo Umaña 050, Santiago, Chile. ²: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) CRI-La Platina, Unidad de Postcosecha, Santa Rosa 11610, Santiago, Chile. E-mail: romina.abarca@usach.cl.

1. INTRODUCCIÓN

Los actuales cambios demográficos y las tendencias de estilo de vida, demandan mayores cantidades de alimentos mínimamente procesados y sin conservantes, como por ejemplo, los alimentos pertenecientes a la cuarta Gama (De Oliveira y col., 2011). Dentro de éstos se encuentran ciertas frutas y verduras, las cuales deben pasar por una serie de procesos, desde su recolección en el campo hasta llegar a manos del consumidor (Lehto y col., 2011). En este contexto, los envases y embalajes para alimentos juegan un rol fundamental en toda la cadena productiva. En el último tiempo, la investigación y desarrollo de nuevos materiales para envasado de alimentos, se ha centrado en la obtención de envases bioactivos, biodegradables, ecológicos, así como también que posean características para incrementar la vida útil del alimento. A este tipo de envases se les denomina envases activos, los cuales se están convirtiendo en una tecnología emergente en el área de los alimentos para mejorar la calidad y seguridad de los productos alimenticios (Restuccia y col., 2010). Generalmente la actividad es conferida a través de la retención o liberación de compuestos que son beneficiosos para el producto. Dentro de los envases activos destacan los envases antimicrobianos, ya que los alimentos en general se ven atacados por diversos microorganismos como bacterias y hongos (Chen y Brody, 2013). En el caso particular de frutas y verduras frescas, éstas reciben un mayor ataque por parte de hongos filamentosos. Un claro ejemplo es la especie fitopatógena *B. cinerea*, la cual produce una enfermedad común de frutas y hortalizas, llamada “moho gris” (Latorre y Torres, 2012). La contaminación del hongo puede causar importantes pérdidas económicas, lo que se transforma en un gran obstáculo, debido a los grandes volúmenes de exportación de frutos frescos como uva de mesa 240.555, arándanos 44.502 y manzanas 18.711 toneladas, como lo indica la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA, 2012). Por lo cual, el transporte de larga distancia y almacenamiento son parámetros críticos y el control de la enfermedad es especialmente

importante en el almacenamiento, ya que el microorganismo puede desarrollarse a bajas temperaturas ($-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se propaga rápidamente entre las bayas o frutos (Xu y col., 2007).

Debido a los antecedentes expuestos, este trabajo estudia el diseño de películas plásticas con capacidad antifúngica, dicha capacidad será proporcionada por un compuesto natural volátil (CNV). Debido a ésta relevante característica, la primera parte del estudio propuso la formación de un complejo de inclusión con el fin de encapsular al CNV antes de su incorporación en películas, cuyo medio encapsulante fue β -ciclodextrina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El compuesto natural volátil fue obtenido de Sigma Aldrich (99% pureza), β -ciclodextrina hidratada adquirida en Sigma-Aldrich, agar papa dextrosa del laboratorio MERCK para los análisis microbiológicos, cepa de *Botrytis cinerea* aislada de uva Red globe del Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA, Chile).

2.2 Preparación de complejos de inclusión

Los complejos de inclusión fueron preparados por el método de precipitación, siguiendo el protocolo planteado por Ayala-Zabala y col., 2008 con modificaciones menores. La β -ciclodextrina fue disuelta en 50 mL de una solución etanol:agua (1:2), mantenidas a 55°C , con agitación constante. Los complejos fueron preparados en distintas proporciones molares de BCD:CNV (1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3). Posteriormente el CNV fue disuelto en etanol al 10% v/v y mezclado con la β -ciclodextrina, agitando la mezcla por 4 horas. La solución final fue mantenida por toda la noche a 4°C . El precipitado fue obtenido por filtración y secado en horno de convección a 50°C por 24 horas. Posteriormente los complejos fueron mantenidos en desecador por 24 horas adicionales a 25°C .

2.3 Caracterización de los complejos de inclusión

Se realizaron diversos análisis con el objetivo de comprobar la formación de los distintos complejos de inclusión entre β -CD y el CNV y a la vez comparándolos con el análisis de la mezcla física de éstos.

2.3.1 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

El espectro IR fue realizado en el equipo Bruker modelo ALPHA (Ettlingen, Alemania), de acuerdo a una resolución entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ con 4 cm^{-1} , con 64 barridos por cada muestra. El espectro se registró utilizando pastillas de bromuro de potasio (KBr).

2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Este análisis se llevó a cabo en el equipo Mettler DSC-882e. Las muestras de complejo de inclusión se pesaron (~10mg) y se analizaron en barrido térmico a una velocidad constante de 10°C/min en atmósfera de nitrógeno, de acuerdo al siguiente programa: 1^{er} calentamiento de 25 a 250°C, enfriamiento de 250 a 25°C y 2^{do} calentamiento de 25 a 250 °C.

2.3.3 Difracción de rayos X (DRX).

El análisis se llevó a cabo en el equipo Siemens D5000 (30 mA y 40 kV) provisto de radiación CuK α ($\lambda= 1,54 \text{ \AA}$) a temperatura ambiente. El patrón de difracción se obtiene en un rango de 2θ comprendido entre 2 a 15 ° a una velocidad de 0,02 °/s.

2.3.4 Análisis microbiológico

Se realizaron pruebas de inhibición in vitro del crecimiento de *B. cinerea* RG. Discos de micelio del hongo, fueron colocados al centro de una placa Petri de 6cm con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), a la vez dicha placa se adhirió por cinta doble contacto a una placa Petri de mayor diámetro 9 cm, en la otra parte de la placa Petri se colocó cierta cantidad de los complejos de inclusión. El sistema de estudio fue incubado a 20°C por un periodo de 3 meses con el fin de evaluar la capacidad antifúngica del agente activo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 1, se observan los espectros FTIR de los complejos sintetizados y mezcla física entre β -ciclodextrina y el CNV. Del análisis se desprende que a medida que existe un incremento en la concentración de CNV se evidencia la aparición cada vez más notoria del pico característico del grupo carbonilo presente en el componente estudiado ($\approx 1715 \text{ cm}^{-1}$), así como también, en el rango 700 – 800 nm, se visualiza la aparición en el complejo de cadenas alifáticas. La contribución en la presencia de grupos funcionales metilo/metileno (≈ 2900) se ve también aumentada bajo las condiciones analizadas, no afectando en gran medida la presencia de grupos hidroxilos en el complejo ($3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$).

3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La figura 2 presenta los termogramas DSC correspondientes al barrido de las muestras de complejos de inclusión, mezcla física y β -ciclodextrina pura. En el cual, es posible observar picos endotérmicos definidos tanto en el análisis de la mezcla físicas ($\sim 175^\circ\text{C}$), así como también en la de β -ciclodextrina pura ($\sim 115^\circ\text{C}$), tal como lo han reportado otros autores (Ponce y col., 2010). En el caso de los complejos de inclusión se observan desplazamientos de

los picos endotérmicos de menores áreas y valores de temperaturas inferiores o intermedios, confirmando la formación de un nuevo complejo β -CD: CNV.

3.3. Difracción de rayos X (DRX)

En la figura 3 se presentan los patrones de difracción de rayos X de los complejos de inclusión sintetizados, así como también de la β -ciclodextrina pura. La obtención de señales nítidas en el difractograma de la β -ciclodextrina, indica su naturaleza cristalina. En cambio en el difractograma del complejo de inclusión se observa un decrecimiento de los máximos de difracción y un perfil distinto al de la β -CD entre los ángulos 25 y 45°, sugiriendo que el producto obtenido posee una nueva estructura menos cristalina debido a la interacción β -CD:CNV. Además del análisis se evidencia que existe una disminución en la intensidad en el ángulo 12,5° a medida que aumenta la concentración del CNV.

3.4 Análisis microbiológico de los complejos de inclusión

Luego del periodo de incubación de 3 meses a 20°C el CNV formando parte del complejo de inclusión, se comportó como un agente fungicida, debido a que no se presentó crecimiento radial del micelio de *B. cinerea* RG dentro de la placa Petri en contacto con la fuente de antifúngico, ni posterior al retiro de los complejos de la placa. Esto es posible apreciarlo en la figura 4, en la cual se muestra el blanco (sin fuente de antifúngico) y una placa sometida al proceso descrito.

CONCLUSIONES

Fue posible la formación del complejo de inclusión entre β -ciclodextrina y CNV mediante la metodología propuesta, lo cual queda de manifiesto con los análisis de caracterización realizados a las muestras.

Las técnicas analíticas FTIR, DRX, denotan un cambio en la conformación molecular, al comparar los complejos con la β -ciclodextrina pura.

La técnica de DRX entrega información relevante con respecto al cambio sufrido por la cristalinidad de la β -ciclodextrina al momento de interactuar con el CNV.

Las pruebas microbiológicas han mostrado de manera relevante que existe una liberación del CNV desde la β -ciclodextrina, inhibiendo al moho fitopatógeno *B. cinerea* bajo las condiciones descritas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto Basal CEDENNA FB 0807 y al proyecto CORFO 11CEII-9568-F1.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen J, Brody A. (2013). Use of active packaging structures to control the microbial quality of a ready-to-eat meat product. *Food Control*. 30: 306-310.
- De Oliveira, M., De Souza, V., Morato, A., Pereira, E. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*. 22: 1400-1403.
- Latorre, B., Torres, R. (2012). Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection*. 40: 49-52.
- Lehto, M., Kuismäki, R., Mänttää, J., Kymäläinen, H., Mäkitie, M. (2011). Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. *Food Control*. 22: 469-475.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. (2012). *Boletín Frutícola*, avance enero–febrero 2012.
- Ponce, C., Buera M.P, Elizalde, B. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effects of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering* 99: 70-75.
- Restuccia, D., Spizzirri, U., Parisi, O., Cirillo, G., Curcio, M., Lemma, F., Puoci, F., Vinci, G., Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. 21: 1425-1435.
- Xu, W., Huang, K., Guo, F., Qu, W., Yang, J., Liang, Z., Luo, Y. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*. 46: 86-94.

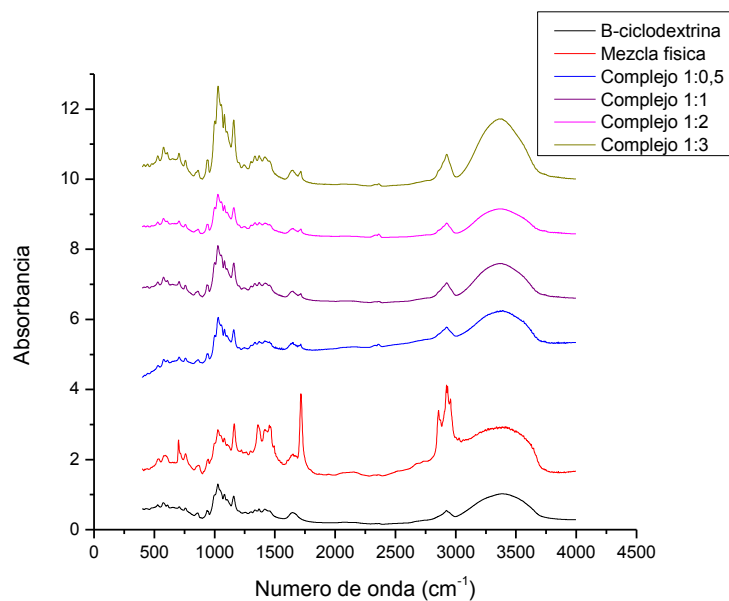


Figura 1. Espectros FTIR de complejos sintetizados y mezcla física

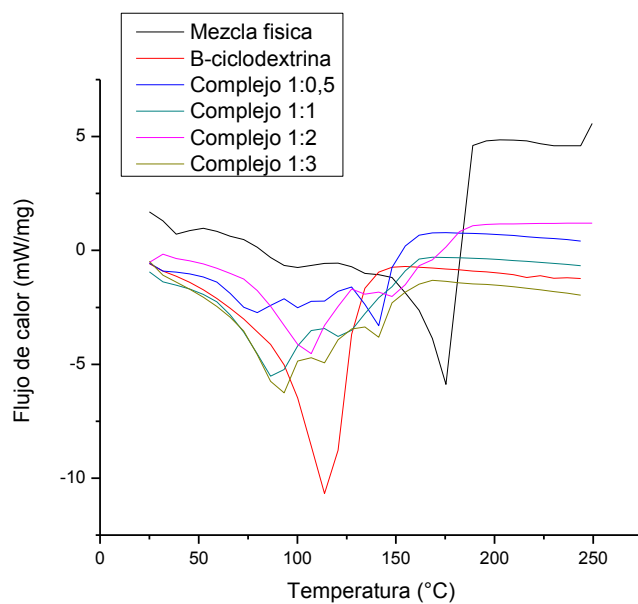


Figura 2. Termograma de complejos de inclusión y mezcla física

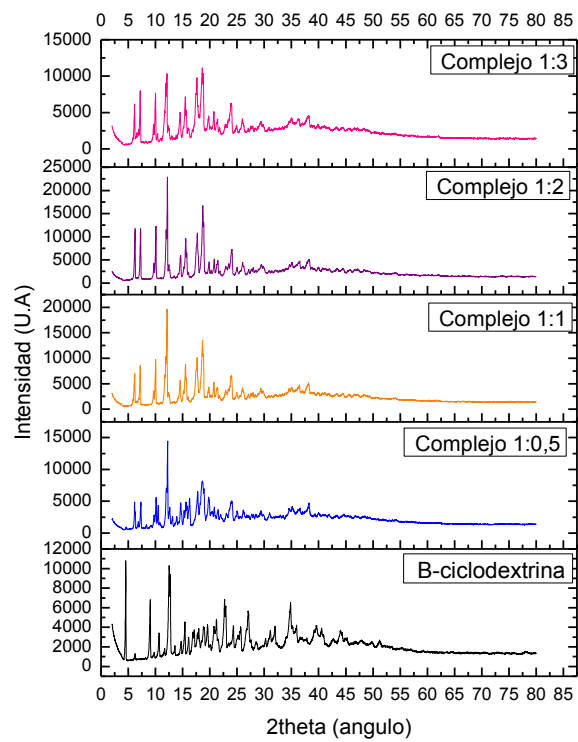
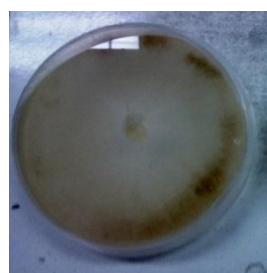
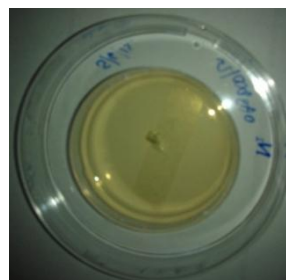


Figura 3. Patrones de difracción de rayos X



Muestra blanco



Muestra con complejo de inclusión

Figura 4. Análisis microbiológico

DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE OCRATOXINA A

A. Ibarz, J. Bochenko, V. Falguera, J. Pagán, S. Garza y A. Garvín

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

INTRODUCCIÓN

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida principalmente por *Penicillium verrucosum*, así como especies de *Aspergillus* sp.. Los hongos productores de OTA infectan muchas especies de plantas. Esta toxina se puede encontrar en los alimentos debido a la contaminación tanto en la etapa de producción, como durante el procesado o incluso en la conservación. Así, se encontraron altos niveles de OTA en café, cereales, uvas, e incluso en la carne por medio del alimento ingerido por el animal. La OTA es un metabolito fúngico tóxico que puede contaminar la uva y sus derivados, siendo el *A. carbonarius* la fuente más importante de OTA en las pasas de uva. Se considera que el vino es la segunda fuente más importante de ingesta de OTA en la dieta humana, después de los cereales, y es por ello que varios países han introducido regulaciones específicas sobre el contenido máximo de OTA en diversos productos (Covarelli *et al.*, 2012). Esta toxina es una de los primeros metabolitos fúngicos en ser clasificada como nociva para animales y seres humanos. Se sospecha que puede ser carcinógena, hepatotóxica, teratogénica, inmunosupresora y nefrotóxica (Wafa *et al.*, 1998). La Comisión que impone los límites de concentración en Europa para la OTA en los productos alimenticios (CE 123 205) ha adoptado ciertas medidas para evitar altos contenidos en alimentos. En la normativa europea, se puede observar que el límite de concentración de OTA permitido en bebidas elaboradas a partir de mosto de uva es de 2 µg/kg (Regulación N°. 1881/2006). Un estudio de incidencia mostró que, en cuatro muestras de treinta y nueve, la presencia de OTA excedía este límite de concentración (Lasram *et al.*, 2012).

El principal problema que enfrenta la industria para cumplir con estas regulaciones es la resistencia de la toxina a los métodos de procesamiento convencionales, tales como la esterilización térmica o fermentación. Por lo tanto, es necesario encontrar alternativas para destruir la toxina en lugar de perder una parte de la producción. Un campo cada vez mayor para la destrucción de muchos compuestos indeseables es la utilización de radiación UV. Esta técnica consiste en la emisión de una radiación en la región de alta absorbancia de la molécula, que causa una rotura de los enlaces y por lo tanto, la destrucción de los mismos.

El objetivo del presente trabajo es realizar un estudio de degradación fotoquímica de OTA en solución acuosa a dos pH (4 y 7), y evaluar el efecto de la temperatura sobre esta degradación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras a irradiar. Se prepararon soluciones acuosas de OTA a pH 4 y 7, con un contenido en toxina de 500 µg/L. Para la preparación de las soluciones tamponadas se utilizaron mezclas de ácido cítrico 0,1 M con Na₂HPO₄ 0,2M.

Tratamiento con radiación UV. El tratamiento fotoquímico con radiación UV es similar al descrito por Falguera *et al.* (2011), que esencialmente consiste en una cámara oscura que contiene el tanque de reacción y la lámpara UV. Las muestras a irradiar se colocan en un tanque de metacrilato de 22x15x10 cm, donde alcanza una altura de 2,4 cm. Con el fin de controlar la temperatura de las muestras se dispone de un sistema de refrigeración consistente en un serpentín metálico alimentado con agua fría, lo que permite mantener la temperatura de la muestra a con una diferencia máxima de ± 1 °C. Se trabajó a cuatro temperaturas 15, 25, 35 y 45°C. Para asegurar que el tanque está perfectamente agitado se utilizó un agitador magnético. La fuente de irradiación es una lámpara de mercurio de alta presión Philips HPM-12 (Philips, Eindhoven, The Netherlands) de 400 W de potencia nominal que emite en el intervalo de 250 a 740 nm, con una potencia real de $3,88 \cdot 10^{-7} \text{ E} \cdot \text{min}^{-1}$. En la Figura 1 se muestra el espectro de emisión de esta lámpara, en la que P_{λ} es la potencia de la misma para las diferentes longitudes de onda de emisión. La distancia entre la lámpara y la superficie de la disolución fue de 22,5 cm. Una vez encendida la lámpara, se esperan 10 minutos antes de introducir la muestra a irradiar en el interior de la cámara. Las soluciones que contenían OTA se irradiaron, tomando muestras a intervalos de tiempo definidos, colocando dichas muestras bajo refrigeración hasta su análisis. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Cuantificación de OTA. Con el fin de cuantificar la OTA, se utilizó un equipo HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity. La columna utilizada es de fase reversa C-18 (apolar hidrófoba) ZORBAX Eclipse Plus, de 100 mm de longitud, con un diámetro de 4,6 mm y el tamaño de partícula de la fase estacionaria es 3.5 micras. Se utiliza un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 333 nm y una de emisión de 460 nm. Como fase móvil se utilizan agua/acetonitrilo/ácido acético (49%/50%/1 %), con un caudal de 1,2 mL/min. Se inyectan 100 µL de muestra.

Espectro de absorción. Para la obtención del espectro de absorción de OTA se preparó una solución de 50 mg/L, realizándose un barrido de longitudes de onda entre 200 y 600 nm con un espectrofotómetro Helios Gamma (Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso.

pH. El pH de las muestras se midió con un pH-metro Crison micropH 2000 (Crison Instruments, S.A., Alella, España).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se muestra el espectro de absorción de una solución de OTA (50 mg/L). Se observa que existe un pico entre 300 y 400 nm. Si se observa el espectro de emisión de la lámpara, existen picos que se encuentran en este intervalo de longitudes de onda, lo que indica que la OTA quedará afectada por la emisión de esta lámpara.

En la Figura 3 se muestra la evolución de la concentración relativa (C/C_0) de OTA con el tiempo de irradiación, para diferentes temperaturas de tratamiento. Se observa que a 15°C, al cabo de 12 minutos de irradiación se obtiene una degradación de aproximadamente el 83% del contenido inicial de OTA. El aumento de temperatura favorece la degradación de OTA de modo que puede obtenerse una degradación total de OTA a los 10, 9 y 6,5 minutos de tratamiento para las temperaturas de 25, 35 y 45°C, respectivamente.

Para las soluciones acuosas de OTA a pH=4, se ha observado que los tiempos de degradación son bastantes más altos, de modo que se necesitan aproximadamente 70 minutos para degradar la OTA, trabajando a temperaturas de 15, 25 y 35°C. Sin embargo, cuando la temperatura de tratamiento se elevó a 45°C, para degradar completamente la OTA se necesitaron unos 40 minutos de tratamiento.

La evolución de la concentración de OTA con el tiempo de irradiación muestra una disminución que podría ajustarse a una caída exponencial. Es por ello que se ha supuesto un modelo cinético de primer orden, de modo que la variación del contenido de OTA con el tiempo de irradiación puede ajustarse a una ecuación del tipo:

$$C = C_0 \exp(-k t)$$

en la que C y C_0 son las concentraciones de OTA a un tiempo determinado y a tiempo cero, respectivamente, t es el tiempo de irradiación y k la constante global de degradación fotoquímica. Cabe mencionar que en esta constante se incluye la energía absorbida por la disolución. En la Tabla 1 se muestran los parámetros del ajuste para las soluciones a pH 4 y 7. Tanto los estimados de los parámetros como el ajuste han resultado significativos a un nivel

de confianza del 95%. Se observa que, para los dos pH ensayados, las constantes globales de fotodegradación tienden a aumentar con la temperatura de tratamiento, lo que indica que un tratamiento fotoquímico asociado a una temperatura suave puede favorecer la degradación de OTA. Asimismo, se observa que las constantes cinéticas son superiores a pH = 7, lo que supone que la fotodegradación de OTA es más favorable en medios acuosos neutros que ácidos.

CONCLUSIONES

Los tratamiento fotoquímicos con radiación UV pueden degradar la OTA en solución acuosa, habiéndose observado que esta degradación se ve favorecida por un aumento de la temperatura de tratamiento. Asimismo, se ha observado que la fotodegradación de OTA es más favorable en medios acuosos neutros que ácidos.

BIBLIOGRAFÍA

Covarelli, L.; Beccari, G.; Marini, A.; and Tosi, L. (2012). A review on the occurrence and control of ochratoxigenic species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control*, 26, 347-356.

Falguera, V.; Pagán, J.; and Ibarz, A. (2011). Effect of UV radiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 115-119

Lasram, S.; Oueslati, S.; Mliki, A.; Ghorbel, A.; Silar, P.; and Chebil, S. (2012). Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. *Food Control*, 25, 75-80

Wafa, E W, Yahya, R.S.; Sobh, M.A.; Eraky, I.; El-Baz, M.; El-Gayar, H.A.M.; Betbeder, A.M.; and Creppy, E.E. (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: A preliminary study. *Human & Experimental Toxicology*, 17, 124-129

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España por la ayuda recibida en el proyecto CTQ2011-26569.

Tabla 1.- Parámetros de la ecuación de primer orden para la fotodegradación de OTA a pH 4 y 7, a diferentes temperaturas de trabajo.

pH	<i>T</i> (°C)	<i>O. Origen</i>	<i>k</i> x10 ² (min ⁻¹)	R ²
4	15	0,898 ± 0,018	4,96 ± 0,04	0,9988
4	25	0,958 ± 0,017	5,43 ± 0,06	0,9974
4	35	0,889 ± 0,019	5,47 ± 0,05	0,9984
4	45	0,990 ± 0,0023	9,52 ± 0,09	0,9901
7	15	1,008 ± 0,003	17,16 ± 0,02	0,9996
7	25	1,002 ± 0,002	39,78 ± 0,01	0,9999
7	35	1,047 ± 0,009	48,48 ± 0,02	0,9996
7	45	1,123 ± 0,018	81,78 ± 0,03	0,9966

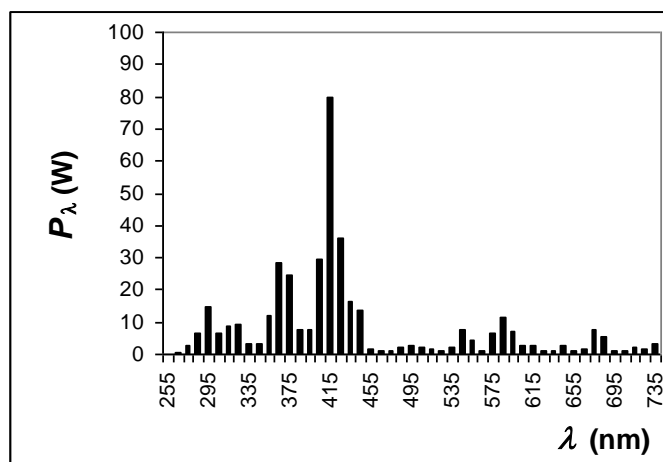


Figura 1. Espectro de emisión de la lámpara Philips HPM-12

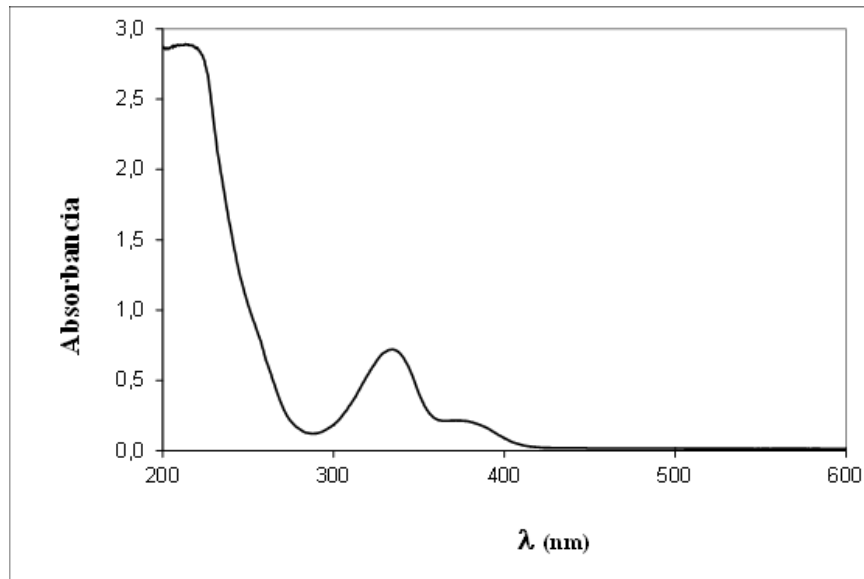


Figura 2. Espectro de absorción de una solución acuosa de OTA (50 mg/L)

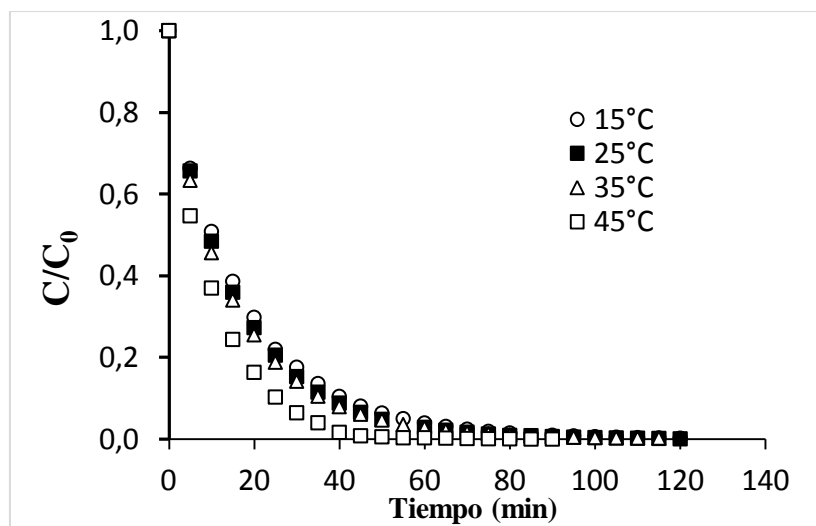


Figura 3. Evolución del contenido en OTA con el tiempo de irradiación, para pH=7.

MODELIZACION DE LA MIGRACION ESPECIFICA DE BPA DESDE FILMS DE POLICARBONATO

M.J.Galotto¹, C. Ramirez¹, G. Guerrero², A. Torres¹, J. Romero², A. Guarda^{1,3}.

¹: Universidad de Santiago de Chile. Laboratorio de Envases LABEN-CHILE. Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología, Obispo Umaña 050, Santiago, Chile.

²: Universidad de Santiago de Chile. Laboratorio de Procesos de Separación por Membranas (Labprosem), Dpto de Ingeniería Química.

³: Universidad de Santiago de Chile. Dpto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

E-mail: maria.galotto@usach.cl.

RESUMEN

El policarbonato (PC) es un termoplástico amorfo, polar, fabricado a partir de reacciones de policondensación entre el bisfenol A (BPA) y el carbonato de difenilo, en atmósfera de gas inerte (nitrógeno) a temperaturas comprendidas entre los 180° y 300°C. Presenta una buena resistencia al impacto, transparencia, estabilidad dimensional, buen aislamiento y buena resistencia al calor, y se utiliza para la fabricación de envases de alimentos. El BPA, componente del PC se libera del mismo durante el tiempo que el material de envase está en contacto con el alimento. Este actúa como un disruptor endocrino estrogénico, provocando problemas en el sistema reproductor.

En el presente trabajo se realizó un estudio teórico-experimental del proceso de liberación del BPA desde películas de policarbonato hacia un simulante de alimento (etanol 50%). Para ello, se prepararon películas de policarbonato, con diferentes concentraciones de bisfenol A. El estudio del proceso de migración permitió determinar los parámetros termodinámicos ($K_{P/SA}$) y de transporte (D_P) involucrados en el proceso de transferencia de masa, utilizando como base un modelo matemático desarrollado. En los resultados obtenidos, se observó que hasta las 70 horas de contacto envase-alimento, el proceso de migración del BPA puede describirse por la difusión del migrante a través del polímero, proceso regido por la Ley de Fick, mientras transcurrido este tiempo, se produce una hidrólisis superficial del polímero, la que se traduce en un aumento progresivo de la concentración de BPA en el simulante.

INTRODUCCION

El policarbonato es un copolímero, termoplástico, de condensación y amorfo, formado por dos monómeros (bisfenol y carbonato de difenilo), que se comporta de manera plástica y dúctil (figura 1).

El Bisfenol A o 4,4'-(propano-2,2-diil) difenol, es un monómero plástico que es utilizado ampliamente en la industria de los polímeros para la producción de resinas fenólicas, poliacrilatos y poliésteres, así como también para resinas epoxy y como monómero del policarbonato. En los últimos años, diversos estudios han señalado que el BPA posee efectos adversos sobre la salud humana, tales como actuar como un disruptor endocrino, potencial cancerígeno, que puede causar desordenes reproductivos, diabetes, obesidad y problemas cardiovasculares. Es por esta razón que Canadá en el año 2008 y la Unión Europea en el 2011 prohibieran el uso de BPA para la utilización en biberones, puesto que los bebés son quienes más se encuentran expuestos a la toxicidad de este compuesto.

Tanto la velocidad como la concentración de BPA que puede ser transferida desde el envase hacia el alimento pueden variar según las condiciones a las cuales este expuesto el PC (Mercea, 2009, Hoekstra y Simoneau, 2013), por lo que estos factores deben considerarse al momento de realizar estudios competentes a este compuesto. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar e implementar una metodología teórica-experimental para describir la transferencia de masa en el proceso de migración específica de BPA en films de policarbonato en su condición de material base de recipientes para alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Con objeto de modelizar la migración específica de Bisfenol A desde films de policarbonato a un simulante de alimento, el estudio contempló diferentes etapas. En una primera etapa se elaboraron films de policarbonato según el método de casting los que posteriormente se caracterizaron en cuanto a sus propiedades térmicas. Con los films obtenidos se realizaron los ensayos de migración específica de BPA, para los parámetros termodinámicos ($K_{P/SA}$) y de transporte (D_p) involucrados en el proceso de transferencia de masa del BPA, utilizando como base el modelo matemático desarrollado y validado en trabajos anteriores (Galotto y col., 2011a, Galotto y col., 2011b), con modificaciones.

Elaboración de los films.- La elaboración de los films de policarbonato se realizó según el método de casting (Siemann, 2005). Se preparó una solución de PC al 10%, en 200 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), agitándose durante 1,5 horas. Posteriormente, se agregó Bisfenol A

(Sigma Aldrich) en concentraciones de 5000 mg de BPA por kg de PC, 7500 mg/kg, 10000 mg/Kg y 15000 mg/kg. Las soluciones se vertieron en placas de vidrio y se llevaron a una estufa a 40°C durante 15 horas, al término de las cuales se extrajeron los films de las placas de vidrio.

Determinación de la concentración efectiva de BPA en los films.- Se determinó la cantidad máxima de BPA que potencialmente podría migrar hacia el simulante. Se pesaron 0,5 g de una muestra de los film de policarbonato elaborados, a los que se les agregaron 20 mL de diclorometano, 100 mL de acetona, y 10 mL de acetonitrilo, la solución obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Su cuantificación se llevó a cabo mediante un equipo HPLC Hitachi Elite LaChrom, con una columna C-18 Lichrospher (250mm x 4,6 mm d.i.) con detector de arreglo de diodo (DAD), a 35°C de temperatura del horno, con un flujo de 1 mL/min, y utilizando como fase móvil una solución de 50% de acetonitrilo en agua.

Determinación de la Migración específica de BPA.- Se determinó la migración específica del BPA de acuerdo a las normas EN 1186-1 y EN 1186-9, utilizándose el simulante alimenticio D1. El ensayo se realizó a 40°C para los films elaborados con distintas concentraciones de BPA. Durante el proceso de migración, se realizaron extracciones de muestras, a distintos intervalos de tiempo, de 1mL del simulante que permaneció en contacto con el film, la que posteriormente fue analizada en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

Determinación del Coeficiente de Partición del BPA.- Para el cálculo del coeficiente de partición (o de reparto), se utilizó la ecuación 1, la cual define este coeficiente como el cociente entre la concentración de migrante en el polímero y la concentración de migrante en el simulante, ambos en estado de equilibrio. Para esto es necesario hacer uso de un balance de masa de la concentración del migrante que se encuentra en el polímero y el simulante.

$$K_{P/SA} = \frac{C_m^P(x, t = \infty)}{C_m^{SA}(x, t = \infty)/\rho_{etanol}} \quad (1)$$

Donde:

$C_m^P(x, t = \infty)$: Concentración de BPA en el polímero en estado de equilibrio [Kg/m³];
 $C_m^P(x, t = 0)$: Concentración de BPA que inicialmente se encuentra en el polímero [Kg/m³];
 $C_m^P(x, t = \infty)$: Concentración de BPA que se encuentra en el simulante en estado de equilibrio [Kg/m³]; V_{SA} : volumen de simulante [m³]; m_p : masa de polímero [Kg]; $K_{P/SA}$: Coeficiente de partición [adimensional]; ρ_{etanol} : densidad del etanol [Kg/m³].

Determinación del Coeficiente de Difusión del BPA en la matriz polimérica.- Conocido el coeficiente de partición y los valores de concentración inicial de BPA y de la concentración de éste en el tiempo (resultados experimentales de migración específica), se resolvió el modelo matemático propuesto por Galotto y col. (Galotto y col., 2011b, Galotto y col., 2011a) para un film monocapa, para así determinar el coeficiente de difusión del BPA en el polímero (D_p). Las concentraciones de BPA en el seno del polímero y de la fase simulante fueron recalculados por medio de las siguientes ecuaciones:

$$C_m^P(x, t + \Delta t) = \frac{(V_P \cdot C_m^P(t) - 2 \cdot J_I \cdot A \cdot \Delta t)}{V_P} \quad (2)$$

$$C_m^{SA}(x, t + \Delta t) = \frac{(V_P \cdot C_m^{SA}(t) + 2 \cdot J_{II} \cdot A \cdot \Delta t)}{V_{SA}} \quad (3)$$

Donde: V_P : volumen del polímero, [m³]; V_{SA} : volumen del simulante, [m³]. Los cálculos fueron desarrollados por medio de un programa desarrollado en Matlab 7.14. Las simulaciones usaron valores obtenidos experimentalmente del coeficiente de reparto, $K_{P/SA}$.

Determinación de la constante cinética de reacción del BPA.- El PC en contacto con agua produce sufre una reacción de hidrólisis (Bair y col., 1981, Wright, 2001, Deirram y Rahmat, 2012), por lo que la cinética de liberación del BPA desde el PC no tendría lugar sólo por un mecanismo difusivo.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presenta la caracterización de los films de PC elaborados con distintas concentraciones de BPA

El film de PC blanco (sin concentración añadida de BPA) tiene una concentración efectiva inicial de 307 mg/kg, lo que indica que parte del BPA dispuesto en la cadena del PC fue de alguna forma liberado de esta. Este resultado está acorde a lo planteado en trabajos anteriores, en los cuales se encontró un rango de variación de esta concentración de entre 140 mg/kg a 600 mg/kg (Kawamura y col., 1998, Hoekstra y Simoneau, 2013). En los films a los que se les agregó BPA, la concentración encontrada fue menor a la que realmente se agregó, lo que puede explicar por el hecho que si bien el procedimiento es específico para la cuantificación de BPA, puede ocurrir que no todo el BPA quede en solución, debido a que no todo el film logra ser disuelto por el diclorometano.

La migración específica del BPA en el tiempo, desde films de PC con distinta concentración inicial de BPA se presenta en la figura 2. El proceso de migración del BPA es extremadamente lento en comparación a otros sistemas, como el presentado por Galotto y col. (Galotto y col., 2011b). Al término de los ensayos de migración, aproximadamente a las 1300 horas de ensayo de migración para el caso del film de PC sin BPA y las 745 horas para el caso de los films de PC con distintas concentraciones de BPA, se puede observar que la concentración de BPA en el simulante de alimento no alcanzó un equilibrio, sino que continuó aumentando, indicando que la difusión de este compuesto migrante no sigue el comportamiento esperado, es decir, no se ajusta a un modelo de Fick de difusión.

En general los modelos que permiten describir la migración específica de componentes desde los materiales plásticos se basan en las leyes de Fick, sin embargo la migración del BPA no cumple con estas leyes, por lo que se estudió la adición de un término cinético de reacción a la ecuación (ec 4), mediante el cual fuese posible encontrar el modelo adecuado para la migración de BPA desde los films de policarbonato (figura 3). Esto se fundamenta en el hecho de que además de existir una difusión, se genera BPA debido a las reacciones involucradas en el contacto del policarbonato con agua. En la tabla 2, se incluyen los valores de coeficiente de difusión, coeficiente de partición y de hidrólisis obtenidos por ajuste del modelo, donde puede observarse que el coeficiente de difusión disminuye al incrementar la concentración inicial del BPA en el film, mientras que a medida que se incrementa la concentración inicial de BPA en el film disminuye el coeficiente de partición. El coeficiente cinético, k_{hyd} , permaneció aproximadamente constante, estimándose valores entre $2,25 \cdot 10^{-5}$ y $5,50 \cdot 10^{-5}$ [$\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$] al variar la concentración de los films

$$C_m^P(x, t + \Delta t) = \frac{(V_P \cdot C_m^P(t) - 2 \cdot J_I \cdot A \cdot \Delta t)}{V_P} + k_{hyd} \cdot \Delta t \quad (\text{ec4})$$

CONCLUSIONES

En las curvas de cinética de liberación de BPA se aprecia que no se alcanza un equilibrio en el proceso, por lo que la ley de Fick por sí sola no es suficiente para explicar el comportamiento del proceso de migración de BPA desde films de PC. Modificando el modelo de transferencia de masa basado en la Ley de Fick surge una ecuación empírica que tiene su base en la cinética de reacción de hidrólisis del PC en contacto con agua, y que considera su

cinética de reacción. Así, se confirmaría una formación significativa de BPA en el seno del polímero, el cual es liberado en el tiempo. La cinética de formación de BPA en los films de PC durante el proceso de migración, evaluado en periodos cortos de contacto de no más de 70 horas, es de orden cero respecto del BPA. Esta cinética de formación abarca todas las reacciones intermedias que sufre el PC para formar BPA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este estudio al proyecto FONDEF-CONICYT D09I1043 y al proyecto FONDECYT 1120368: "Study of the specific migration of Bisphenol (an endocrine disrupting agent), from food packaging materials".

REFERENCIAS

- Bair, H. E., Falcone, D. R., Hellman, M. Y., Johnson, G. E. y Kelleher, P. G. 1981. Hydrolysis of polycarbonate to yield BPA. *Journal of Applied Polymer Science*, 26, 1777-1786.
- Deirram, N., Rahmat, A. R., Rashidi, S., Ghanbari, T. y Moradpour, M. 2012. Hydrolysis degradation of polycarbonate under microwave irradiation by using design of experiment software. *Scientific Research and Essays*, 7, 3399-3405.
- Galotto, M. J., Torres, A., Guarda, A., Moraga, N. y Romero, J. 2011a. Experimental and theoretical study of LDPE: Evaluation of different food simulants and temperatures. *Food Research International*, 44, 3072-3078.
- Galotto, M. J., Torres, A., Guarda, A., Moraga, N. y Romero, J. 2011b. Experimental and theoretical study of LDPE versus different concentrations of Irganox 1076 and different thickness. *Food Research International*, 44, 566-574.
- Hoekstra, E. J. y Simoneau, C. 2013. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 386-402.
- Kawamura, Y., Koyama, Y., Takeda, Y. y Yamada, T. 1998. Migration of bisphenol A from polycarbonate products. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 39, 206-212.
- Mercea, P. 2009. Physicochemical Processes Involved in Migration of Bisphenol A from Polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*, 112, 579-593.

Tabla1.- Caracterización de los films elaborados con distintas concentraciones de BPA.

Muestra	Peso del film [mg]	Espesor [μm]	Concentración efectiva [mg/kg]	% de incorporación
PC + 0 mg/kg	696,4 \pm 51	111 \pm 8	307 \pm 3	-
PC + 5000 mg/kg	653,4 \pm 49	106 \pm 12	4449 \pm 115	89
PC + 7500 mg/kg	808,7 \pm 71	130 \pm 27	6610 \pm 205	88
PC + 10000 mg/kg	685,1 \pm 78	107 \pm 15	8431 \pm 242	84
PC + 15000 mg/kg	691,4 \pm 61	116 \pm 16	13172 \pm 241	88

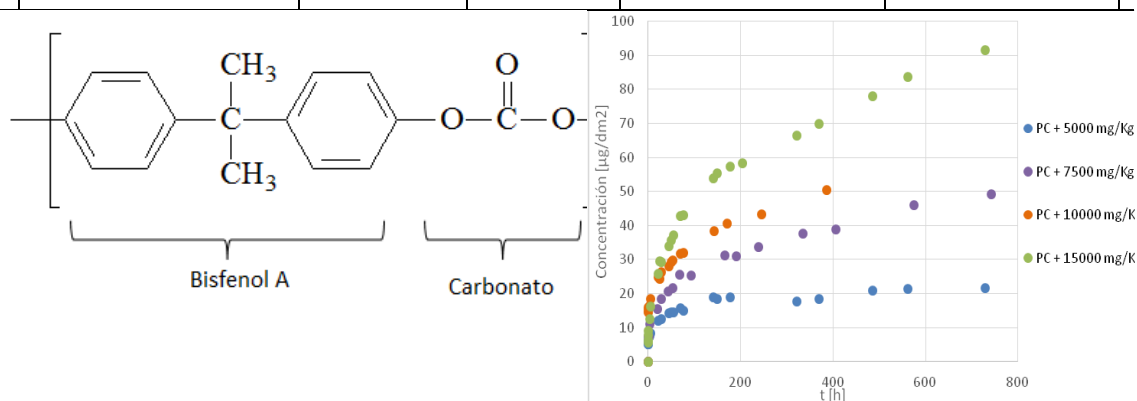


Figura 1.- Estructura química del policarbonato.

Figura 2.- Migración de BPA desde film de PC.

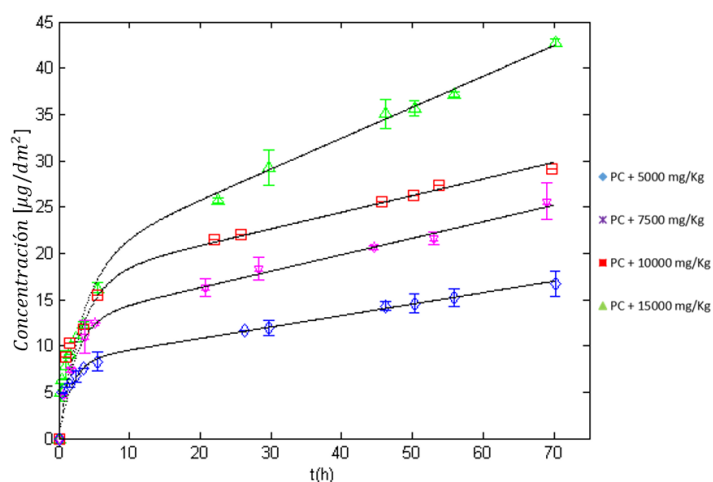


Figura 3.- Ajuste del modelo considerando cinética de orden cero en la hidrólisis del BPA para films de PC con diferentes concentraciones iniciales de BPA

Tabla 2.- Coeficientes termodinámicos, de transporte y cinéticos en films de PC con distintas concentraciones de BPA, considerando orden cero de reacción.

Muestra	k_{hyd} [kg/m ³ ·s]	$K_{P/SA}$	D_p [m ² /s]	RSME [%]
PC + 5000ppm	2,25E-05	170000	2,00E-15	0,011
PC + 7500ppm	3,20E-05	168000	1,20E-15	0,020
PC + 10000ppm	3,00E-05	156000	7,00E-16	0,020
PC + 15000ppm	5,50E-05	154000	6,00E-16	0,025

DESARROLLO DE UN FILM ANTIMICROBIANO FRENTE BOTRYTIS OBTENIDO POR IMPREGNACION CON CO₂ SUPERCRITICO.

Guarda^{1,2}, A. Torres¹, A. López^{1,3}, J. Romero³, M.J. Galotto¹.

¹: Universidad de Santiago de Chile. Laboratorio de Envases LABEN-CHILE. Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología, Obispo Umaña 050, Santiago, Chile.

²: Universidad de Santiago de Chile. Dpto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

³: Universidad de Santiago de Chile. Dpto de Ingeniería Química.

E-mail: abel.guarda@usach.cl.

ABSTRACT

El envase de alimentos tradicionalmente se ha utilizado con las funciones específicas de contener y proteger a los alimentos, buscando siempre la máxima inercia entre envase y el producto. Sin embargo en los últimos años ha habido un cambio en el paradigma del envasado de alimentos. Ahora ya no solo se busca que el envase contenga y proteja al producto sino que durante el tiempo que el envase está en contacto directo con el alimento, este ejerza una función positiva sobre el alimento envasado a través de un proceso de interacción beneficiosa para el alimento. Aparecen entonces los denominados envases activos. Dentro de los envases activos los que están presentando un mayor interés son los denominados envases antimicrobianos que inhiben el desarrollo de bacterias y hongos en la superficie del alimento. En el presente trabajo se ha desarrollado un envase activo antimicrobiano frente a *Botrytis*, utilizando un compuesto natural volátil, el cual ha sido incorporado a un film de polietileno de baja densidad mediante un proceso de impregnación por fluido supercrítico, como alternativa a los procesos tradicionales de extrusión o recubrimiento de films. La impregnación del film se realizó a tres presiones diferentes 170, 190 y 220Bar. Los resultados obtenidos por espectroscopia de infrarrojo permitieron confirmar la incorporación del compuesto natural en los films. La capacidad antimicrobiana frente *Botrytis* fue confirmada frente a un control de film de polietileno de baja densidad sin impregnar y frente a un control con etanol como antifúngico. Los resultados confirmaron la capacidad de inhibición del crecimiento de *Botrytis* en los films impregnados.

INTRODUCCION

Los envases activos son aquellos envases que además de contener y proteger alimento ejercen un efecto adicional durante el tiempo que el alimento está en contacto directo con el envase, ya que estos materiales de envase están diseñados para que absorban sustancias

indeseables del interior del envase, o liberen sustancias del plástico al medio que tengan un efecto positivo y beneficioso sobre el alimento envasado. Dentro de los sistemas que absorben, se pueden mencionar aquellos que atrapan oxígeno, humedad, etileno y dióxido de carbono, entre otros, mientras que dentro de los sistemas que liberan sustancias se encuentran aquellos que emiten compuestos antimicrobianos y/o antioxidantes, aditivos, etc (Galet 2010, Lim 2011, Fernández 2012). De estos envases son los envases antimicrobianos los más prometedores puesto que gracias a su sistema de inhibición de actividad microbiana, puede alargar el tiempo útil del alimento (Sadaka, et al. 2013).

Son muchos los compuestos con capacidad antimicrobiana, tales como metales (plata, cobre), ácidos y gases inorgánicos, enzimas, agentes quelantes, y entre los que mas se están utilizando actualmente se encuentran los aceites esenciales, los que tienen un interés particular porque son sustancias GRAS.

Uno de los principales retos en la elaboración de envases activos, radica en la forma de incorporación del propio componente activo en el envase. Mientras que tradicionalmente se incorporaban estos compuestos en sachets, en el último tiempo se intenta su incorporación en la propia matriz polimérica. En este sentido, se están incorporando compuestos activos en el propio proceso de extrusión y en otros casos se incorporan al polímero en forma de recubrimiento. Sin embargo ambos métodos presentan inconvenientes y dificultades.

En el presente trabajo se aborda un nuevo sistema de incorporación de agentes activos en estructuras plásticas para la elaboración de envases para alimentos, la Impregnación por Fluidos Supercríticos, utilizando en nuestro caso el CO₂ supercrítico. Este presenta como ventajas el ser un compuesto considerado GRAS por la FDA, no ser tóxico, relativamente económico, fácil de llegar a sus puntos críticos de temperatura (31°C) y presión (7,38 mPa) (Castro et al., 1993). El proceso de impregnación incluye tres principales pasos: en primer lugar, se expone el polímero a SC-CO₂ por un período de tiempo, hasta que se establezca el equilibrio entre el film y el fluido. En segundo lugar, se incorpora el agente activo al polímero y posteriormente se libera el CO₂ de una manera controlada, de manera que el agente activo quede atrapado en la red polimérica (Tomasko et al., 2003).

El objetivo del presente trabajo fue la incorporación de un agente activo (compuesto natural volátil) con propiedades antimicrobianas frente a *Botrytis cinerea* en una matriz de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE).

MATERIALES Y METODOS

Proceso de impregnación del compuesto activo natural volátil en films de LLDPE mediante uso de CO₂ supercrítico.- El proceso de impregnación se llevo a cabo en una celda de acero de 100 mL de volumen interno, en la que se colocó un vial con 1 mL del compuesto activo, y 8 films de LLDPE de 25 cm² los cuales fueron dispuestos a lo largo de la celda, separados unos de otros con el fin de mejorar la superficie que se encuentra en contacto con el gas. La temperatura de la celda constante (40°C), y se procedió a inyectar el CO₂. El proceso de impregnación se llevó a cabo a 3 presiones 170, 190 y 220 bar, durante tres horas. Una vez cumplido este tiempo se procedió a descomprimir la celda liberando el gas a la atmósfera en condiciones ambientales.

Determinación de la concentración de agente activo incorporado en los films tras el proceso de impregnación.- A los films impregnados (0,5 g) se les agregó 40 ml de etanol y se sonificaron durante 10 minutos en un sonicador Elma modelo S10H, Lab-tech, Chile. Tras lo cual se aforo el matraz y se tomaron muestras las que se analizaron por cromatografía de gases (cromatógrafo PerkinElmer modelo Clarus 500) equipado con una columna Equity 5 Fused silica capillary de dimensiones 30 m por 0,32 mm por 0,25 µm de diámetro. El barrido de temperatura utilizado fue de 40 a 220°C a una velocidad de 10°C/min, con un tiempo de retención de 37 minutos por cada muestra. Se utilizó un detector fotométrico de llama (FID) el cual se programó a 220°C. Se hicieron extracciones y determinación del compuesto activo en los films a tiempos 0, 7 y 14 días, para las 3 condiciones de presión (170, 190 y 220 Bar). Este proceso se realizó por triplicado.

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.- Con el objetivo de confirmar la incorporación del agente activo en los films, se realizó el análisis de espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), utilizándose un equipo FTIR marca Bruker modelo ALPHA con accesorio ATR (reflexión total atenuada). Las muestras fueron evaluadas 6 veces, ambos extremos, al medio y por ambas caras del film.

Determinación de la capacidad antimicrobiana de los film de PELBD impregnados. La evaluación de la capacidad antimicrobiana que presentan los films impregnados se realizaron a partir de la determinación de la medida del halo de crecimiento en placas Petri con medio rico APD. Estas placas fueron dispuestas de manera que no estuvieran en contacto directo con los films, es decir, que se produjese la inhibición del crecimiento del hongo por medio de la atmósfera creada por el film. Para ello, en una placa de 5,3 cm de diámetro con medio APD se inoculó el microorganismo *Botrytis cinerea*. Luego, esta placa fue adherida a otra placa Petri

de 9 cm de diámetro con ayuda de cinta de doble contacto; en la tapa de la placa Petri de 9 cm de diámetro se colocó el film impregnado; posterior a esto se juntaron ambas partes y se sellaron con ayuda de cinta adhesiva y parafilm. Este proceso se repitió 8 veces. El estudio se llevo a cabo utilizando film impregnado con etanol (EtOH) como control, 600 μL en papel filtro, y un film impregnado con agua destilada 600 μL en papel filtro, así como se analizo también un film no impregnado. Las placas se llevaron a cámara de 0°C durante 20 días, trascurrido este tiempo las placas se mantuvieron a 20°C durante 3 días, tras lo cual se midió el halo de crecimiento del hongo.

RESULTADOS

En la figura 1 se presentan los espectros FTIR de las muestras impregnadas, con el objetivo de comprobar la presencia del compuesto activo en los films. Claramente se observa un peak entre los 1500 a 1700 cm^{-1} , característico de la presencia de un grupo funcional de cetona (Silverstein y col 1981) y otro peak a 3400 cm^{-1} también correspondiente a la presencia del compuesto activo. También se observa una leve perturbación en la línea correspondiente al polietileno control (sin compuesto activo), lo que puede ser atribuido al efecto plastificante del CO_2 supercrítico sobre el polietileno, este efecto es capaz de perturbar la lectura del FTIR.

Tras la confirmación por IRFT de la incorporación del agente activo se cuantificó cuanto se había impregnado en los films sometidos a distintas condiciones de proceso (tabla 1). Se observa claramente un incremento en la cantidad de compuesto activo impregnado a medida que se incrementa la presión durante el proceso de impregnación, hasta llegar a una presión de 190Bar, sin embargo a una presión de 220 Bar la incorporación del principio activo decae significativamente. Este hecho puede ser atribuido al incremento de la solubilidad del compuesto activo en el solvente, CO_2 , a medida que se incrementa la presión, lo que provocaría la perdida del principio activo durante el proceso de despresurización de la celda (Varona y col, 2011). Al estar trabajando con un principio activo volátil, es esperable que a medida que transcurre el tiempo de elaborado el material se observa una disminución de la concentración del compuesto en el mismo. Esta disminución a los 14 días fue del 42% en el caso de las muestras impregnadas a 150 Bar, de un 84% en las muestras impregnadas a 170 bar, de un 75% en las muestras impregnadas a 190Bar y del 92% en las muestras impregnadas a 220 Bar. Sin embargo todas las muestras presentaron concentraciones de agente activo superiores a la concentración mínima inhibitoria requerida para la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* (Perez, 2012).

Efecto antimicrobiano de los films impregnados.

En las figuras 2 y 3 se presentan el comportamiento de los films impregnados bajo distintas condiciones de presión frente a los controles de EtOH y film sin impregnar, tras almacenamiento de los mismos a 0°C y tras 3 días a 20°C. Como se observa en ambos casos los films impregnados inhiben totalmente el crecimiento del hongo, independientemente de cual sea la condición de presión durante el procesamiento. En este caso los films presentaron un comportamiento similar al de los films impregnados con EtOH, reconocido compuesto fungicida. En la figura 3, se confirma el mismo comportamiento observado, de forma tal que tras dejar el hongo en condiciones óptimas para su crecimiento se observa inhibición total del mismo, confirmando el efecto antimicrobiano de los films desarrollados.

CONCLUSIONES

El proceso impregnación por fluido supercrítico permitió la incorporación en una matriz plástica de polietileno lineal de baja densidad de un compuesto activo natural con propiedades antimicrobianas. Los films obtenidos mostraron actividad antimicrobiana frente a *Botrytis cinérea* tras almacenamiento a 0°C durante 30 días y a 20°C durante 3 días.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este estudio al proyecto CEDENNA BASAL y proyecto CORFO Centro de Excelencia Wageningen-Chile: “*Develop a superior global fresh fruit supply chain by optimization of the postharvest pre transport phase, focus on avocado and table grapes*”.

REFERENCIAS

- Pérez, G. (2013). Incorporación de CNV en films de polietileno lineal de baja densidad (PELBD) mediante impregnación con CO₂ supercrítico. Tesis para optar al Grado de Ingeniero en alimentos. Universidad de Santiago de Chile, Chile.
- Silverstein, R. M., Bassler, G. C., & Morrill, T. C. (1981). Spectrometric identification of Organic Compounds. In J. W. a. Sons (Ed.). New York .
- Torres, A.; Romero, J.; Macan, A.; Guarda, A.; Galotto, M.J. (2013). Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE film used for food packaging. *Journal of Supercritical Fluids* (aceptado).
- Varonaa, S., Rodríguez-Rojoa, S., Martínez, Á., Coceroa, M. J., & Duarte, C. M. M. (2011). Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. *The journal of supercritical fluids*, 58, 313-319 .

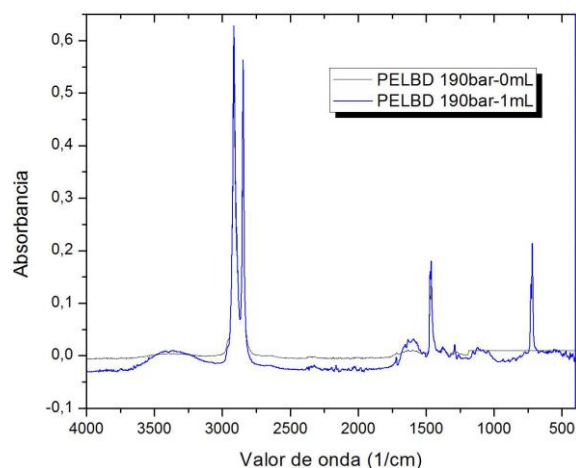


Figura 1.- Espectro FTIR de film control (PELBD 190 bar 0 ml) y film de polietileno impregnado (PELBD 190 bar 1 ml)

Tabla1.- Evolución de la concentración de agente activo impregnado en films

Días	Concentración Compuesto Activo (mg/Kg film)			
	150 Bar	170 Bar	190 Bar	220 Bar
0	3786±419	11892±72	23190±1736	6687±152
7	2967±11	3489±145	6811±457	584±57
1	2197±149	1897±150	5676±85	469±11

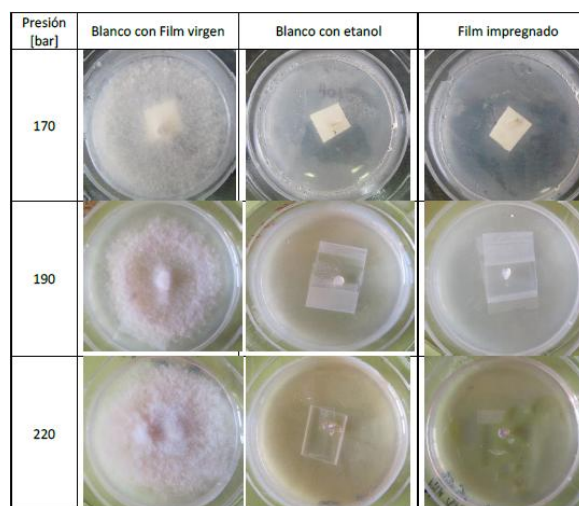


Figura 2.- Comportamiento de los films impregnados tras almacenamiento a 0°C durante 30 días.

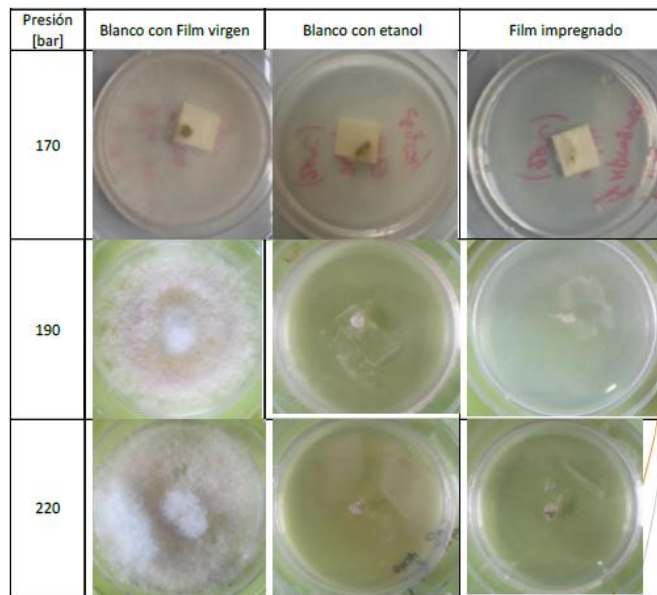


Figura 3.- Comportamiento de los films impregnados tras almacenamiento a 0°C durante 30 días y a 20°C durante 3 días.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL RECOCIDO Y CICLOS DE CALENTAMIENTO-ENFRIAMIENTO SOBRE LA ESTRUCTURA DE HIELOS DE SOLUCIONES DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES

C. Robles¹, F.L. Moreno^{1,2}, M.X. Quintanilla¹, Y. Ruiz^{*10}.

¹ Ingeniería de Producción Agroindustrial. Facultad de Ingeniería, Universidad de La sabana, km 7 vía autopista Norte, Chía, Colombia

² Doctorado en Biociencias. Universidad de La sabana, km 7 vía autopista Norte, Chía, Colombia.

*Corresponding author: ruth.ruiz@unisabana.edu.co, Tel. +5718615555 ext 25217

INTRODUCCIÓN

La congelación es un fenómeno importante en la industria de alimentos, este consiste en la cristalización y crecimiento de hielo a partir de un líquido subenfriado (Falguera, Aliguer, and Falguera 2012). Los cristales de hielo formados durante la congelación pueden variar su forma y tamaño dependiendo de diferentes variables como la velocidad de congelación, el nivel de subenfriamiento inicial de la solución, la naturaleza de la solución, la concentración de los solutos, principalmente (Kiani and Sun 2011; Singh et al. 2009). En operaciones realizadas a bajas temperaturas como la crioconcentración y la liofilización, la morfología del hielo puede afectar la eficiencia de las operaciones (Nakagawa, Maebashi, and Maeda 2009; Petzold and Aguilera 2009).

El recocado (etapa que ocurre en la maduración de los cristales) es el proceso de mantener (o exponer) un cristal de hielo de una solución, a una temperatura por debajo del punto de fusión durante un periodo de tiempo (Kubota 2011). Este tratamiento es realizado después de la etapa de congelación, calentando la muestra por encima de la temperatura de transición vítrea en un tiempo determinado, esto le confiere a la muestra una cierta homogeneización de los cristales de hielo, permitiendo la reorganización de la estructura cristalina formada inicialmente en el sistema (Hottot, Vessot, and Andrieu 2007).

Este tipo de cambios estructurales se han evaluado con diversas herramientas, en el caso de los alimentos, el análisis de imágenes permite cuantificar parámetros morfométricos de diferentes sistemas con el objetivo de caracterizarlos y evidenciar diferencias entre ellos (Aguilera 2005; Russ 2004).

Con el fin de evaluar el cambio en la morfología de los cristales de hielo, en el presente trabajo se utilizó la metodología de análisis de imágenes para analizar el efecto de los ciclos de enfriamiento-calentamiento y recocado, sobre la morfología de cristales de hielo en soluciones acuosas de café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para evaluar el cambio en la estructura del hielo se preparó una solución en agua destilada al 15% (P/P) en sólidos de café liofilizado, Buencafé Liofilizado de Colombia (Federación Nacional de Cafeteros, Colombia).

Tratamientos térmicos

Se sometieron 21 μ L de la solución a ciclos de enfriamiento-calentamiento y tiempos de recocido, como se observa en la tabla 1. La temperatura de la solución se controló por medio de una cámara de refrigeración (INSTECHCS321i). La solución se enfrió inicialmente hasta una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para posteriormente ser sometida a los tratamientos evaluados. Para el primer tratamiento la muestra se mantuvo a -20°C con recocido de 1 hora, en el segundo tratamiento la muestra se calentó hasta -5°C a $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sin recocido y el tercer tratamiento se calentó hasta -5°C a $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y a recocido de 1 hora. Finalmente para los tres tratamientos la muestra fue enfriada nuevamente hasta -20°C a $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La captura de imágenes de los cristales de hielo se realizó utilizando una cámara digital acoplada a un microscopio Nikon Eclipse Ti con un objetivo de 10X, la cámara de refrigeración se adaptó a la platina del microscopio.

Análisis de imágenes

Se tomaron imágenes en los diferentes puntos de los tratamientos con una resolución de 1280×960 píxeles y 20 ms de exposición, se evaluó la Dimensión Fractal de Textura (DFT) de cada punto observado por medio del *plugin* SDBC del software *ImageJ* (National Institute of Health, USA), tomando 9 *crops* (430×320 píxeles) para cada imagen obtenida. Adicionalmente, se obtuvieron los descriptores de forma (Área, Diámetro de Feret, Circularidad y Relación de Aspecto) de los cristales formados al final de los tratamientos (P4), por medio del software *ImageJ*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los ciclos de enfriamiento-calentamiento y recocido aplicados a las soluciones acuosas de café, se obtuvieron los siguientes resultados.

Perfiles de temperatura

Los perfiles de temperatura obtenidos durante la evaluación de los ciclos de enfriamiento- calentamiento y recocido se pueden observar en la figura 1, estos muestran las temperaturas y velocidades de los tratamientos, teniendo tiempos de evaluación de 80 min para el primero, 45 min para el segundo y 100 min para el tercero. Adicionalmente se muestran los puntos en los cuales fueron adquiridas las imágenes. El punto P1 representa el primer enfriamiento realizado en la muestra, el punto P2 muestra el aumento de la temperatura hasta estabilización térmica, el punto P3 representa al tiempo en el cual la muestra fue sometida a recocido y el punto P4 representa el enfriamiento final del tratamiento.

Análisis de imágenes

Las imágenes adquiridas en cada punto de los tratamientos evaluados se muestran en la figura 2, en estas se pueden observar los cambios que se presentaron al aplicar los ciclos de enfriamiento-calentamiento y recocido en la solución.

Para los tres tratamientos evaluados, en el primer punto del ciclo aplicado se observa una formación de múltiples cristales de minúsculo tamaño, lo que puede deberse al subenfriamiento inicial y a la velocidad a la cual sucedió la congelación en la muestra (Orrego Alzate 2008). En el segundo punto del ciclo se presenta el primer cambio en la morfología del cristal al aumentar la temperatura en la muestra, esto puede ser debido a que este crecimiento es controlado por la tasa de calor latente que se libera durante el cambio de fase y por la velocidad de transferencia de masa (Guillermo Petzold and Aguilera 2009). En el tercer punto del ciclo se puede observar el cambio ocurrido al aplicar el recocido a la temperatura de calentamiento por medio del aumento en el tamaño de los cristales formados inicialmente, esto puede ser debido a que el recocido permite la reorganización de la estructura cristalina formada inicialmente en el sistema (Hottot, Vessot, and Andrieu 2007), esta reorganización podría ser debida a que durante este tiempo se llevan a cabo fenómenos de transferencia de masa y calor, que permiten aumentar el tamaño de los cristales.

De acuerdo al análisis de DFT realizado, se pudo evidenciar que en el primer tratamiento no se presentan cambios entre las imágenes obtenidas, es decir que no existe una diferencia significativa ($\alpha=0,05$) en la textura de la imagen a pesar de exponer la muestra a un recocido a la misma temperatura de enfriamiento evaluada. Sin embargo, el segundo y tercer tratamiento, si presentaron diferencia significativa ($\alpha=0,05$) en la DFT al aplicar los ciclos de enfriamiento-calentamiento y recocido a una temperatura mayor que la de congelación, esto podría estar asociado a la influencia que ejerce la temperatura de tratamiento y recocido sobre

el movimiento de las partículas de hielo logrando una redistribución y cambio en la morfología del cristal de hielo (Li and Sun 2002).

Como se observa en la figura 2 la DFT obtenida al final de los tratamientos evaluados (P4), con valores de 2.1438 ± 0.0376 para T1, 2.1438 ± 0.0145 para T2 y 2.3933 ± 0.0180 para T3 presentaron diferencia significativa ($\alpha=0,05$) entre los datos, lo cual evidencia que los cristales de hielo formados se ven afectados por la temperatura de calentamiento y recocido.

Los descriptores de forma calculados en P4 se presentan en la figura 3 indicando el área, diámetro de Feret, circularidad y relación de aspecto de cada tratamiento. El diámetro de feret puede utilizarse para describir el cambio de forma de un objeto; la circularidad varía entre los valores 0.0 y 1.0, donde un valor de 1.0 indica un círculo perfecto y la relación de aspecto indica la proporción entre el ancho y alto del objeto evaluado.

De acuerdo a los parámetros evaluados se pudo evidenciar que la temperatura de calentamiento y el recocido afectan al tamaño del cristal (área y diámetro de feret), presentándose un aumento dentro de los tratamientos evaluados, además de la disminución en su circularidad y por tanto el aumento en su relación de aspecto, presentando los valores de la tabla 2.

CONCLUSIONES

La combinación de la temperatura de calentamiento y recocido afectan significativamente la DFT, evidenciándose un incremento en el tamaño del cristal obtenido y un cambio en la morfología del cristal aumentando su relación de aspecto y disminuyendo la redondez.

El análisis de imágenes es una herramienta útil para la evaluación, cuantificación y análisis de los cambios morfométricos y estructurales de los cristales de hielo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Universidad de La Sabana y COLCIENCIAS con el proyecto 1230521-28461, 2011.

REFERENCIAS

Aguilera, José Miguel. 2005. "Why Food Microstructure?" *Journal of Food Engineering* 67 (1-2) (March): 3–11. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.050. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877404003255>.

- Falguera, Víctor, Núria Aliguer, and Mercè Falguera. 2012. "An Integrated Approach to Current Trends in Food Consumption: Moving Toward Functional and Organic Products?" *Food Control* 26 (2) (August): 274–281. doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.051. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512000606>.
- Hottot, Aurélie, Séverine Vessot, and Julien Andrieu. 2007. "Freeze Drying of Pharmaceuticals in Vials: Influence of Freezing Protocol and Sample Configuration on Ice Morphology and Freeze-Dried Cake Texture." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 46 (7) (July): 666–674. doi:10.1016/j.cep.2006.09.003. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S025527010600208X>.
- Kiani, Hossein, and Da-Wen Sun. 2011. "Water Crystallization and Its Importance to Freezing of Foods: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 22 (8) (August): 407–426. doi:10.1016/j.tifs.2011.04.011. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224411000896>.
- Kubota, Noriaki. 2011. "Effects of Cooling Rate, Annealing Time and Biological Antifreeze Concentration on Thermal Hysteresis Reading." *Cryobiology* 63 (3) (December): 198–209. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.06.005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884689>.
- Li, Bing, and Da-Wen Sun. 2002. "Effect of Power Ultrasound on Freezing Rate During Immersion Freezing of Potatoes." *Journal of Food Engineering* 55 (3) (December): 277–282. doi:10.1016/S0260-8774(02)00102-4. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877402001024>.
- Nakagawa, Kyuya, Shohei Maebashi, and Koji Maeda. 2009. "Concentration of Aqueous Dye Solution by Freezing and Thawing." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 87 (5) (October): 779–787. doi:10.1002/cjce.20213. <http://doi.wiley.com/10.1002/cjce.20213>.
- Orrego Alzate, Carlos Eduardo. 2008. "Congelación." In *Congelación y Liofilización de Alimentos*, 1 – 43. Colombia: Orrego A.C.E.
- Petzold, Guillermo, and José M. Aguilera. 2009. "Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods." *Food Biophysics* 4 (4) (October 22): 378–396. doi:10.1007/s11483-009-9136-5. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11483-009-9136-5>.
- Russ, John C. 2004. *Image Analysis of Food Microstructure*. First. Boca Raton: CRC PRESS.
- Singh, Satish K., Parag Kolhe, Wei Wang, and Sandeep Nema. 2009. "Large-Scale Freezing of Biologics A Practitioner's Review, Part One: Fundamental Aspects." *BioProcess Technical*.

Tabla 1. Tratamientos evaluados en los ciclos de enfriamiento y calentamiento

TRATAMIENTO	Puntos de medición	T1	T2	T3
Temperatura enfriamiento	P1	-20 °C	-20 °C	-20 °C
Temperatura calentamiento	P2	-	-5 °C	-5 °C
Tiempo recocido	P3	1 h	0 h	1 h
Temperatura enfriamiento	P4	-	-20 °C	-20 °C

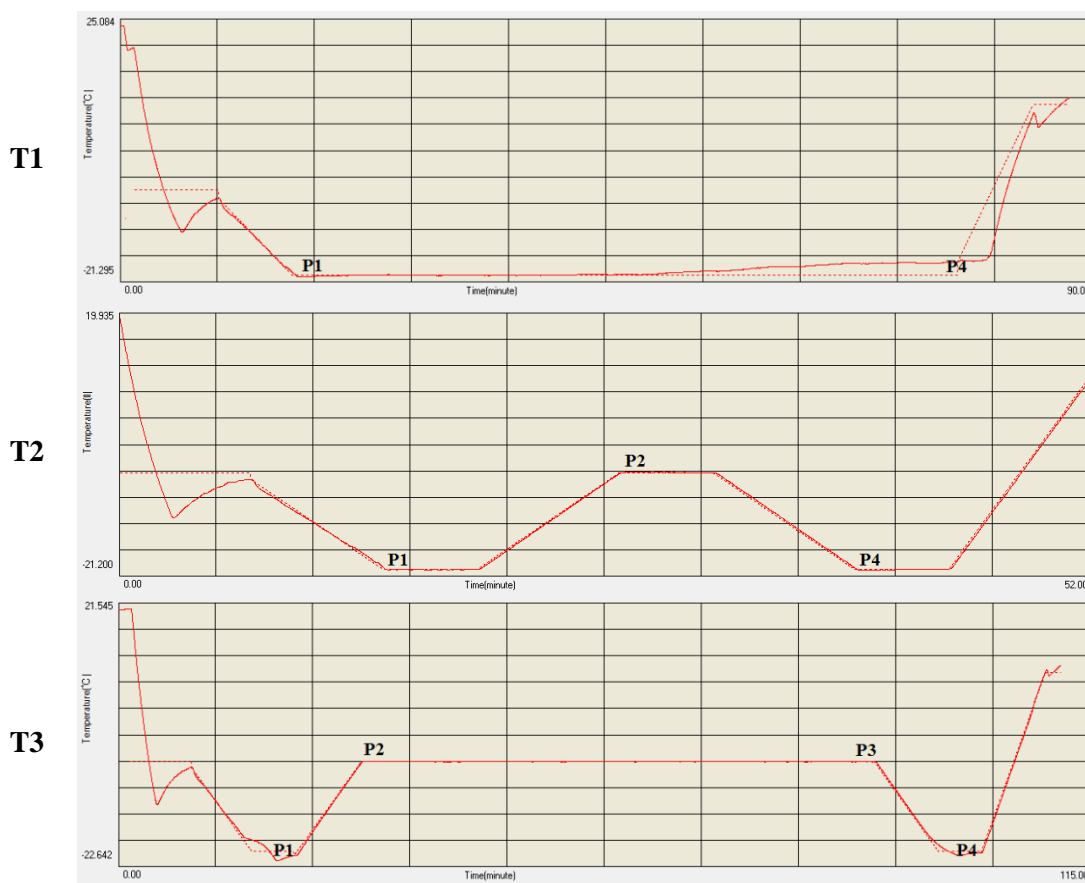


Figura 1. Perfiles de temperatura de los tratamientos




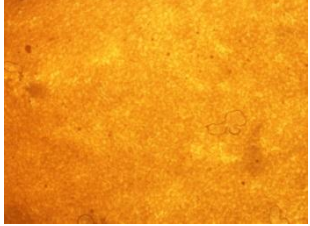

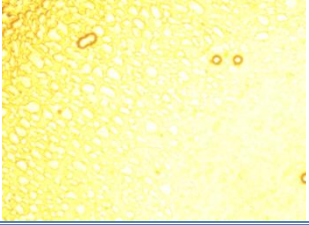
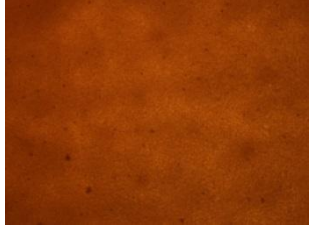
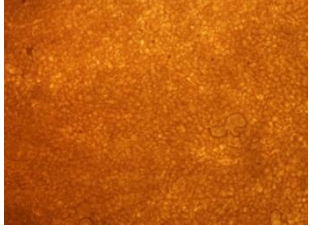
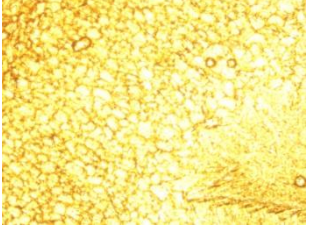
	T1	T2	T3
P1			
P2	*		
P3	*	*	
P4			
DFT	2.1438	2.1438	2.3933

Figura 2. Imágenes de los puntos evaluados en los tratamientos, 10X.
 * Puntos no evaluados en los tratamientos

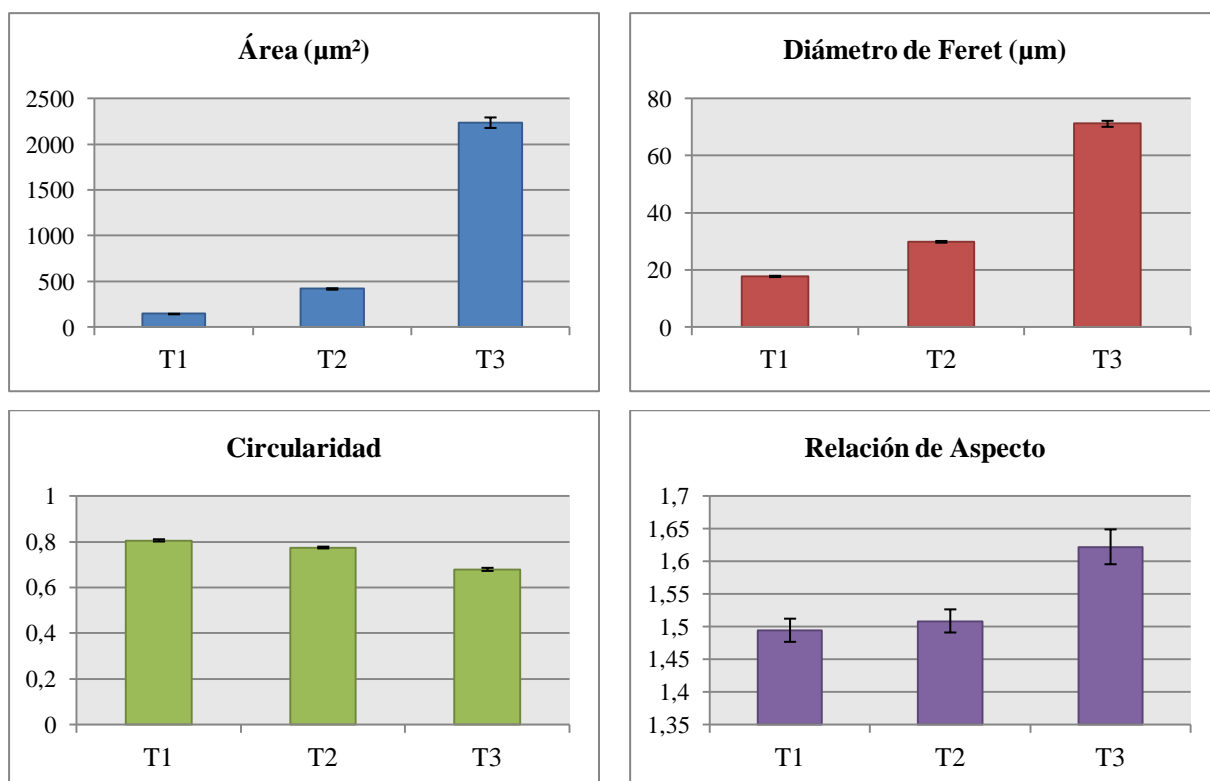


Figura 3. Descriptores de forma de los cristales obtenidos en los tres tratamientos en P4 a 10X

Tabla 2. Descriptores de forma de los tratamientos evaluados en P4

	T1	T2	T3
Área (μm^2)	145.712	419.523	2237.551
Diámetro de Feret (μm)	17.823	29.926	71.204
Circularidad	0.805	0.774	0.678
Relación de Aspecto	1.494	1.508	1.622

EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES COM PODER PREBIÓTICO A PARTIR DE RESÍDUO INDUSTRIAL DE ALCACHOFRA

Mariana T. C. Machado, Kaliana S. Eça, Florência C. Menegalli, Miriam D. Hubinger

Departamento de Engenharia de Alimentos Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
marifea@fea.unicamp.br

1. INTRODUÇÃO

A alcachofra tem tido um interesse renovado e crescente devido ao seu novo uso em alimentos funcionais. É uma rica fonte de fruto-oligossacarídeos com propriedades prebióticas. Porém, somente algumas partes desta planta são utilizadas pelas indústrias. Os resíduos, que representam 80-85% do total de biomassa da planta e possuem as mesmas propriedades funcionais, são descartados (LATTANZIO et al., 2009).

Os prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e / ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon (bactérias probióticas, como lactobacilos), e, portanto, podem promover efeitos benéficos aos seres humanos (Gibson e Roberfroid, 1995). Seu crescimento aumenta a proteção ao câncer de colon, a resistência aos patógenos e a absorção de cálcio, diminui os níveis de colesterol no sangue riscos de cancro e estimular a resposta inume (Manning; Gibson, 2004).

O processo de extração destes compostos convencionalmente é realizado pela maceração com utilização de água quente a partir de tecidos vegetais (Lingyun, 2007; AOAC, 2006). Esta técnica requer longo tempo e alta temperatura de extração. No entanto alguns trabalhos sugerem que a extração assistida por ultrassom pode promover a melhora da transferência de massa, em relação ao uso do método convencional, proporcionando redução do tempo e temperatura de processo (Shirsath et al. 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi: (1) avaliar o efeito de três diferentes processos de extração de açúcares prebióticos a partir de pétalas de alcachofra, e (2) estudar as variáveis do processo que apresentou maior rendimento destes compostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração de polissacarídeos por diferentes métodos

Foi utilizado resíduo (pétalas) de alcachofra da produção de conservas, que foi adquirida na fábrica Bom Sucesso (São Roque, SP). O material foi sanitizado com ácido peracético (80 ppm), embalado a vácuo e armazenado a -18 °C até o uso. As características químicas das pétalas encontram-se na Tabela 1.

O estudo da extração aquosa do resíduo de alcachofra, em escala de bancada, foi realizado avaliando-se três diferentes métodos: Método convencional, ultrassom por sonicação direta e ultrassom por sonicação indireta. Para todos os processos, a homogeneização inicial foi realizada de acordo com o método AOAC (n° 997.08, 2006). O material, ainda congelado, foi homogeneizado com água destilada a 100 °C (proporção 1:40 matéria-prima:água) em liquidificador industrial durante 15s.

Para a realização do processo de modo convencional, o método AOAC (n° 997.08, 2006) foi utilizado, com modificações. Após a homogeneização, a solução foi colocada em um béquer encamisado com temperatura controlada (85 °C) através de um banho termostático e agitada com o auxílio de um agitador mecânico (600 rpm).

Na realização dos outros métodos de extração, a temperatura foi reduzida para 60 °C a fim de se avaliar o efeito do processo com menor influência da temperatura de extração. Para o método com ultrassom por sonicação indireta, após a homogeneização, a solução foi colocada em um béquer e este foi sonicado por um banho de ultrassom de 40 kHz, com potência fixa de 154 W, a 60 °C (modelo USC-2800 A, marca Unique, Piracicaba, SP). E para o método de ultrassom por sonicação direta, a solução foi colocada em um béquer encamisado com a temperatura controlada (60 °C) por um banho termostático e foi sonicada por uma sonda de ultrassom de 19 kHz, com potência ajustável de 240 W (modelo DES500, marca Unique, Indaiatuba, SP).

Em todos os experimentos, foi realizada uma cinética com 9 pontos, por um período de 120 min. Em cada tempo, os extratos foram filtrados em filtro de poliéster para retirada das partículas grosseiras e armazenadas à -18 °C até serem analisadas.

2.2. Estudo das variáveis do processo de extração por sonicação direta

O método de extração que apresentou maior rendimento de polissacarídeos por matéria-prima seca foi escolhido para ser estudado. No estudo foram avaliadas as principais variáveis relativas ao processo, tempo (5 a 120 min), temperatura (50, 60 e 70 °C) e potência (240, 360, 480 W). Todas as combinações possíveis entre a temperatura e potência foram

feitas, e para cada combinação foi realizada uma cinética de extração de 120 min, sendo retiradas alíquotas em 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min.

2.3. Determinação de sólidos totais e solúveis, e açúcares totais e redutores

Os sólidos totais dos extratos foram determinados por método gravimétrico (AOAC, 1998). A determinação de açúcares totais nos extratos foi realizada pelo método colorimétrico de Fenol-ácido sulfúrico de acordo com o método descrito por Dubois et al. (1956), com modificações. A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método colorimétrico de DNS através da metodologia descrita por Miller (1959). A quantidade de açúcares foi expressa em g de açúcares totais/l de produto. A quantificação dos mesmos nos produtos foi realizada por meio da média \pm desvio padrão de pelo menos três replicatas. O teor de açúcares prebióticos foi determinado pela diferença entre açúcares totais e redutores conforme descrito por Lingyun et al. (2007).

No extrato selecionado por conter maior concentração de açúcares prebióticos, a identificação e quantificação dos principais açúcares foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massas (UPLC-MS). Foi utilizado o cromatógrafo Waters (Estados Unidos) e a coluna Acquity UPLC BEH Amide (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm). As fases móveis foram compostas por água mili-Q (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambas com hidróxido de amônio 0,1%, a uma vazão de 0,4 mL/min durante 5,5 min. A eluição começou com 20 % do solvente A, alcançou 40% em 4 min, permaneceu assim até 5 min. Neste momento, a coluna começou a ser re-equilibrada com 20% do solvente A até 5,5 min., para retornar a condição inicial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Extração de polissacarídeos por diferentes métodos

As cinéticas de extração pelos três diferentes métodos, convencional, ultrassom com sonicação direta e indireta, estão apresentadas na Figura 1.

Os extratos obtidos por sonicação indireta apresentaram menor teor de açúcares redutores e totais, porém similar quantidade de açúcares prebióticos, em alguns pontos da cinética, quando comparados com o método convencional. A sonicação indireta por ter sido realizada com temperatura mais baixa (60 °C) pode ter extraído maiores quantidades de maior grau de polimerização, enquanto o método convencional por utilizar maior temperatura (85 °C), apesar de ter extraído maior quantidade de açúcares, parte destes pode ter se degradado em monossacarídeos. Pode-se concluir que a sonicação indireta foi mais eficiente em extrair

açúcares prebióticos que o método convencional, pois com uma temperatura mais baixa (25 °C a menos), se obteve o mesmo rendimento destes açúcares.

Os extratos obtidos a partir do método de sonicação direta apresentaram maiores conteúdos de açúcares redutores do que os extratos obtidos pelos outros métodos, que pode ter ocorrido devido a uma maior extração de açúcares em geral ou por uma degradação dos polissacarídeos com redução para monossacarídeos.

A caracterização da matéria-prima realizada neste trabalho detectou 0,32g de carboidrato/ g de pétala seca (Tabela 1), o ultrassom por sonicação direta extraiu aproximadamente 90% dos carboidratos contidos na matéria prima seca, enquanto o método convencional extraiu 67% e a sonicação indireta extraiu 56%.

Segundo Shirsath et al. (2012), geralmente a imersão da sonda ultrassônica produz uma cavitação mais intensa que a sonicação indireta (como um banho de ultrassom), extraindo deste modo maior quantidade do composto a partir do material vegetal. Além disso, uma frequência ultrassônica baixa, 19 kHz, provoca um fenômeno de cavitação intenso, ocasionando uma circulação intensa da suspensão e turbulência que promovem uma maior taxa de transferência de massa e conseqüentemente, maior extração.

O método com maior rendimento de açúcares prebióticos foi a sonicação direta. Os resultados obtidos mostraram a mesma tendência entre o conteúdo destes açúcares e a concentração de sólidos totais dos extratos. Dos açúcares extraídos pelo ultrassom por sonicação direta, aproximadamente 62 % foram açúcares prebióticos, e esta quantidade representa 90% dos carboidratos totais presentes na pétala seca.

3.2. Estudo das variáveis do processo da extração por sonicação direta

Para seleção do extrato, as variáveis, tempo, temperatura e potência de sonicação foram variados, a fim de se obter a condição que extraia a maior quantidade de açúcares prebióticos. Os resultados das cinéticas estão apresentados na Figura 2.

De forma geral, o tempo não influenciou significativamente o rendimento da extração de açúcares e do extrato seco ao longo do processo, exceto na condição de 70 °C e 240 W, onde se observou um aumento significativo do rendimento com o tempo de extração. Curtos períodos de processo podem ser suficientes para difusão e dissolução dos compostos de interesse no solvente.

Em relação à temperatura, o rendimento do extrato seco não variou com o aumento da mesma. Por outro lado, o rendimento de açúcares prebióticos foi maior a 60 °C, exceto na condição de 70 °C e 240 W após 1 h de processo. O maior valor de rendimento de açúcares

prebióticos foi obtido a 60 °C durante 10 e 15 minutos de extração (sem diferença significativa), sendo de 0,220 g de açúcares prebióticos/ g de matéria prima seca.

A temperatura pode promover aceleração dos movimentos moleculares, redução da tensão superficial e da viscosidade, aumentando a penetração na matriz do material, a solubilidade e a difusividade dos compostos. Além disso, a temperatura pode intensificar a cavitação, melhorando a taxa de transferência de massa (Toma et al., 2001).

Em geral, nos limites inferiores e superiores à temperatura ótima de extração, 50 e 70 °C, foi observada uma redução no rendimento de açúcares prebióticos dos extratos. Tian et al. (2012) relataram comportamento semelhante no processo de extração de polissacarídeos a partir de cogumelos. No presente trabalho, a 50 °C pode ter ocorrido menor transferência de massa de açúcares que a 60 °C, com menor solubilidade dos mesmos compostos. Após esta temperatura, um acréscimo na mesma, não causou um incremento na extração de açúcares.

Entre as diferentes potências estudadas, a 480 W menores valores de rendimento de açúcares prebióticos foram observados. Menores valores de rendimento de extrato seco também foram obtidos nesta potência. Uma potência alta pode ter causado degradação parcial nos açúcares. Além disso, com a potência de 240 W, só houve alta extração de açúcares prebióticos a 70 °C e elevados tempos. Este fato indica que uma menor potência pode necessitar de uma temperatura mais alta para promover maior cavitação e um maior tempo para a transferência de massa. Desta maneira a 360 W de potência foi a condição que mais extraiu açúcares prebióticos.

De acordo com os resultados apresentados, entre as condições estudadas, a condição selecionada para extração de açúcares prebióticos a partir das pétalas de alcachofra foi: temperatura de 60 °C, potência de sonicação de 360 W e tempo de 10 minutos. Nesta condição foi realizada a identificação e quantificação dos principais açúcares presentes no extrato (Figura 3). Foram quantificados altos níveis de glicose e frutose, baixos de açúcares prebióticos (rafinose e três fruto-oligossacarídeos, GF2, GF3) e traços de GF4. A análise espectrofotométrica havia apresentado concentrações maiores de açúcares prebióticos, porém pode haver outros açúcares no extrato selecionado que não foram identificados, pois análise cromatográfica foi feita com açúcares de baixa massa molecular.

4. CONCLUSÕES

O processo de extração assistida por ultrassom utilizando sonicação direta foi mais eficiente em obter açúcares prebióticos a partir de pétalas de alcachofra que o de

sonicação indireta e o convencional. A técnica de sonicação direta permitiu extrair os açúcares prebióticos em um curto período de tempo com a temperatura mais baixa. A condição selecionada para o processo foi: 60 °C, 360 w e 10 minutos. Nesta condição foram identificados os açúcares prebióticos GF2, GF3, GF4 e rafinose, além de frutose, glicose e sacarose.

Desta maneira, confirma-se que é possível extrair compostos biologicamente ativos de uma matéria prima de baixo custo e agregar valor ao resíduo industrial, que pode ser utilizado como ingrediente funcional nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia.

5. REFERÊNCIAS

- AOAC. n° 934.06, 960.52, 985.33 (1998). 997.08 (2006). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16 ed. The Association, Arlington.
- Cecchi, H.M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. UNICAMP: 2 ed., Campinas, SP, 2003.
- Gibson, G.; Roberfroid, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.*, 125 (6), 13, 1995.
- Lattanzio, V.; Kroon, P. A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Functional Foods*, 1 (2), 131-144, 2009.
- Tian, Y.; Zeng, H.; Xu, Z.; Zheng, B.; Lin, Y.; Gan, C.; Lo, Y.M. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydr. Polym.*, 88 (2), 522-529, 2012.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Anal. Chem.*, 283, 350-356, 1956.
- Miller, G. L., *Anal. Chem.*, 31, 420-428, 1959.
- Lingyun, W.; Jianhua, W.; Xiaodong, Z.; Da, T.; Yalin, Y.; Chenggang, C.; Tianhua, F.; Fan, Z. *J. Food Eng.*, 79 (3), 1087-1093, 2007.
- Manning, T.S.; Gibson, G.R. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 18, 287-298, 2004.
- Toma, M.; Vinatoru, M. Paniwnyk, L.; Mason, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Soochemistry*, 8, 137-142, 2001.
- Shirsath, S.R.; Sonawane, S.H.; Gogate, P.R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – A review of current status. *Chem. Eng. Process.*, 53, 10-23, 2012.

Tabela 1. Composição química centesimal das pétalas de alcachofra.

Características Químicas	b.u.	b.s.	Métodos analíticos
Umidade	76,93 ± 0,51	-	(AOAC, 1998)
Cinzas	0,89 ± 0,07	3,84 ± 0,30	(AOAC, 1998)
Proteínas	2,98 ± 0,16	12,90 ± 0,67	(AOAC, 1998)
Lipídios	0,67 ± 0,03	2,89 ± 0,13	(Cecchi, 2003)
Fibra alimentar	11,24 ± 0,68	48,70 ± 2,95	(AOAC, 1998)
Carboidratos	18,53	80,31	*

*O teor de carboidrato foi estimado por diferença (100 –umidade –lipídeos –proteínas -cinzas).

Valores médios e seus respectivos desvios padrão. b.u. = base úmida; b.s. = base seca.

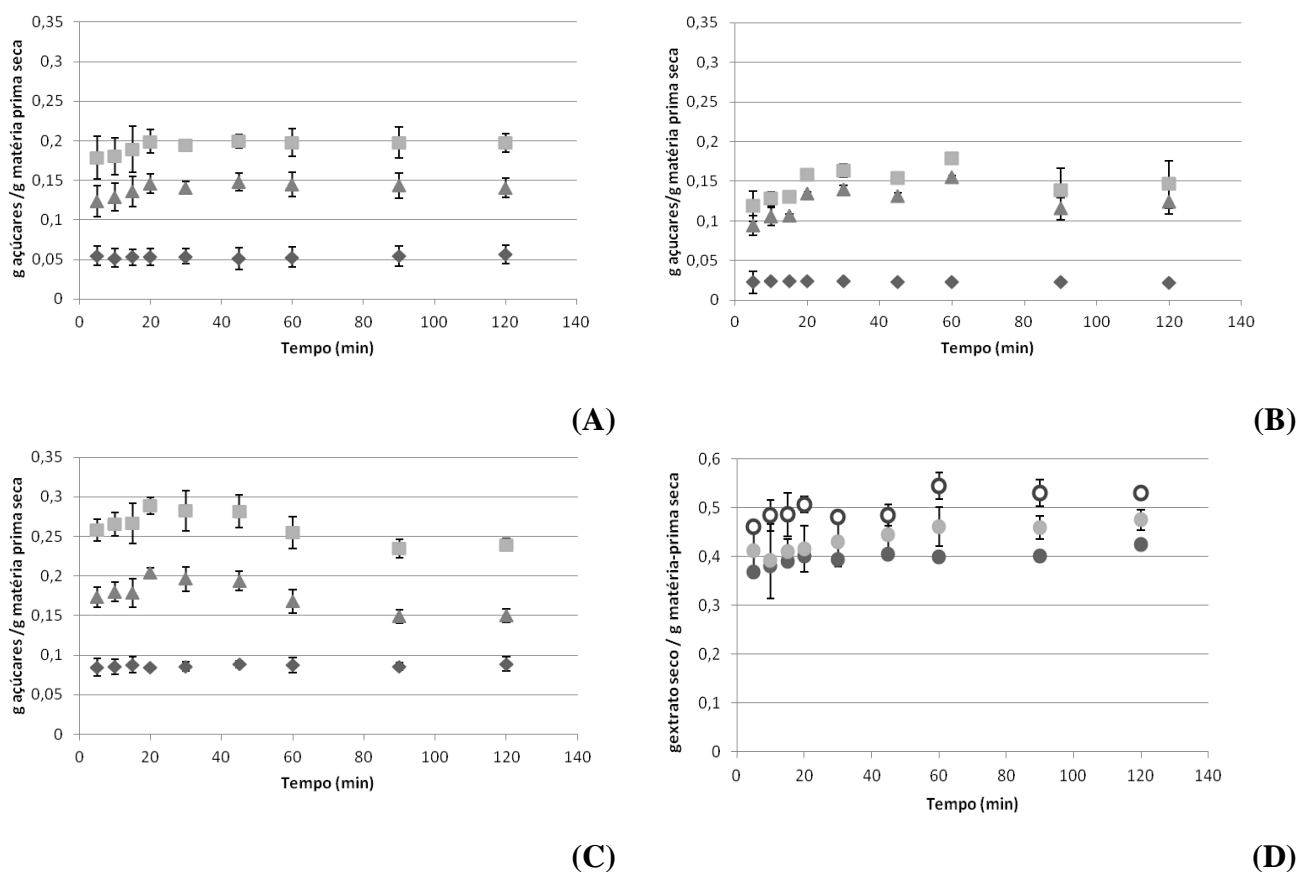
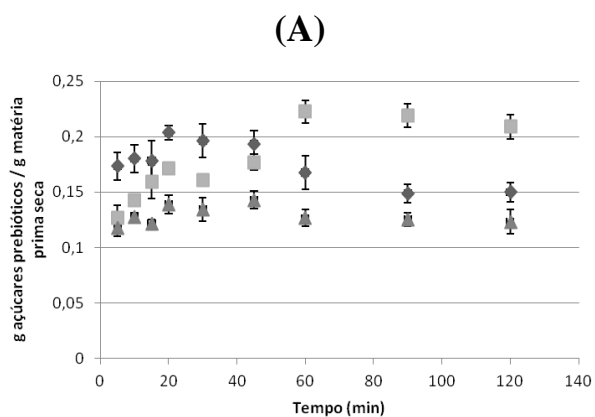


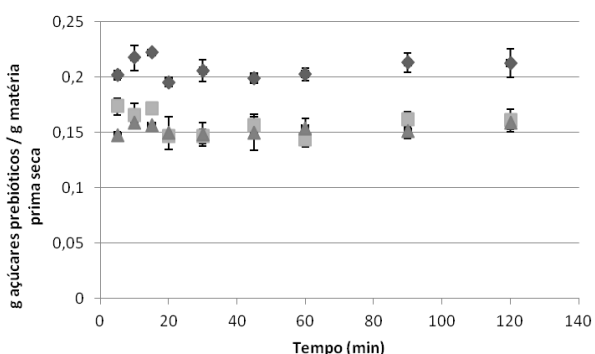
Figura 1. Rendimento (g de açúcar / g de matéria prima seca) das cinéticas de extração pelos três diferentes métodos estudados: (A) Convencional; (B) Sonicação indireta; (C) Sonicação direta. ◆ Açúcares redutores; ▲ açúcares prebióticos; ■ açúcares totais. (D) Rendimento (g de extrato seco / g de matéria prima seca) das mesmas cinéticas de extração:

● Convencional; ● Sonicação indireta; ○ Sonicação direta.

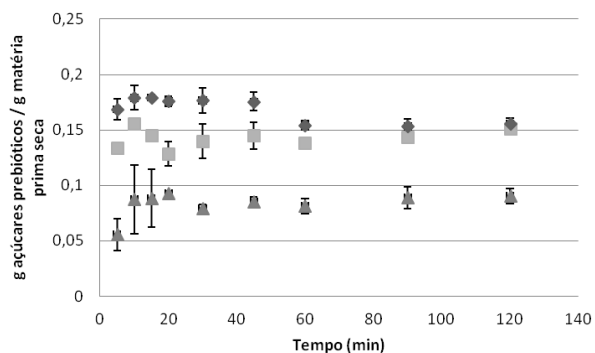
2
4
0
W



3
6
0
W



4
8
0
W



(B)

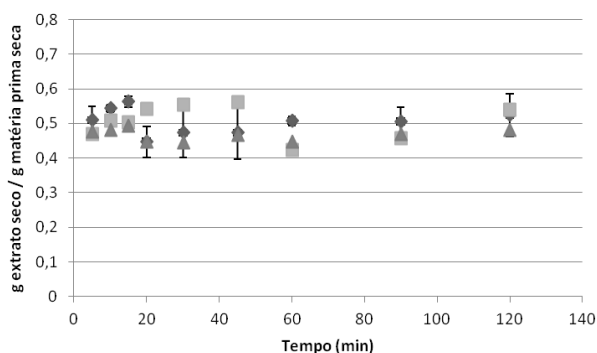
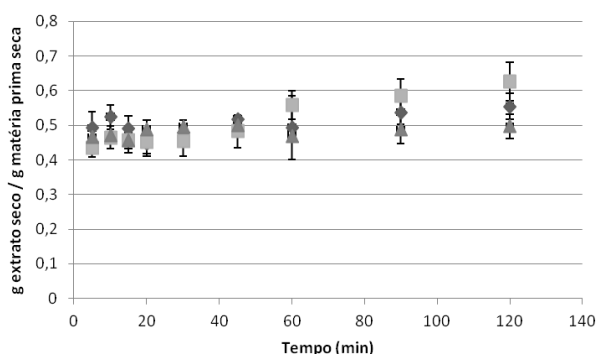
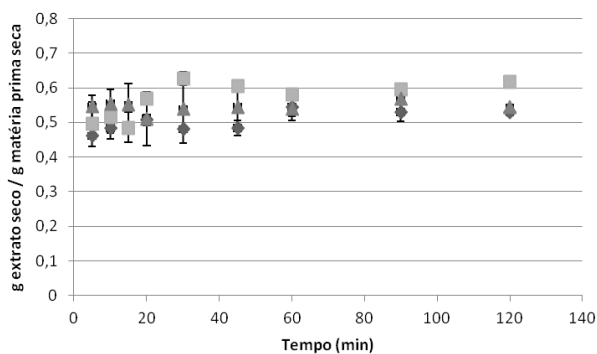


Figura 2.: (A) Rendimento de açúcares prebióticos (g de açúcar / g de matéria prima seca) e (B) de extração (g de extrato seco/ g de matéria prima seca).e das cinéticas de extração em três diferentes potências (240, 360 e 480 W) e três temperaturas ▲ 50 , ◆ 60 e ■ 70 °C.

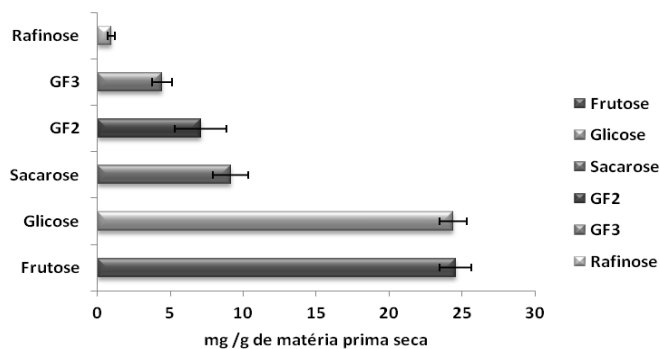


Figura 3. Açúcares (mg /g de matéria prima seca) presentes no extrato selecionado.

ESTUDO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES ÁGUA EM ÓLEO FORMADAS POR SOLUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO E MISTURAS DE ÓLEO DE SOJA TOTALMENTE HIDROGENADO COM ÓLEO DE SOJA

L.Consoli*, M. T. C. Machado, M.D.Hubinger

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos

*e-mail: larissa.consoli@gmail.com

1.INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas nas espécies vegetais, que desenvolvem nos alimentos funções de sabor e cor, além de apresentar atividade antioxidante (BRETCH *et al.*, 2010). Algumas das atividades *in vitro* ou *in vivo* dos compostos fenólicos são a redução de inflamações, inibição no desenvolvimento de tumores, modulação do sistema imune e proteção do sistema cardiovascular (MUNIN & EDWARDS-LÉVY, 2011).

Devido a estas propriedades, a adição destes compostos em alimentos industrializados é bastante interessante. No entanto, sua susceptibilidade a fatores como luz e oxigênio pode ser um fator prejudicial ao serem adicionados a outras matrizes alimentícias. Neste contexto, a microencapsulação pode ser uma alternativa interessante para viabilizar a aplicação dos compostos fenólicos.

Diversas técnicas tem sido empregadas para a microencapsulação de compostos fenólicos, dentre elas a de *spray drying* (BAKOWSKA-BARCZAK & KOLODZIEJCZYK, 2011; CILEK *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2013; MEDINA-TORRES *et al.*, 2013) e de coacervação complexa (DELADINO *et al.*, 2008; SHUTAVA *et al.*, 2009).

Spray chilling é uma das técnicas de produção de micropartículas. Neste processo, o material de recheio é disperso no material de parede fundido. Se necessário, pode ser utilizado um surfactante. A dispersão resultante é atomizada através de um bico aquecido para dentro de uma câmara resfriada. Com o resfriamento, o material de parede é solidificado, formando partículas sólidas quase perfeitamente esféricas (THIES, 2003; DESAI & PARK, 2005).

Materiais de recheio de diversos tipos já foram microencapsulados através desta técnica, entre eles insulina (MASCHKE *et al.*, 2007), solução de glucose (LEONEL, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012), caseína e hidrolisado de caseína (CHAMBI *et al.*, 2008), vitaminas e minerais (WEGMULLER *et al.*, 2006; GAMBOA *et al.*, 2011; DUBEY & WINDHAB, 2012), probióticos (PEDROSO *et al.*, 2012), entre outros. No entanto, não são encontrados

trabalhos que envolvam a aplicação desta técnica para a microencapsulação de compostos fenólicos.

Como os materiais de parede utilizados na técnica de *spray chilling* normalmente são de natureza lipídica (THIES, 2003), é comum que a mistura a ser atomizada seja preparada na forma de emulsões água em óleo (A/O) quando os materiais de recheio apresentam comportamento hidrofílico, sendo comum o emprego de surfactante. Poliglicerol polirricinoleato (PGPR) é um emulsificante de grau alimentício preparado através da esterificação de ácidos graxos condensados de óleo de rícino com poliglicerol (WILSON *et al.*, 1998), conhecido por ser um dos emulsificantes oligoméricos mais eficientes para emulsões (A/O) (BENICHOU *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi obter condições de preparo de emulsões (A/O), a fim de obter emulsões estáveis para atomização em *spray chilling*, possibilitando o estudo da microencapsulação de compostos fenólicos através desta técnica. Será utilizado ácido gálico como composto fenólico modelo e PGPR como emulsificante.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Óleo de soja (OS) refinado foi adquirido no comércio local. Óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) foi doado pela empresa Triângulo Alimentos (Itápolis, São Paulo, Brasil). O emulsificante poliglicerol – polirricinoleato (PGPR) foi doado pela empresa Danisco (Cotia, São Paulo, Brasil). Ácido gálico foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, São Paulo, Brasil).

Otimização das emulsões

As variáveis selecionadas para estudo foram concentração de emulsificante, tempo e velocidade de agitação. A Tabela 1 mostra as faixas estudadas, baseadas em trabalhos em que o PGPR foi utilizado em sistemas A/O (BENICHOU *et al.*, 2001; SCHERZE *et al.*, 2006; MUN *et al.*, 2010; DUBEY & WINDHAB, 2012). Os ensaios foram conduzidos em triplicata, tendo a ordem definida com base em uma Tabela de Números Aleatórios (BUSSAB & MORETTIN, 1987). A Figura 1A resume as etapas de avaliação das emulsões.

Preparo das emulsões

A fase contínua da emulsão foi composta por uma mistura de OSTH com OS, na proporção de 80 % e 20 % (temperatura final de fusão 74,7 °C), respectivamente. A fase dispersa foi uma solução de ácido gálico 6 % (m/m), cujo valor foi estabelecido a partir dos

resultados de Lu & Lu (2007) e Daneshfar *et al.* (2008), que avaliaram a solubilidade de ácido gálico em função da temperatura.

Inicialmente o ácido gálico foi dissolvido em uma quantidade de álcool etílico correspondente a 5 % (m/m) da solução. Esta mistura foi diluída com água destilada a 60 °C até atingir a concentração de 6 %. A solução foi aquecida a 70 °C antes de ser adicionada à fase lipídica, para impedir sua solidificação.

A concentração mássica de PGPR foi calculada em função da massa da fase lipídica. A proporção da fase dispersa para a fase contínua foi de 30 : 70. Foi utilizado um banho ultratermostático (marca Quimis, modelo Q214M2, Diadema, São Paulo, Brasil) para manter as misturas aquecidas a 79 °C, a fim de impedir a cristalização dos componentes lipídicos. Inicialmente, o OSTH foi aquecido até completa fusão. Em seguida, foram adicionados o OS e o PGPR, pré-aquecidos até 70°C, sendo mantidos sob agitação em um agitador magnético (marca IKA, modelo RH basic 1) por 1 minuto. A solução de ácido gálico (70 °C) foi adicionada em seguida, mantendo-se a agitação. Depois de 1 minuto, foi utilizado um agitador Ultra-Turrax modelo T10 basic, marca IKA (Janke and Kunkel, Staufen, Alemanha) para dispersar a emulsão, com a velocidade variando de acordo com o ensaio. A Figura 1B resume as etapas de preparo das emulsões.

Estabilidade das Emulsões

Imediatamente após o preparo das emulsões, alíquotas de 25 g de cada amostra foram transferidas para provetas graduadas de 25 mL, seladas e mantidas em banho térmico a 79°C por 4 horas. Utilizou-se uma régua para obter a medida da altura das fases da emulsão. A altura da fase aquosa foi medida a cada 15 minutos até a primeira hora após o preparo, depois a cada 30 minutos até o tempo de 4 horas. O cálculo foi efetuado através da proporção da medida da altura da fase contínua em relação à altura total do conteúdo da proveta, expressando o resultado em porcentagem, de acordo com (LEONEL, 2008). Assim, uma emulsão sem separação foi considerada 100 % estável, enquanto uma emulsão totalmente separada foi considerada 0% estável. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey através do programa Statistica 12 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Foram consideradas significativas as diferenças entre as médias no intervalo de 95 % de confiança ($p < 0,05$).

3.RESULTADOS

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para estabilidade das emulsões, em função da concentração de emulsificante (PGPR). Dentro do intervalo avaliado as emulsões sem

emulsificante apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras com concentração de 4 e 8 %, até o período de 4 horas após o preparo. Isto revela a necessidade da aplicação do emulsificante para o sistema estudado.

Até 4 horas após o preparo das emulsões, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre aquelas que continham 4 e 8 % de PGPR. Desta forma, nas condições avaliadas, o efeito alcançado em termos de estabilidade da emulsão com 4 % de PGPR é similar àquele conferido pelo dobro da concentração. Ou seja, é possível obter o mesmo nível de estabilidade com a menor quantidade de emulsificante avaliada. Desta forma, a concentração de PGPR no sistema avaliado ficou estabelecida em 4 % (m/m).

A Tabela 3 resume a estabilidade das emulsões com 4 % (m/m) de PGPR, em função do tempo de agitação. Até o período de observação de 3h após o preparo das emulsões, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras agitadas por 4, 8 ou 12 minutos. Após este período, as emulsões agitadas pelo menor tempo (4 minutos) continuaram semelhantes às demais, havendo diferença apenas entre as amostras agitadas 8 e 12 minutos. Dentro do intervalo avaliado, o tempo de agitação não exerceu influência significativa sobre a estabilidade das emulsões. Neste sistema, em que um ácido fenólico está sendo submetido a temperaturas relativamente altas (> 70 °C), é importante que a emulsão seja preparada e levada à atomização no menor prazo possível. Portanto, o tempo de agitação de 4 minutos foi considerado o melhor no sistema aqui avaliado.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a estabilidade das emulsões em função da velocidade de agitação. Dentro do intervalo avaliado, a velocidade de agitação mostrou não exercer influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) sobre a estabilidade das emulsões. Assim, a velocidade de 9.500 rpm foi selecionada para este sistema.

4. CONCLUSÃO

O sistema avaliado apresentou estabilidade satisfatória, em geral acima de 90 %, sendo possível alcançar uma condição satisfatória ($95,01 \pm 2$, 60 % de estabilidade) com as variáveis fixas em 4 % de PGPR, com 9.500 rpm de velocidade de agitação por 4 minutos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

bakowska-Barczak, A. M.; Kolodziejczyk, P. P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.

- Benichou, A.; Aserin, A.; Garti, N. Polyols, high pressure, and refractive indices equalization for improved stability of W/O emulsions for food applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 22, n. 2-3, p. 269-280, 2001 2001.
- Bretch, J. K. et al. Fisiologia pós-colheita de tecidos vegetais comestíveis. In: Damodaran, S. (Ed.). *Química De Alimentos De Fennema*. 4ª. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Bussab, W. O.; Morettin, P. A. *Métodos Quantitativos. Estatística Básica*. 4ª edição. São Paulo: Atual Editora, 1987.
- Chambi, H. N. M. et al. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterisation and release profiles. *Food Research International*, v. 41, n. 3, p. 229-236, 2008.
- Cilek, B. et al. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, v. 235, n. 4, p. 587-596, 2012/10/01 2012.
- Da Silva, F. C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, n. 1, p. 28-36, 2013.
- Daneshfar, A.; Ghaziaskar, H. S.; Homayoun, N. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 53, n. 3, p. 776-778, Mar 2008.
- Deladino, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 1, p. 126-134, 2008.
- Desai, K. G. H.; Park, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.
- Dubey, B. N.; Windhab, E. J. Iron encapsulated microstructured emulsion-particle formation by prilling process and its release kinetics. *Journal of Food Engineering*, n. 0, 2012.
- Gamboa, O. D.; Gonçalves, L. G.; Grosso, C. F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. *Procedia Food Science*, v. 1, n. 0, p. 1732-1739, 2011.
- Leonel, A. J. Produção e caracterização de partículas lipídicas constituídas por ácidos graxos, gordura vegetal hidrogenada e lecitina na encapsulação de um composto hidrofílico de baixa massa molar. 2008. 114 (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Lu, L.-L.; Lu, X.-Y. Solubilities of gallic acid and its esters in water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 52, n. 1, p. 37-39, Jan-Feb 2007.
- Maschke, A. et al. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, n. 2, p. 175-187, Feb 2007.
- Medina-Torres, L. et al. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 642-650, 2013.
- Mun, S. et al. Preparation and Characterization of Water/Oil/Water Emulsions Stabilized by Polyglycerol Polyricinoleate and Whey Protein Isolate. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 2, p. E116-E125, Mar 2010.

Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, v. 3, p. 793-829, 2011.

Pedroso, D. D. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, v. 26, n. 2, p. 127-132, Oct 2012.

Ribeiro, M.; Arellano, D. B.; Grosso, C. R. F. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. *Food Research International*, v. 47, n. 1, p. 38-44, Jun 2012.

Scherze, I.; Knoth, A.; Muschiolik, G. Effect of emulsification method on the properties of lecithin- and PGPR-stabilized water-in-oil-emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 27, n. 4, p. 427-434, 2006 2006.

Shutava, T. G.; Balkundi, S. S.; Lvov, Y. M. (-)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 330, n. 2, p. 276-283, 2009.

Thies, C. Microcapsules. In: Editor-In-Chief: Benjamin, C. (Ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 2003. p.3892-3903.

Wegmuller, R. et al. Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine, and vitamin a for use in food fortification. *Journal of Food Science*, v. 71, n. 2, p. S181-S187, Mar 2006.

Wilson, R.; Van Schie, B. J.; Howes, D. Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, n. 9-10, p. 711-718, 1998.

6.TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Variáveis e faixas de estudo para definição das condições de preparo das emulsões.

Variável	Faixa estudada
Concentração de PGPR (% m/m)	0, 4 e 8
Tempo de agitação (minutos)	4, 8 e 12
Velocidade de agitação (rpm)	9.500, 11.500 e 14.500

Tabela 2. Estabilidade das emulsões ao longo do tempo em função da concentração de emulsificante (PGPR). A velocidade de agitação foi mantida em 11.500 rpm por 8 minutos.

Tempo	Concentração de PGPR (% m/m)		
	0	4	8
0 min.	74,30 ± 0,60 ^a	99,40 ± 1,03 ^b	100,00 ± 0,00 ^b
15 min.	75,75 ± 2,23 ^a	98,81 ± 1,03 ^b	100,00 ± 0,00 ^b
30 min.	75,03 ± 1,48 ^a	99,10 ± 0,90 ^b	99,39 ± 1,05 ^b
45 min.	74,52 ± 0,62 ^a	98,24 ± 1,75 ^b	98,49 ± 1,38 ^b
60 min.	74,10 ± 0,64 ^a	97,92 ± 2,25 ^b	97,91 ± 2,24 ^b
90 min.	73,61 ± 1,42 ^a	97,66 ± 2,65 ^b	97,91 ± 2,24 ^b
120 min.	73,61 ± 1,42 ^a	97,65 ± 2,67 ^b	96,43 ± 3,22 ^b
150 min.	73,19 ± 1,53 ^a	97,63 ± 2,70 ^b	93,49 ± 3,06 ^b
180 min.	73,19 ± 1,53 ^a	96,11 ± 1,84 ^b	91,20 ± 6,47 ^b
210 min.	73,19 ± 1,53 ^a	94,92 ± 1,41 ^b	90,75 ± 6,42 ^b
240 min.	73,19 ± 1,53 ^a	95,55 ± 0,92 ^b	90,84 ± 6,46 ^b

* letras diferentes nas mesmas linhas indicam a existência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras (p<0,05).

Tabela 3. Estabilidade das emulsões ao longo do tempo em função do tempo de agitação. A velocidade de agitação foi mantida em 11.500 rpm, e a concentração de PGPR em 4 % (m/m).

Tempo	Tempo de agitação (minutos)		
	4	8	12
0 min.	100,00 ± 0,00 ^a	99,40 ± 1,03 ^a	100,00 ± 0,00 ^a
15 min.	98,30 ± 0,82 ^a	98,81 ± 1,03 ^a	98,21 ± 0,01 ^a
30 min.	97,69 ± 0,46 ^a	99,10 ± 0,90 ^a	97,92 ± 0,52 ^a
45 min.	97,41 ± 0,08 ^a	98,24 ± 1,75 ^a	97,62 ± 0,48 ^a
60 min.	97,42 ± 0,07 ^a	97,92 ± 2,25 ^a	97,34 ± 0,01 ^a
90 min.	97,41 ± 0,87 ^a	97,66 ± 2,65 ^a	97,61 ± 0,51 ^a
120 min.	96,56 ± 0,92 ^a	97,65 ± 2,67 ^a	97,62 ± 0,50 ^a
150 min.	96,84 ± 0,57 ^a	97,63 ± 2,70 ^a	97,03 ± 0,50 ^a
180 min.	96,83 ± 0,59 ^a	96,11 ± 1,84 ^a	97,33 ± 0,01 ^a
210 min.	96,82 ± 0,60 ^{ab}	94,92 ± 1,41 ^a	97,32 ± 0,00 ^b
240 min.	96,30 ± 0,54 ^{ab}	95,55 ± 0,92 ^a	97,32 ± 0,00 ^b

* letras diferentes nas mesmas linhas indicam a existência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

Tabela 4. Estabilidade das emulsões ao longo do tempo em função da velocidade de agitação. A concentração de PGPR foi mantida em 4 % (m/m) e o tempo de agitação em 4 minutos.

Tempo	Velocidade de Agitação (rpm)		
	9.500	11.500	14.500
0 min.	99,12 ± 1,53 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a
15 min.	96,50 ± 2,94 ^a	98,30 ± 0,82 ^a	98,52 ± 0,51 ^a
30 min.	95,61 ± 3,09 ^a	97,69 ± 0,46 ^a	97,65 ± 1,00 ^a
45 min.	96,14 ± 2,82 ^a	97,41 ± 0,08 ^a	97,36 ± 0,01 ^a
60 min.	95,89 ± 3,24 ^a	97,42 ± 0,07 ^a	97,37 ± 1,52 ^a
90 min.	95,60 ± 2,96 ^a	97,41 ± 0,87 ^a	96,77 ± 1,82 ^a
120 min.	95,59 ± 2,24 ^a	96,56 ± 0,92 ^a	96,77 ± 0,97 ^a
150 min.	95,30 ± 2,74 ^a	96,84 ± 0,57 ^a	96,20 ± 1,01 ^a
180 min.	94,41 ± 3,04 ^a	96,83 ± 0,59 ^a	96,50 ± 0,85 ^a
210 min.	94,13 ± 2,14 ^a	96,82 ± 0,60 ^a	96,21 ± 1,30 ^a
240 min.	95,01 ± 2,60 ^a	96,30 ± 0,54 ^a	96,19 ± 1,33 ^a

* letras diferentes nas mesmas linhas indicam a existência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

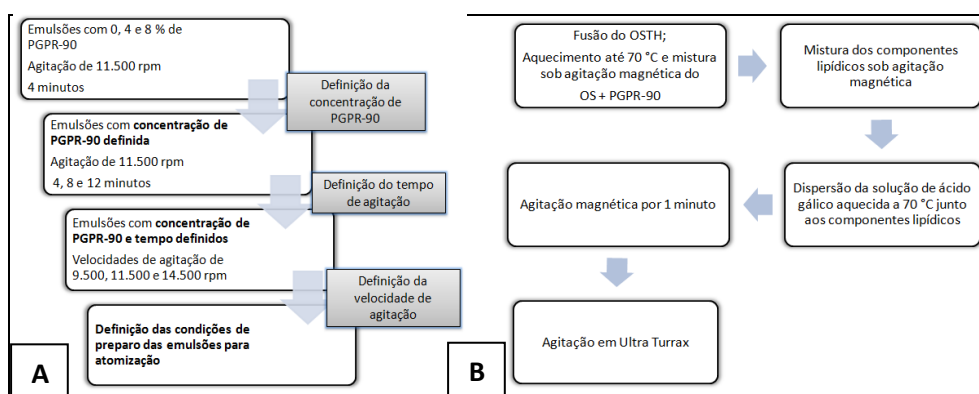


Figura 1. (A) Definição das etapas para avaliação das condições de preparo das emulsões; (B) Diagrama de fluxo de preparo das emulsões água em óleo.

APLICAÇÃO DA TÉCNICA SPRAY CHILLING PARA MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO COMO COMPOSTO FENÓLICO MODELO

L.Consoli^{*1}, R. Grimaldi², M. T. C. Machado¹, M.D.Hubinger¹

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos
Laboratório de Engenharia de Processos
Laboratório de Óleos e Gorduras
*e-mail: larissa.consoli@gmail.com

1.INTRODUÇÃO

Polifenóis são fitoquímicos que apresentam diversas atividades biológicas devido à sua capacidade antioxidante (MEDINA-TORRES *et al.*, 2013). Nos alimentos, eles desempenham funções principalmente com relação a sabor e cor (BRETCH *et al.*, 2010). Tanto pelas propriedades tecnológicas, quanto pelas características nutricionais, o emprego de compostos fenólicos como ingredientes alimentícios é muito interessante. Para isso, é importante garantir que estes compostos estejam de fato presentes no produto desde a sua produção até o momento do consumo, protegendo-o de fatores externos como temperatura, luz e oxigênio, além das próprias condições do trato gastrointestinal (pH, enzimas, presença de outros nutrientes), os quais prejudicam a estabilidade destes compostos. A aplicação da microencapsulação pode ser uma alternativa para proteção dos compostos fenólicos.

A técnica de *spray drying* tem sido bastante aplicada para a produção de micropartículas contendo compostos fenólicos. Alguns exemplos são a microencapsulação de extratos de antocianinas de cenoura roxa (ERSUS & YURDAGEL, 2007); cassis (BAKOWSKA-BARCZAK & KOLODZIEJCZYK, 2011); própolis tipo verde (DA SILVA *et al.*, 2013) e ácido gálico (MEDINA-TORRES *et al.*, 2013).

Spray chilling é uma técnica de microencapsulação na qual uma mistura fundida é atomizada dentro de uma câmara com ar resfriado, que leva à solidificação do material de parede ao redor do recheio. É similar ao *spray drying*, porém não envolve a evaporação de água (DESAI & PARK, 2005). Entre as técnicas de microencapsulação, a de *spray chilling* é considerada a de menor custo (GOUIN, 2004), e tem sido aplicada para produtos secos, na conservação de enzimas, *flavours*, minerais e proteínas (DE VOS *et al.*, 2010).

Tendo em vista a viabilidade econômica desta técnica, bem como a importância da microencapsulação de compostos fenólicos para utilização como ingrediente alimentício, este trabalho teve como objetivo estudar a aplicação da técnica de *spray chilling* para a microencapsulação de fenóis, utilizando para isto o ácido gálico como composto modelo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Óleo de soja (OS) refinado foi adquirido no comércio local. Óleo de soja totalmente hidrogenado (OSTH) foi doado pela empresa Triângulo Alimentos (Itápolis, São Paulo, Brasil). O emulsificante poliglicerol – polirricinoleato (PGPR-90) foi doado pela empresa Danisco (Cotia, São Paulo, Brasil). Ácido gálico foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, São Paulo, Brasil). Reagente de Folin e os surfactantes Tween 20 e Tween 80 foram adquiridos da empresa Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil), e carbonato de sódio anidro da empresa Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

2.1 Produção das micropartículas lipídicas

Utilizou-se um Mini Spray Dryer B-290 (marca Büchi, Flawil, Suíça). Os parâmetros utilizados (Tabela 1) foram estabelecidos a partir de testes preliminares. Foram avaliadas formulações variando-se as proporções de OSTH e OS e o *ratio* (proporção entre material de parede e de recheio), resumidas na Tabela 2. Os ensaios foram conduzidos em duplicata.

2.2 Preparo das emulsões

Aqueceu-se o OSTH até completa fusão, adicionando-se o OS e o PGPR previamente aquecidos. A solução aquosa de ácido gálico (6 % m/m; 70 °C) foi acrescentada a esta mistura sob agitação magnética. Após 1 minuto, foi utilizado um agitador Ultra-Turrax (marca IKA, modelo T10 basic; Janke and Kunkel, Alemanha) para dispersar a emulsão, em velocidade de 9.500 rpm, durante 4 minutos. A concentração de PGPR foi mantida a 4 % (m/m) em relação à fase lipídica da mistura. Estes parâmetros foram estabelecidos a partir de ensaios preliminares.

2.3 Caracterização das micropartículas lipídicas

2.3.1 Determinação de ácido gálico

A determinação de ácido gálico foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (SWAIN & HILLIS, 1959). A curva de calibração ($R^2=0,9981$) foi preparada com concentrações de ácido gálico variando de 50 a 750 mg/L. Uma alíquota de 40 μ L de amostra foi adicionada a 3.160 μ L de água destilada e 200 μ L do reagente de Folin. Após 3 minutos, foram acrescentados 600 μ L de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 20 %. Após duas horas de reação em ambiente escuro, as absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos) a 765 nm. A quantidade de ácido gálico foi expressa em mg de ácido gálico/mg de amostra, sendo calculada a partir da média \pm desvio padrão de três repetições.

2.3.2 Eficiência de encapsulação

2.3.2.1 Determinação de ácido gálico superficial

Foram pesados aproximadamente 250 mg de amostra em erlenmeyers e adicionados 10 mL de solução de Tween 80 a 0,1 %. Os frascos foram colocados em um agitador orbital (marca Tecnal, modelo TE-420, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e mantidos por 1 minuto sob agitação de 100 opm (oscilações por minuto). O conteúdo foi filtrado em papel filtro *Whatman* n°1. Nas alíquotas deste filtrado foi determinada a concentração de ácido gálico como descrito em 2.3.1.

2.3.2.2 Determinação de ácido gálico total

Utilizou-se a metodologia de Maschke *et al.* (2007) com algumas modificações. Foram pesados aproximadamente 180 mg de amostra em um tubo de ensaio e adicionados 10 mL de clorofórmio. Cada tubo foi agitado em um agitador de tubos tipo vórtex (marca Phoenix Luferco, modelo AP56, Araraquara, São Paulo, Brasil) por 10 segundos com pausa de 10 minutos, duas vezes. Logo após, foram acrescentados 10 mL de água destilada e cada tubo foi agitado por 1 minuto com pausa de 10 minutos, repetindo este passo por mais duas vezes. A seguir, os tubos foram colocados em uma centrífuga (marca Beckman Coulter, modelo Allegra 25-R, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) por 10 minutos a 10.000 rpm. A concentração de ácido gálico foi determinada na fração aquosa resultante, como descrito em 2.3.1.

2.3.2.3 Retenção de Recheio

A quantidade de ácido gálico superficial foi subtraída da quantidade de ácido gálico total. O valor foi comparado à quantidade inicialmente pesada para a produção das micropartículas. O quociente, expresso em porcentagem, representa o valor da eficiência de encapsulação efetiva, conforme a Equação 1.

$$RET(\%) = \frac{AGT - AGS}{\text{ácido_gálico_pesado}(g)} \times 100 \quad \text{Equação 1, onde } RET \text{ é a eficiência de}$$

encapsulação efetiva, AGT é o teor de ácido gálico total e AGS é o teor de ácido gálico superficial.

2.3.3 Distribuição do Tamanho e Diâmetro Médio

Foi determinada por um analisador de tamanho de partículas por difração a Laser Mastersizer S (marca Malvern Instruments Ltda, modelo Scirocco 2000, Malvern, Reino Unido). O diâmetro médio foi determinado com base na relação área superficial/volume,

através do parâmetro $D_{[4,3]}$ (Equação 2). As amostras foram analisadas em triplicata, por via úmida, com dispersão em solução aquosa de Tween 20 0,4%.

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^n n.d_i^4}{\sum_{i=1}^n n.d_i^3} \text{ Equação 2, onde } d_i \text{ é o diâmetro das partículas e } n \text{ é o número de partículas.}$$

3.RESULTADOS

A Tabela 3 resume os resultados para retenção de recheio das micropartículas produzidas pelas 8 formulações avaliadas, enquanto a Tabela 4 mostra o conteúdo de ácido gálico na superfície das partículas. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) comparando-se as formulações de mesma mistura lipídica com diferentes *ratios*, observa-se que ocorre uma tendência na diminuição da retenção do material de recheio em resposta ao aumento do teor de material de parede, que também fica claro pelo aumento do conteúdo superficial de ácido gálico (Tabela 4).

Por outro lado, a variação do teor de lipídeos saturados (OSTH) na mistura lipídica mostrou maior impacto na retenção e no conteúdo superficial de ácido gálico, evidenciado pela diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a maior parte das formulações, nos dois valores de *ratio* avaliados.

Os valores de retenção obtidos estão próximos aos apresentados por trabalhos envolvendo microencapsulação de extratos fenólicos por *spray drying*, visto até o momento não ter sido estudado em publicações conhecidas o emprego da técnica de *spray chilling* para esta finalidade. Silva *et al.* (2013) obtiveram valores de retenção de compostos fenólicos de 76 ± 1 a 86 ± 2 % ao microencapsularem extrato de própolis tipo verde por *spray drying*, utilizando goma arábica e amido modificado como materiais de parede. A microencapsulação de extrato fenólico de cassis também pela técnica de *spray drying* utilizando maltodextrina com diferentes graus de dextrose equivalente e inulina como materiais de parede, produziu micropartículas com retenção de compostos fenólicos variando de 54,2 a 86,3 % nas temperaturas de entrada do ar de 150 °C, 160 e 180 °C (BAKOWSKA-BARCZAK & KOLODZIEJCZYK, 2011).

Alguns autores estudaram a aplicação da técnica de *spray chilling* para a microencapsulação de outros compostos hidrofílicos. Maschke *et al.* (2007) utilizaram tripalmitato de glicerol como material de parede para a microencapsulação de insulina, e obtiveram eficiências de encapsulação maiores que 100 % em todas as formulações avaliadas,

atribuindo este fato à perda de lipídeo no bico atomizador. Soluções de glicose com várias concentrações foram microencapsuladas em uma mistura de ácidos esteárico, oléico e gordura vegetal hidrogenada por Leonel *et al.* (2010), obtendo-se eficiências de encapsulação entre 78,3 a 97,8 %. Valores semelhantes foram encontrados por Chambi *et al.* (2008) e Ribeiro *et al.* (2012). Os valores encontrados neste trabalho estão próximos aos obtidos nos trabalhos citados, como ser observado na Tabela 3.

A Tabela 5 mostra os diâmetros médios $D_{[4,3]}$ (Equação 2). A distribuição de tamanho das micropartículas é ilustrada pelas figuras da Tabela 6.

Os resultados mostram que, apesar de se observar uma pequena tendência na diminuição do diâmetro das micropartículas em função do aumento do teor de lipídeo saturado na formulação, em geral houve semelhança estatística nas amostras em ambos os *ratios* estudados. Observou-se que a variação no *ratio* não impactou de forma significativa no valor do diâmetro médio das micropartículas. No entanto, os gráficos da Tabela 6 mostram que na proporção de 80 % de material de parede as micropartículas apresentaram, na maioria das amostras, uma distribuição de tamanho mais uniforme, evidenciado pela ausência no terceiro pico que é apresentado pelas formulações com 70 % de material de parede. Os valores de diâmetro obtidos neste trabalho foram intermediários aos reportados por Chambi *et al.* (2008) (12,6 a 24,4 μm) e por Ribeiro *et al.* (2012) (81,39 a 115,63 μm), que utilizaram misturas de composição semelhante como materiais de parede para microencapsular soluções de glicose.

4. CONCLUSÃO

A aplicação da técnica de *spray chilling* para a produção de micropartículas lipídicas contendo ácido gálico mostrou ser viável, pois os produtos obtidos apresentaram retenção de material de recheio comparável àquelas resultantes em micropartículas de extratos fenólicos produzidas por *spray drying* (acima de 70 % nas melhores formulações). As diferentes formulações praticamente não demonstraram exercer efeito significativo sobre o valor do diâmetro médio. Observou-se que o aumento do teor de OSTH na mistura levou à obtenção de maiores valores de retenção de ácido gálico. A proporção entre material de parede e material de recheio mostrou menor efeito sobre os resultados.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bakowska-Barczak, A. M.; Kolodziejczyk, P. P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.
- Bretch, J. K. et al. Fisiologia pós-colheita de tecidos vegetais comestíveis. In: Damodaran, S. (Ed.). *Química de Alimentos de Fennema*. 4ª. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Chambi, H. N. M. et al. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterisation and release profiles. *Food Research International*, v. 41, n. 3, p. 229-236, 2008.
- Da Silva, F. C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, n. 1, p. 28-36, 2013.
- De Vos, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, v. 20, n. 4, p. 292-302, Apr 2010.
- Desai, K. G. H.; Park, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.
- Ersus, S.; Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 3, p. 805-812, 2007.
- Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.
- Leonel, A. J. et al. Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 276-281, Jan-Mar 2010.
- Maschke, A. et al. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, n. 2, p. 175-187, Feb 2007.
- Medina-Torres, L. et al. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 642-650, 2013.
- Ribeiro, M.; Arellano, D. B.; Grosso, C. R. F. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. *Food Research International*, v. 47, n. 1, p. 38-44, Jun 2012.
- Swain, T.; Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, p. 63-68, 1959.

6. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Parâmetros aplicados aos ensaios para formação de micropartículas lipídicas.

Parâmetros	Valor estabelecido
Vazão do ar de resfriamento	35.000 L/h
Vazão do ar no bico atomizador	667 L/h
Diâmetro do bico atomizador	0,7 mm
Temperatura do banho térmico	10 ± 1°C acima da temperatura final de fusão da mistura
Temperatura da mistura na entrada do bico atomizador	5°C ± 1°C acima da temperatura final de fusão

Tabela 2. Descrição das formulações avaliadas.

Formulação	Proporção OSTH: OS	Temperatura final de fusão da mistura (°C)	Proporção Material de Parede: Material de Recheio
F1	60:40	71,30 ± 0,47	70:30
F2	60:40		80:20
F3	70:30	74,31 ± 1,01	70:30
F4	70:30		80:20
F5	80:20	74,65 ± 1,01	70:30
F6	80:20		80:20
F7	90:10	74,99 ± 1,26	70:30
F8	90:10		80:20

Tabela 3. Retenção do material de recheio nas micropartículas lipídicas. Os resultados estão expressos como porcentagem do teor de ácido gálico total.

Proporção OSTH: OS	Proporção Material de Parede : Material de Recheio (<i>Ratio</i>)	
	70:30	80:20
60:40	74,67 ± 1,19 ^{bB}	62,59 ± 9,80 ^{aAB}
70:30	54,14 ± 2,82 ^{aA}	55,16 ± 4,96 ^{aA}
80:20	83,48 ± 6,48 ^{aC}	71,90 ± 11,47 ^{aC}
90:10	101,83 ± 6,74 ^{bD}	80,01 ± 2,76 ^{aC}

Valores são médias de dois ensaios, com cada amostra analisada individualmente em triplicata. Letras diferentes em cada linha 'a' e coluna 'A' representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 4. Teor superficial de ácido gálico das micropartículas lipídicas. Os resultados estão expressos como porcentagem do teor de ácido gálico total.

Proporção OSTH: OS	Proporção Material de Parede : Material de Recheio (<i>Ratio</i>)	
	70:30	80:20
60:40	33,89 ± 4,12 ^{aC}	38,87 ± 5,68 ^{aAB}
70:30	55,46 ± 3,73 ^{bD}	44,68 ± 4,78 ^{aB}
80:20	22,57 ± 1,17 ^{aB}	33,98 ± 3,58 ^{bA}
90:10	11,96 ± 1,75 ^{aA}	16,04 ± 3,26 ^{bC}

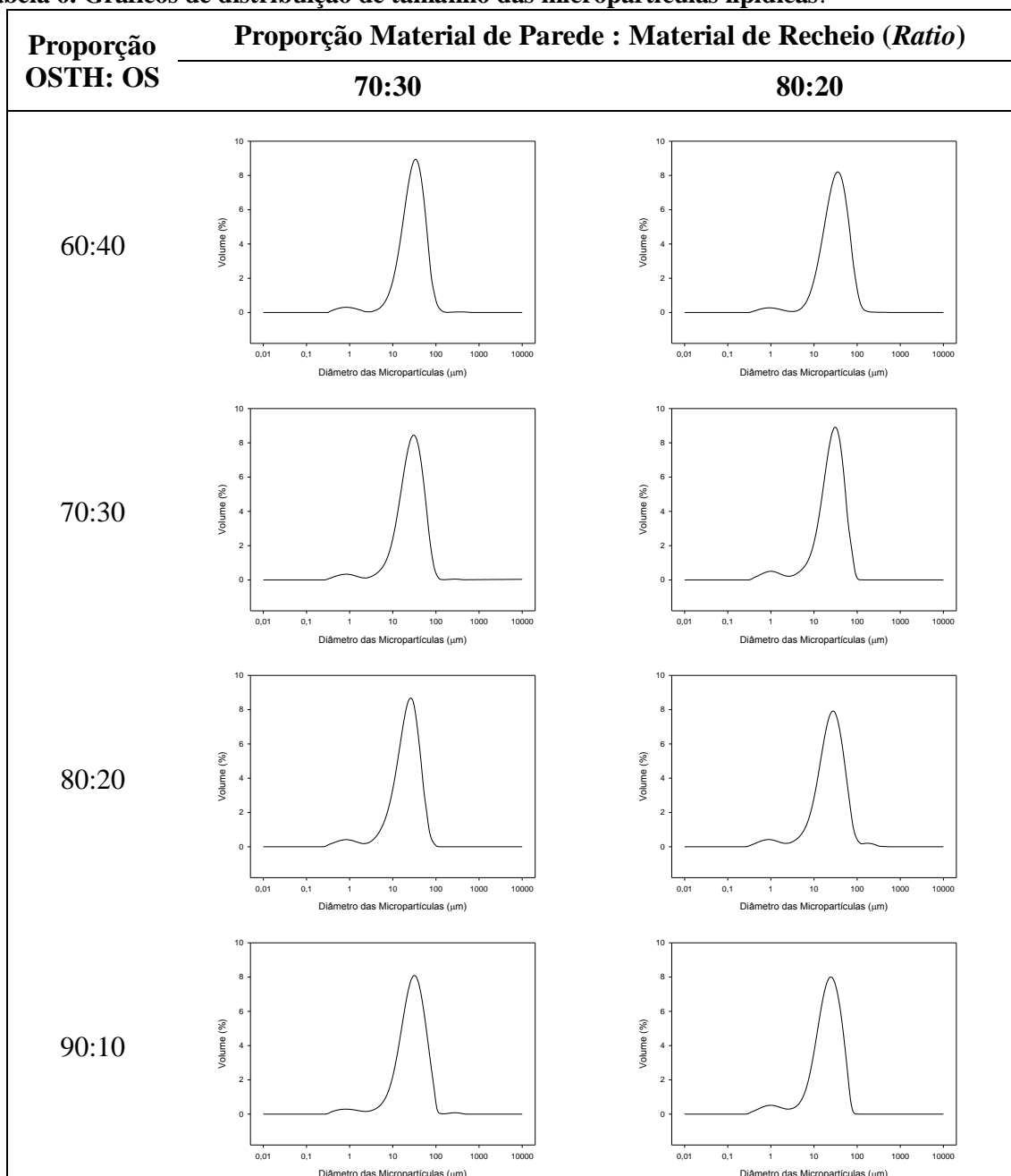
Valores são médias de dois ensaios, com cada amostra analisada individualmente em triplicata. Letras diferentes em cada linha 'a' e coluna 'A' representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 5. Diâmetro médio das micropartículas lipídicas. Os resultados estão expressos em μm .

Proporção OSTH: OS	Proporção Material de Parede : Material de Recheio (<i>Ratio</i>)	
	70:30	80:20
60:40	34,30 \pm 5,48 ^{aA}	35,98 \pm 2,17 ^{aB}
70:30	30,60 \pm 3,99 ^{aA}	26,68 \pm 2,29 ^{aA}
80:20	28,39 \pm 2,35 ^{aA}	32,13 \pm 3,44 ^{aB}
90:10	28,74 \pm 3,17 ^{Ab}	23,91 \pm 1,60 ^{aA}

Valores são médias de dois ensaios, com cada amostra analisada individualmente em triplicata. Letras diferentes em cada linha 'a' e coluna 'A' representam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Gráficos de distribuição de tamanho das micropartículas lipídicas.



FILMES DE PECTINA ADITIVADOS DE EXTRATOS DE FRUTAS

Kaliana S. Eça, Mariana T. C. Machado, Miriam D. Hubinger, Florência C. Menegalli

Departamento de Engenharia de Alimentos Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
kaliana.se@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de filmes e coberturas comestíveis formadas por polímeros biodegradáveis incorporados de compostos naturais é uma das tecnologias mais promissoras da área de embalagens e conservação de alimentos, visto que através da aplicação desta mesma é possível manter a qualidade e a segurança dos alimentos, além de conferir ao produto extensão da vida útil e até funções extras.

A matriz dos filmes e coberturas comestíveis são formadas principalmente por proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Filmes de polissacarídeos, como os de pectina, têm boas propriedades estruturais, devido às suas propriedades coloidais e mecânicas, mas são altamente permeáveis à água devido à sua natureza hidrofílica. Eles são capazes de produzir películas transparentes, resistentes e flexíveis devido à sua microestrutura (ANKER et al, 2002, KRISTO et al, 2007).

A pectina é normalmente usada como um agente de gelificação e é um produto potencialmente utilizado para fabricação de filmes e coberturas devido às suas propriedades coloidais (TAPIA et al., 2008). Além disto, eles são boas barreiras ao oxigênio, devido à sua estrutura ordenada, embora eles não se comportam como boas barreiras a umidade devido sua natureza hidrofílica (YANG & PAULSON, 2000).

Os biofilmes aditivados de compostos antimicrobianos, nutrientes e antioxidantes podem ser obtidos a partir da incorporação de extratos naturais, vitaminas, corantes, aromatizantes, especiarias e óleos essenciais aos mesmos. Estes, muitas vezes, preservam as propriedades funcionais do aditivo, conferindo ao alimento além de proteção mecânica, uma proteção extra, relacionada à inibição dos efeitos de oxidação do produto.

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição de extratos de frutas nas propriedades físicas e antioxidantes de filmes biodegradáveis à base de pectina. Esta caracterização inclui a determinação do conteúdo compostos fenólicos, atividade antioxidante, solubilidade dos filmes água, dentre outros ensaios com intuito de estudar a capacidade de retenção de polifenóis pelos filmes e a velocidade de liberação destes compostos ativos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação dos filmes

Os filmes foram produzidos pelo método *casting* de acordo com a metodologia proposta por Norajit et al. (2010) com modificações. A suspensão foi preparada a partir de 2 g de pectina de baixo grau de metilação (GENU Tipo pectina LM-102 AS-BNB) em 100 mL de água destilada, por agitação mecânica à 550 rpm durante 30 minutos, seguido por aquecimento até à temperatura de processo, 70 ° C. O glicerol (1,5 g glicerol/g pectina) e uma solução de cloreto de cálcio a 1% (0,5mL/g pectina) também foi adicionado a suspensão, por gotejamento, em seguida, esta foi mantida por mais 10 min sob agitação. A solução filmogênica foi deixada em repouso até a temperatura de 40 °C para que os extratos de frutas pudessem ser adicionados sem perdas nutricionais. Os extratos adicionados aos filmes foram de acerola, caju, mamão, morango e pequi na concentração de 0,5g de extrato seco/ g de pectina. A suspensão foi agitada à 550 rpm, durante 10 min. O filmes foram secos em câmara de circulação de ar (Model MA-415UR, Marconi, Brasil) a 35° C e 40% de umidade relativa do ar por um período de 12h. Após secos, os filmes foram removidos das placas de acrílico e reticulados pela segunda vez através da imersão das películas em 100 mL de solução de CaCl₂ à 2% por 30 segundos. Os filmes foram recolocados na câmara de circulação de ar, nas mesmas condições de operacionais, até que estivessem completamente secos. Antes da caracterização dos filmes, estes foram acondicionados 25° C, por 48h em dessecadores contendo solução supersaturada de NaBr, o qual proporciona uma umidade relativa de 58%.

2.2 Caracterização dos filmes de pectina

O teor de umidade e a solubilidade dos filmes foram analisados por gravimetria, de acordo com os métodos D644-99 (ASTM, 1999) e Gontard et al. (1992), respectivamente.

Para preparação da solução utilizada na determinação de polifenóis e atividade antioxidante, amostras de filmes foram imersas em metanol e agitadas vigorosamente por 2 h, a temperatura ambiente e protegidas da luz. O método utilizado para determinação de polifenóis foi espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteau (Prior et al., 2005) e o seu conteúdo foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE).g⁻¹ de filme. Já a atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH (Prior et al., 2005) e os resultados foram expressos em mM trolox. g⁻¹ filme.

2.3 Determinação da retenção de compostos fenólicos pelos filmes aditivados

A capacidade de retenção de compostos fenólicos dos filmes aditivados por extratos de fruta foi analisada por um método no qual utilizou géis modelo de gelatina em contato direto

com os filmes aditivados. Amostras de filmes em formato de discos de 3 cm de diâmetro foram sobrepostos a géis de gelatina em formatos cilíndricos. O sistema filme-gel formado foi acondicionado em potes herméticos de plástico de 200 mL que possuem um tripé de plástico em seu interior para suporte dos recipientes onde foram colocadas as amostras. No interior dos potes foi adicionada uma solução salina supersaturada de brometo de sódio para que fosse proporcionada uma umidade relativa na faixa de 58%. Todo o procedimento experimental foi realizado à 20°C. A liberação de compostos fenólicos foi determinada a partir de uma cinética na qual cada filme aditivado, em contato com os géis de gelatina, foi avaliado quanto à sua capacidade de reter estes compostos ao longo do tempo. Um conjunto de 11 sistemas filme-gel foi montado para cada filme aditivado. Em tempos pré-determinados (0; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6 h) as partes, filme e gel, foram separadas com o objetivo de analisá-las parte a parte, posteriormente. A determinação do conteúdo de polifenóis de cada amostra de filme foi realizada pelo método espectrofotométrico, conforme descrito anteriormente e os géis, por sua vez, foram fundidos à 40 °C e alíquotas dos mesmos foram utilizadas para análise.

Todos os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância, com o auxílio do programa Statistica® 8.0 (Statsoft Inc. Tulsa, OK, EUA).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Propriedades dos filmes

Todos os filmes apresentaram superfície homogênea sem formação de bolhas ou fissuras, logo, com boas características de manuseamento. Todavia, a segunda reticulação fez com que eles ficassem menos flexíveis e mais quebradiços. Além disto, a adição dos extratos aos filmes não mostrou qualquer influência sobre os conteúdos de umidade e solubilidade em água, sendo uma exceção o filme de pequi que apresentou conteúdo de umidade um pouco menor que os demais. Este resultado pode está relacionado ao fato de que os componentes dos quais os filmes são formados (pectina, extratos e glicerol) possuem alta afinidade com água. Os seguintes valores médios foram obtidos para o conteúdo de umidade e solubilidade dos filmes, $25,54 \pm 0,68\%$, $47,53 \pm 6,15\%$, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta a concentração real e teórica de polifenóis. Os resultados demonstram que os filmes aditivados apesar de apresentarem um conteúdo real de polifenóis elevado, este, muitas vezes, não representa o conteúdo teórico adicionados ao filme, visto que pode ocorrer um aprisionamento dos compostos pela matriz polimérica do filme.

Além disto, outros fatores influenciam a perda de polifenóis pelos filmes durante a preparação do mesmo. O primeiro ponto a ser considerado é a etapa de incorporação do extrato. Nesta etapa, pode ocorrer a oxidação dos polifenóis visto que o procedimento envolve agitação, o que favorece o contato do oxigênio do ar com o aditivo da suspensão. Outra etapa importante é a secagem do filme em incubadora aquecida. Por último, e talvez a etapa mais relevante relacionada a perda destes micronutrientes, é a segunda reticulação do filme. Nesta etapa, mesmo que por um tempo curto de exposição, o filme permanece imerso em uma solução de cloreto de cálcio que por sua vez acaba por remover parte do extrato que foi previamente incorporado ao filme.

Pode ser observado que para os casos dos filmes que possuíam baixa concentração de polifenóis, como o mamão e o pequi, os conteúdos teóricos e reais foram semelhantes. Muito provavelmente, algumas perdas podem ter acontecido também para estes casos, como comentadas anteriormente. Todavia os desvios encontrados relacionam as diferenças de amostragens entre as alíquotas dos extratos utilizadas no processo de formação do filme, visto que trata-se de uma matéria-prima que permite algumas variações na sua composição.

Os filmes de acerola e caju apresentaram os maiores conteúdos reais de compostos fenólicos, cujas concentrações foram $1,74 \pm 0,16$ mM/g filme seco e $1,36 \pm 0,12$ mM/g filme seco, respectivamente. Os filmes de morango e pequi apresentaram conteúdos reais semelhantes, ao nível de significância de $p < 0,05$.

Um método que é comumente utilizado para determinar a atividade antioxidante de filmes de pectina e alginato é o DPPH (Shojaee-Aliabadi et al, 2013). A Figura 1 apresenta os resultados obtidos por este método. Os valores mais elevados de atividade antioxidante foram obtidos pelo filme de acerola seguido pelo de caju. Os menores valores foram obtidos para os filmes de mamão e pequi e entre eles, não é observada diferença significativa ($p < 0,05$). Estes valores de atividade antioxidante estão em boa concordância com os conteúdos de polifenóis dos extratos. O filme de acerola mostrou-se o de capacidade antioxidante mais elevada, cujo conteúdo representa cerca de 6 vezes os valores obtidos para os filmes de mamão e pequi, cujos conteúdos são de $4,06 \pm 0,37$ e $4,23 \pm 0,04$ mM trolox/g filme seco, respectivamente.

3.2. Retenção de compostos fenólicos

3.2.1 Retenção em gel

Através da Figura 2 é possível visualizar os resultados que representam a cinética de liberação de compostos fenólicos dos filmes para géis modelos de gelatina, com e sem celulose. Os filmes 1 e os géis 1 representam o sistema gel/filme formado por filmes aditivados em contato com géis de gelatina, e os filmes 2 e géis 2 por aqueles os quais o

sistema foi formado por filmes aditivados em contato com géis de gelatina adicionado de celulose.

Para a maioria dos sistemas apresentados, a liberação de compostos pelos filmes ocorre em 3 estágios diferentes. O primeiro estágio é caracterizado por uma liberação mais rápida de compostos fenólicos e pode ser observada pela queda mais acentuada das curvas. Nesta etapa, pode-se observar que, nos primeiros minutos de processo, as curvas de concentração de compostos fenólicos em função do tempo obtidas para os filmes apresentam inclinações mais acentuadas. Após uma hora de processo, a liberação de compostos torna-se mais lenta e as curvas têm um perfil menos decrescentes e tendem a variações de concentração menores ao longo do tempo. Nesta etapa, os compostos são liberados pelos filmes de forma lenta e continua. Este fenômeno é observado para todas as curvas dos filmes estudados, exceto para as de caju, cujo comportamento continua acentuado e decrescente até o final do processo. Esta etapa segue até o momento onde o sistema tende ao equilíbrio, ou seja, o conteúdo de fenólicos do filme e do gel tende a se igualar e o processo de liberação pelo filme e absorção pelo gel tende a estacionar. Este estágio é representado pelo final das curvas das cinéticas (terceiro estágio).

Ainda na Figura 2, comparando-se os pares das curvas obtidas para o sistema 1 e 2, pode ser observado que os filmes, os quais, ficaram em contato com os géis formados por gelatina e celulose, apresentaram uma queda menos acentuada ou igual a obtida para o filme em contato com géis apenas de gelatina. Isto se deve ao fato de o gel formado por gelatina e celulose pode dificultar o processo de transferência de compostos entre a matriz filme e o gel modelo, sendo a celulose um empecilho físico para a passagem de compostos fenólicos. A exceção para este comportamento é dada ao se observar o comportamento dos filmes de mamão. Todavia, para o último caso, ao se observar as curvas obtidas para os géis, é possível notar que o teor de polifenóis absorvido por ambos os géis é praticamente igual.

O conteúdo de compostos fenólicos absorvidos pelos géis está em boa concordância como o conteúdo liberado pelos filmes. Este fato pode ser facilmente verificado ao se observar as curvas características para os géis e filmes correspondentes.

Para uma melhor visualização do que foi disposto na Figura 2, foi construída a Tabela 3, a qual apresenta o conteúdo de compostos fenólicos que ainda se encontrava na matriz do filme no final do processo proposto, ou seja relaciona a capacidade dos filmes aditivados em manter compostos fenólicos aderidos em suas matrizes quando em contato direto com sistema géis modelos.

Ao se comparar os estudos de liberação de compostos fenólicos pelos filmes aditivados nos processos 1 (gel formado por gelatina) e 2 (gel formado por gelatina e celulose) pode se observar que ao se adicionar celulose a gelatina ocorreu um aumento da resistência a transferência de composto fenólicos do filme para o gel. As diferenças encontradas entre os processos 1 e 2 foram de 6% a 1%, sendo a diferença obtida para os filmes de acerola, caju e pequi praticamente iguais.

4.CONCLUSÕES

Os filmes incorporados com extratos não apresentaram grandes alterações nos valores de solubilidade a água e umidade em relação ao filme controle. Todavia, a incorporação de acerola, caju, mamão, morango e pequi aos filmes de pectina proporcionou um aumento na capacidade antioxidante dos mesmos, sendo o extrato de acerola o que mais contribuiu, mostrando-se com potencial a ser usado como filmes antioxidantes para alimentos. Quanto à retenção de compostos fenólicos pelos filmes, foi observado que os mesmos possuem uma capacidade de retenção relativamente alta, todavia, não há limitação quanto à migração de compostos dos filmes para os meios em questão uma vez que se trata de compostos com funções antioxidantes, os quais vão acrescentar maior conteúdo nutricional ao produto.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anker, M.; Berntsen, J.; Hermansson, A.M.; Stading, M. Improved water vapour barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innov Food Sci Emerg.* v. 3, p. 81–92, 2002.
- ASTM – American Society for Testing and Materials. Standard test method for moisture content of paper and paperboard by oven drying (D644-99). In: *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, USA: ASTM, 1999.
- Gontard, N; Guilbert, S; Cuq, J.L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, v.57, n.1, p. 190-195, 1992.
- Kristo, E.; Biliaderis, C.G.; Zampraka, A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate–pullulan films: biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chem.*v. 101, p. 753–764, 2007.
- Norajit, K.; Kim, K.M.; Ryu, G.H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *J Food Eng.* v. 98, p. 377–384, 2010.
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agr Food Chem.* v. 53, p. 4290-4302, 2005.

Shojaee-Aliabadi, S.; Hosseini, H.; Mohammadifar, M. A. Mohammadi, A.; Ghasemlou, M.; Ojagh, S.M.; Hosseini, S.M. Y Khaksar, R. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 52, p. 116-124, 2013.

Tapia, M.S.; Rojas-Grau, M.A.; Carmona, A.; Rodríguez, F.J.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloid*. v. 22, p. 1493–1503, 2008.

Yang, L.; Paulson, A. T. Mechanical properties of water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Res Int.* v. 33, p. 563–570, 2000.

Tabela 1. Conteúdo de polifenóis dos filmes aditivados

Filmes	Concentração teórica de polifenóis (mM/g filme seco)	Concentração real de polifenóis (mM/g filme seco)
Acerola	3,32±0,08	1,16±0,11
Caju	1,47±0,05	0,97±0,08
Mamão	0,65±0,03	0,66±0,00
Morango	0,73±0,02	0,63±0,01 ^c
Pequi	0,42±0,04	0,48±0,06

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 2. Percentual de compostos fenólicos presentes nos filmes no final do experimento

Filmes	Processo – Gel 1 (%)	Processo – Gel 2 (%)
Acerola	38,87	44,83
Caju	38,59	43,57
Mamão	40,05	40,73
Morango	40,15	43,58
Pequi	40,93	45,46

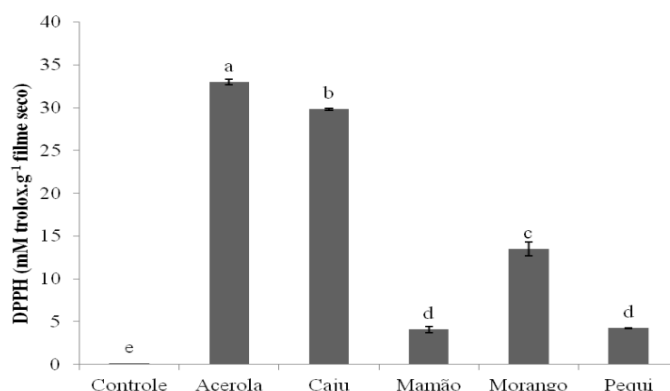


Figura 2. Atividade antioxidante dos filmes de pectina

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

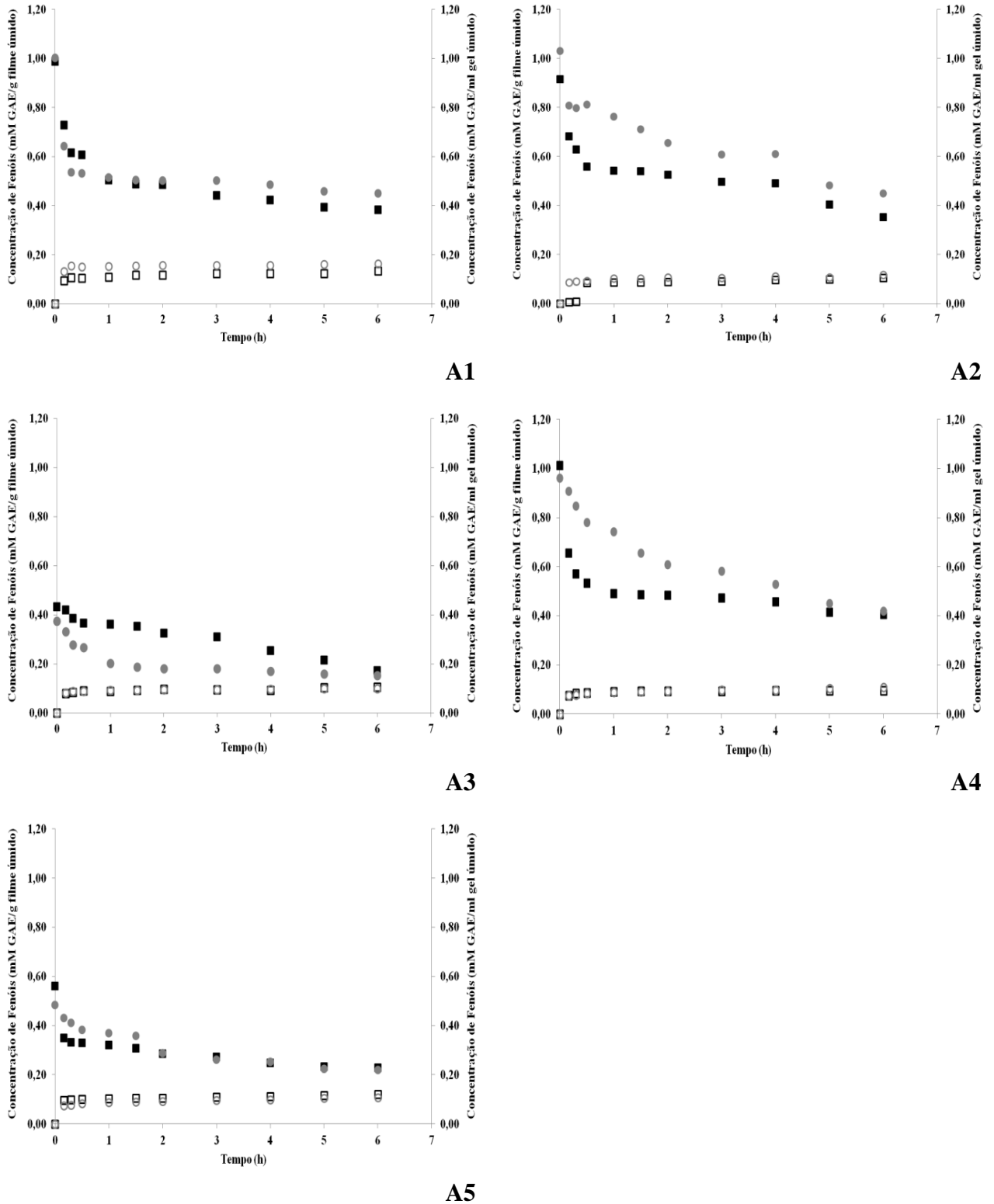


Figura 4.10. Cinética de liberação de compostos fenólicos

Legenda: A1 – acerola; A2 – caju; A3 – mamão; A4 – morango; A5 – pequi

■ FILME 1 (GELATINA); □ GEL 1 (GELATINA); ● FILME 2 (GELATINA + CELULOSE) e ○ GEL 2 (GELATINA + CELULOSE)

DIGESTIBILIDAD DE EMULSIONES DEL TIPO ACEITE EN AGUA ELABORADAS POR HOMOGENIZACIÓN A ULTRA ALTA PRESIÓN: CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN BIOACCESIBLE DE ÁCIDOS GRASOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN

J. Sánchez, C. Fernández-Ávila, B. Juan, A.J. Trujillo

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA), XaRTA, TECNIO, MALTA-Consolider, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, España.

1. INTRODUCCIÓN

La ultra alta presión de homogenización es una tecnología emergente basada en el mismo principio de la homogenización convencional, sin embargo, a través de esta tecnología se alcanzan presiones de hasta 400 MPa. Las fuerzas mecánicas que se generan a estas altas presiones actúan sobre el producto líquido produciendo emulsiones finas y estables (Thiebaud et al., 2003), debido a la disminución del tamaño de partícula al aumentar la presión de homogenización (Lethuaut et al., 2002). Esta disminución del tamaño de partícula reduce también la oxidación de los lípidos presentes en la emulsión produciendo un mejor recubrimiento de las gotitas de aceite (Nakaya et al., 2005), lo cual le confiere mayor estabilidad química. A pesar de ser un sistema que ofrece estabilidad física y química para la incorporación de ácidos grasos esenciales o de componentes bioactivos que pudieran ser encapsulados y liberados durante la digestión, la digestibilidad de emulsiones producidas por homogenización a ultra alta presión no ha sido estudiada hasta el momento. Para evaluar la digestibilidad de emulsiones del tipo aceite en agua se ha utilizado el método pH-stat (Liu et al., 2012; Quian et al., 2012; Li et al., 2011; Li & McClements, 2010) basado en la cuantificación de la actividad de la lipasa pancreática en términos del porcentaje de ácidos grasos libres liberados de estas emulsiones. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la digestibilidad durante el almacenamiento en refrigeración (5°C por 21 días) de emulsiones del tipo aceite (20%) en agua con un emulgente proteico (caseinato sódico y proteína de suero) obtenidas por homogenización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) y homogenización convencional (15 MPa) mediante una digestión *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Caseinato sódico en polvo (88 %), EPÍ Ingredients (Lote 10360014, Ancenis Cedex, France). Proteína de suero en polvo (Prolacta 95, Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France). Aceite de pescado, aceite de girasol refinado y aceite de oliva refinado de Gustav Heess (Barcelona, España). Pepsina de mucosa gástrica porcina (P7000), extracto de bilis (porcino, B8631), lipasa de páncreas porcino, tipo II (L3126), cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), cloruro de sodio (NaCl), ácido clorhídrico 36,5-38,0% e hidróxido de sodio (NaOH) de grado analítico; todos estos reactivos de Sigma-Aldrich Química S.L. (Tres Cantos, Madrid). Se utilizó agua purificada por un sistema Milli-Q (Millipore Ibérica S.A.U., Madrid) para la preparación de todas las soluciones.

2.2. Preparación de las emulsiones

Las soluciones emulsionantes fueron preparadas dispersando en agua purificada caseinato sódico o proteína de suero a diferentes concentraciones (Tabla 1), utilizando un agitador de asta tipo BS (Velp Scientífica, Usmate, Italia) a 400 rpm por 20 min. Estas soluciones fueron almacenadas en refrigeración a 5 °C por 12 h para garantizar la completa hidratación de las proteínas. La preparación de las emulsiones consistió en la homogenización de un 20 % de una fase grasa (mezcla de aceite de girasol refinado y aceite de oliva refinado en proporción 3:1 incluyendo un 3% de aceite de pescado) con un 90 % de una fase acuosa (solución emulsionante) utilizando un sistema rotor-estator (modelo Diax900, Heidolph, Schwabach, Alemania) a 17000 rpm por 15 min a 20 °C. Estas pre-emulsiones fueron sometidas a tratamientos de homogenización convencional a 15 MPa y de homogenización a ultra alta presión de 200 MPa (Tabla 1) utilizando un homogenizador de alta presión modelo Stansted (Benchtop Homogenizator nG12500, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK.) a una temperatura de entrada de 27 °C.

2.3. Estabilidad física durante el almacenamiento en refrigeración

Todas las emulsiones fueron almacenadas en refrigeración a 5 °C por 21 días. Su estabilidad física al día 1, 7, 14 y 21 fue evaluada con un equipo Turbiscan MA 2000 (Formulacion, Toulouse, France).

2.4. Tamaño de partícula

El diámetro medio ponderado por superficie (d_{32}) de las partículas (gotas de grasa) en las emulsiones fue determinado por difracción láser (LS 13 320 series Beckam Coulter, Fullerton, CA, USA).

2.5. Digestión *in vitro*

Para la cuantificación de la fracción bioaccesible de ácidos grasos, las emulsiones fueron sometidas a una digestión *in vitro*. El proceso de digestión se llevó a cabo en dos fases, una fase gástrica (2 h) y una fase intestinal (30 min).

Fase gástrica. Se utilizó una modificación del método de Liu et al. (2012) y Quian et al. (2012). Se preparó un fluido gástrico simulado disolviendo 2 g de cloruro de sodio en agua Milli-Q, luego se añadieron 7 mL de ácido clorhídrico concentrado. Esta solución se diluyó hasta 1 L y se ajustó el pH a 1,2 con una solución de ácido clorhídrico 1 M. En recipientes de vidrio se mezcló una relación 1:3 de cada emulsión con el fluido gástrico simulado previamente incubado a 37 °C en un baño termostatzado digital con agitación horizontal a 95 rpm (OVAN, Badalona, España), luego se añadió pepsina (3,2 mg/mL) y se incubó cada muestra en el baño termostatzado por 2 h (37 °C a 95 rpm).

Fase intestinal. Se utilizó una modificación del método empleado por Li et al. (2011), Li & McClements (2010) y Bonnaire et al. (2008). Finalizada la fase de digestión gástrica, a cada muestra de digerido gástrico (19 mL) se ajustó el pH a 7 (solución de hidróxido de sodio 1 M) para detener la actividad proteolítica de la pepsina. Se añadió bajo agitación (95 rpm con agitador magnético) 15 mL de solución de extracto de bilis (750 mg de extracto de bilis disueltos en buffer fosfato, pH 7 a 37 °C), 1 mL de solución de CaCl₂ (375 mM en agua Milli-Q a 37 °C) y 1 mL de solución de NaCl (5,625 M en agua Milli-Q a 37 °C). Se ajustó el pH a 7 en caso de ser requerido. Se añadió 1,5 mL de suspensión recién preparada de lipasa (90 mg de lipasa dispersa en buffer fosfato pH 7 a 37 °C). Una vez añadida la lipasa e iniciada la lipólisis se procedió a la valoración a pH constante (pH 7) y a 37 °C de los ácidos grasos liberados utilizando el método pH-stat con solución de NaOH 0,1 M (Li & McClements, 2010). La valoración de los ácidos grasos liberados se realizó con un valorador potenciométrico (842 Titrand, Metrohm, Suiza) utilizando el peso molecular de la trioleína como peso promedio de los triacilgliceroles presentes en las emulsiones. De cada digestión se hicieron 2 repeticiones y un blanco sin la adición de enzimas para tener en cuenta cualquier descenso del pH debido a otros factores (Li et al., 2011).

2.6. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y reportados como promedios. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) usando el software estadístico multivariable Statgraphics 7 Plus y se usó el test de Tukey para comparaciones múltiples entre medias ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cinética de liberación de ácidos grasos (fracción bioaccesible) en la fase de digestión intestinal durante los días 1 y 21 (Figura 1a,b) de almacenamiento en refrigeración (5 °C), muestra que la emulsión con un 4% de proteína de suero presenta una disminución promedio (al día 21) en la bioaccesibilidad de los lípidos del orden de un 4,4% cuando fue homogenizada a 200 MPa y de un 13,79% cuando el tratamiento aplicado fue el convencional a 15 MPa (Figura 1b). Para estas emulsiones el tamaño promedio de partícula al día 1 fue de 245 nm a 200 MPa y de 520 nm a 15 MPa. El mayor % de liberación de ácidos grasos al día 1 de almacenamiento (73,19%) se obtuvo en las emulsiones tratadas a 200 MPa (Figura 1a). Por otra parte, las emulsiones con caseinato sódico presentaron una disminución promedio de liberación de ácidos grasos (día 1 a 21) del orden de un 20,32% en emulsiones con un 5% de emulgente proteico a 200 MPa (tamaño promedio de partícula 190 nm día 1) y de un 10,31% en emulsiones con 1% de proteína a 15 MPa (tamaño promedio de partícula 646 nm día 1) (Figura 1b). Sin embargo, es importante destacar que con un 1% de emulgente proteico y homogenización a 15 MPa se obtuvo el menor % promedio de liberación el día 1 y 21 de almacenamiento con valores de 43,23% y de 32,92% respectivamente, en comparación a las emulsiones tratadas a 200 MPa (Figuras 1a y 1b). Las emulsiones con proteína de suero como emulgente fueron más bioaccesibles que aquellas con caseinato sódico. Por otra parte, las emulsiones con proteína de suero ofrecieron un sistema coloidal más estable durante los 21 días de almacenamiento (Figura 2 b,d), lo cual está asociado a una variación mínima del tamaño de partícula inicial de la emulsión. Por el contrario, las emulsiones con caseinato sódico fueron menos estables en el tiempo (Figura 2 a,c), posiblemente debido a fenómenos de coalescencia que incrementaron el tamaño de partícula de la emulsión. Se han identificado un gran número de factores que influyen en la digestibilidad de lípidos micro encapsulados (emulsiones aceite en agua). Algunos de estos factores son la naturaleza y la composición de las paredes de la microcápsula (emulgente utilizado), el tamaño de las gotas de la emulsión (tamaño de partícula), la viscosidad del sistema emulsión y la presencia de otros componentes en la fase acuosa (Calvo et al., 2012). En estudios para la estandarización de la digestión *in vitro* con el método pH-stat de emulsiones de aceite (10% aceite de maíz) en agua estabilizadas con proteína de suero (1%) (Li et al., 2011) se ha establecido que la velocidad y el grado de digestión lipídica se incrementa con la disminución del tamaño de partícula, debido a que el área de lípidos expuestos hacia la fase acuosa de la emulsión se incrementa a medida que el diámetro de las partículas decrece, lo cual provee de más sitios para que las moléculas de lipasa actúen (Li & McClements, 2010). En estos estudios también se ha

establecido que el tipo de emulgente puede retardar la hidrólisis de los lípidos, pero el resultado depende más de las condiciones usadas durante la digestión *in vitro* que de la actividad superficial y la habilidad para inhibir a las sales biliares y la absorción de la lipasa que pueda presentar el emulgente. En el presente trabajo la influencia del tamaño de partícula sobre el % de bioaccesibilidad de los ácidos grasos se hace evidente para las emulsiones con un mismo emulgente proteico. A menor tamaño de partícula mayor bioaccesibilidad de los ácidos grasos. Las emulsiones homogenizadas a ultra alta presión ofrecieron mejores condiciones para la lipólisis de las grasas.

4. CONCLUSIONES

Para un mismo emulgente proteico, las emulsiones obtenidas aplicando el tratamiento de UHPH presentaron mayor digestibilidad que aquellas emulsiones obtenidas por homogenización convencional. El porcentaje de ácidos grasos liberados en la celda de reacción durante la fase intestinal (% bioaccesible) de la digestión *in vitro* (30 min) fue influenciado por el tamaño de partícula de la emulsión, a menor tamaño de partícula mayor digestibilidad de la emulsión. La emulsión con el sistema coloidal más favorable y estable para la liberación de una mayor cantidad de ácidos grasos durante 21 días de almacenamiento a 5 °C (74,19% día 1 y 69,85% día 21) en las condiciones de digestión ensayadas fue aquella con un 4 % de proteína de suero y homogenizada a ultra alta presión (200 MPa). La menor digestibilidad (43,23% día 1 y 32,92 % día 21) se obtuvo con 1% de caseinato sódico y homogenización a 15 MPa.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Qian C., Decker E., Xiao H. & McClements D.J.. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene Bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135, 1440–1447.
- Lethuaut L., Metro F. & Genot G. (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 425–430.
- Bonnaire L., Sandra S., Helgason T., Decker E.A., Weiss J. & McClements D.J.(2008). Influence of Lipid Physical State on the *in Vitro* Digestibility of Emulsified Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3791–3797.
- Nakaya K., Ushio H., Matsukawa S., Shimizu M. & Ohshima T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, 40(5), 501–507.
- Calvo P., Lozano M., Mansilla A.E. & Gómez D.G.(2012). *In-vitro* evaluation of the availability of ω -3 and ω -6 fatty acids and tocopherols from microencapsulated walnut oil. *Food Research International*, 48, 316–321.

Thiebaud M., Dumay E., Picart L., Guiraud J. P. & Cheftel J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427-439.

Liu W., Ye A., Liu C., Liu W. & Singh H. (2012). Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during *in vitro* digestion. *Food Research International*, 48, 499–506.

Li Y., Hu M. & McClements D.J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126, 498–505.

Li Y. & McClements D.J.. (2010). New Mathematical Model for Interpreting pH-Stat Digestion Profiles: Impact of Lipid Droplet Characteristics on *in Vitro* Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8085–8092.

Tabla 1. Formulación de las emulsiones y tratamientos de homogenización

	Proteína de suero	Caseinato sódico
Homogenización a ultra alta presión		
Concentración de proteína (%)	4	5
Concentración de aceite (%)	20	20
Presión (MPa)	200	200
Homogenización convencional		
Concentración de proteína (%)	4	1
Concentración de aceite (%)	20	20
Presión (MPa)	15	15

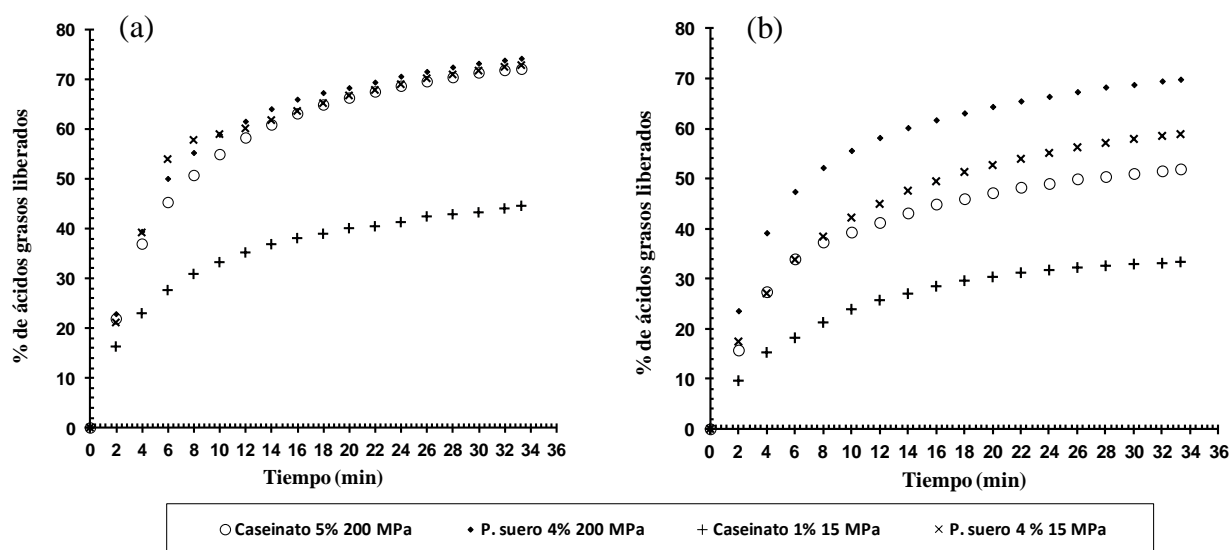


Figura 1. Bioaccesibilidad de ácidos grasos durante la digestión *in vitro* al día 1 (a) y 21 (b) de almacenamiento a 5 °C.

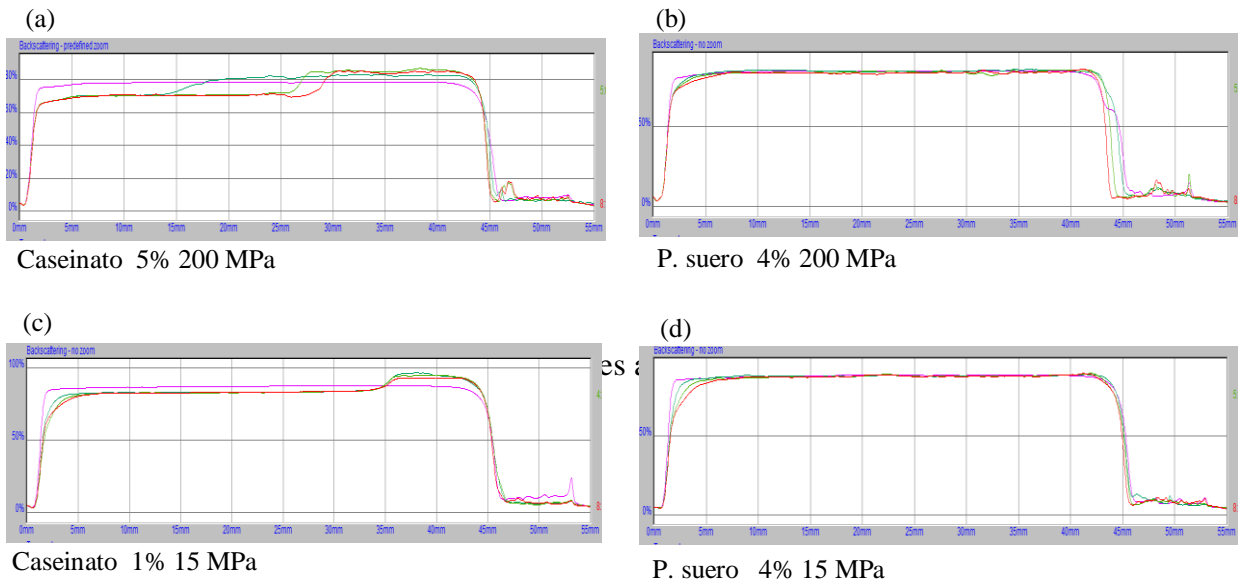


Figura 2. Estabilidad física de las emulsiones a los días 1 (a), 7 (b), 14 (c) y 21 (d) de almacenamiento en refrigeración a 5 °C.

SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS SÃO ADEQUADOS PARA EXTRAÇÃO DE BIXINA DE URUCUM

Guilherme P. Almeida¹, Lizzy P. Alcântara², Valéria P. R. Minim³; Luis A. Minim⁴

¹Eng., Guilherme.p.almeida@ufv.br; ²MSc, lizzy.alcantara@gmail.com; ³DSc, vprm@ufv.br; ⁴DSc, iminim@ufv.br. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Brazil.

1. INTRODUÇÃO

O urucum é um corante natural obtido das sementes de *Bixa orellana L.* e a bixina, um carotenoide lipossolúvel, é o principal pigmento extraído de suas sementes. Sendo muito usada como corante nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, é conhecida por sua capacidade antioxidante. Norbixina é a forma hidrossolúvel resultante da saponificação da bixina em soluções alcalinas de sódio ou potássio. Ambos os carotenóides são considerados promotores de saúde humana, tais como a proteção de células contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Di Mascio et al., 1898; Edge et al., 1997; Agner et al., 2004; Montenegro et al., 2004; Zhang e Zhong, 2013).

A extração e concentração da bixina são geralmente realizadas através da operação de extração líquido-líquido com solventes orgânicos. No entanto, o uso de solventes orgânicos tem o inconveniente de tornar o processo não ambientalmente seguro, podendo causar problemas de saúde devido à sua toxicidade, inflamabilidade e carcinogenicidade (Chao et al., 1991; Mageste et al., 2009; Scotter, 2009).

Na última década, pesquisadores iniciaram estudos de extração com sistemas aquosos bifásicos (SAB), como uma técnica alternativa para a purificação de biomoléculas e até mesmo pigmentos (Chethana et al., 2007; Mageste et al., 2009; Alcântara et al., 2011; Muthuraman, 2011; Mageste et al., 2012; Alcântara et al., 2013).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo aplicar os SAB para estudar a partição de norbixina. Posteriormente, foram determinados os dados de equilíbrio líquido-líquido da norbixina nesses sistemas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Neste experimento foram utilizados polietilenoglicol (PEG) de massa molar média de 2000 g/mol, 4000 g/mol e 6000 g/mol foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Fosfato de potássio, sulfato de sódio, citrato de sódio, hidróxido de sódio e hidróxido de

potássio foram adquiridos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). A amostra comercial de bixina foi obtido por Kraki & Kratschmer Ltda. (Santo André, Brasil). Em todos os experimentos foram empregados reagentes de grau analítico e água ultrapura.

2.2. Preparo dos SAB e experimentos de partição

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque de PEG com concentração 60% (m/m) e soluções de sal com concentração de 20% (m/m). Os valores de pH das soluções estoques de PEG, citrato de sódio e sulfato de sódio foram ajustados com hidróxido de sódio (1 M). Para a solução de fosfato de potássio, utilizou-se hidróxido de potássio (1M). Os valores de pH das soluções foram ajustados e conferidos em pHmetro (HANNA instruments, Brasil).

A montagem dos sistemas foi realizada em tubos de centrífuga de 15 mL, por meio da adição de quantidade pré determinadas de soluções estoques de PEG, solução salina e água ultrapura até se obter um volume final de 10 mL. Os tubos foram agitados em agitador vortex por aproximadamente 1 minuto, centrifugados a $4000 \times g$ por 15 minutos e mantidos em repouso por aproximadamente 24 h em uma câmara (Eletrolab, Brasil) à temperatura de 25° C.

Após esse período, foram coletadas 2 mL de cada fase dos sistemas pré-equilibrados para a montagem dos SABs nos quais foram realizados os experimentos de partição. A esses sistemas contendo as fases superior e inferior já pré-equilibradas foram adicionados 50 µL de solução estoque norbixina (50 mg/mL). Em seguida os quais foram agitados, centrifugados a $4000 \times g$ por 15 min e incubados a temperatura constante de 25 °C por 5 h.

As fases superior e inferior foram coletadas e a concentração de norbixina nessas fases foi determinada por meio da leitura de absorbância no comprimento de onda de 451 nm, em um espectrofotômetro (Biomate 3, Thermo Scientific, USA). O coeficiente de partição da norbixina foi calculado de acordo com a equação 1:

$$K_p = \frac{[norbixina]_{sup}}{[norbixina]_{inf}} \quad (1)$$

Em que $[norbixina]_{sup}$ e $[norbixina]_{inf}$ são as concentrações de norbixina nas fases superior e inferior, respectivamente.

Um delineamento fatorial fracionado de níveis mistos (Tabela 1) com duas repetições foi utilizado para avaliar a influencia dos fatores pH, massa molar e concentração do PEG e concentração e tipo de sal na variável resposta coeficiente de partição (K_p).

Em seguida, o sistema que apresentou o melhor resultado de coeficiente partição foi empregado na extração direta do pigmento norbixina a partir de sementes de *Bixa orellana*.

Para isso, 2 g de semente de urum foram lixiviadas com 12 mL de solução alcalina (pH 11) durante 1 h a 25 °C. A solução extrato foi filtrada e o pH foi ajustado para 8. Uma amostra dessa solução foi separada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após, 30 µL da solução extrato foi adicionada aos SAB pré equilibrados (2 mL de cada fase) e incubados por 5 h. Os sistemas foram então centrifugados a $1400 \times g$ por 10 min e o conteúdo de norbixina nas fases foi determinado por CLAE usando um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Japão) no comprimento de onda de 460 nm. Uma coluna de fase reversa (C18 Shim-pack VP-ODS, 250 x 4.6 mm, Shimadzu) foi empregada para a separação cromatográfica, com fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético (5% v/v) na razão de 75:25 e vazão de 1 mL/min. Um volume de 50 µL de amostra foi injetado no cromatógrafo e o pigmento foi eluído em método isocrático.

2.3 Dados do equilíbrio líquido-líquido

Para a determinação do número de estágios teóricos requeridos para a purificação da norbixina é essencial o uso dos dados de equilíbrio da extração líquido-líquido. Assim, experimentos de partição foram realizados conforme descritos anteriormente usando fosfato de potássio (13% m/m) e PEG 4000 (15% m/m) em pH 11 a 25 °C. Soluções estoque de norbixina foram preparadas em uma faixa de concentração de 10 mg/mL a 300 mg/mL, sendo posteriormente adicionados 200 µL da solução estoque aos SABs pré-equilibrados. Após alcançado o equilíbrio, a concentração de norbixina foi determinada por CLAE. Os experimentos foram realizados em triplicada e os resultados foram apresentados como valores médios e seus respectivos desvios padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios obtidos para o coeficiente de partição da norbixina nas diferentes condições experimentais estudadas são apresentados na Tabela 1. Em todos os experimentos os erros experimentais provenientes do balanço de massa foram inferiores a 10%.

Tabela 1

De acordo com a Tabela 1, verificou-se que a norbixina foi concentrada exclusivamente na fase superior rica em PEG, o que indica que o pigmento apresenta uma maior afinidade com a fase polimérica, uma vez que o PEG é um polímero não iônico e a molécula da norbixina possui uma cadeia carbônica relativamente grande (24 carbonos). Sendo assim, as interações entre a norbixina e a fase poliméricas são favorecidas.

Os resultados experimentais foram então submetidos à ANOVA sendo verificado que o tipo de sal influenciou significativamente ($p < 0,05$) o coeficiente de partição e que o sal fosfato de potássio apresentou os maiores valores de coeficientes de partição da norbixina (Figura 1).

Figura 1

Escolheu-se então o sistema PEG 4000/fosfato de potássio em pH 11 a temperatura de 25 °C para a purificação do extrato de norbixina obtido por lixiviação das sementes de urucum.

Os cromatogramas das amostras do extrato inicial de norbixina e da fase superior do SAB após o processo de purificação do corante são apresentados na Figura 2.

Figura 2

De acordo com a Figura 2, verificou-se a presença de apenas um pico no cromatograma, evidenciando que o emprego do SAB foi eficiente para a extração e purificação da norbixina obtida a partir de matrizes reais e complexas.

Figura 3

Na Figura 3 são apresentados os dados de equilíbrio da norbixina em SAB PEG 4000/fosfato de potássio em pH 11 a temperatura de 25 °C.

Como pode ser visto na Figura 3 o coeficiente de partição da norbixina apresentou uma dependência não linear com a concentração de norbixina, sendo também observada uma difusão dos resultados quando a concentração de norbixina na fase inferior alcança valores acima 0,25 mg/mL, o que pode ser devido a uma saturação da fase causado pela alta concentração do pigmento.

4. CONCLUSÃO

A utilização da técnica de extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos para a separação e purificação da norbixina apresentou-se bastante viável e eficiente visto os elevadores valores de coeficiente de partição obtidos e os perfis cromatográficos do pigmento após o processo de extração líquido-líquido

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

P.D. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, Arch. Biochem. Biophys. 274 (1989) 532.

R. Edge, D.J. Mcgarvey, T.G. Truscott, Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology 41 (1997) 189.

- A.R. Agner, L.F. Barbisan, C. Scolastici, D.M.F. Salvadori, *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 1687.
- M.A. Montenegro, A.O. Rios, A.Z. Mercadante, M.A. Nazareno, C.D. Borsarelli, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 367.
- Y. Zhang, Q. Zhong, *Food Hydrocolloids* 33 (2013) 1.
- R.R. Chao, S.J. Mulvaney, D.R. Sanson, F. Hsieh, M.S. Tempesta, *J. Food Science* 56 (1991) 80.
- A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, *J. Chromatogr. A* 45 (2009) 7623.
- M. Scotter, *Food Additives Contaminants* 26 (2009) 1123.
- S. Chethana, C.A. Nayak, K.S.M.S., Raghavarao, *Journal of Food Engineering* 81 (2007) 679.
- G. Muthuraman, *Desalination* 277 (2011) 308.
- A.B. Mageste, T.D.A. Senra, M.C.H. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.H.M. da Silva, *Separation and Purification Technology* 98 (2012) 69.
- L.A.P. Alcântara, L.A. Minim, V.P.R. Minim, R.C.F. Bonomo, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 1881.
- L.A.P. Alcântara, K.S. do Nascimento, C.A. Mourão, V.P.R. Minim, L.A. Minim, *Separation and Purification Technology* 118 (2013) 888.

Tabela 1. Resultados médios do coeficiente de partição da norbixina.

Tratamento	pH	Concentração de PEG	Concentração de Sal	Massa Molar do PEG	Tipo de Sal	K_p
1	-1	-1	-1	-1	-1	5,99
2	-1	-1	-1	0	0	136,25
3	-1	-1	-1	+1	+1	117,5
4	-1	+1	+1	-1	0	112,25
5	-1	+1	+1	0	+1	150,75
6	-1	+1	+1	+1	-1	84
7	-1	+1	+1	-1	+1	80,14
8	-1	+1	+1	0	-1	92,17
9	-1	+1	+1	+1	0	115,8
10	+1	-1	+1	-1	+1	148
11	+1	-1	+1	0	-1	99,17
12	+1	-1	+1	+1	0	141,5
13	+1	+1	-1	-1	-1	22,12
14	+1	+1	-1	0	0	179,67
15	+1	+1	-1	+1	+1	103,83
16	+1	+1	-1	-1	0	141,25
17	+1	+1	-1	0	+1	93,5
18	+1	+1	-1	+1	-1	101,33

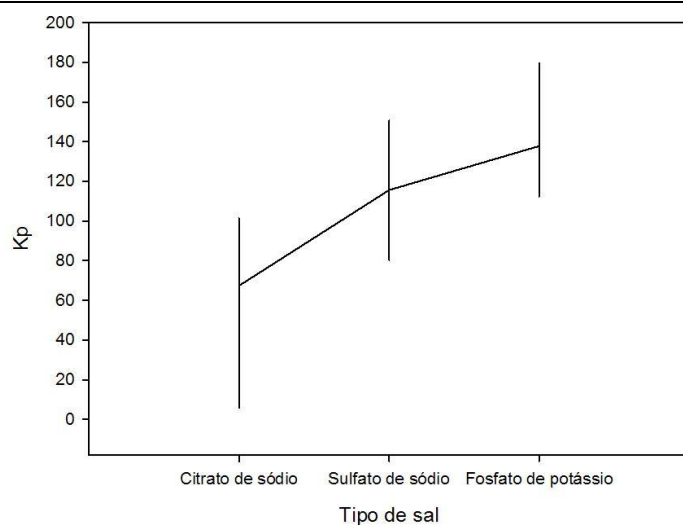


Figura 1. Coeficiente de partição da norbixina em função do tipo de sal.

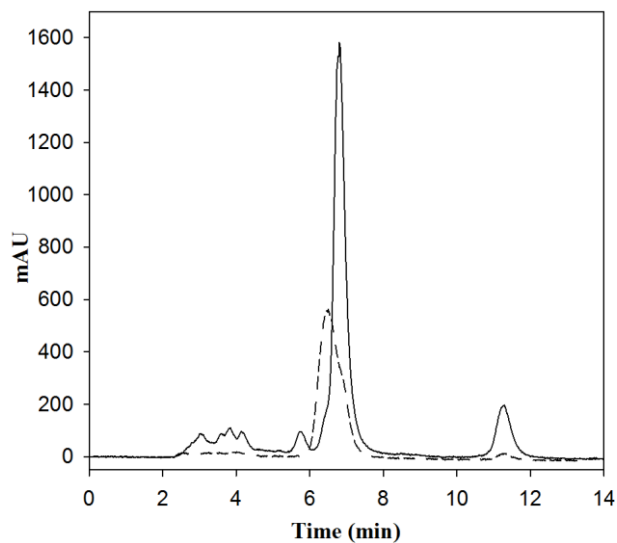


Figura 2. Cromatogramas da norbixina a 460 nm presentes no extrato inicial (linha sólida) e após a extração (linha pontilhada).

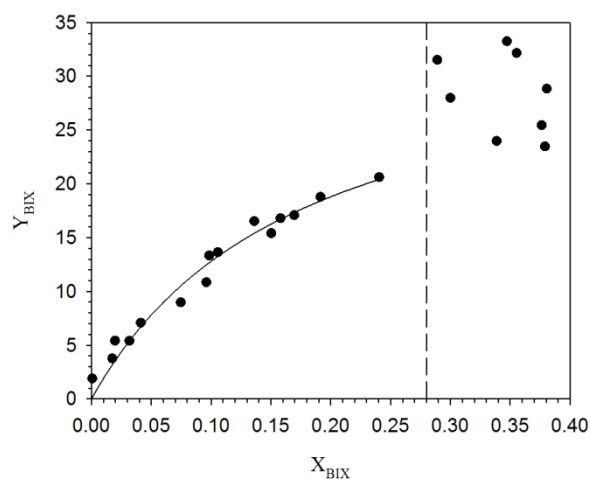


Figura 3. Curva da extração líquido-líquido da norbixina nos sistemas PEG 4000/fosfato de potássio em pH 11 e temperatura de 25 °C.

PELICULAS BI-CAPA CON ACTIVIDAD INSECTICIDA FRENTE A *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Arancibia, M^{1,2}, Rabossi, A³, Bochicchio, P.A³, Moreno, S³, López-Caballero, M.E², Gómez-Guillén, M.C², Montero, P².

¹Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador

²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid- España

³Fundación Instituto Leloir (IIBBA, CONICET), Buenos Aires-Argentina.

INTRODUCCION

A pesar de la preocupación generalizada por los efectos a largo plazo sobre la salud y el medio ambiente de los pesticidas sintéticos especialmente en Europa y América del Norte, los pesticidas naturales tanto de origen microbiano como vegetal no han tenido aún un impacto significativo. Apenas un poco más del 1% del mercado mundial de insecticidas está dominado por productos naturales (EPA, 2010).

En base a lo expuesto, los pesticidas naturales a base de aceites esenciales son una alternativa interesante al uso de productos sintéticos. Los aceites esenciales se obtienen de plantas aromáticas principalmente por arrastre de vapor o prensado. Tradicionalmente han sido utilizados para proteger los granos almacenados y legumbres, o para repeler a los insectos voladores en el hogar (Batish, Singh, Kohli y Kaur, 2008; Moretti, Sanna-Passino, Demontis y Bazzoni, 2002). La actividad de estos aceites está íntimamente relacionada con sus componentes químicos que tienen actividad y capacidad fumigante frente a una serie de insectos (Chaieb y cols., 2007).

Los productos naturales como aceites esenciales han demostrado proporcionar un eficaz control de insectos, son ecológicos y seguros además ofrecen una alternativa que salvaguarda la salud humana en comparación con los productos químicos sintéticos (Nerio, Olivero-Verbel y Stashenko, 2010). Muchos autores han investigado sobre la capacidad fumigante e insecticida de los aceites esenciales de plantas. Regnault-Roger, Hamraoui, Holeman, Theron y Pinel (1993) evaluaron 22 aceites esenciales frente a *Acanthoscelides obtectus* (Bruchidae) con resultados prometedores. Passino, Bazzoni, Moretti y Prota (1999), estudiaron la actividad de aceites esenciales de tomillo, canela, salvia y romero frente a *Ceratitidis capitata* o mosca mediterránea de la fruta y observaron que tanto la canela como el tomillo provocaban la mortalidad del 90% de las moscas en 72h a concentraciones de aceite esencial de 0.25, 0.5 y 1%. Esta mosca fue seleccionada porque provoca serios daños en los cultivos, se reproduce y adapta rápidamente ya que no posee depredadores potenciales.

Algunos aceites esenciales interfieren con el sistema nervioso octopaminérgico de los insectos, que no es compartido con los mamíferos, y proporcionan una alternativa más segura para el control de plagas y no es tóxica para mamíferos y peces (Koul, Walia y Dhaliwal, 2008). El eugenol compuesto mayoritario del aceite esencial de clavo ha demostrado tener actividad frente a insectos (Enan, 2001; Huang, Ho, Lee y Yap, 2002) y además se considera seguro y sin riesgos (EPA, 2004).

Sin embargo, los compuestos activos *per se* y los aceites esenciales en especial requieren una matriz que sirva como soporte. En este sentido el empleo de películas biodegradables elaboradas a partir de biopolímeros permite la liberación controlada de compuestos activos como los aceites esenciales y actúan además como una barrera frente a agentes externos como humedad, vapores y gases con lo cual se logra extender la vida útil y la calidad de los productos a los que protegen (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz e Ibarz, 2011). Debido a estas propiedades, estas películas se utilizan para el recubrimiento de carnes, frutas y vegetales (Coma, 2008). Sin embargo su aplicación a sistemas agroalimentarios es prometedora, no solo por su biodegradabilidad, sino además por la liberación controlada de compuestos activos como repelentes de insectos. La utilización de películas biodegradables se supone una práctica amigable con el ambiente, algo particularmente difícil de conseguir con materiales sintéticos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar a nivel de laboratorio el potencial que tienen las películas biodegradables de proteína de soja y lignina, activadas con aceite esencial de clavo, para proteger del ataque de insectos a frutas o cultivos, utilizando un bioensayo con individuos adultos de *Ceratitis capitata* como sistema modelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las películas: las películas se prepararon por la técnica de moldeo en dos etapas a fin de obtener una película de doble capa. La primera capa se preparó de la siguiente manera: el aislado de proteína de soja (SPI) (PRO FAM, ADM, Decatur, IL, EE.UU.) se disolvió en agua destilada (4 g/100 ml) a temperatura ambiente. El plastificante glicerol fue añadido (1% w/v) y el pH se ajustó hasta 8,0 con NaOH 2N, a continuación, se añadió formaldehído (3,3 mmol/100mL) con agitación constante durante 10 min. El pH se ajustó a 10,5 utilizando NaOH 2N. Simultáneamente se preparó otra solución disolviendo lignina comercial (Protobind 1000, Granit I + D SA, Lausanne, Suiza) en agua destilada a una concentración de 0,6 % (w/v) ajustando el pH a 11,0 con NaOH 2N. Ambas soluciones se

mezclaron con agitación constante durante 15 min y se ajustó el pH hasta 11,0. Se colocaron entonces 25 ml de la mezcla resultante sobre placas de plexiglás ($\varnothing = 12 \times 12 \text{ cm}^2$) y se secaron a 45 °C en estufa de aire forzado (Binder FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 6 h.

La segunda capa se preparó siguiendo el método descrito anteriormente, con la excepción del plastificante (glicerol), que fue sustituido por aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllata*, Isabrubotanik®, S.A) en una concentración de 3% (w/w) y se homogeneizó con un equipo Ultra - Turrax (T25, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania), 3 min a 17,500 rpm. El aceite esencial contenía 85% de eugenol (dato proporcionado por la empresa). Una vez obtenida esta primera solución se añadió la solución de lignina (preparada como se describió anteriormente) y se mezcló en un agitador magnético para evitar la formación de burbujas. La mezcla obtenida (25 ml) se vertió lentamente sobre la primera capa y se secó a 45 °C durante 6 h. En las películas “control” no se adicionó aceite esencial. Las películas resultantes fueron acondicionadas sobre una solución saturada de KBr (58 % de HR) durante 5 días.

Insectos: moscas *Ceratitis capitata* tipo salvaje (cepa "Mendoza") fueron criadas en un medio rico en calabaza y mantenidas en una cámara Conviron (CMP 3244) a 23 °C, a 50-60% de humedad relativa, con fotoperiodos de 16:8 (luz: oscuridad). Estos insectos se utilizaron para poner huevos representativos de la población estándar de laboratorio. Para todos los experimentos, las moscas adultas (con menos de 2 días de edad) fueron recogidas bajo CO₂ y colocadas en frascos con libre acceso a sucrosa:levadura seca (3:1) y 1 % de agar como fuentes de alimento y agua, respectivamente.

Bioensayo: el efecto fumigante e insecticida del aceite esencial en las películas se realizó con algunas modificaciones al método de Tarelli, Zerba, & Alzogaray (2009). Las películas de aproximadamente 4 y 36 cm² que contienen aceite esencial al 3% (5,2 mg AE/cm²) fueron suspendidas en la parte superior de un matraz de 1 L (18 cm de altura, 10,5 cm y 7,5 cm de diámetro inferior y superior, respectivamente). Para evitar el contacto directo de las moscas, cada película se cubrió con un trozo de gasa (Figura 1A). Grupos de 25 moscas vírgenes se enfriaron a 4 °C y rápidamente se introdujeron en el matraz. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento. Después de un período de equilibrio de 20 min, contabilizó el tiempo que tardan las moscas en caer abatidas. Consideramos una mosca derribada cuando ha caído sobre el suelo de la cámara en posición supina o cuando fueron incapaces de caminar. El efecto insecticida de las películas se determinó contando las moscas muertas después de 20 horas de exposición.

Análisis de datos: los datos fueron evaluados con un análisis de varianza ANOVA con el software Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos demostraron por primera vez un método adecuado para controlar la liberación de aceite esencial de clavo en películas biodegradables a base de proteína de soja y lignina con actividad insecticida. Inicialmente la actividad insecticida del aceite esencial de clavo en las películas fue evaluada con trozos de película de 4 o 36 cm². En la Tabla 1 se puede apreciar la alta mortalidad provocada al utilizar las películas de 36 cm² con 3% de aceite esencial (90% de moscas muertas), que fueron significativamente superiores que al utilizar una película de 4 cm² (8%). Ningún efecto de mortalidad fue observado en los controles (películas sin aceite esencial).

La Figura 1B muestra el porcentaje de moscas muertas (40%) durante las primeras 4 horas de exposición a las películas de 36 cm². Por otro lado las películas de 4 cm² no presentaron actividad insecticida significativa. El aceite esencial de clavo contiene como principal compuesto activo el eugenol (85%). Recientemente se ha documentado que este compuesto tiene actividad insecticida (Chaieb, y cols., 2007; Huang, Ho, Lee, y Yap, 2002) y que su inclusión en películas biodegradables genera cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas de la matriz polimérica (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, e Ibarz, 2011). En base a estos resultados se considera que la actividad insecticida está relacionada con un efecto acumulativo durante la evaporación del aceite esencial en el tiempo de exposición de las moscas. Además las películas activas con aceite esencial de clavo parecen ser una buena alternativa para mantener y extender la bioactividad de un compuesto en el tiempo y en base a materiales biodegradables.

CONCLUSIONES

Actualmente, el uso de productos químicos sintéticos para controlar insectos plantea problemas relacionados con el medio ambiente y la salud humana. Una práctica alternativa es utilizar productos naturales que posean actividad insecticida, biodegradables y además sean amigables con el medioambiente. En este trabajo se presenta una aplicación para un sistema de envasado o protección de alimentos o cultivos en base a películas biodegradables con liberación controlada de compuestos bioactivos del aceite esencial de clavo que presentaron actividad fumigante e insecticida contra la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitidis capitata*.

BIBLIOGRAFÍA

- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166-2174.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1), 90-103.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy research*, 21(6), 501-506.
- Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325-337.
- EPA. (2004). Floral attractants, repellents, and insecticides fact sheet. In.
- EPA. (2010). Insect repellent use and safety in children. In.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303.
- Huang, Y., Ho, S.-H., Lee, H.-C., & Yap, Y.-L. (2002). Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(5), 403-412.
- Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic Int*, 4(1), 63-84.
- Moretti, M. D., Sanna-Passino, G., Demontis, S., & Bazzoni, E. (2002). Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPs PharmSciTech*, 3(2), 64-74.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372-378.
- Passino, G. S., Bazzoni, E., Moretti, L., & Prota, R. (1999). Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae) adult flies. *Journal of Applied Entomology*, 123(3), 145-149.
- Regnault-Roger, C., Hamraoui, A., Holeman, M., Theron, E., & Pinel, R. (1993). Insecticidal effect of essential oils from mediterranean plants upon *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae), a pest of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of chemical Ecology*, 19(6), 1233-1244.
- Tarelli, G., Zerba, E., & Alzogaray, R. A. (2009). Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of economic entomology*, 102(3), 1383-1388.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de moscas *Ceratitis* al exponerlas a películas de SPI-lignina con 3% de aceite esencial de clavo de olor. La mortalidad se registró después de 20 h de exposición. El ensayo se repitió cuatro veces con 25 adultos por ensayo. No se observaron diferencias significativas en el área de 4cm² (p = 0,2755), si existieron diferencias significativas en el área 36cm² (p <0,0001).

Área de la película (cm ²)	Porcentaje de mortalidad (% ± d.s)	
	<i>Control</i>	<i>Película con AE</i>
4	5.04 ± 1.97	8.00 ± 9.24
36	3.50 ± 2.52	90.00 ± 4.00

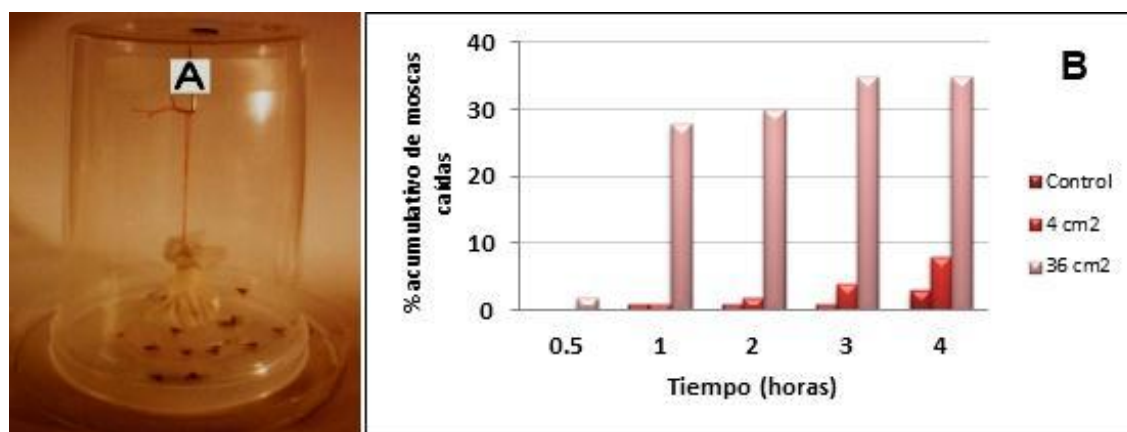


Figura 1. A) Cámara experimental para evaluar la actividad fumigante e insecticida de las películas activas. B) moscas muertas durante la exposición a películas activas de soja, lignina y aceite esencial de clavo de 4cm² y 36 cm² y el control sin aceite esencial.

CONTROL ANTI-FÚNGICO EN PLÁTANO (*MUSA ACUMINATA*) MEDIANTE PELÍCULAS ACTIVAS

Arancibia, M^{1,2}, López-Caballero, M.E², Gómez-Guillén, M.C², Montero, P².

¹Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador

²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid- España

INTRODUCCIÓN

El plátano de la especie *Musa acuminata*, variedad utilizada para postre, es uno de los principales cultivos de Latinoamérica y se estima que su producción mundial llega a los 16 millones de toneladas métricas por año (Loeillet, 2012; Ploetz, 2006). Sin embargo, ciertas enfermedades como el “*Mal de Panamá*” producido por el hongo *Fusarium oxysporum* representan cuantiosas pérdidas en las plantaciones de todo el mundo. Más del 80% de las especies de plátano del mundo son susceptibles de esta enfermedad (SENASICA, 2012). Por ejemplo, China se vio afectada en el año 2000 por esta enfermedad que arrasó el 25% del total de la superficie de producción. Si bien en la actualidad no existen estudios científicos sobre el control químico o biológico de esta patología, la utilización de aceites esenciales pudiera ser una alternativa viable para el control del crecimiento del hongo. Moleyar y Narasimham (1986) evaluaron la actividad antimicrobiana de 15 componentes de los aceites esenciales frente a *F. oxysporum*. Estos autores observaron que tanto la citronela como el geraniol, compuestos mayoritarios del aceite esencial de citronela, inhiben el crecimiento de éste microorganismo tanto en medio líquido como en su forma volátil. Otros investigadores emplearon aceite esencial de albahaca y sus componentes mayoritarios mostraron diferentes efectos de inhibición contra *Fusarium oxysporum*, ya que su actividad estuvo condicionada fundamentalmente por el porcentaje de los componentes principales: cineol, linalol, metilcavicol y eugenol (Reuveni & Putievsky, 1984). Además de por sus propiedades antimicrobianas, algunos autores utilizan este aceite en micro y nanoencapsulados con miras a ser aplicados como repelentes de insectos (Hsieh, Chang, & Gao, 2006; Specos, et al., 2010). Esta doble actividad hace del aceite esencial de citronela una alternativa versátil. El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de citronela en películas biodegradables de liberación controlada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fruta: plátanos (*Musa acuminata*) sin madurar adquiridos en un supermercado local, fueron colocados sobre bandejas de polietileno divididas en dos grupos: grupo C: (control recubierto con la película biodegradable sin agente activo) y grupo PA (recubierto con la película bioactiva). Las películas se perforaron para simular un proceso de comercialización normal con películas plásticas perforadas.

Preparación de las películas: las películas se prepararon por la técnica de moldeo para películas en bi-capa según lo descrito por Arancibia y cols., 2013. La primera capa se preparó de la siguiente manera: el aislado de proteína de soja (SPI) (PRO FAM, ADM, Decatur, IL, EE.UU.) se disolvió en agua destilada (4 g/100 ml) a temperatura ambiente. El plastificante glicerol fue añadido (1% w/v) y el pH se ajustó hasta 8,0 con NaOH 2N, a continuación, se añadió formaldehído (3,3 mmol/100mL) con agitación constante durante 10 min. El pH se ajustó a 10,5 utilizando NaOH 2N. Simultáneamente se preparó otra solución disolviendo lignina comercial (Protobind 1000, Granit I + D SA, Lausanne, Suiza) en agua destilada a una concentración de 0,6 % (w/v) ajustando el pH a 11,0 con NaOH 2N. Ambas soluciones se mezclaron con agitación constante por 15 min y se ajustó el pH hasta 11,0. Se colocaron entonces 25 ml de la mezcla resultante sobre placas de plexiglás ($\varnothing = 12 \times 12 \text{ cm}^2$) y se secaron a 45 °C en estufa de aire forzado (Binder FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 6 h. La segunda capa se preparó siguiendo el método descrito anteriormente, excepto que el plastificante (glicerol) fue sustituido por aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllata*, Isabrubotanik®, S.A) en una concentración de 3% (w/w) y se homogeneizó con un equipo Ultra-Turrax (T25, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) durante 3 min a 17,500 rpm. Una vez obtenida esta primera solución se añadió la solución de lignina (preparada como se describió anteriormente) y se mezcló con ayuda de la agitación magnética para evitar la formación de burbujas. La mezcla obtenida (25 ml) se vertió lentamente sobre la primera capa y se secó a 45 °C por 6 h. Las películas “control” se prepararon de la misma forma descrita anteriormente con excepción de que en la segunda capa no se adicionó aceite esencial. Las películas resultantes fueron acondicionadas sobre una solución saturada de KBr (58% de HR) durante 5 días.

Análisis microbiológico: la actividad antimicrobiana de las películas C y PA se determinó por el método de difusión en agar. Discos de 5 mm de diámetro de las películas se colocaron sobre la superficie de Agar Patata Dextrosa (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) previamente inoculada con *F. oxysporum* CECT 2867. Después de la incubación (35 °C durante 3-5 días)

se observó el crecimiento microbiano con el software de Corel Photo Paint X3 y se expresó el grado de inhibición de la siguiente manera: + + +: totalmente inhibido; + +: parcialmente inhibido; +: ligeramente inhibido; -: ninguna inhibición. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Ensayo de conservación: los plátanos fueron cubiertos por las películas C y PA respectivamente con la capa que contenía el aceite esencial hacia el exterior para que no entre en contacto directo con el fruto. Los lotes se almacenaron a 15 °C durante 6 días. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas mediante la mezcla en bolsas estériles (Sterilin, Staffordshire, Reino Unido) de 10 g de plátano pelados con 90 ml de agua de peptona tamponada estéril 0,1% y se homogenizó usando un Stomacher (modelo Colworth 400, Seward, Londres) durante 1 min. Para el recuento de mohos y levaduras se utilizó el método de propagación en superficie de agar glucosa extracto de levadura y cloranfenicol (YGC) (Oxoid) las placas fueron incubadas a 35 °C durante 3-5 días. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Color: Los parámetros de color L^* (luminosidad), a^* (rojo/verde) y b^* (amarillo/azul) fueron determinados con un colorímetro Konica Minolta CM-3500d (Konica Minolta, Madrid, España). Las medidas fueron tomadas en 5 lugares diferentes de la fruta y por lo menos 15 veces.

Análisis sensorial: se realizó una prueba triangular (UNE 87 006 92) sobre los plátanos para identificar diferencias durante la aplicación de las películas con y sin aceite esencial. Antes del análisis, las películas que recubrían las muestras se retiraron. Para la prueba se contó con diez panelistas semi-entrenados siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE.

Análisis estadístico: las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.) para el análisis unidireccional de la varianza usando la prueba de Bonferroni con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

La película con aceite esencial presentó inhibición (++) frente a *Fusarium oxysporum*, hongo causante del *Mal de Panamá* (marchitamiento en el plátano) mientras que la película C que no contenía aceite esencial no presentó inhibición (-). El potencial de los aceites esenciales como agentes antifúngicos se ha descrito en la literatura (Bakkali, Averbek, Averbek e Idaomar, 2008; Moleyar y Narasimham, 1986; Reuveni y Putievsky, 1984). Así, Bakkali, Averbek, Averbek e Idaomar, 2008 obtienen que la aplicación de aceite esencial de hierba santa (paico), taray, salvia, o compuestos mayoritarios como el linalol, inhiben el

crecimiento de *F. oxysporum* Teniendo en cuenta la importancia de los aceites esenciales como compuestos activos respetuosos del medio ambiente, su aplicación en plátanos demostró que la citronela y los compuestos volátiles liberados de la matriz polimérica tienen actividad antifúngica. La película C inhibe el crecimiento del hongo en apenas un 4.6% mientras que en las PA se alcanzó una inhibición del 28%, seis veces por encima del control. Esto sugiere que los compuestos mayoritarios liberados desde la película generan un efecto acumulativo que favorece la inhibición microbiana, tal como fue observado por Moleyar y Narasimham (1986).

Inicialmente, los valores de luminosidad fueron de 67.98 ± 7.30 , $a^* = -12,49 \pm 4,76$ y $b^* = 50,45 \pm 1,40$ (indican una clara tendencia al verde). Durante la conservación se logró mantener el color de la fruta, y al final del ensayo (6 días), la muestra con la película C presento los valores de $L^* = 83,26 \pm 1,54$ $a^* = 17,63 \pm 1,64$ $b^* = 84,48 \pm 2,05$; estos valores indican una clara tendencia al amarillo producto de la maduración de los plátanos tras el almacenamiento. El comportamiento del plátano cubierto con la película PA fue similar ($L^* = 80.59 \pm 1.75$, $a^* = 0.78 \pm 1.10$ $b^* = 68.7 \pm 1.04$) lo que indica que la presencia del aceite no altera el grado de maduración del fruto (Fig. 1).

En cuanto a las propiedades sensoriales no se vieron afectadas por la aplicación de películas. Los panelistas no detectaron ningún olor o sabor extraño. Este resultado sugiere que la aplicación de películas en bicapa es una alternativa para utilizar aceites esenciales sobre alimentos sin alterar sus propiedades sensoriales.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un recubrimiento en base a materiales biodegradables de origen natural como la proteína de soja, lignina y el aceite esencial de citronela. Este envase presenta actividad antifúngica y no genera cambios apreciables en las propiedades sensoriales del alimento.

BIBLIOGRAFIA

- Arancibia, M., Rabossi, A., Bochicchio, P. A., Moreno, S., López-Caballero, ME, Gómez-Guillén, MC, Montero P. (2013). Biodegradable Films Containing Clove or Citronella Essential Oils against the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Agriculture and Food Technology*, 3(3), 1-7.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Hsieh, W.-C., Chang, C.-P., & Gao, Y.-L. (2006). Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2), 209-214.

Loeillet, D. (2012). The international banana market from one world to the other In: FAO.

Moleyar, V., & Narasimham, P. (1986). Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology*, 3(4), 331-336.

Ploetz, R. C. (2006). Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653-656.

Reuveni, A. F. R., & Putievsky, E. (1984). Fungistatic Activity of Essential Oils from *Ocimum basilicum* Chemotypes. *Journal of Phytopathology*, 110(1), 20-22.

SENASICA. (2012) *Mal de Panamá* (Vol. 2013). Mexico.

Specos, M. M., García, J., Tornesello, J., Marino, P., Della Vecchia, M., Tesoriero, M. D., & Hermida, L. (2010). Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(10), 653-658

UNE 87-006-92. (1992). Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madrid, España.

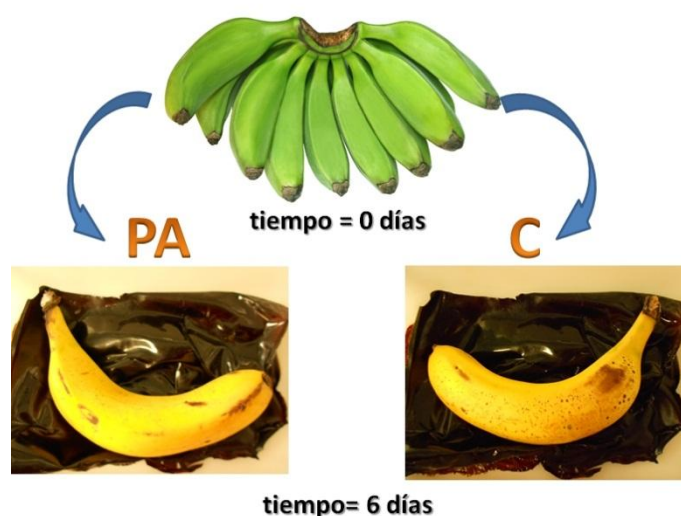


Figura 1. Aspecto de los plátanos tras el ensayo de conservación

APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A PARTIR DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS EN EL DESARROLLO Y CONSERVACION DE PRODUCTOS

Arancibia, M^{1,2}, Alemán, A², González, F^{2,3}, López-Caballero, M.E², Gómez-Guillén, M.C², Montero, P².

¹Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador

²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid- España

³Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid- España

1.INTRODUCCIÓN

El envasado de los alimentos, ya sean crudos o elaborados y listos para su consumo, tiene como finalidad la conservación y protección de los mismos. En este sentido, el crecimiento microbiano y la oxidación son las dos causas de alteración más importantes contra las que va dirigido (Tharanathan, 2003). La utilización de envases plásticos se ha extendido por sus buenas propiedades físicas, no obstante, al no ser biodegradables, la acumulación de los mismos representa un serio problema medioambiental. Por ello, en los últimos años ha incrementado el interés por la elaboración de envases comestibles, a partir de polímeros naturales. Estos envases, además de ser comestibles y biodegradables se pueden elaborar a partir de materiales de desecho de la industria alimentaria.

Los residuos generados por la industria procesadora de crustáceos representan entre un 50 y un 70% del material original (Holanda & Netto, 2006). Estos residuos constituyen una fuente importante de quitina o de su derivado deacetilado, el quitosano (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). El quitosano ha sido ampliamente estudiado por sus múltiples aplicaciones industriales, y más recientemente por sus buenas propiedades antimicrobianas y filmogénicas (Coma et al., 2002; Huang et al., 2005; Friedman & Juneja, 2010).

Por otra parte, debido a sus excelentes propiedades filmogénicas, la gelatina es también un polímero ampliamente utilizado para la elaboración de envases comestibles. Además, su particular capacidad para formar geles termorreversibles en frío, dota a dichos envases la capacidad de mantener su estructura durante la conservación en refrigeración, congelación o incluso a temperatura ambiente, pudiendo fundirse fácilmente durante el cocinado.

Para el envasado de alimentos estos biopolímeros se pueden aplicar en forma de película o de recubrimiento. Las películas se emplean para envolver o cubrir el alimento y pueden ser ingeridas directamente con el mismo, o bien retirarse antes del consumo. En el

caso de los recubrimientos comestibles, éstos generan una fina capa en contacto íntimo con el alimento que no se separa del mismo (Sathivel, 2005; López-Caballero *et al.*, 2005); esta forma de conservación se puede aplicar sobre frutas, carnes, pescados y otros alimentos. Estos recubrimientos comestibles pueden ser una alternativa a corto plazo para conservar los productos de forma más natural. Además, en la formulación de los mismos se puede recurrir a la incorporación de compuestos con actividades específicas, generalmente antimicrobianas o antioxidantes.

El agua procedente de la cocción de crustáceos contiene una gran cantidad de efluentes con una elevada carga orgánica y un exceso de salinidad, lo que representa un peligro para el medio ambiente (Pérez-Santín *et al.*, 2013). Así, la recuperación del material orgánico residual presente en crustáceos de agua de cocción, además de reducir el coste de los tratamientos descontaminantes, permitiría también una valorización de los residuos, mediante una búsqueda de compuestos con propiedades bioactivas. Estos desechos de crustáceos son una fuente importante de péptidos, proteínas y carotenoides (Pérez-Santín *et al.*, 2013).

Así, el objetivo del presente trabajo experimental, fue el estudio del efecto de un recubrimiento comestible (elaborado a partir de quitosano, gelatina de pescado y un concentrado de aguas de cocción de langostinos), en la conservación en refrigeración de un reestructurado de surimi.

2.MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del concentrado de langostino

El concentrado de langostinos se obtuvo a partir de aguas de cocción. Las aguas de cocción (suministradas por Angulas Aguinaga Burgos) fueron centrifugadas en un separador centrífugo vertical (GEA Westfalia, OKA 2-06-566, Dusseldorf, Alemania). El precipitado obtenido tras la centrifugación se congeló para su posterior utilización en la elaboración del recubrimiento.

Preparación del recubrimiento comestible

El recubrimiento comestible se elaboró a partir de quitosano procedente de caparzones de crustáceos (Guinana, Valencia, España). Gelatina de piel de pescado de aguas cálidas (Lapi Gelatine, Florencia Italia), y el concentrado de aguas de cocción de langostinos. El quitosano (1% p/p con relación al peso final) se disolvió en ácido láctico 0.15M, mientras que la gelatina (1% p/p con relación al peso final) y el concentrado de langostinos (2% p/p con relación al peso final) se disolvieron en agua. Se adicionó además un 20% (p/p con

respecto al peso final de la gelatina) de glicerol y un 0.2% (p/p con respecto al peso final del concentrado) de tween 80.

Preparación y conservación del reestructurado

El reestructurado (en forma de salchicha), se preparó mediante gelificación a partir de un surimi de Abadejo de Alaska. En un homogeneizador a vacío (Stephan FD112M10-72D Universal Machine, Germany) y a una temperatura de -2°C, se mezcló el cloruro de sodio (2%), almidón (5%) y clara de huevo (1%) con agua (cantidad necesaria para obtener una humedad final del 76%). El homogenizado obtenido se embutió en tripas de celulosa con una embudadora de engranajes (Mainca Deluxe, España). El tratamiento térmico de gelificación aplicado a las salchichas fue de 30 minutos a 90°C en un horno ahumador Eller (modelo Unimatic 1000, Micro 40, Eller, Merano, Italia). Una vez finalizado el tiempo de cocción se sumergió el reestructurado en agua y hielo para enfriarlo rápidamente. Posteriormente se mantuvo en refrigeración durante 20h. Pasadas las 20h, 15 salchichas se cubrieron con un plástico de cocina convencional (lote C) y otras 15 se sumergieron 2 veces (2 minutos cada vez) en el recubrimiento comestible de quitosano-gelatina-concnetrado de langostino (lote F). Ambos lotes de reestructurados de surimi fueron conservados en refrigeración.

Propiedades mecánicas del reestructurado durante el período de conservación (test de Kramer)

EL test de Kramer, que intenta imitar la masticación humana, se realizó en un texturómetro ANAME (TA-XT,Plus, NY, EEUU), con una célula de carga de 30 Kg y una sonda de Kramer pequeña de cinco cuhillas (sonda HDP/MK05), a una velocidad de 100mm/min. Se realizaron cinco mediciones por muestra. Los resultados se expresaron en N/g.

Determinación del pH del reestructurado durante el período de conservación

Para la determinación de pH las muestras se homogenizaron en un ultraturrax IKA, con agua destilada en proporción 1:10 (p/v). El pH se determinó con un pHmetro digital (Thermo Orion 3 Star,USA), a temperatura ambiente, y por triplicado.

Análisis microbiológico

Las técnicas microbiológicas se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar (Telstar, modelo AV 30/70, Madrid, España). Se mezclaron 10 gramos del reestructurado de surimi con 90ml de agua de peptona tamponada (Scharlau,España), en bolsas de plástico estériles. La mezcla se homogeneizó en un homogeinozador Stomacher (Colworth 400,

Seward, London, UK) durante 1 minuto. Se prepararon diluciones decimales de la muestra con agua de peptona, y se sembraron en placas de petri en diferentes medios.

Recuento de microorganismos aerobios totales

El medio utilizado para esta técnica fue PCA (Plate Count Agar, Scharlau, España). Se sembró 1ml de muestra en profundidad y se incubó 72 h \pm 3 h, a 30°C \pm 1°C. El límite permitido según la legislación Española es de 10 log ufc por gramo en productos sólidos.

Recuento de enterobacterias

Se llevó a cabo de acuerdo con la norma VF V08-054 (AFNOR, 1999), y el medio utilizado fue VRBG (“Violet red bile glucose agar”, Oxoid, UK). Se sembró 1ml de muestra en profundidad, y se incubó a 30°C durante 48 h. El límite permitido según la legislación Española es de 10 log ufc por gramo en productos sólidos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características microbiológicas del reestructurado de surimi cubierto con un plástico convencional (C) y con un recubrimiento comestible (F).

Inicialmente, debido al efecto del tratamiento térmico, los recuentos de microorganismos totales en el reestructurado de surimi estuvieron por debajo del límite de detección. En el reestructurado control (C), los microorganismos totales se incrementaron de forma exponencial desde etapas muy tempranas de la conservación, alcanzando 9 log ufc/g a los 22 días (Tabla 1). Raju et al., 2003 obtuvieron recuentos del orden de 10⁷ ufc/g en salchichas refrigeradas de Japanese threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) a los 30 días de conservación. La aplicación del recubrimiento de quitosano, gelatina y concentrado de langostinos en el reestructurado (F), aumentó la fase de latencia de los microorganismos hasta los 14 días, con una inhibición superior de 7 ciclos logarítmicos respecto al lote control (Tabla 1). El grupo de enterobacterias evolucionó de forma similar a los microorganismos totales, el reestructurado cubierto con el plástico convencional (C) supera los 3 log ufc/g a los 8 días de conservación, mientras que el reestructurado con el recubrimiento comestible (F) alcanza estos niveles superados los 15 días ($p \leq 0.05$). El recubrimiento de gelatina-quitosano-concentrado de langostino permitió alargar la vida útil del reestructurado más de 15 días.

3.2. pH del reestructurado de surimi cubierto con un plástico convencional (C) y con un recubrimiento comestible (F).

El reestructurado de surimi presentó el día de su preparación (día 0) un pH de 6,80. Dicho valor de pH varió para el producto, cuando éste fue cubierto con plástico convencional

(C), de 6,83 (día 1) a 6,57 (día 22). Para el reestructurado mantenido en conservación con el recubrimiento comestible (F), la fluctuación de los valores de pH fue de 6,45 (día 1) a 6,25 (día 42). El comportamiento del pH, tanto cuando el producto fue cubierto con el plástico convencional (C), como con el recubrimiento comestible (F), se mantuvo con tendencia lineal y constante a lo largo del tiempo, situándose siempre en valores de pH próximos a 7 (neutro), siendo éste un pH idóneo para peces de carne blanca (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2004).

3.3. Dureza del reestructurado de surimi cubierto con un plástico convencional (C) y con un recubrimiento comestible (F).

La dureza del producto, tal y como puede observarse en la Figura 1, tampoco se vio afectada durante la conservación, independientemente de que el reestructurado hubiese sido cubierto con el plástico convencional o con el recubrimiento comestible de quitosano, gelatina y concentrado de langostino.

4. CONCLUSIONES

La aplicación de un recubrimiento comestible (quitosano-gelatina-concentrado de langostino), sobre un producto pesquero reestructurado, permite aumentar la vida útil del producto, sin afectar sus propiedades mecánicas y su pH.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162-1169.
- Friedman, M., Juneja, V.K. 2010. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection* 73 (9), 1737-1761.
- Holanda, H.D., Netto, F.M. 2006. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science* 71 (5), pp. C298-C303.
- Huang, R., Mendis, E., & Kim, S. (2005). Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36, 120-127.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 87-94.

Raju, C. V., Shamasundar B. A., Udupa, K. S. 2003. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28 ± 2 °C) and refrigerated (6 ± 2 °C) temperatures. *International Journal of Food Science & Technology* 38, 2, 171–185.

Sathivel, S. (2005). Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid oxidation of pink salmon (*oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Science*, 70(8), e455-e459.

Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). Color and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white. *Food Research International*, 37(8), 767-775.

Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14: 71-78.

6. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Crecimiento microbiano (microorganismos totales y enterobacterias), durante la conservación en refrigeración (42 días), del reestructurado de surimi cubierto con un plástico convencional (C) y con el recubrimiento comestible de quitosano-gelatina-concentrado (F).

Días	1	4	9	15	17	22	25	29	32	36	39	42
MAT												
Log (UFC/g)												
C	1.0	3.4	4.2	7.3	8.9	9.0						
F	1.0	1.0	1.0	1.0	4.2	4.7	5.4	6.1	6.4	7.3	7.9	8.2
Enterobacterias												
Log (UFC/g)												
C	1.0	1.0	3.4	6.9	8.9							
F	1.0	1.0	1.0	2.4	4.1	4.6	4.9	5.5	6.1	6.2	6.9	7.2

MAT: microorganismos aerobios totales.

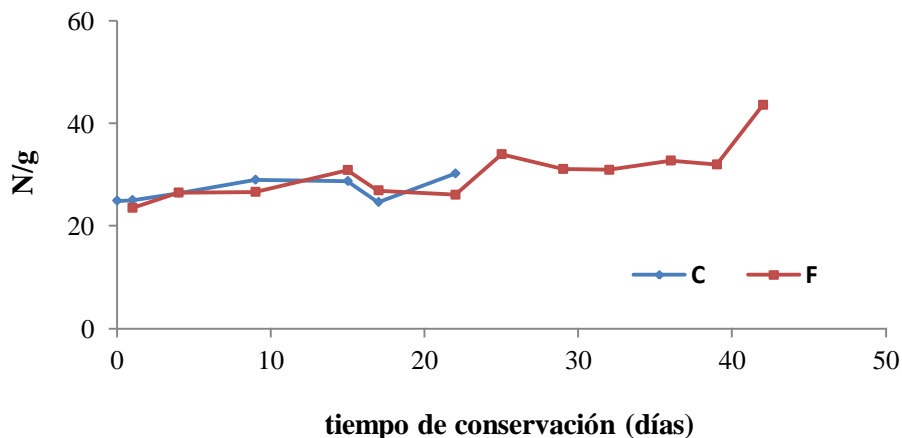


Figura 1. Estudio de la textura (test de Kramer), durante la conservación en refrigeración (42 días), del reestructurado de surimi cubierto con un plástico convencional (C) y con el recubrimiento comestible de quitosano-gelatina-concentrado (F).

DESARROLLO DE PELICULAS ACTIVAS A PARTIR DE RESIDUOS DE LANGOSTINO (*PENAEUS VANNAMEI*)

Arancibia, M^{1,2}, Alemán, A², López-Caballero, M.E², Gómez-Guillén, M.C², Montero, P².

¹Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador

²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid- España

INTRODUCCION

La industrialización de productos de la pesca deja como resultado gran cantidad de desperdicios. Uno de los productos más comercializados dentro del sector pesquero es el langostino, del cual se aprovecha únicamente el 50% (que representa el músculo) y se desecha el 50% (que representa la cabeza y exoesqueleto) (Sachindra, Bhaskar y Mahendrakar, 2006). Estos desechos son una fuente invaluable de proteínas y biopolímeros que sin un adecuado aprovechamiento se convierten en un problema medioambiental (Gildberg y Stenberg, 2001). Si bien en la actualidad los desechos provenientes de crustáceos son utilizados (secos y triturados) como alimento para animales (Coward-Kelly, Agbogbo y Holtzaple, 2006; Oliveira Cavalheiro, Oliveira de Souza y Bora, 2007), una alternativa al aprovechamiento de estos residuos es la obtención de proteínas, hidrolizados proteicos, quitina y su derivado el quitosano (Gildberg y Stenberg, 2001; Pérez-Santín, Calvo, López-Caballero, Montero y Gómez-Guillén, 2013). La proteína tiene gran potencial como aditivo o suplemento alimentario y la quitina sometida a un proceso de desacetilación puede fácilmente convertirse en quitosano. El quitosano es el único polímero catiónico pseudonatural y por lo tanto, encuentra muchas aplicaciones que se derivan de su carácter único como agente antimicrobiano, biodegradable, biocompatible, floculante para la recuperación de proteínas o descontaminación, por su capacidad filmogénica en la elaboración de geles, o películas y fibras (Koide, 1998; Rinaudo, 2006). Arancibia y cols., 2014 utilizaron desperdicios de langostino (cabeza y exoesqueleto) para obtener proteínas y quitosano con potencial aplicación como agentes antimicrobianos y antioxidantes. Estos subproductos de la industria de los crustáceos pueden ser utilizados como ingredientes activos en el desarrollo de películas. El objetivo de este trabajo fue utilizar subproductos obtenidos a partir de desechos de langostino y evaluar su potencial aplicación en el desarrollo de películas bioactivas.

MATERIALES Y METODOS

Obtención del concentrado proteico y el quitosano: la proteína se aisló a partir de langostino (*Litopenaeus vannamei*) proporcionados gentilmente por Angulas Aguinaga Burgos (Burgos, España), siguiendo el método descrito por Arancibia y cols., (2014). Los residuos de langostino (cefalotórax y exoesqueleto) se suspendieron en agua y se sometieron a una autólisis a 40 °C durante 4 h con agitación constante. Luego de la inactivación a 80 °C, los residuos se mantuvieron a 2 °C durante 12h. A continuación se separó el material quitinoso de la fase acuosa. La fase acuosa fue centrifugada (10,000xg, 30 min, 5 °C), el sobrenadante desechado y el sedimento que constituye el concentrado proteico (P) se liofilizó (42% de proteína, grasa 11%, minerales 29%).

La quitina se obtiene a partir de material quitinoso, después de una desproteínización enzimática y una desmineralización con ácido láctico (75,6 g/L), en relación de 1:3 (p/v) durante 36 horas a 21 °C (Arancibia y cols., 2014). La desacetilación de la quitina se llevó a cabo con una solución de NaOH al 10%, relación de 1:7 (p/v) durante 72 horas a 100 °C con agitación constante. El quitosano (Q) así obtenido se lavó con agua destilada hasta la neutralidad y se caracterizó en su grado de desacetilación por espectroscopia de infrarrojo siguiendo el método descrito por Miya, Iwamoto, Yoshikawa y Mima (1980).

Preparación de las películas: con el quitosano obtenido se preparó una solución al 2% p/p en ácido láctico 0,15M (pH 3,2). El concentrado proteico obtenido (1% p/p) se dispersó en una solución de ácido láctico 0,15 M y se sonicó (Q700, Qsonica, CT, EE.UU.) durante 1 min al 100% de amplitud. La película de quitosano (PQ) se preparó mezclando la solución filmogénica de quitosano (2% p/p) con la solución de ácido láctico 0.15M en una proporción 1:1 (p/p) hasta una concentración final de quitosano de 1% (p/p). La película de quitosano-proteína (PQP) se preparó mezclando la solución filmogénica de quitosano (2% p/p) con la dispersión de proteína (1% p/p) en una proporción 1:1 (p/p) hasta obtener una concentración final de quitosano de 1% w/w y proteína 0,5% w/w. Las soluciones filmogénicas así obtenidas (25 ml) se colocaron sobre placas de plexiglás ($\varnothing = 12 \times 12 \text{ cm}^2$) y se secaron a 45 °C en estufa de aire forzado (Binder FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 12h. Las películas se acondicionaron al 58% HR en desecadores con NaBr por 4 días antes de los análisis.

Determinación de las propiedades mecánicas: los ensayos de tracción y de punción en las películas se realizaron en un analizador de textura TA.XT2 plus (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, EE.UU), controlado por el software Texture Exponent (Texture Technologies, by Stable Micro Systems, Ltd., Scarsdale, NY, USA). Las muestras fueron recortadas con

forma rectangular (100 mm x 20 mm) de acuerdo al método descrito por Blanco-Pascual, Fernández-Martín y Montero (2013) . El ensayo de perforación (punción) se realizó con películas de 100 × 100 mm. Las películas se fijaron en una celda de 35 mm de diámetro y el ensayo se realizó de acuerdo al método descrito por Sobral, Menegalli, Hubinger y Roques (2001). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado a temperatura y manteniendo las muestras a 58 % de humedad relativa hasta el momento del ensayo.

Capacidad antioxidante de las películas: se determinó por FRAP (poder antioxidante de reducción férrica) siguiendo el método previamente descrito por Alemán, Giménez, Montero, y Gómez- Guillén (2011). Ambas películas se disolvieron en agua destilada y se agitaron hasta lograr una solución homogénea. Las soluciones se filtraron a través de papel Whatman N° 1. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Fe/g}$. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Actividad Antimicrobiana: la actividad antimicrobiana de las películas comestibles se determinó por el método de difusión en agar tal como lo describió anteriormente Gómez-Estaca, López de Lacey, López- Caballero, Gómez- Guillén , y Montero, (2010), modificando el diámetro del disco utilizado. Discos de 30mm de diámetro de cada una de las películas se colocaron sobre la superficie de agar previamente inoculado con los microorganismos. Las cepas seleccionados por ser responsable del deterioro de pescado, se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *Escherichia coli* CECT 515, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192 y *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898. Después de la incubación (37 °C durante 48 h) se observó el crecimiento microbiano con el software Corel Photo Paint X3 el grado de inhibición se expresó de la siguiente manera: + + +: totalmente inhibido; + +: parcialmente inhibido; +: ligeramente inhibido; -: ninguna inhibición. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico: las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.) para el análisis unidireccional de la varianza usando la prueba de Bonferroni con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades mecánicas: La adición de la proteína afectó las propiedades mecánicas de las películas (Tabla 1). El concentrado proteico provocó una reducción en la deformación durante la punción y un incremento en la resistencia a la tracción. Por otra parte, el incremento en el módulo de Young sugiere que P hace a la película más rígida (Tabla 1). Es bien sabido que la

adición de proteínas a las soluciones de quitosano afecta directamente las propiedades mecánicas y la funcionalidad de las películas (Ferreira y cols., 2009). Este hecho podría ser debido en parte a modificaciones estructurales durante la adición de CP que llevaron a obtener películas más rígidas con propiedades mecánicas mejoradas.

Actividad antioxidante: la capacidad antioxidante de las películas (según el método FRAP) se muestra en la Tabla 1. La película PQP presentó un poder reductor mucho mayor que PQ. Si bien el quitosano presenta *per se* capacidad antioxidante como lo han descrito Kim y Thomas (2007), la adición de CP incrementó la capacidad antioxidante de la película. Este hecho podría estar relacionado a la presencia de carotenoides o proteína parcialmente hidrolizada en CP. Resultados similares fueron observados por Manni, Ghorbel-Bellaaj, Jellouli, Younes, & Nasri (2010) en diferentes crustáceos incluyendo los de la especie *Penaeus sp.*

Actividad antimicrobiana: las películas obtenidas inhibieron el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas (Tabla 2). La adición del concentrado proteico favoreció considerablemente la actividad antimicrobiana. En este sentido, la actividad antimicrobiana del quitosano ha sido discutido ampliamente en la literatura (Fernández-Saiz, Ocio y Lagaron, 2010). López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos y Montero (2005) observaron que los recubrimientos de gelatina-quitosano extienden la vida útil en productos a base de pescado. La presencia de CP incrementó significativamente la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano. En el presente estudio, este comportamiento se observó para la totalidad de los microorganismos seleccionados (Tabla 2). Resultados similares fueron observados por Arancibia y cols., (2014) en quitosano, concentrados e hidrolizados proteicos obtenidos a partir de desperdicios de crustáceos. Este comportamiento puede estar asociado a la carga positiva del quitosano (NH^{3+}) (Kim y Rajapakse, 2005) y que además es sumatoria cuando se adiciona el concentrado proteico en la película PQP. En este último caso, el concentrado proteico puede contener péptidos bioactivos (Gildberg y Stenberg, 2001) o péptidos antimicrobianos tales como penaeidinas (Rosa y Barracco., 2010).

CONCLUSIONES

Las películas obtenidas a partir de residuos de crustáceos mostraron excelentes propiedades funcionales y actividad biológica. La adición del concentrado proteico mejoró considerablemente la matriz biopolimérica y favoreció sus propiedades bioactivas (capacidad antioxidantes y antimicrobiana); por lo cual, su aplicación en alimentos es muy prometedora

BIBLIOGRAFÍA

- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Carmen Gómez-Guillén, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, M. (2013). Effect of different protein extracts from (*Dosidicus gigas*) muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 118-131
- Coward-Kelly, G., Agbogbo, F. K., & Holtzapfle, M. T. (2006). Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. *Bioresource Technology*, 97(13), 1515-1520.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M., & Lagaron, J. (2009). The use of chitosan in antimicrobial films for food protection. *Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour*, 5, 1-11.
- Ferreira, C. O., Nunes, C. A., Delgadillo, I., & Lopes-da-Silva, J. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807-813.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8), 809-812.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Kim, K. W., & Thomas, R. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101(1), 308-313.
- Kim, S.-K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357-368.
- Koide, S. (1998). Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 18(6), 1091-1101.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S., & Mima, S. (1980). Ir spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(5), 323-324.
- Oliveira Cavaleiro, J. M., Oliveira de Souza, E., & Bora, P. S. (2007). Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) feed. *Bioresource Technology*, 98(3), 602-606.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M., López-Caballero, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 87-94

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.

Rosa, R., & Barracco, M. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr Surviv J*, 7, 262-284.

Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26(10), 1092-1098.

Sobral, P. d. A., Menegalli, F., Hubinger, M., & Roques, M. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 423-432

Tabla 1. Propiedades mecánicas y capacidad antioxidante (FRAP) de PQ y PQP.

Muestra	Resistencia a la tracción (MPa)	Módulo de Young	Deformación a la punción (%)	FRAP (μmol Fe/g)
PQ	8.2 ± 1.9 ^a	85.4 ± 2.54 ^a	70.3 ± 4.1 ^a	7,70 ± 0,05 ^a
PQP	18,3 ± 1,8 ^b	168.8 ± 10.2 ^b	21.9 ± 1.8 ^b	15,34 ± 0,20 ^b

Resultados con media y desviación estándar. Análisis de varianza de una vía. Letras diferentes (a,b) en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (P≤0.05).

Tabla 2. Actividad antimicrobiana cualitativa de las películas frente a microorganismos del deterioro.

Microorganismo	PQ	PQP
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	+	+++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++	+++
<i>Escherichia coli</i>	++	+++
<i>Listeria Monocytogenes</i>	+	+++

EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS DESDE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE CONTACTORES DE MEMBRANA: EFECTO DE LAS VARIABLES OPERACIONALES Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.

W.E. Silva¹, E.X. Morales¹, Mendoza², M. Cotoras², J.R. Romero¹

¹Universidad de Santiago de Chile. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, LabProSeM, Chile.

² Departamento de Química de los Materiales, Universidad de Santiago de Chile.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, existe un creciente interés en la forma de recuperación de componentes bioactivos desde fuentes naturales para el desarrollo de alimentos funcionales y aditivos sin trazas de solventes orgánicos. (Duarte, 2010)

Entre aquellos componentes se tiene aquellos de naturaleza fenólica que pueden ser utilizados en diferentes procedimientos terapéuticos con el propósito de neutralizar los radicales libres en sistemas biológicos e inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad humana, así como también, actuar como antibacterianos, anti-inflamatorios, anti – carcinogénico y antivirales. (Correa, 2011)

En general, las técnicas analíticas de extracción se ven influenciadas por la naturaleza química del componente, relación solvente – soluto y la presencia de sustancias interferentes. Las extracciones han sido realizadas por procesos de extracción tradicionales, tales como la extracción sólido – líquido utilizando solventes orgánicos con diferentes polaridades, tales como metanol, etanol, acetona, etil acetato y no orgánicos como el agua, pura o mezclada (Cavero, 2006). Sin embargo, existen desventajas asociadas con las técnicas clásicas de extracción, tales como la necesidad de una gran cantidad de solvente, consumo de tiempo y el tratamiento de una considerable cantidad de productos de desecho. (Sunarso, 2009)

Una alternativa es el uso de la extracción sólido – gas mediante fluidos supercríticos debido a su rapidez, selectividad y obtención de productos libres de solvente residual. Además, de contribuir de forma significativa sobre la estabilidad de los componentes que son termo – sensibles, sensibles a la luz y al oxígeno. (Junior, 2010)

Los fluidos a temperaturas y presiones sobre los valores críticos poseen propiedades termodinámicas únicas. Además, las tasas de transferencia de masa son mayores en un fluido supercrítico que en un líquido, y los valores de constante dieléctrica y solubilidad pueden cambiar bruscamente con un cambio de presión alrededor del nivel crítico. (Hirokazu, 2008)

En particular, el dióxido de carbono es benigno medioambientalmente, y en su estado de fluido supercrítico (FSC) ha demostrado un significativo potencial para el desarrollo de un amplio rango de procesos alternativos, que en su totalidad o parcialidad eliminan el uso de algunos de los solventes orgánicos más utilizados. Además, más del 98 % de las aplicaciones han sido desarrolladas usando dióxido de carbono a su baja temperatura crítica (31,18 °C) y relativamente baja presión crítica (7,4 MPa), bajo costo, no inflamable, no tóxico, reciclable y medio ambientalmente benigno. (Pasquali, 2008)

Por otro lado, estudios previos han evaluado el procesamiento de vino tinto y blanco con propósitos de discriminación entre variedades en un sistema continuo mediante CO₂ supercrítico (Vejrosta, 2003) operado en una columna empacada en contracorriente bajo condiciones operacionales de 50 (°C) y 20 (MPa) con flujos de vino y CO₂ entre 0,5 – 0,7 (mL/min) y 3,7 (mL/min), respectivamente. La recolección del extracto se realizó en alcohol, lo cual evidenció que las antocianinas y otros componentes coloreados de alto peso molecular no fueron extraídos desde ambos tipos de vinos.

En base a lo mencionado anteriormente, el siguiente trabajo busca determinar la influencia de las variables operacionales sobre el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos totales desde vino tinto cepa *Cabernet Sauvignon* junto a la caracterización química del producto sólido obtenido utilizando CO₂ en condiciones supercríticas en un contactor de fibras huecas líquido – gas denso en estado continuo.

Este trabajo es el primer paso para obtener un extracto comercial con un número restringido de compuestos que permitan valorizar vinos de descarte o de baja calidad.

En este trabajo se utilizará un sistema de circulación y contacto no dispersivo entre el vino y el CO₂ supercrítico, el cual estará basado en un contactor de membranas de fibras huecas.

Los contactores de membrana son un tipo de membranas que, por lo general, no son selectivas y de naturaleza macroporosa, típicamente fabricadas de materiales hidrofóbicos. Desde el punto de vista funcional, actúa como una barrera física pasiva y como un medio de contacto de dos fluidos inmiscibles sin dispersión de una fase en otra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El vino utilizado para la extracción fue *Cabernet Sauvignon* producido en la Zona Central chilena (Santiago, Chile). CO₂ (pureza ≥ 99.0 %) fueron obtenidos desde Praxair,

Chile. Reactivos como ácido gálico $C_7H_6O_5$ (pureza ≥ 99.0 %), carbonato de sodio Na_2CO_3 (pureza ≥ 99.9 %), reagente folin – Ciocalteu, cloroformo deuterado (pureza ≥ 99.8 %), ácido acético glacial Na_2CO_3 (pureza ≥ 99 %) y metanol grado HPLC fueron suministrados por Merck S.A., Chile. Asimismo, acetonitrilo grado HPLC y tubos de RMN fueron suministrados por Sigma Aldrich, Chile. El sistema de extracción con fluidos supercríticos fue diseñado y construido en el laboratorio utilizando componentes y fitting de Thar Technologies, Jasco, Swagelok y Autoclave Engineers.

Métodos

Extracción con CO_2 supercrítico

En este trabajo, se realizó el diseño, construcción de un sistema de extracción con fluidos supercríticos acoplado a un contactor de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE, Teflón®). El diseño del sistema de extracción se describe en la Figura 1.

Las condiciones operacionales evaluadas fueron 303 – 323 K, 12 – 18 MPa, flujo de CO_2 60 – 80 mL/min CNTP y flujo de vino 0,1 – 0,5 mL/min acorde a un diseño experimental. La disposición de los flujos de CO_2 y vino a través del contactor de membrana fue contracorriente, y circulan a través de la carcasa y el lumen de la fibra, respectivamente.

Contenido total de polifenoles

La extracción de polifenoles totales desde el vino tinto fue cuantificada utilizando el método folin – Ciocalteu. Se agrega 100 μ L de muestra de vino a tubos eppenderf (1,5 mL), 50 μ L de reactivo de folin, homogeneizar y mantener a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, agregar 150 μ L de Na_2CO_3 20% y 700 μ L de agua deionizada, homogeneizar y mantener a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, diluir 500 μ L de esta muestra con 4,5 mL de agua y realizar la lectura en espectrofotómetro UV a 760 nm. La concentración de polifenoles en la muestra fue calculado utilizando una solución estándar de ácido gálico entre 5 – 55 μ g/mL y las mediciones fueron realizados en duplicado. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/mL vino tinto).

Medición espectro FTIR

Un espectro FTIR (Bruker, modelo ALPHA) fue realizado a la muestra sólida obtenida desde la expansión del CO_2 utilizando el fenómeno Joule – Thomson inmediatamente después de la sección de extracción en el contactor de membrana. Las muestras previamente al análisis fueron liofilizadas a -40 °C y la presión varía entre 0,01 – 0,1

mbar por un período de tiempo de 24 horas para disminuir contenido de agua. La muestra fue depositada sobre la superficie de cristal bajo presión para ser analizada bajo la técnica ATR (Reflectancia Total Atenuada) y escaneada desde 400 a 4000 cm^{-1} a intervalos de 4 cm^{-1} . El número de escáneres generados por muestra fue de 24 y el procesamiento de los espectros fue realizado mediante software Opus V.7.

HPLC barrido fase Reversa con gradiente.

Se procedió a solubilizar 4,7 mg de la muestra sólida con 0,94 mL de Acetonitrilo (Concentración de 5 mg/mL) a temperatura ambiente, posteriormente fue diluida 50 veces para evaluar el peak en técnica HPLC. El análisis fue realizado en un HPLC Waters 600 (Waters, Mildford, MA, USA) equipado con un detector – array – diodo Waters 2990, y una columna Symmetry C18 (5 μm) con dimensiones 4,6 x 250 mm. El sistema solvente consistió de una solución acuosa de ácido acético 1% (A) y Metanol (B). La tasa de flujo volumétrico fue de 1 mL/min constante.

Medición calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis se llevó a cabo en un equipo DSC Mettler DSC – 882e. La muestra sólida previamente liofilizada (4 mg) se analizó en un barrido térmico a una tasa constante de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en atmósfera de nitrógeno, de acuerdo al programa de calentamiento de 20 a 300 $^{\circ}\text{C}$.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El diseño experimental consistió de 81 experiencias sin réplica (tabla no mostrada) diseñada y evaluada en el software Statgraphics ®.

Como se visualiza en la Fig.2, se visualiza que existe un notorio incremento del flujo transmembrana al trabajar en condiciones críticas, es decir, a baja temperatura y altas presiones, lo cual se podría atribuir al aumento en el valor de constante dieléctrica del gas (mayor poder solvente), por otro lado, al aumentar la temperatura a una presión constante si bien es cierto existe una disminución de las resistencias hidrodinámicas de la solución líquida se visualiza un descenso en los valores de flujo de materia, posiblemente atribuible a que en gases al aumentar la temperatura, aumenta la viscosidad y para un incremento de temperatura a presión constante, existe una disminución en el valor de densidad, aumentando la resistencia y disminuyendo el poder solvente del fluido, respectivamente. Con respecto al porcentaje de extracción de los compuestos polifenólicos Fig.3, se visualiza que existe un incremento en su

magnitud a medida aumenta la presión del sistema para todos los niveles de flujo de vino a través de la fibra. Lo anterior, se atribuye al incremento de la densidad del CO₂ que circula por la carcasa del sistema y está presente en los poros de la membrana, permitiendo la difusión de los componentes. Por otro lado, a medida que se incrementa el flujo de vino, existen mejores condiciones de transferencia de masa al disminuir la resistencia hidrodinámica en las capas límites.

Con respecto al análisis FTIR (Fig.4a) y DSC (Fig.4b), se aprecia que la naturaleza del extracto obtenido presenta grupos funcionales característicos tales como grupos metilo/metileno ($\approx 2900 - 3000 \text{ cm}^{-1}$), carbonilo ($\approx 1700 \text{ cm}^{-1}$) y anillo aromático ($\approx 1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$). Por otro lado, mediante el DSC se aprecian 2 peak de reacción endotérmica a temperaturas de 125 °C y 255 °C, indicando la presencia de 2 compuestos en el extracto obtenido a través del proceso de extracción.

En base a los resultados previos, se procedió a desarrollar un HPLC (300 nm) con gradiente para la correcta visualización y recolección para análisis químicos de RMN. De acuerdo al correcto ajuste de los gradientes de las fases móviles, junto al flujo de alimentación, se obtuvo la separación de ambos componentes (Fig.5) en una columna analítica a tiempos de 16,3 y 31,8 minutos para posteriormente escalar el proceso de separación utilizando una columna semipreparativa.

CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo diseñar e implementar un sistema de extracción supercrítica continua de polifenoles directamente desde vino tinto utilizando un proceso de contacto no dispersivo basado en contactores de membrana.

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos para el flujo transmembrana se obtuvo que la respuesta óptima de 0,0356 (mol/hm²) dentro de los niveles estudiados se obtiene para valores de temperatura de 30 °C, una presión de 180 bar, flujo de líquido 0,5 mL/min y flujo de CO₂ de 60 mL/min, siendo el flujo de vino el efecto más estadísticamente significativo.

Con respecto al porcentaje de extracción, se observó que para el rango de niveles evaluados, el máximo porcentaje de extracción obtenido es de 15,85 % para valores de temperatura 30 °C, una presión de 180 bar, flujo de vino de 0,5 mL/min y flujo de CO₂ de 60 mL/min, siendo el flujo de vino el efecto estadísticamente significativo.

El proceso de extracción de compuestos orgánicos a partir de vino tinto *Cabernet Sauvignon* presenta un rendimiento de extracción de sólido seco de 21,1 mg/L de vino procesado, y con tiempos de residencia en el contactor de membrana de 15 segundos aproximadamente por circulación en condiciones actuales de procesamiento de 35 °C, 180 bar, 85 mL/min y 1 mL/min de alimentación de CO₂ atmosférico y vino, respectivamente. Es conveniente señalar que el rendimiento obtenido corresponde a 2 circulaciones a través del sistema de contactor de membrana.

Los procedimientos analíticos realizados al extracto sólido obtenido a partir de vino tinto, señalan que existe la presencia de sólo 2 componentes, cuya caracterización química continua siendo evaluada mediante técnicas de RMN 1D y 2D.

Para las condiciones de proceso, se verificó la estabilidad del contactor de membrana, sin embargo, para flujos de vino superiores a 1 mL/min existe el colapso de la interfase líquido – gas denso, por lo cual sería un parámetro limitante junto a la utilización de temperaturas superiores a 50 °C por la naturaleza termosensible de los polifenoles.

BIBLIOGRAFÍA

- Catarina M.M.Duarte, A. I. (2010). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *Journal of Supercritical Fluids* 55, 184 – 191.
- H.A. Martinez-Correa, P. c. (2011). Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *Journal of Supercritical Fluids* 55, 998 – 1006.
- A.Cavero, M.-R. F. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. *Journal of Supercritical Fluids* 38, 62 - 69.
- Sunarso J., I. S. (2009). Decontamination of hazardous substances from solid matrices and liquids using supercritical fluids extraction: a review. *J. Hazard. Mater.* 161, 1 - 20.
- M.R.M. Junior, A. N. (2010). Supercritical Fluid Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds from natural sources Review (Supercritical Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds). *The Open Chemical Engineering Journal* 4, 51 – 60.
- Hirokazu Okamoto, K. D. (2008). Application of supercritical fluid to preparation of powders of high - molecular weight drugs for inhalation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 433 - 446.
- Irene Pasquali, R. B. (2008). Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid - state of pharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 399 - 410.
- Yong-Hee Choi, K. G. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 485 – 490.

Vejrosta J., K. P. (2003). Direct continuous supercritical fluid extraction as a novel method of wine analysis. Comparison with conventional indirect extraction and implications for wine variety identification. *Journal of Chromatography A*. 1002, 13 - 23.

Pabby A.K., R. S. (2009). *Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceuticals, Food, and Biotechnological Applications*. U.S: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Porcheron F., D. S. (2009). Hollow fiber membrane contactor transient experiments for the characterization of gas/liquid thermodynamics and mass transfer properties. *Chemical Engineering Science* 64, 265 – 275.

Estay H., B. S. (2007). Modeling and simulation of mass transfer in near-critical extraction using a hollow fiber membrane contactor. *Chemical Engineering Science* 62, 5794 – 5808.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se lleva a cabo con el soporte del proyecto FONDECYT n°1100305 (CONICYT Chile), Beca CONICYT para estudios de Doctorado en Chile y Beneficio de Gastos Operacionales, CONICYT, otorgada al Sr. Wladimir Silva.

FIGURAS

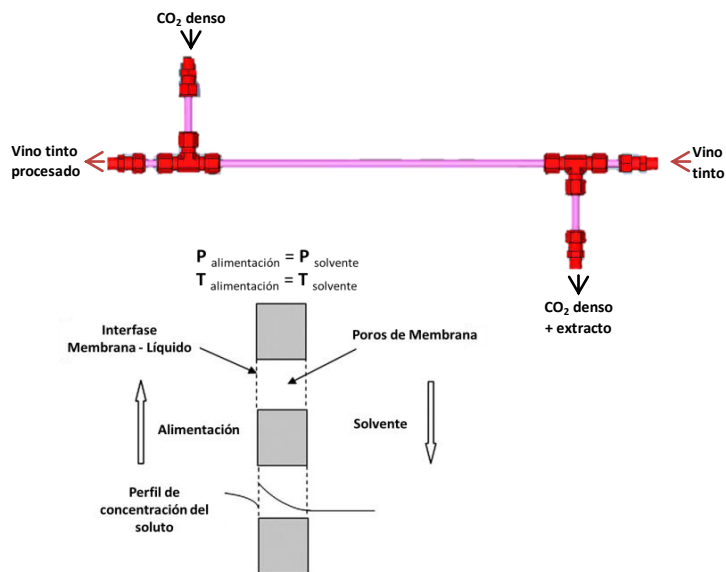


Figura 1. Representación física del sistema contactor de membrana de fibra hueca (Membrana macroporosa).

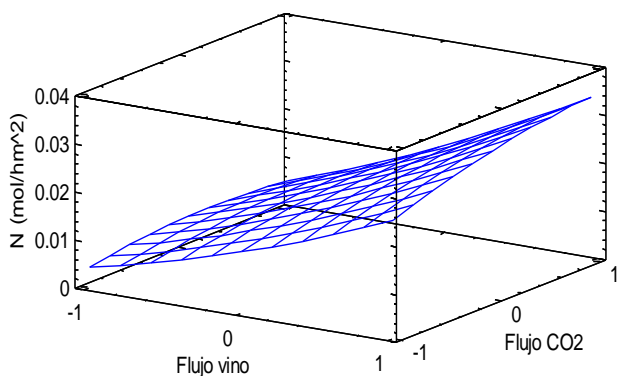


Figura 2. Superficie de respuesta para flujo molar transmembrana (mol/hm^2) en función de las variables de flujo de vino y flujo de CO_2 denso normalizada para temperatura = 30°C y presión = 150 bar.

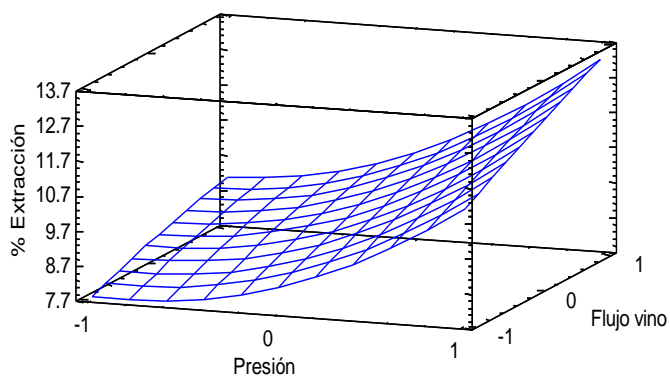


Figura 3. Superficie de respuesta para % de extracción en función de las variables flujo de vino y presión normalizada para temperatura = 30°C y flujo CO_2 = 60 mL/min.

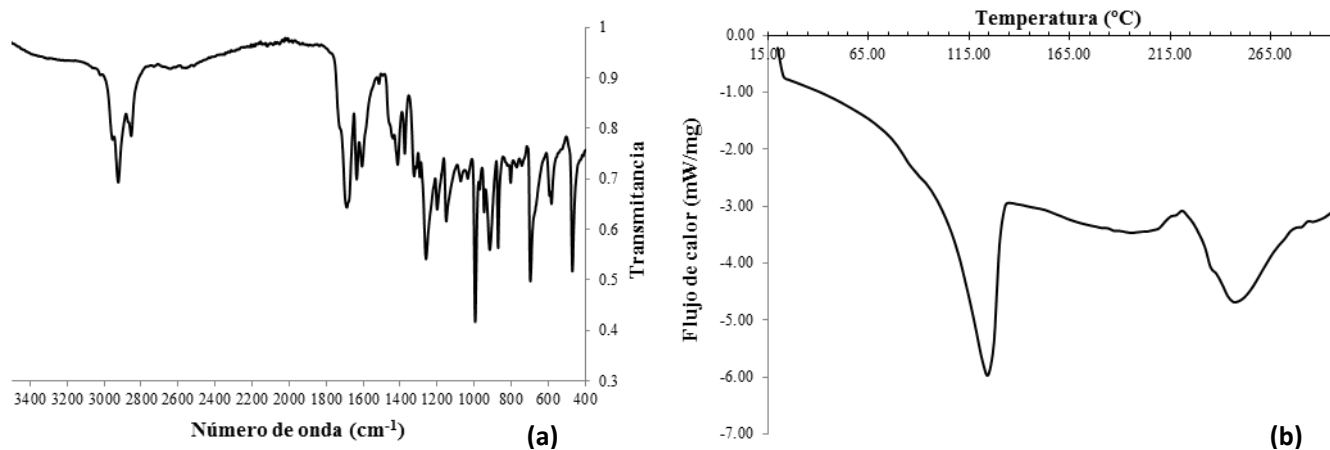


Figura 4. Representación gráfica de a) FTIR de muestra sólida liofilizada (ATR) y b) DSC extracto sólido.

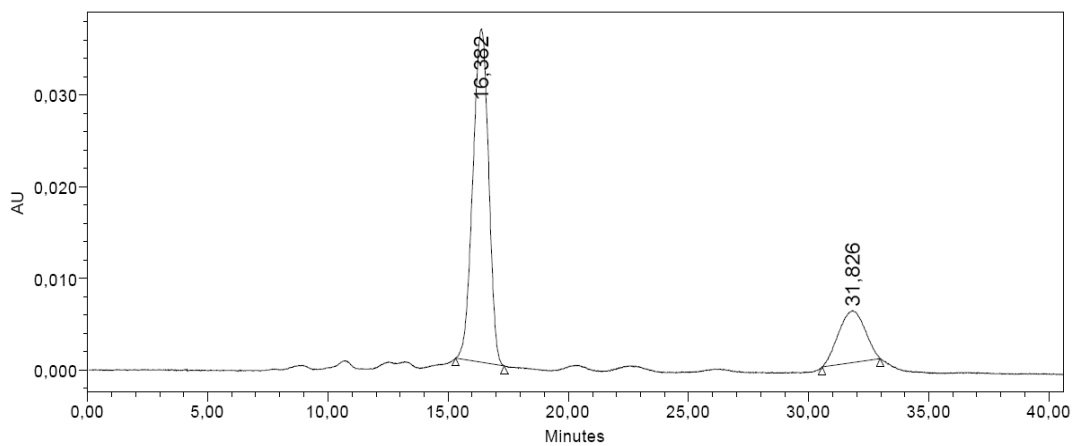


Figura 5. Representación gráfica de HPLC a 300 nm de extracto sólido liofilizado obtenido en proceso de extracción con CO₂ supercrítico.

EFFECTO DE LA COCCIÓN Y EL ESTADO DE MADUREZ SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOS EN VARIETADES DE PLÁTANO

Jhon Larry Moreno^{a, b}, **Moralba Domínguez**^a, **Jorge Luis Luna**^a, **Dominique Dufour**^{a, c}

^a Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia

^b Universidad Nacional de Colombia, Palmira Campus, Colombia

^c Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement (CIRAD), UMR Qualisud, 34398 Montpellier Cedex, France

RESUMEN

La deficiencia de vitamina A afecta a gran parte de la población mundial. Esta deficiencia es asociada a los hábitos alimenticios, el estilo de vida y la forma de procesar los alimentos. El plátano (*Musa spp*) es cultivado en regiones del trópico. En África se han encontrado variedades que poseen alto contenido de carotenoides provitamina A. Por tal razón, el efecto de la cocción y el estado de maduración fue evaluado sobre el contenido de carotenos totales e individuales en cuatro variedades de plátano (Dominico Hartón, Cachaco, Guayabo y Guineo) cultivadas en Colombia. Las evaluaciones se realizaron antes y después del proceso de cocción, donde el contenido de β -caroteno y α -caroteno fueron determinados por HPLC-DAD, representando el 90% de los carotenos totales en las muestras evaluadas. Adicionalmente, se evaluó el color superficial a través de un cromometro, encontrando una relación positiva entre el color y el contenido de carotenos totales. El rango de concentración de carotenos totales en fruto fresco se encuentra entre 367- 4047 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso seco, en β -caroteno es 89- 2249 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso seco, y en α -caroteno 142 -1219 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso seco. La concentración de β -caroteno disminuye después de la cocción, aumentando la concentración de los isómeros 15-cis, 13-cis y 9 cis- β -caroteno. La concentración de carotenos totales disminuye con el grado de maduración, a excepción de la variedad guineo. Los niveles más altos de carotenos fueron encontrados en la variedad Dominico Hartón. Sin embargo esta presenta la menor retención después de la cocción. Por lo anterior, se observa que los plátanos evaluados presentan un alto potencial nutricional, los cuales podrían cultivarse en las regiones, cuyas poblaciones presentan una alta incidencia de deficiencia de vitamina A, lo que abre la posibilidad de iniciar programas de mejoramiento genético, para desarrollar genotipos con alto contenido de carotenoides provitamina A

Palabras clave: Plátano, carotenoides, cocción y retención.

1. INTRODUCCIÓN

Las musáceas representan el cuarto cultivo más importante en el mundo, con una producción para el 2011 de 145 millones de toneladas, de las cuales el 74% son bananos y el 26% son plátanos (FAO, 2013). Colombia se encuentra entre los países de mayor producción de plátano en el mundo, constituyendo para el país, uno de los productos fundamentales de la canasta familiar, una fuente generadora de trabajo y divisas (Cayón et al., 2000). En Colombia, los frutos de Dominico Hartón (*Musa paradisiaca*, AAB), se procesan en una amplia variedad de formas, principalmente cocidos y en todas las etapas de maduración, debido a que representan una importante fuente de micronutrientes esenciales en la dieta de las personas (Davey et al., 2009).

El banano y el plátano son una fuente de micronutrientes, entre los cuales se encuentran los carotenoides, caracterizados por poseer propiedades benéficas para la salud, debido a su actividad de provitamina A (pVAC). El β -caroteno, es el carotenoide más importante y abundante en los alimentos, seguido de α -caroteno y β -criptoxantina. Sin embargo, los carotenoides vegetales son particularmente sensibles a la luz, calor y oxígeno provocando la degradación durante los tratamientos térmicos y la maduración, conduciendo a la isomerización cis-trans, oxidación y/o epoxidación de los carotenoides (Schieber et al., 2005; Rodríguez et al., 2000).

La pulpa de banano y plátano contiene altos niveles de precursores de vitamina A (pVAC) (Davey et al., 2006; Englberger et al., 2003). En general, los niveles más altos de pVAC se encuentran en plátanos, mientras que en bananos de cocción y de postre el contenido es menor (Harvestplus, 2007; Davey et al., 2006, 2007 y 2009). Existe evidencia del efecto sinérgico positivo entre la vitamina A y la bio-disponibilidad de hierro y zinc (Graham & Rosser., 2000). Generando un mayor interés de investigaciones en este cultivo. El mayor contenido de micronutrientes en los cultivos debe conservarse después de ser procesados (industrialmente y/o en el hogar) para obtener una mayor absorción de ellos.

Debido a la falta de información que existe acerca de la magnitud de los efectos de los tratamientos térmicos, la acidez, la luz, entre otros, sobre el contenido de carotenoides en musáceas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la cocción y el estado de maduración sobre la concentración de carotenoides en pulpa de plátano.

2.MATERIALES Y MÉTODOS

Cuatro variedades de plátanos: Dominico Hartón (AAB), Guayabo (AAB), Cachaco (AAB) y Guineo (AAA), fueron cosechados en el corregimiento del Bolo San Isidro, Valle del Cauca, Colombia a 994 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 23 °C. Dos racimos por variedad fueron cosechados al azar y almacenados, en condiciones ambientales (25-28 °C y 56-62% de humedad relativa). Se utilizaron los frutos de la mano 2 y 3, en dos estados de madurez. El grado de madurez se estimó según el color de la cáscara esencialmente como se describe por Dadzie & Orchard, (1997). De acuerdo con esta escala, la etapa 1 es fruto inmaduro/verde y la etapa 5 fruto maduro.

2.1.Preparación de la muestra.

Los frutos frescos fueron pelados, homogenizados y analizados inmediatamente, en dos estados de maduración (1 y 5). La cocción se llevó a cabo en vasos de precipitados (500 ml), con 300 ml de agua, durante 30 minutos a temperatura de ebullición. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar durante 20 minutos, se homogenizó la pulpa y se realizó el análisis de inmediato. La prueba de cocción solo se realizó a los frutos en la etapa 1 de maduración.

2.2.Color

El color de la pulpa fresca y cocida fue medido directamente con un cromómetro (CM-3500d (Minolta, spectrophotometer, USA). El índice de pardeamiento (BI) fue calculado como $\frac{[100(x-0,31)]}{0,17}$, donde $\frac{(a + 1.75L)}{(5.645L + a - 3.012b)}$. (Maskan, 2001).

2.3.Análisis de carotenoides

Los carotenos se extrajeron siguiendo el método reportado por Ceballos et al. (2012). Los carotenoides totales (CT) e individuales fueron expresados como µg/ 100 g de peso fresco y peso seco.

2.4. Actividad de Retinol equivalente

Los carotenos equivalentes se determinaron a través de la suma de Trans β-caroteno, sus isómeros y α-carotenos medios, el retinol equivalente (RAE) se determinó utilizando un factor de conversión 12:1 de carotenos equivalentes a RAE (Englberger et al., 2006).

2.5.Análisis estadístico

El efecto de la cocción y el estado de madurez sobre el contenido total e individual de carotenoides fue analizado por ANOVA, con tres repeticiones. Tres factores fueron considerados: variedad, grado de madurez y tratamiento (fresco y cocido). Análisis de

correlación ($p= 0,05$) se realizaron para determinar la relación entre RAE y parámetros de color. Los datos fueron analizados utilizando SAS/STAT, 9.0 (SAS, 2002).

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de la cocción y el estado de maduración sobre la concentración de los carotenoides

El rango de concentración de carotenos totales es 367 hasta 4047 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso seco, en muestras de guineo y dominico hartón, ambas en estado verde. La concentración de β -caroteno (BC) y α -caroteno representa más del 65 % de los carotenos totales, siendo el BC el pigmento de mayor proporción en frutos frescos y cocidos (figura 1).

El análisis de varianzas muestra diferencias significativas entre el contenido de carotenos totales, BC y α -caroteno, debido a la cocción y al estado de maduración, por lo tanto el tratamiento térmico influye sobre la concentración de los carotenos, presentando variación entre genotipos.

La variedad Dominico Hartón presentó reducciones significativas en la concentración de BC, α -carotenos y carotenos totales, después de la cocción. El rango de concentración de carotenos totales en frutos fresco es 367 a 4047 y de los frutos cocidos es 705 a 2015 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso seco (Figura 2). Los frutos de la variedad Guineo, después de la cocción presentaron un aumento en la concentración de carotenos totales, un comportamiento similar fue encontrado por Englberger et al. (2003). La reducción de la concentración de carotenos totales después de la cocción en la mayoría de las variedades de plátanos evaluadas es debido a la degradación de carotenoides durante la cocción. Sin embargo, el incremento de estas concentraciones después de la cocción podría deberse a la mayor facilidad con la cual se pueden extraer los carotenoides de muestras cocidas o procesadas en comparación con la extracción en alimentos frescos, donde los carotenoides están protegidos físicamente y/o están combinados con otros componentes de los alimentos que impiden la penetración de los solventes y extracción, tal como lo menciona Rodríguez-Amaya, (2000).

Para la variedad Dominico Hartón, Cachaco y Guayabo presentaron reducciones significativas en las concentraciones de α -caroteno y BC, después de la cocción (figura 3), con porcentajes de retención que van desde 32,9 a 72,1 y de 32,8 a 64,5 %, respectivamente, siendo el cachaco el material que presentó la mayor retención de carotenos después del proceso de cocción. Todas las variedades evaluadas presentaron un aumento en la concentración de luteína tanto en la maduración como la cocción. Clevidence et al. (2000), evaluaron diferentes procesos de cocción en verduras encontrando que el tratamiento térmico

no afecta la concentración de luteína, debido a que los carotenoides pueden estar más disponibles después de la cocción, sugiriendo que la cocción altera la estructura de la célula y libera estos compuestos.

En los procesos de cocción los principales productos de degradación de BC identificados son productos isómeros y de oxidación. Estos compuestos pueden reducir las propiedades sensoriales y nutricionales de los productos alimenticios resultantes. Por ejemplo, se demostró que los cis-isómeros de β -caroteno tiene propiedades antioxidantes más bajos que el trans- β -caroteno (Graham & Rosser, 2000). Los resultados obtenidos, demuestran la isomerización en el procesamiento de fruto de musáceas. Para casi todos las variedades evaluados (tabla 1), los isómeros 15-cis y 13-cis-BC aumentaron de concentración al hervir los frutos, a excepción de guineo en estado verde. La concentración de 13-cis-BC aumentó significativamente con respecto a los otros isómeros evaluados, Hiranvarachat et al. (2008), encontraron resultados similares en zanahorias. Las pérdidas en BC se pueden explicar por el aumento en la concentración de los isómeros, además en el agua de cocción se pueden presentar perdidas por efecto de la lixiviación. A pesar, que la proporción de los isómeros cis es baja, las consecuencias biológicas y nutricionales puede ser importante debido a su baja conversión a retinol equivalente (Aherne et al., 2010).

La concentración de carotenos total en estado verde osciló entre 110 a 1667 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso fresco y en estado maduro 393 a 742 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso fresco (tabla 1). Las variedades Dominico Hartón y Guayabo presentaron una reducción en la concentración de carotenoides del 57% y 14%, respectivamente, cuando el material pasa a un estado a maduro. Las variedades Cachaco y Guineo presentaron un aumento de carotenos con el grado de maduración del fruto. El grado de madurez de la fruta puede influir en la eficiencia de extracción de carotenoides, debido al ablandamiento de la pulpa y la ruptura de la estructura celular en la fruta madura. Los plátanos contienen cantidades considerables de almidón resistente, un componente de la matriz no digerible que posiblemente puede limitar la biodisponibilidad de carotenoides (Tanumihardjo al., 2010; Zhang et al., 2005; Menezes E.B et al., 2011).

La maduración y el procesamiento térmico pueden disminuir este almidón resistente, aumentando la biodisponibilidad de la vitamina A. Como se mencionó anteriormente la variedad Dominico Hartón, no presento incremento de carotenos al aumentar el grado de maduración del fruto, ya que posiblemente presenta una concentración de almidón considerable en la etapa 6 de maduración (Mora, 2001).

Dominico Hartón, fue la variedad que presentó la mayor concentración de carotenoides, que presenta una pulpa de color naranja claro en la etapa 1 (fruto verde) y de acuerdo con Davey et al. (2009), esto está asociado con un mayor contenido de carotenoides. Englberger et al. (2006) reportó que el cultivar Fe'i 'lap Utin' de color naranja, tiene los más altos contenidos de carotenoides provitamina A, medidos hasta la fecha. La mayoría de los plátanos, que se caracterizan por la pulpa de color naranja, poseen un mayor contenido de carotenoides y tiende a crecer lentamente presentando largos intervalos entre ciclos, relacionado con una deficiencia en giberelinas (Swennen & Wilson, 1983).

Ngho Newilah et al. (2009), reportaron concentraciones de BC para plátanos en etapa 1 de maduración (verde) similares a los obtenidos en este estudio para Dominico Hartón y Cachaco. Además, encontraron que el contenido de BC disminuye con el grado de maduración como es el caso de la variedad Mbouroukou.

La disminución de carotenoides, especialmente BC y α -caroteno, durante la maduración de se debe a la degradación de estos, dando lugar a la síntesis de isómeros; debido principalmente a las condiciones de almacenamiento. La misma tendencia fue reportada en banano por Giami & Alu (1994).

3.2. Correlación de RAE con el Índice de pardeamiento (BI)

El BI es reportado como un importante parámetro de color en procesos donde el pardeamiento enzimático o no enzimático toma lugar (Palou et al., 1999). En este estudio, los valores de BI promedio variaron entre 164,43 y 475,30, presentando el mayor BI para las variedades en estado verde. Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico afecta fuertemente la calidad del color de las variedades de plátano aumentando su coloración, debido a que se inactiva la polifenol-oxidasa (Palou et al., 1999).

Este estudio muestra una correlación positiva ($R= 0.7515$) entre RAE con BI (figura 4), con una relación lineal de $y= 2,95 x + 218,15$ (donde $y = BI$ y $x = RAE$). Diferentes estudios han reportado que existe una relación positiva entre la provitamina A y la coloración de la pulpa (Engelberg et al., 2003, Amorin et al., 2009), mostrando que el contenido de BC es más alto en pulpas de coloración amarilla o naranjas, sin embargo, pero esto no se evidencio en este estudio, debido a que muchos materiales presentaron en estado maduro pulpas de coloración intenso, lo cual indica que influyen otros factores que hasta el momento no han sido considerados, tales como la síntesis de otros pigmentos durante la maduración del fruto.

4.CONCLUSIÓN

Este estudio es la primera evaluación llevada a cabo en Colombia sobre el efecto de la cocción y el estado de maduración en el contenido de carotenos. Los resultados indican que existe variabilidad en concentración de carotenos con actividad provitamina A en las muestras evaluadas. En el perfil típico de carotenoides para frutos de musáceas se presentan BC y α -caroteno, los cuales representan más del 65 % de los carotenoides totales de todos los tratamientos evaluados. Las cuatro variedades de plátano estudiadas presentan altos contenidos de carotenoides, aunque los resultados podrían haber sido influenciado por diferentes factores como: condiciones de producción, los períodos de cosecha y la extracción. La variedad Dominico Hartón presentó la concentración más alta de carotenos totales (4047 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso seco, etapa 1). Las variedades Dominico Hartón, Cachaco y Guayabo presentaron reducciones significativas de las concentraciones de α -caroteno y BC, después de la cocción. Por otra parte, la concentración de luteína aumento con el grado de maduración del fruto y después de la cocción. La variedad Guineo, presenta un comportamiento diferente ya que después de la cocción presentó un aumento en la concentración de carotenos totales. Existe una correlación positiva entre RAE y BI, evidenciando una mayor biodisponibilidad de los carotenos en variedades de color naranja.

5.RECOMENDACIONES

Es necesario llevar a cabo más investigaciones donde se pueda identificar materiales con alto contenido de carotenos acompañado de un enfoque etnográfico. Además, se debe desarrollar métodos para estimar el contenido de carotenoides en base a las diferencias de color y dilucidar el efecto de la cocción sobre el contenido de carotenoides. Llevar a cabo ensayos de biodisponibilidad de los carotenoides en plátano y banano con el fin de determinar cuál es la proporción de carotenos absorbidos después del proceso de cocción. Finalmente tecnificar el proceso de cocción de musáceas, con el objetivo de disminuir las pérdidas de nutrientes como los carotenoides.

6.REFERENCIAS

- Aherne, S. A., Daly, T., Jiwan, M. A., O' Sullivan, L., O' Brien, N. M. (2010). Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestión model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. *Food Research International*. 43: 1449-1454.
- Cayón-Salinas, D. G., Giraldo-Giraldo, G. A., Arcila-Pulgarin, M. I. (eds.). (2000). *Postcosecha y agroindustria del plátano en el eje cafetero de Colombia*. CORPOICA, Universidad del Quindío, ASIPLAT, Comité Departamental de Cafeteros del Quindío, COLCIENCIAS. Fudesco, Armenia, Colombia. 270 p.

- Ceballos, H., Luna, J., Escobar, A. F., Ortiz, D., Pérez, J. C., Sánchez T., Pachón H., Dufour, D. (2012). Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoids retention upon boiling. *Food Research International*, 45, 52-59.
- Clevidence, B., Paetau, L., & Smith, C. (2000). Bioavailability of carotenoids from vegetables. *HortScience*, 34 (4), 585-588.
- Dadzie, B. K., & Orchard, J. E. (1997). Routine post-harvest screening of banana/ plantain hybrids: criteria and methods. INIBAP Technical Guidelines (Vol. 2). International Plant Genetic Resources Institute.
- Davey, M. W., Keulemans, J., Swennen, R. (2006). Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 176–184.
- Davey, M. W., Stals, E., Ngoh-Newilah, G., Tomekpe, K., Lusty, C., Markham, R., et al. (2007). Sampling strategies and variability in fruit pulp micronutrient contents of west and central African bananas and plantains (*Musa* species). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2633–2644.
- Davey, M. W., Mellidou, I., Keulemans, J. (2009). Considerations to prevent the breakdown and loss of fruit carotenoids during extraction and analysis in *Musa*. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5759–5762.
- Davey, M. W., Van den Bergh, I., Markham, R., Swennen, R., & Keulemans, J. (2009). Genetic variability in *Musa* fruit provitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutrient contents. *Food Chemistry*, 115, 806–813.
- E.B. Rodríguez, D.B. Rodríguez-Amaya, *Food Chem.* 101 (2007) 563.
- Englberger, L., Aalbersberg, W., Ravi, P., Bon-Nin, E., Marks, G. C., Fitzgerald, M.H., Elymore, J. (2003). Further analyses on Micronesian banana, taro, breadfruit and other foods for provitamin A carotenoids and minerals, *J. Food Compos. Anal.* 16, 219–236.
- Englberger, L., Wills, R. B. H., Blades, B., Dufficy, L., Daniells, J., Coyne, T. (2006). Carotenoid content and flesh color of selected banana cultivars growing in Australia. *Food and Nutrition Bulletin*, 27 (4), 281-291.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Database – FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>; 2003 (citado 28 de Octubre de 2013).
- Giami, S: & Alu, D. (1994). Changes in composition and certain functional properties of ripening plantain (*Musa spp.*, AAB group) pulp. *Food Chem.* 50: 137-140.
- Graham, R. D., & Rosser, J. M. (2000). Carotenoids in staple foods: Their potential to improve human nutrition. *Food and Nutrition Bulletin*, 21, 404–409.
- HarvestPlus. (2007). Addressing micronutrient deficiencies in Sub-Saharan Africa through *Musa*-based foods. Annual Technical Report Prepared by Bioversity International With partners: CARBAP – Centre African de Recherches sur Bananiers et Plantains, Cameroon KULeuven, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
- Hiranvaracha, B., Suvarnakuta, P., Devhastin, S. (2008). Isomerisation kinetics and antioxidant activities of B-carotene in carrots undergoing different drying techniques and conditions. *Foods Chem.* 1007: 1538-1546.
- Maskan M. (2001). Kinetics of colour change ok kiwifruit during hot air and microwave drying. *Journal of food Engineering* 48 (2001): 169-175.

- Menezes E. W., Tandini C. C., Tribess T. B., Zuleta A., Binaghi J., Pak N., Vera G., Dan M. C., Bertolini A. C. (2011). Cordenunsi B. R., et al. Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata*, var. Nanica~ o). *Plant Foods Hum Nutr.* 66: 231–7.
- Mora, P. (2010). Hidrolisis del almidón de diferentes variedades de plátano y banano en el proceso de maduración. Tesis. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Ngoh Newilah, G., Dhuique Mayer, C., Rojas Gonzales, J., Tomekpe, K., Kokou, E., X. Etoa, F. (2009). Carotenoid contents during ripening of banana hybrids and cultivars grown in Cameroon. *Fruit*, 64, 197-206.
- Palou, E., Lopez- Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Welti-Chanes, J., Swanson, B. G. (1999). Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science*, 64, 42-45
- Rodríguez-Amaya, D. B. (2000). Carotenoides y preparación de alimentos: la retención de los carotenoides pro-vitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. January 1997, translated version, 2000. 88 p. (Spanish).
- Rodríguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press.
- Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus technical monograph 2. Washington, DC and Cali, Colombia: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
- SAS (2002). SAS/STAT 9.0. Users Guide. Cary, NC; SAS Institute Inc.
- Swennen, R., & Wilson, G. F. (1983). The stimulation of sword sucker development by applied gibberellin (Ga3) in plantain (*Musa Sp.* Aab). *Fruits*, 38 (4), 261-265.
- Schieber, A., & Carle R. (2005). Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Foods Science & Technology*. 16: 416-422.
- Tanumihardjo S. A., Palacios N., Pixley K.V. (2010). Provitamin A carotenoid bioavailability: what really matters? *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 80:336–50.
- Zhang P, Whistler R. L., BeMiller J. N., Hamaker B. R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility: a review. *Carbohydr Polym.* 59:443–58.

ANEXO

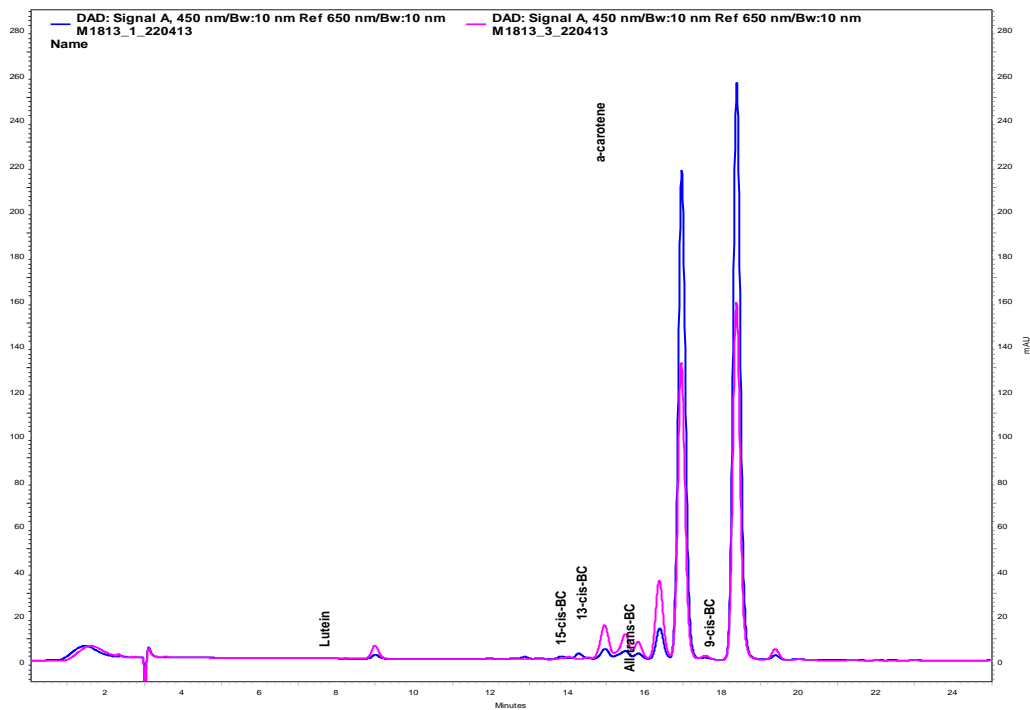


Figura 1. Cromatograma (HPLC-DAD) de Dominico Hartón (etapa 1). — fresco, — cocido.

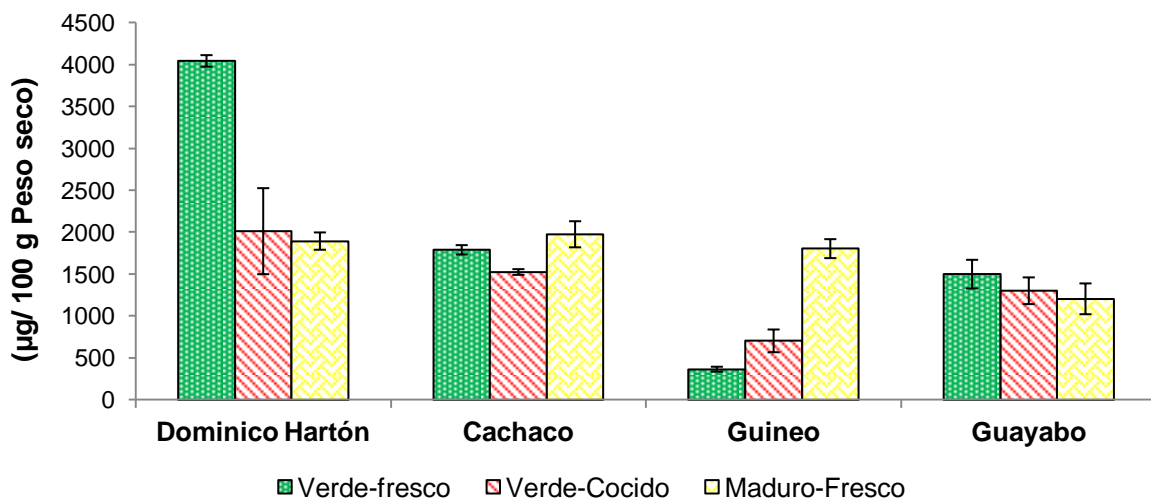


Figura 2. Concentración de carotenos totales en cuatro variedades de plátano.

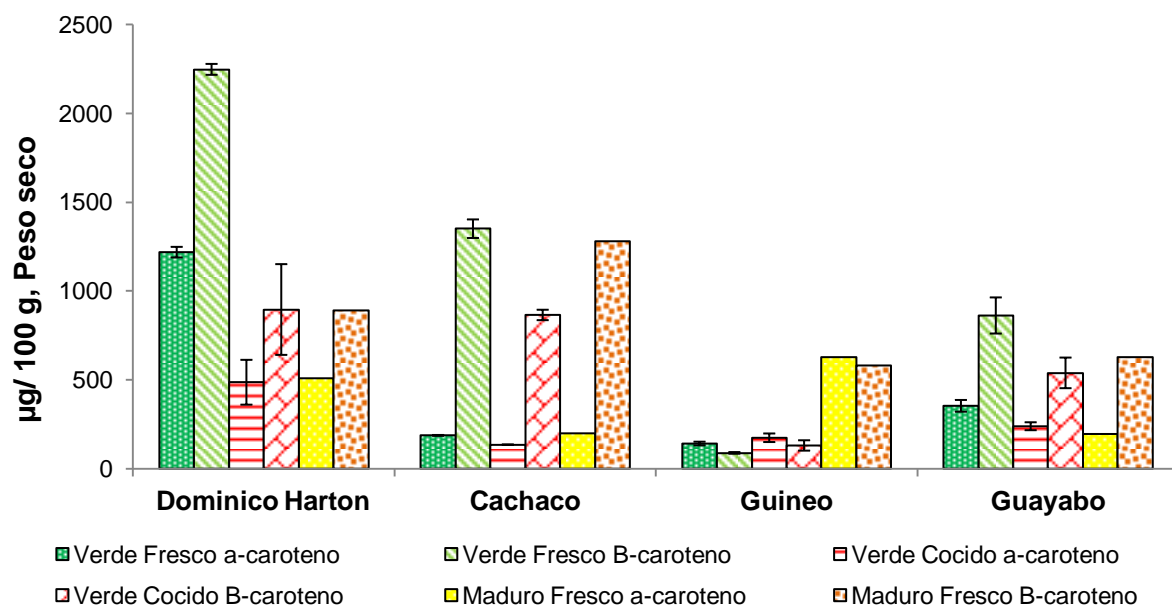


Figura 3. Concentración de BC y α -caroteno en cuatro variedades de plátano.

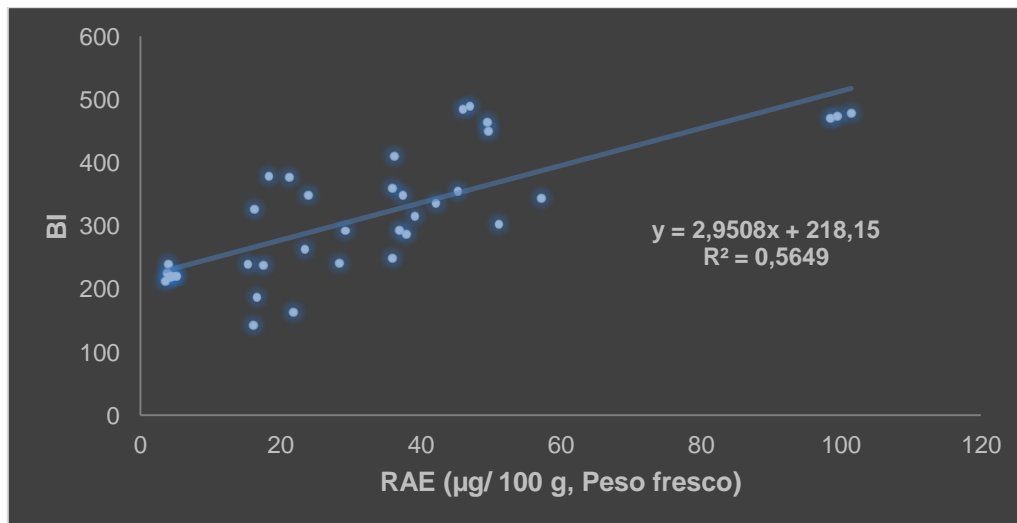


Figura 4. Correlación RAE y BI.

Tabla 1. Concentración del total e individual carotenoides ($\mu\text{g}/100\text{ g peso fresco}$)¹ en plátanos frescos y cocinados.

Muestra	Estado	Procesamiento	Luteína	15-cis-BC	13-cis-BC	α -caroteno	BC	CT
Dominico Hartón	Verde (E1)	Fresco	7,69 \pm 0,89	4,50 \pm 0,10	14,52 \pm 0,57	502,19 \pm 12,29	926,06 \pm 12,64	1666,64 \pm 28,37
		Cocido	16,18 \pm 1,40	16,87 \pm 4,62	60,46 \pm 18,99	186,57 \pm 48,34	343,53 \pm 97,90	771,93 \pm 196,77
	Maduro (E5)	Fresco	16,38 \pm 1,32	6,48 \pm 1,69	21,80 \pm 5,36	193,95 \pm 8,35	339,70 \pm 20,41	723,57 \pm 39,47
Cachaco	Verde (E1)	Fresco	4,53 \pm 0,76	1,75 \pm 0,37	0,11 \pm 1,56	73,77 \pm 0,95	531,29 \pm 20,54	704,37 \pm 22,02
		Cocido	18,63 \pm 0,78	18,21 \pm 0,10	69,97 \pm 2,65	49,94 \pm 0,25	319,64 \pm 10,80	563,74 \pm 12,55
	Maduro (E5)	Fresco	18,22 \pm 2,93	8,40 \pm 1,05	46,38 \pm 9,69	75,32 \pm 6,17	480,26 \pm 46,10	741,52 \pm 58,40
Guineo	Verde (E1)	Fresco	25,90 \pm 3,14	n. d.	n. d.	42,49 \pm 3,10	26,73 \pm 1,37	109,94 \pm 8,84
		Cocido	64,62 \pm 11,52	n. d.	n. d.	43,14 \pm 5,96	32,42 \pm 7,21	174,48 \pm 33,63
	Maduro (E5)	Fresco	64,86 \pm 3,48	n. d.	n. d.	136,53 \pm 9,67	126,59 \pm 9,51	393,03 \pm 24,63
Guayabo	Verde (E1)	Fresco	6,81 \pm 0,35	n. d.	n. d.	110,16 \pm 10,25	268,41 \pm 31,65	467,16 \pm 53,18
		Cocido	25,67 \pm 1,61	8,04 \pm 1,82	23,17 \pm 7,07	66,61 \pm 6,20	150,27 \pm 23,99	362,89 \pm 44,45
	Maduro (E5)	Fresco	28,23 \pm 10,11	1,21 \pm 1,13	7,88 \pm 7,52	65,45 \pm 18,43	208,24 \pm 15,00	400,94 \pm 61,09

¹ Valores promedios \pm Desviación estándar (n=3).

BC: Beta carotenos, CT: Carotenos totales, n. d.: no detectado, E1: Etapa 1, E5: Etapa 5.

BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE 10 VARIEDADES DE NOGAL

Fernando Figueroa¹, Javier Marhuenda¹, Begoña Cerdá¹, Pilar Zafrilla¹, Juana Mulero¹.

¹Universidad Católica San Antonio. Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Facultad de Ciencias de la Salud. 30107 Guadalupe - Murcia (España).

INTRODUCCIÓN

Las nueces son una fuente importante de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son los antioxidantes más abundantes de la dieta. Si bien, a pesar de la importante actividad antioxidante *in vitro* atribuida a los compuestos fenólicos ingeridos en la dieta, no siempre se observa lo mismo en ensayos *in vivo*. Esto podría ser debido a la baja biodisponibilidad de estos compuestos fenólicos. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos totales presentes en nueces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se han utilizado frutos de 10 genotipos diferentes de nueces (Algaida, Amigo, Chico, Eureka, Franquette, Payne, Pedro, Serr, Sunland y Tehama) cultivados todos ellos, bajo las mismas prácticas agrícolas, en dos fincas experimentales del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) ubicadas en dos municipios de la Región de Murcia (Torre Pacheco y El Chaparral) que presentan unas características de suelo similares.

Determinación de Fenoles Totales

Los fenoles totales han sido medidos a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965).

Para la preparación de las muestras, se homogeneizaron 5 g de nueces en un Ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm durante 2 min con 20 ml de una disolución metanol + ácido fórmico al 3%. Los extractos se centrifugaron a 4000 g durante 10 min en una centrífuga Heraeus Biofuge stratos. El sobrenadante, extracto metanólico, se separó del precipitado y se filtró a través de papel de filtro Whatman nº 4 y se recogió en frascos opacos. El precipitado fue sometido a un nuevo proceso de extracción en idénticas condiciones, y su extracto metanólico se unió al obtenido tras la primera extracción.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó disolviendo 700 ml de agua destilada en 100 g de wolframato de sodio, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 25 g de molibdeno de sodio, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se añadieron 50 ml de ácido fosfórico al 85% ($r_{20} = 1,71 \text{ g/ml}$) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado ($r_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$). Se llevó a ebullición, permaneció así durante 10 h y se añadieron a continuación 150 g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo, y se mantuvo en ebullición durante otros 15 min. Se dejó enfriar y se completó hasta 1 l con agua destilada.

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20%, pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, al cual se añadieron 15 ml de agua grado HPLC y se disolvió completamente utilizando ultrasonidos, finalmente se enrasó hasta 25 ml con agua.

Se realizó una recta de calibrado de la que se obtuvo la ecuación $y = 0,181x - 0,035$ ($r^2 = 0,994$). La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro, modelo Varian Cary 50 Bio.

Las determinaciones se llevaron a cabo en el extracto metanólico de las muestras, utilizando para ello el espectrofotómetro.

A 1 ml del extracto metanólico de nuez se le adicionó 50 ml de agua destilada, 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 ml de solución carbonato de sodio al 20%. Se agitó y se esperó 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 765 nm con relación a un blanco.

Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por 100 g de nuez.

Biodisponibilidad *In Vitro* de Los Compuestos Fenólicos

Los ensayos de biodisponibilidad se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Miller *et al.* (1981), modificado por Vaquero *et al.* (1994).

Para la preparación de las muestras, se homogeneizaron 12 g de nueces, previamente machacadas en un mortero, en un Ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm con 60 ml de agua destilada hasta una completa homogeneización.

La solución de pepsina se preparó a partir de 4 g de pepsina (Sigma-Aldrich) a la que se añadieron 25 ml de agua destilada y se llevaron a agitación.

La solución de pancreatina se preparó con 0,42 g de NaHCO_3 , junto a 1,25 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) y 0,2 g de pancreatina (Sigma-Aldrich), mezcla que se disolvió en 50 ml de agua destilada.

En primer lugar, se midió el pH de la muestra y se valoró con HCl 0,6 N hasta pH 2. A continuación se añadieron 6 ml de la solución de pepsina y se realizó la digestión ácida

durante 2 h, a 37 °C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó cada media hora el mantenimiento del pH en 2.

En segundo lugar, a una alícuota (alícuota I) de la muestra (± 40 ml) se le añadió 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina, y se valoró con NaOH hasta pH 7. Otra alícuota (alícuota II), de ± 40 ml, permaneció en un baño de hielo con la digestión ácida detenida.

En tercer lugar, la alícuota II se sometió a una segunda digestión y a diálisis, a 37 °C, durante 2 h en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introdujo una membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) tubular sellada, con un volumen de 10 ml de una solución preparada con una cantidad de NaHCO_3 equivalente a la acidez valorada en la alícuota I y diluida hasta 25 ml con agua destilada. Media hora después, se añadieron los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recogió el dializado, se filtró a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ 0,45 μm (Millipore, EE.UU.) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

Se realizaron tres ensayos de biodisponibilidad de cada muestra y los resultados se expresan como medias \pm SD.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico IBM[®] SPSS[®] Statistics (versión 19.0.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra el contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces. Atendiendo a la misma, cabe subrayar la riqueza en compuestos fenólicos de las variedades Eureka y Tehama ($1302,88 \pm 139,56$ y $1296,93 \pm 83,11$ mg ác. gálico/100 g de nuez, respectivamente), significativamente más altas ($\rho \leq 0,05$) que el resto de genotipos estudiados. Estas dos variedades presentan un contenido en fenoles similar al obtenido por Labuckas *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2009), Ogunmoyole *et al.* (2011) y Stonehouse, (2011) y al obtenido por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1556 mg ác. gálico/100 g de nuez) (USDA, 2010). En sentido contrario, son las variedades Amigo, Serr y Chico las que presentan un menor contenido en fenoles totales.

El contenido en fenoles totales de las nueces tras someterlas a una digestión *in vitro* descendió una media de un 74,1% respecto a su contenido antes de la misma ($953,36 \pm$

206,93 frente a $242,27 \pm 68,67$ mg ácido gálico/100 g de nuez de media antes y después de la digestión, respectivamente) (Figura 1).

No en nueces, pero sí en otras matrices alimentarias se han llevado cabo estudios con resultados en consonancia con los presentados en este trabajo. Así, Pérez-Vicente *et al.* (2002), obtuvieron resultados similares a los nuestros al determinar la biodisponibilidad *in vitro* de fenoles totales en zumo de granada. El zumo después de la digestión presentaba únicamente el 29% de fenoles respecto al zumo inicial. Igualmente, Bouayed *et al.* (2012), obtuvieron pérdidas de hasta el 75% en el contenido en fenoles de la manzana, las mismas que McDougall *et al.* (2007), en col lombarda y Tarko *et al.* (2009a), en diferentes frutas, mientras que Fazzari *et al.* (2008), encontraron pérdidas de entre el 70 y el 74% en cerezas.

Otros autores obtuvieron resultados en los que observaban una menor biodisponibilidad de fenoles en diferentes alimentos (Dinnella *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2012). Es el caso de McDougall *et al.* (2005a y b), quienes obtuvieron una biodisponibilidad del 10,3% de fenoles totales en frambuesas y del 7,2% en vino tinto.

En sentido contrario, Tagliazucchi *et al.* (2010), obtuvieron una pérdida de fenoles únicamente del 37% después de someter a uva a una digestión simulada. En este último caso en el que la biodisponibilidad de fenoles es mayor hay que subrayar, por un lado, que sometieron a la uva a una etapa adicional en la que se simulaba la masticación y, por otro lado, que el método de medida empleado no fue el de Folin-Ciocalteu, sino que utilizaron un método enzimático. De igual forma, Bouayed *et al.* (2011), publicaron un porcentaje de recuperación de fenoles de entre el 44,6% y el 62,7% en diferentes variedades de manzanas. Mientras que Cilla *et al.* (2011), obtuvieron valores de recuperación de fenoles en diferentes zumos de frutas de entre el 74 y el 96%.

Existen también trabajos en los que se ha mantenido el contenido en fenoles (Vallejo *et al.*, 2004), e incluso algunos en los que se han encontrado mayores contenidos en fenoles totales después de la digestión *in vitro* (Noguer *et al.*, 2008; Tarko *et al.*, 2009b; Wootton-Beard *et al.*, 2011; Chandrasekara & Shahidi, 2012).

Si analizamos el comportamiento de las diferentes variedades tras su digestión *in vitro* de forma individual (Tabla 2), podemos destacar que los dializados de Algaida y Amigo son los que presentan una mayor biodisponibilidad en fenoles totales. Por el contrario, Eureka, que antes de la digestión era la variedad con un mayor contenido en fenoles, es la variedad que mayor pérdida de estos compuestos presenta.

Tras la digestión *in vitro*, el dializado de la variedad Algaida es el que presenta un mayor contenido en fenoles totales de manera significativa ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de variedades.

Chico, que ya antes de la digestión *in vitro* resultaba ser una de las variedades con menor riqueza en compuestos fenólicos, es el genotipo que, de manera significativa ($\rho \leq 0,05$), presenta menor contenido en fenoles en su dializado.

CONCLUSIONES

Todas las variedades de nogal estudiadas presentan un alto contenido en compuestos fenólicos, destacando los genotipos Eureka y Tehama.

Encontramos una baja biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos en las variedades de nueces estudiadas. Los genotipos Algaida y Amigo presentan la mayor biodisponibilidad de compuestos fenólicos, mientras que Eureka y Tehama presentan la menor biodisponibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Bouayed J, Deusser H, Hoffmann L, Bohn T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chem* 2012;131(4):1466-1472.

Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem* 2011;128(1):14-21.

Chandrasekara A, Shahidi F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. *J Funct Food* 2012;4(1):226-237.

Cilla A, Perales S, Jesus Lagarda M, Barberá R, Clemente G, Farre R. Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *J Food Compos Anal* 2011;24(1):87-94.

Dinnella C, Minichino P, D'Andrea AM, Monteleone E. Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro* digestion. *J Agric Food Chem* 2007;55(21):8423-8429.

Fazzari M, Fukumoto L, Mazza G, Livrea MA, Tesoriere L, Di Marco L. *In vitro* bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *J Agric Food Chem* 2008;56(10):3561-3568.

Labuckas DO, Maestri DM, Perello M, Martínez ML, Lamarque AL. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem* 2008;107(2):607-612.

- McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *J Agric Food Chem* 2005a;53(15):5896-5904.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* 2007;68(9):1285-1294.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* 2005b;66(21):2540-2548.
- Miller DD, Schriker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 1981;34:2248-2256.
- Noguer M, Cerezo AB, Rentzsch M, Winterhalter P, Troncoso AM, Carmen García-Parrilla M. Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *J Agric Food Chem* 2008;56(19):8879-8884.
- Ogunmoyole T, Kade IJ, Korodele B. *In vitro* antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of walnut (*Juglans regia*). *J Med Plants Res* 2011;5(31):6839-6848.
- Pérez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, García-Viguera C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 2002;50(8):2308-2312.
- Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965;16:144-158.
- Stevenson DE, Cooney JM, Jensen DJ, Zhang J, Wibisono R. Comparison of the relative recovery of polyphenolics in two fruit extracts from a model of degradation during digestion and metabolism. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(8):939-945.
- Stonehouse W. Chapter 135 - The effects of walnuts (*Juglans regia*) on the characteristics of the metabolic syndrome. En: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson y Vinood B. Patel, Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson, Vinood B. Patel, editors. *Nuts and seeds in health and disease prevention* San Diego: Academic Press; 2011. p. 1141-1148.
- Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem* 2010;120(2):599-606.
- Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Michalik J. Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technol Biotechnol* 2009a;47(4):456-463.
- Tarko T, Duda-Chodak A, Tuszyński T. Simulation of phenolic compounds transformations and interactions in an *in vitro* model of the human alimentary tract. *Food Sci Technol Int* 2009b;15(3):235-241.
- Tavares L, Figueira I, Macedo D, McDougall GJ, Leirao MC, Vieira HLA, *et al.* Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2012;131(4):1443-1452.
- US Department of Agriculture. 2010. Database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, release 2. Nutrient Data Laboratory [updated May 2010]. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>. Fecha de acceso: 13/08/2011.
- Vallejo F, Gil-Izquierdo A, Pérez-Vicente A, García-Viguera C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J Agric Food Chem* 2004;52(1):135-138.

Vaquero MP, Veldhuizen M, Vandokkum W, Vandenhamer CJA, Schaafsma G. Copper bioavailability from breakfasts containing tea - influence of the addition of milk. *J Sci Food Agric* 1994;64(4):475-481.

Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Res Int* 2011;44(1):217-224.

Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chem* 2009;113(1):160-165.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces

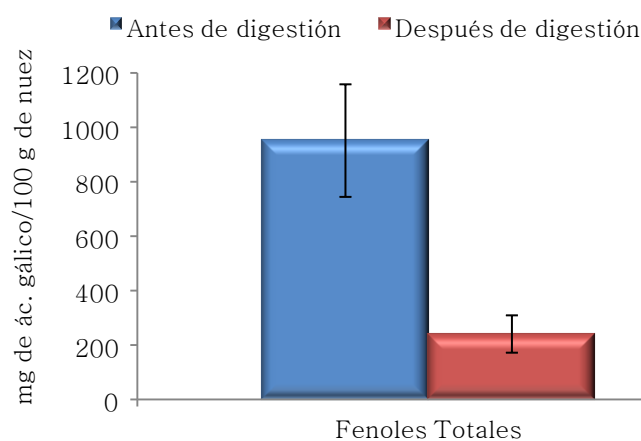
Variedad	mg ácido gálico/100 g de nuez \pm SD ¹
Algaida	1008,92 \pm 55,51 ^{b, c, d, h, j}
Amigo	743,74 \pm 23,85 ^{a, d, f, i, j}
Chico	762,40 \pm 71,98 ^{a, d, i, j}
Eureka	1302,88 \pm 139,56 ^{a, b, c, e, f, g, h, i}
Franquette	869,34 \pm 23,82 ^{d, j}
Payne	940,78 \pm 160,81 ^{b, d, j}
Pedro	846,88 \pm 120,42 ^{d, j}
Serr	753,13 \pm 98,58 ^{a, d, i, j}
Sunland	1008,62 \pm 114,28 ^{b, c, d, h, j}
Tehama	1296,93 \pm 83,11 ^{a, b, c, e, f, g, h, i}
	953,36 \pm 206,93

¹Presenta diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama

Tabla 2. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces tras digestión *in vitro*¹

Variedad	mg ácido gálico/100 g de nuez \pm SD ¹	Pérdida tras la digestión (%)
Algaida	373,30 \pm 20,53 ^{b, c, d, e, f, g, h, i, j}	63
Amigo	282,62 \pm 8,82 ^{a, c, d, e, f, g}	62
Chico	144,85 \pm 13,67 ^{a, b, d, e, f, g, h, i, j}	77
Eureka	208,46 \pm 22,32 ^{a, b, c, i, j}	84
Franquette	199,94 \pm 5,47 ^{a, b, c, i, j}	77
Payne	197,56 \pm 33,77 ^{a, b, c, i, j}	79
Pedro	211,72 \pm 30,10 ^{a, b, c, i, j}	75
Serr	203,34 \pm 26,61 ^{a, b, c, i, j}	73
Sunland	302,58 \pm 34,28 ^{a, c, d, e, f, g, h}	70
Tehama	298,29 \pm 19,11 ^{a, c, d, e, f, g, h}	81

¹Presenta diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente a : ^a, Algaida; ^b, Amigo; ^c, Chico; ^d, Eureka; ^e, Franquette; ^f, Payne; ^g, Pedro; ^h, Serr; ⁱ, Sunland; ^j, Tehama


Figura 1. Contenido en Fenoles totales antes y después de la digestión *in vitro*

EFFECTO DE LA BIODISPONIBILIDAD “IN VITRO” EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES FRUTOS ROJOS

Pilar Zafrilla^a, Javier Marhuenda^a, M^a Dolores Alemán^a, Alfonso Perez^a, Gabriel Caravaca^a, Fernando Figueroa^a, Juana Mulero^a

¹Universidad Católica San Antonio. Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Facultad de Ciencias de la Salud. 30107 Guadalupe - Murcia (España).

INTRODUCCIÓN

Los principales efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la salud humana son atribuidos en su mayoría a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y más recientemente a su papel regulador en vías de señalización celular y de expresión génica

Los antioxidantes como los polifenoles son capaces de inhibir o mejorar el estado de oxidación del organismo, en este sentido, los polifenoles de los frutos rojos han demostrado beneficios para la salud tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

OBJETIVOS

Se compararon cuatro diferentes tipos de bayas: fresa, frambuesa, mora y arándano con el objetivo de distinguir su composición de antocianos, así como su biodisponibilidad *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pretatamiento de las Muestras

Se compraron los frutos rojos de proveedores locales (fresas, frambuesa, arándano y mora). Posteriormente se homogeneizaron en un ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm durante 1 min y se pesaron 10 gramos de cada tipo de fruta, se centrifugaron a 5000 g durante 10 min en una centrífuga HaraeusBiofugestratos y se midió el volumen de sobrenadante para analizar los compuestos fenólicos totales, los antocianos y la actividad antioxidante por el método ORAC. No se ha realizado ningún tipo de extracción de los compuestos fenólicos con el fin de poder observar la influencia de la digestión “*in vitro*” sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, y para ello es imprescindible simular las condiciones fisiológicas del tracto digestivo.

Biodisponibilidad *In Vitro*

La biodisponibilidad “in vitro” se ha analizado por el método descrito por (Gil-Izquierdo, Zafrilla, & Tomás-Barberán, 2002).

Para la preparación de las muestras se homogeneizaron 20g de cada fruto rojo como se ha descrito anteriormente, y se diluyó en proporción 1:2 en agua destilada hasta una completa homogeneización.

La solución de pepsina se preparó a partir de 4 g de pepsina (Sigma-Aldrich) a la que se añadieron 25 ml de agua destilada y se llevaron a agitación.

La solución de pancreatina se preparó con 0,42 g de NaHCO₃, junto a 1,25 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) y 0,2 g de pancreatina (Sigma-Aldrich), mezcla que se disolvió en 50 ml de agua destilada.

En primer lugar, se midió el pH de la muestra y se valoró con HCl 0,6 N hasta pH 2. A continuación se añadieron 6 ml de la solución de pepsina y se realizó la digestión ácida durante 2 h, a 37 °C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó cada media hora el mantenimiento del pH en 2.

En segundo lugar, a una alícuota (alícuota I) de la muestra (± 20 ml) se le añadió 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina, y se valoró con NaOH hasta pH 7. Otra alícuota (alícuota II), de ± 20 ml, permaneció en un baño de hielo con la digestión ácida detenida.

En tercer lugar, la alícuota II se sometió a una segunda digestión y a diálisis, a 37 °C, durante 2 h en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introdujo una membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) tubular sellada, con un volumen de una solución preparada con una cantidad de NaHCO₃ equivalente a la acidez valorada en la alícuota I y diluida hasta 25 ml con agua destilada. Media hora después, se añadieron los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recogió el dializado, se filtró a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ 0,45 μ m (Millipore, EE.UU.) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

Se realizaron tres ensayos de biodisponibilidad de cada muestra y los resultados se expresan como medias \pm SD.

Actividad Antioxidante por El Método Orac.

La actividad antioxidante se midió por el método ORAC según Dávalos, Gómez-Cordovés, and Bartolomé (2004).

La solución de fluoresceína (4 μ M) fue disuelta en tampón fosfato sódico 75 mM (pH 7,4), conservándola a -20°C durante un máximo de cuatro semanas. A partir del stock de

fluoresceína, se prepararon disoluciones de trabajo a una concentración final de 6 nM. La concentración de Trolox C utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0,25 mM. El AAPH (127 nM) se preparó diariamente disolviéndolo en tampón fosfato sódico 75 mM (pH 7,4).

Las determinaciones se realizaron en un lector de placas Synergy HT multidetec microplate reader de biotek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA). Se emplearon microplacas de 96 pocillos de polietileno negro con el fondo transparente, de Nalge Nunc Internacional (Roskilde, Denmark). La fluoresceína se leyó a una longitud de excitación de 485/20 nm. El detector de placas se controló mediante el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de absorción del radical se determinó con el método descrito por Dávalos et al. (253) con algunas modificaciones. El volumen final de cada pocillo fue de 200 μ L; 100 μ L de fluoresceína (con una concentración final de 3 nM), de 0 a 70 μ L de muestra (adicionada en orden creciente), 30 μ L de AAPH (que se adicionó posteriormente) y el resto, hasta completar los 200 μ L, de tampón fosfato sódico.

La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, acto seguido se añadió la solución de AAPH (30 μ L) con una concentración final de 19 mM. La microplaca se introdujo en el lector, el cual mide la fluorescencia cada 1 min 14 seg, durante 120 min, agitándose automáticamente en cada medida. Se realizó un blanco que contenía fluoresceína y AAPH usando tampón fosfato sódico en lugar de muestra antioxidante y 8 soluciones a concentraciones crecientes de Trolox C (compuesto antioxidante de referencia), para obtener la recta de calibrado (6.25, 12.5, 15.0, 18.75, 21.25, 25, 27.5 y 31.25 μ M).

La capacidad de inhibición de FL, se cuantificó mediante la integración del área bajo la curva de caída de la FL (AUC). Todas las muestras fueron preparadas por triplicado y al menos, se realizaron tres ensayos independientes para cada muestra. Con el fin de evitar el efecto de temperatura, sólo se utilizaron los 60 pocillos centrales de la placa, dejando los exteriores con 200 μ L de agua destilada. Los resultados fueron expresados como equivalentes de Trolox en μ M, utilizando la curva de calibración de Trolox C ($y=0.12+1.43x$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad antioxidante de un alimento no siempre se traduce en una acción mejor o más eficaz *in vivo*, ya que la estructura del mismo determina la absorción de compuestos químicos y la eficacia de los polifenoles en el organismo depende de la biodisponibilidad de estos compuestos antioxidantes. La medición de la biodisponibilidad de las diferentes matrices de alimentos permite determinar la eficacia de su composición fenólica.

Los resultados de actividad antioxidante de nuestro estudio se ven reflejados en la figura 1. De todos los frutos rojos analizados, la mora es la que presenta la mayor actividad antioxidante, resultados que concuerdan con Wang and Lin (2000). En todos los casos las diferencias entre la actividad antioxidante antes y después de la digestión *in vitro* son estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Wang and Lin (2000) analizaron la actividad antioxidante de la mora, fresa y frambuesa por el método ORAC y los resultados son en todos los casos inferiores a los obtenidos en nuestro estudio.

Después de la digestión *in vitro*, todas las bayas analizadas presentaron una disminución de la actividad antioxidante de aproximadamente el 90%. Esta disminución es mayor en mora y menor en el caso de la frambuesa. La biodisponibilidad de todos los frutos analizados fue: 10,47% para la mora, 10,6% para la fresa, 10,87 en el caso del arándano y para la frambuesa del 13,07%. Es destacable que la mora, aun presentando la mayor actividad antioxidante por el método ORAC, es el fruto rojo que presenta menor biodisponibilidad de los cuatro. El caso contrario sería la frambuesa, que siéndola fruta con menor actividad antioxidante, presentó una mayor biodisponibilidad. Muchos estudios publicados han observado diferentes resultados en diferentes matrices alimentarias.

Cerezo, Cuevas, Winterhalter, Garcia-Parrilla, and Troncoso (2010), Después de someter a las fresas a una digestión *in vitro* observaron una disminución del 50% de la actividad antioxidante, mayor valor biodisponibilidad que la observada en nuestro estudio. Tavares et al. (2012) Observaron una disminución de 84% en la actividad antioxidante de los arándanos, una biodisponibilidad ligeramente más alta que la reportada en nuestro estudio. Otras matrices presentan mayor biodisponibilidad, Record and Lane (2001) encontraron pérdidas mucho más moderadas en la actividad antioxidante de los extractos de té verde y negro después de la digestión *in vitro* (25%). Parece evidente pues que la matriz alimentaria es un factor fundamental a la hora de valorar la biodisponibilidad de los componentes de un alimento.

Muchas publicaciones han reportado diferencias en la biodisponibilidad de antocianos y compuestos fenólicos (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán, & García-Conesa, 2007; Liang et al., 2012; G. McDougall et al., 2007; G. J. McDougall, Dobson, Smith, Blake, & Stewart, 2005; G. J. McDougall, Fyffe, Dobson, & Stewart, 2005; Record & Lane, 2001; Tavares et al., 2012), pero pocos han relacionado esta biodisponibilidad con la actividad antioxidante *in vitro*.

CONCLUSIONES

Todos los frutos rojos presentaron una gran actividad antioxidante, posiblemente debido a su contenido en polifenoles.

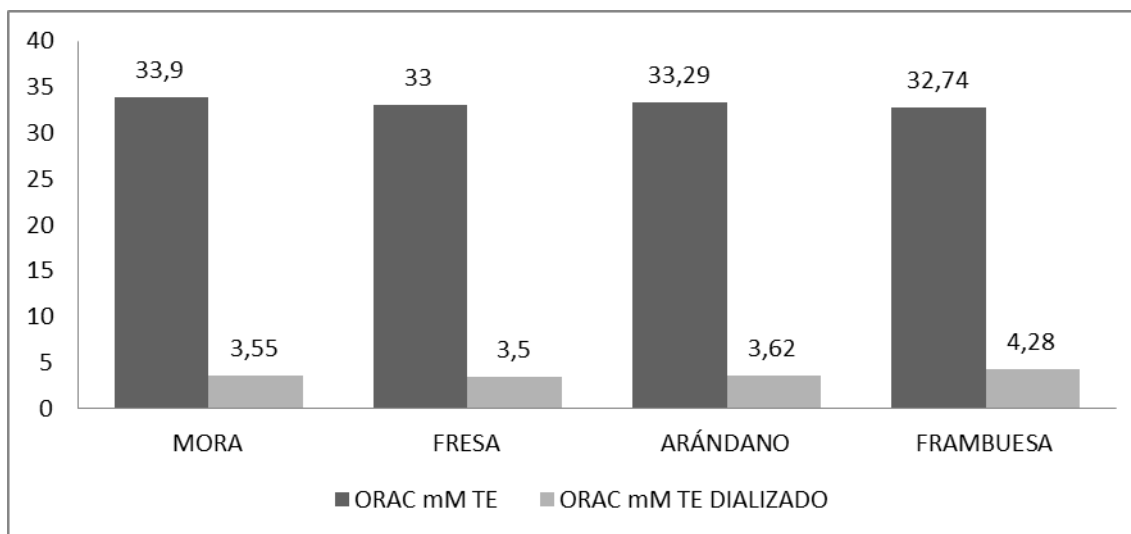
Las moras son de los frutos rojos analizados los que presentan una mayor actividad antioxidante y tras la biodisponibilidad *in vitro* se produce una disminución entre un 86%-90% de la actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, *102*(3), 865-874.
- Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2010). Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, *123*(3), 574-582.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(1), 48-54.
- Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, *214*(2), 155-159.
- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., . . . Yang, L. (2012). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, *46*(1), 76-82.
- McDougall, G., Dobson, P., Shpiro, F., Smith, P., Stewart, D., & Fyffe, S. (2007) Assessing bioavailability of soft fruit polyphenols *in vitro*. *Vol. 744* (pp. 135-148).
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(15), 5896-5904.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, *66*(21), 2540-2548.
- Record, I. R., & Lane, J. M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, *73*(4), 481-486.
- Tavares, L., Figueira, I., MacEdo, D., McDougall, G. J., Leitão, M. C., Vieira, H. L. A., . . . Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *131*(4), 1443-1452.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 140-146.

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Consecuencias de la digestión *in vitro* en la actividad antioxidante.
Resultados expresados en mM TE



EFFECTO DE LA BIODISPONIBILIDAD “IN VITRO” EN LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES Y ANTOCIANOS DE DIFERENTES FRUTOS ROJOS

Pilar Zafrilla^a, Javier Marhuenda^a, M^a Dolores Alemán^a, Alfonso Perez^a, Gabriel Caravaca^a, Fernando Figueroa^a, Juana Mulero^a

¹Universidad Católica San Antonio. Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Facultad de Ciencias de la Salud. 30107 Guadalupe - Murcia (España).

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes como los polifenoles son capaces de inhibir o mejorar el estado de oxidación del organismo. Los polifenoles de los frutos rojos han demostrado beneficios para la salud tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Los principales efectos beneficiosos sobre la salud humana de los polifenoles son atribuidos en su mayoría a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y más recientemente a su papel regulador en vías de señalización celular y de expresión génica. Los antocianos también muestran beneficios *in vitro*, por ejemplo la regulación del metabolismo de la glucosa, así como la inhibición de la α -amilasa.

OBJETIVOS

Se compararon cuatro diferentes tipos de bayas, fresa, frambuesa, mora y arándano con el objetivo de distinguir su composición de antocianos junto a su biodisponibilidad *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pretatamiento de las Muestras

Se compraron los frutos rojos de proveedores locales (fresas, frambuesa, arándano y mora). Posteriormente se homogeneizaron en un ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm durante 1 min y se pesaron 10 gramos de cada tipo de fruta, se centrifugaron a 5000 g durante 10 min en una centrífuga HeraeusBiofugestratos y se midió el volumen de sobrenadante para analizar los compuestos fenólicos totales, los antocianos y la actividad antioxidante por el método ORAC. No se ha realizado ningún tipo de extracción de los compuestos fenólicos con el fin de poder observar la influencia de la digestión “*in vitro*” sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, y para ello es imprescindible simular las condiciones fisiológicas del tracto digestivo.

Biodisponibilidad *In Vitro* de Compuestos Fenólicos

La biodisponibilidad “*in vitro*” se ha analizado por el método descrito por (Gil-Izquierdo, Zafrilla, & Tomás-Barberán, 2002). Para la preparación de las muestras se homogeneizaron 20g de cada fruto rojo como se ha descrito anteriormente, y se diluyó en proporción 1:2 en agua destilada hasta una completa homogeneización.

La solución de pepsina se preparó a partir de 4 g de pepsina (Sigma-Aldrich) a la que se añadieron 25 ml de agua destilada y se llevaron a agitación. La solución de pancreatina se preparó con 0,42 g de NaHCO_3 , junto a 1,25 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) y 0,2 g de pancreatina (Sigma-Aldrich), mezcla que se disolvió en 50 ml de agua destilada.

En primer lugar, se midió el pH de la muestra y se valoró con HCl 0,6 N hasta pH 2. A continuación se añadieron 6 ml de la solución de pepsina y se realizó la digestión ácida durante 2 h, a 37 °C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó cada media hora el mantenimiento del pH en 2.

En segundo lugar, a una alícuota (alícuota I) de la muestra (± 20 ml) se le añadió 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina, y se valoró con NaOH hasta pH 7. Otra alícuota (alícuota II), de ± 20 ml, permaneció en un baño de hielo con la digestión ácida detenida.

En tercer lugar, la alícuota II se sometió a una segunda digestión y a diálisis, a 37 °C, durante 2 h en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introdujo una membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) tubular sellada, con un volumen de una solución preparada con una cantidad de NaHCO_3 equivalente a la acidez valorada en la alícuota I y diluida hasta 25 ml con agua destilada. Media hora después, se añadieron los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recogió el dializado, se filtró a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ 0,45 μm (Millipore, EE.UU.) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. Se realizaron tres ensayos de biodisponibilidad de cada muestra y los resultados se expresan como medias \pm SD.

Compuestos Fenólicos Totales.

Los fenoles totales han sido medidos a través del método de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó disolviendo 700 ml de agua destilada en 100 g de wolframato de sodio, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 25 g de molibdeno de sodio, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se añadieron 50 ml de ácido fosfórico al 85% ($r_{20} = 1,71$ g/ml) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado ($r_{20} = 1,19$ g/ml). Se llevó a ebullición, permaneció así durante 10 h y se añadieron a continuación 150 g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo, y se mantuvo en ebullición durante otros 15 min. Se dejó enfriar y se completó hasta 1 l con agua destilada.

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20%, pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, al cual se añadieron 15 ml de agua grado HPLC y se disolvió completamente utilizando ultrasonidos, finalmente se enrasó hasta 25 ml con agua. Se realizó una recta de calibrado de la que se obtuvo la ecuación $y = 0,181x - 0,035$ ($r^2 = 0,994$). La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro, modelo VarianCary 50 Bio.

Quantificación de Antocianos por Hplc-Dad.

El análisis de antocianos se realiza mediante la inyección directa de 20 μ l de muestra en un equipo HPLC (Merck-Hitachi) equipado con una bomba L-7100 (Merck), un detector DAD y empleando una columna de fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany) (25 x 0.4 cm, con un tamaño de partícula de 5 μ m) utilizando como fase móvil ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemania) al 5% (v/v) en agua ultrapura (J.P. Baker, Alemania) (solvente A) y metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) (solvente B).

La elución se realiza con una velocidad de flujo de 1 ml/minuto empleando un gradiente cuyas condiciones se especifican a continuación: 2% B inicial, incremento a 32% de B a los 30 minutos, 40% de B a los 40 minutos y 95% de B a los 50 minutos, retorno a las condiciones iniciales a los 55 minutos y dejando un tiempo de acondicionamiento de la columna mínimo de 10 minutos (Cantos, Garcia-Viguera, De Pascual-Teresa, & Tomas-Barberan, 2000).

Los diferentes compuestos son caracterizados por comparación cromatográfica con patrones comerciales y por su espectro visible registrado con el detector de red de diodos. Los antocianos se cuantifican como cianidina-3 rutinósido (Sigma, Madrid, España) a 510 nm. El análisis de las muestras se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como valores medios (mg/100g muestra) \pm desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos Fenólicos Totales tras la Biodisponibilidad.

La concentración de fenoles totales muestra una gran variabilidad en función del tipo de fruto rojo analizado, disminuyendo entre un 27-67%. Tras la digestión *in vitro*. La disminución es de un 67% en el caso de las fresas y un 27% en los arándanos (tabla 1).

En otras matrices alimentarias se han llevado a cabo estudios de biodisponibilidad *in vitro* observándose resultados que coinciden con los obtenidos en los frutos rojos analizados. Pérez-Vicente, Gil-Izquierdo, and García-Viguera (2002), Tras determinar los fenoles totales

después de la biodisponibilidad *in vitro* en zumo de granada observaron una pérdida del 71%. (Bouayed, Deußer, Hoffmann, & Bohn, 2012) obtuvieron pérdidas de hasta el 75% en el contenido de fenoles totales de la manzana, las mismas que G. McDougall et al. (2007) en col lombarda y Tarko, Duda-Chodak, Sroka, Satora, and Michalik (2009) en diferentes frutas, mientras (Fazzari et al., 2008) encontraron pérdidas de entre el 70 y el 74% en cerezas. Otros autores reportaron pérdidas de 10,3% de fenoles totales en frambuesa (G. J. McDougall, Dobson, Smith, Blake, & Stewart, 2005; G. J. McDougall, Fyffe, Dobson, & Stewart, 2005), resultado inferior al observado en nuestro estudio, donde se muestra una biodisponibilidad en el caso de las frambuesas del 63% y en las fresas un 33%. Estos autores observaron una biodisponibilidad en el vino tinto del 7.2% resultado muy inferior al observado en nuestro estudio con diferentes frutos rojos.

Bouayed, Hoffmann, and Bohn (2011) Obtuvieron valores de recuperación de fenoles en diferentes zumos de frutas entre el 74% y el 96%, resultados superiores a los observados en nuestro estudio. (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010) Observaron, tras someter a la uva a una digestión simulada, una pérdida de fenoles totales del 37%., resultado inferior al observado en la fresa y la mora de nuestro estudio y superior al observado en frambuesa y arándano. Chandrasekara and Shahidi (2012) Reportaron mayores concentraciones de fenoles totales después de la digestión “*in vitro*”.

Antocianos tras la Biodisponibilidad.

Los antocianos cuantificados se muestran en la tabla 1.

Pelargonidina-3-glucósido es la antocianina principal en la fresa ($347 \pm 10,5$ mg/100 g), seguido por pelargonidina-3-rutinósido, peonidina-3-rutinósido y cianidina-3-rutinósido. Kelebek and Selli (2011) Encontraron cianidina-3-glucósido en los extractos de fresa, y dos formas más esterificados de pelargonidina. Sin embargo, no reportaron evidencias de peonidina-3-rutinósido. Por otra parte, el contenido de la fresa de antocianinas total (TAC) que se encuentra en su investigación es muy inferior en comparación con el TAC que se refleja en este estudio.

La mora mostró el mayor TAC de las cuatro bayas (Lugasi, Hóvári, Kádár, & Dénes, 2011) analizaron diferentes variedades de moras, todas ellas exhibieron menos TAC (entre 50 y 233 mg/100 g) que las bayas de nuestro trabajo. Delfinidina-3-glucósido exhibió la concentración máxima ($516,5 \pm 9,3$ mg/100g) en mora, a lo largo de tres formas esterificados cianidina (cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-xilosido) que se encuentran en menor concentración.

A diferencia de Huang, Zhang, Liu, and Li (2012), los arándanos mostraron el TAC inferior de las cuatro bayas. Los arándanos mostraron concentración similar de Delfinidina-3-glucósido ($27,3 \pm 3,1$ mg/100 g), petunidina-3-glucósido ($28,1 \pm 4,1$ mg/100 g) y una concentración de peonidina-3-glucósido ($15,1 \pm 2,4$ mg/100g) ligeramente inferior. Nuestros datos están de acuerdo con los resultados obtenidos en diferentes variedades de arándanos por Gavrilova, Kajdžanoska, Gjamovski, and Stefova (2011), con TAC similares (forma de 41,99 a 83,64 mg/100 g y las condiciones de elución de HPLC (ácido fórmico (5%,v/v) en Agua fase A, y Metanol fase B) pero con distinto contenido en antocianos.

Los resultados de nuestro estudio revelan que el TAC de la frambuesa ($133,9 \pm 8,4$ mg/100 g) es ligeramente superior al TAC de arándanos ($77,5 \pm 11,3$ mg/100g). Lugasi et al. (2011) Reportaron un TAC inferior en su estudio (14,5 a 78,4 mg/100g). Sin embargo, nuestros resultados están en el rango observado en diferentes variedades comerciales de frambuesas (Chen, Xin, Zhang, & Yuan, 2013). Cianidina-3-glucósido ($57,5 \pm 3,4$ mg/100g) y cianidin-3-glucosilrutinosido ($56,4 \pm 3,8$ mg/100 g) fueron identificados como las principales antocianinas en frambuesa, seguido de cianidina-3-rutinósido ($19,6 \pm 1,2$ mg/100 g) y cianidina-3-soforosido a muy baja concentración ($0,4 \pm 0,1$ mg/100 g).

El TAC muestra gran variabilidad tras la biodisponibilidad, disminuyendo los valores de 68.3% de los arándanos a 90.1% en el caso de moras, con valores intermedios (89.8%) para fresas y para frambuesas (73%). Los resultados se expresan y comparan con la fracción inicial en la tabla 3.

Los resultados de G. J. McDougall, Dobson, et al. (2005) están en desacuerdo con nuestros datos, ellos reportaron sólo un 5,5% de la disponibilidad de antocianos con una digestión gastrointestinal simulada de frambuesa. Los mismos autores, en 2007, analizaron varias frutas, como fresas y arándanos. Encontraron cerca de 1% de antocianinas en la fracción dializada, que representa un rango muy bajo de disponibilidad en comparación con nuestros resultados (G. McDougall et al., 2007). Algunos autores han estudiado la biodisponibilidad simulada en distintas matrices alimentarias. Los valores más altos fueron encontrados por Fazzari et al. (2008), que reportaron 15-21% de la disponibilidad de antocianos en cerezas congeladas digeridas. También se mostró un aumento de la fracción de la disponibilidad por Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán, and García-Conesa (2007), cuantificando el 57% de antocianinas iniciales.

CONCLUSIONES

Todos los frutos rojos presentaron una gran concentración de antocianos y fenoles totales.

Los arándanos son, de los frutos rojos analizados, los que presentan una mayor biodisponibilidad. La disminución de los frutos rojos analizados varía entre un 68.3%-90.1% del contenido total de antocianos, y entre un 27%-67% para fenoles totales.

BIBLIOGRAFÍA

- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865-874.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466-1472.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- Cantos, E., Garcia-Viguera, C., De Pascual-Teresa, S., & Tomas-Barberan, F. A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4606-4612.
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 226-237.
- Chen, L., Xin, X., Zhang, H., & Yuan, Q. (2013). Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 508-515.
- Fazzari, M., Fukumoto, L., Mazza, G., Livrea, M. A., Tesoriere, L., & Di Marco, L. (2008). In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3561-3568.
- Gavrilova, V., Kajdžanoska, M., Gjamovski, V., & Stefova, M. (2011). Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MS n. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4009-4018.
- Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214(2), 155-159.
- Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 13(2), 94-102.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Characterization of phenolic compounds in strawberry fruits by RP-HPLC-DAD and investigation of their antioxidant capacity. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(20), 2495-2504.

- Lugasi, A., Hóvári, J., Kádár, G., & Dénes, F. (2011). Phenolics in raspberry, blackberry and currant cultivars grown in Hungary. *Acta Alimentaria*, 40(1), 52-64.
- McDougall, G., Dobson, P., Shpiro, F., Smith, P., Stewart, D., & Fyffe, S. (2007) Assessing bioavailability of soft fruit polyphenols in vitro. *Vol. 744* (pp. 135-148).
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896-5904.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66(21), 2540-2548.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P., & Michalik, J. (2009). Transformations of Phenolic Compounds in an in vitro Model Simulating the Human Alimentary Tract. *Food Technology and Biotechnology*, 47(4), 456-463.

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Consecuencias de la digestión *in vitro* en fenoles totales.
Resultados expresados en mgac. Gálico/100g de fruto fresco

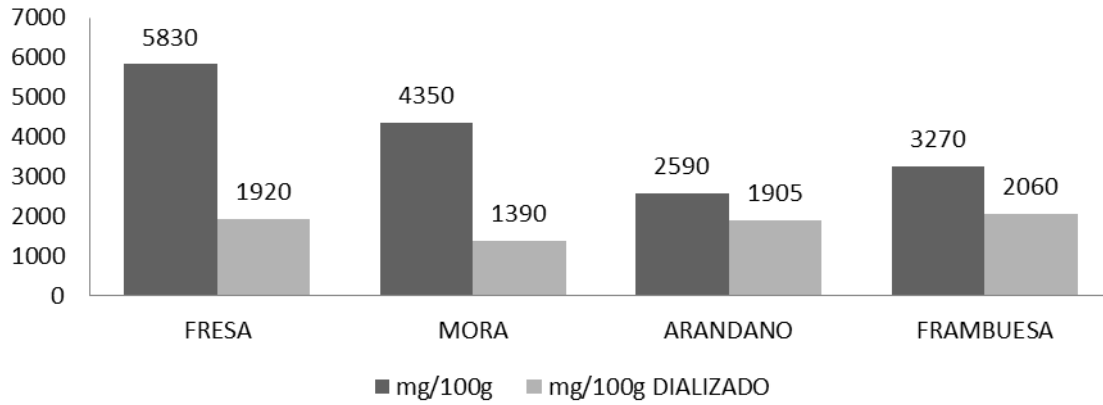
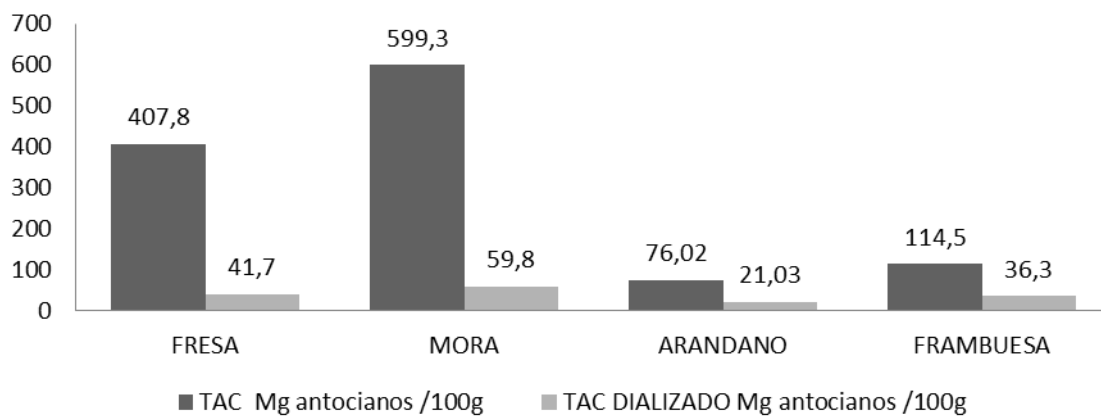


Figura 2. Consecuencias de la digestión *in vitro* en la concentración de antocianos.
Resultados expresados en mg/100g de fruto fresco



INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICAS EN LA CONCENTRACIÓN EN FENOLES TOTALES DE 10 VARIEDADES DE NOGAL

Fernando Figueroa¹, Javier Marhuenda¹, Begoña Cerdá¹, Pilar Zafrilla¹, Juana Mulero¹.

¹Universidad Católica San Antonio. Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición. Facultad de Ciencias de la Salud. 30107 Guadalupe - Murcia (España).

INTRODUCCIÓN

Las nueces son una fuente importante de compuestos fenólicos. Se ha demostrado que la concentración en fenoles en alimentos depende de factores como la procedencia geográfica, condiciones climáticas, prácticas agrícolas y fecha de recolección. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de las condiciones edafoclimáticas sobre la concentración en fenoles en las semillas de 10 variedades de nogal cultivadas bajo las mismas prácticas agrícolas y recolectadas en las mismas fechas en dos fincas diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se han utilizado frutos de 10 genotipos diferentes de nueces (Algaida, Amigo, Chico, Eureka, Franquette, Payne, Pedro, Serr, Sunland y Tehama) cultivados en las fincas Torre Blanca y El Chaparral bajo las mismas prácticas agrícolas. El Chaparral situada en Cehegín (Murcia), a una altitud de 432 m, latitud de 38° 6' 39,35" y longitud de 1° 40' 59,06". Los datos meteorológicos recogidos indican que la plantación ha soportado una temperatura media anual de 15,38 °C, 220 h anuales por debajo de 0 °C, una humedad relativa media de 61,53% y precipitaciones de 344,07 mm/año. Torre Blanca situada en Torre Pacheco (Murcia), a una altitud de 31 m, latitud de 37° 46' 25,89" y longitud de 0° 53' 54,62", con una temperatura media anual de 17,05 °C, 6,92 h anuales por debajo de 0 °C, una humedad relativa media de 76,35% y precipitaciones de 271,07 mm/año.

Determinación de Fenoles Totales

Los fenoles totales han sido medidos a través del método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965).

Para la preparación de las muestras, se homogeneizaron 5 g de nueces en un Ultraturrax T-18 basic a 24.000 rpm durante 2 min con 20 ml de una disolución metanol + ácido fórmico al 3%. Los extractos se centrifugaron a 4000 g durante 10 min en una centrífuga Haraeus Biofuge stratos. El sobrenadante, extracto metanólico, se separó del

precipitado y se filtró a través de papel de filtro Whatman nº 4 y se recogió en frascos opacos. El precipitado fue sometido a un nuevo proceso de extracción en idénticas condiciones, y su extracto metanólico se unió al obtenido tras la primera extracción.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó disolviendo 700 ml de agua destilada en 100 g de wolframato de sodio, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 25 g de molibdeno de sodio, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se añadieron 50 ml de ácido fosfórico al 85% ($r_{20} = 1,71 \text{ g/ml}$) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado ($r_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$). Se llevó a ebullición, permaneció así durante 10 h y se añadieron a continuación 150 g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo, y se mantuvo en ebullición durante otros 15 min. Se dejó enfriar y se completó hasta 1 l con agua destilada.

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20%, pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, al cual se añadieron 15 ml de agua grado HPLC y se disolvió completamente utilizando ultrasonidos, finalmente se enrasó hasta 25 ml con agua.

Se realizó una recta de calibrado de la que se obtuvo la ecuación $y = 0,181x - 0,035$ ($r^2 = 0,994$). La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro, modelo Varian Cary 50 Bio.

Las determinaciones se llevaron a cabo en el extracto metanólico de las muestras, utilizando para ello el espectrofotómetro.

A 1 ml del extracto metanólico de nuez se le adicionó 50 ml de agua destilada, 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 ml de solución carbonato de sodio al 20%. Se agitó y se esperó 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 765 nm con relación a un blanco.

Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por 100 g de nuez.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico IBM[®] SPSS[®] Statistics (versión 19.0.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra el contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces en función de la finca. Atendiendo a la misma, podemos observar como los genotipos Eureka y Tehama son los que presentan el mayor contenido en fenoles totales en ambas fincas, existiendo diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) frente al resto de genotipos estudiados.

La variedad Amigo en El Chaparral y la variedad Serr en Torre Blanca son las que presentan menor contenido en fenoles totales de manera significativa ($\rho \leq 0,05$).

El contenido en fenoles totales de las variedades cultivadas en El Chaparral es significativamente más alto que el obtenido por las mismas variedades en la finca Torre Blanca, $1024,14 \pm 22,66$ mg de ác. gálico/100 g de nuez frente a $882,58 \pm 18,72$ mg ác. gálico/100 g de nuez, siendo los valores obtenidos en El Chaparral similares a los obtenidos en otros estudios (Kornsteiner *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008; Arcan & Yemenicioglu, 2009; Yang *et al.*, 2009; Bakkalbaşı *et al.*, 2012). Estas diferencias encontradas entre las dos fincas pueden ser debidas a la mejor adaptación de los genotipos a las condiciones geográficas y climatológicas reinantes en El Chaparral que se caracterizaban por una altitud superior a la de Torre Blanca, 432 m frente a 31 m, y una temperatura anual media más suave, $15,38$ °C, por los $17,05$ °C alcanzados como media en Torre Blanca.

Resultados similares, en los que se apreciaban diferencias en el contenido en compuestos fenólicos de nueces, posiblemente debidas a la diferente altitud y temperatura han sido publicados por otros estudios, como el de Ghasemi *et al.* (2011), en el que se observaba como el contenido en fenoles totales del pericarpio de la nuez era superior, $108,11 \pm 4,6$ mg ác. gálico/g de extracto, en una región de Irán (Ab-ali) situada a mayor altitud y, por tanto, con temperaturas medias más suaves que en otras regiones (Galikesh y Chogholondi) situadas más cercanas al nivel del mar, que presentaban un contenido en fenoles de $16,88 \pm 0,9$ y $15,15 \pm 0,4$ mg ác. gálico/g de extracto, respectivamente.

Amaral *et al.* (2008), estudiaron la influencia de la localización geográfica y del clima en el perfil fenólico de las hojas del nogal cultivado en Portugal, observando que el contenido en fenoles de las hojas era inferior cuando la pluviometría era escasa y las temperaturas altas en las fechas previas a la recolección.

Si atendemos al comportamiento de cada uno de las variedades, observamos como Amigo y Franquette son las que sufren menos variación en el contenido en fenoles en función de la finca, mientras que Payne y Serr son las más afectadas, al ver reducido su contenido en fenoles en un 26,70 y 21,19%, respectivamente en Torre Blanca.

CONCLUSIONES

Todas las variedades de nogal estudiadas presentan un alto contenido en compuestos fenólicos, destacando los genotipos Eureka y Tehama.

Las condiciones climatológicas caracterizadas por temperaturas más suaves y mayores precipitaciones afectan positivamente al contenido en compuestos fenólicos en las nueces.

BIBLIOGRAFÍA

Amaral JS, Valentao P, Andrade PB, Martins RC, Seabra RM. Do cultivar, geographical location and crop season influence phenolic profile of walnut leaves? *Molecules* 2008;13(6):1321-1332.

Arcan I, Yemenicioğlu A. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *J Food Compos Anal* 2009;22(3):184-188.

Arranz S, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *Eur Food Res Technol* 2008;227(2):425-431.

Bakkalbaşı E, Yılmaz ÖM, Javidipour I, Artık N. Effects of packaging materials, storage conditions and variety on oxidative stability of shelled walnuts. *LWT - Food Sci Technol* 2012;46(1):203-209.

Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, *et al.* Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J Med Plants Res* 2011;5(7):1128-1133.

Kornsteiner M, Wagner K, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem* 2006;98(2):381-387.

Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965;16:144-158.

Yang J, Liu RH, Halim L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Sci Technol* 2009;42(1):1-8.

TABLAS

Tabla 1. Contenido en Fenoles totales de las 10 variedades de nueces en función de la finca (mg ácido gálico/100 g de nuez ± SD)

Variedad	Fincas	
	El Chaparral	Torre Blanca
Algaida	1058,46 ± 15,44*	959,38 ± 10,13
Amigo	727,13 ± 7,52	760,34 ± 23,22
Chico	826,94 ± 15,36*	697,85 ± 14,77
Eureka	1423,94 ± 65,64*	1181,82 ± 20,43
Franquette	857,06 ± 27,76	881,62 ± 13,97
Payne	1085,77 ± 38,66*	795,78 ± 9,47
Pedro	942,36 ± 88,95*	751,40 ± 31,51
Serr	842,38 ± 11,99*	663,88 ± 15,94
Sunland	1110,76 ± 28,23*	906,48 ± 23,56
Tehama	1366,60 ± 46,50*	1227,26 ± 23,37
	1024,14 ± 22,66*	882,58 ± 18,72

(*) = Se encuentran diferencias significativas ($\rho \leq 0,05$) intergrupo (diferentes fincas)

EVALUACIÓN DE SACIEDAD Y ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE UNA BARRA ALIMENTICIA ADICIONADA DE β -GLUCANOS Y GLUCOMANANO ORIENTADA A CONSUMIDORES ESCOLARES

Ximena López^{1,2}, Juan P. Vivanco^{1,3}, Danilo Segovia¹, Paula Berríos⁴, Nataly Espinoza⁴, Marcela Alviña⁴

¹: Consorcio de Cereales Funcionales S.A., Santiago, Chile. ²: Granotec S.A., Santiago, Chile. ³: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Santiago, Chile. ⁴: Universidad de Valparaíso, Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Alimentos, Valparaíso, Chile.

INTRODUCCIÓN

En Chile, la obesidad infantil constituye un problema epidemiológico de grandes proporciones. En el año 2010 la obesidad afectaba al 9,9% de los menores de 6 años, 5% más respecto de 2009 (MINSAL, 2012a). La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial, que suele iniciarse en la infancia o adolescencia, y que tiene su origen en una interacción genética y ambiental. Los niños que padecen obesidad, sobre todo en la segunda década de la vida, tienen mayor probabilidad de continuar con esta condición en la edad adulta (Cancino y Soto, 2007).

Es indudable que los malos hábitos alimentarios, entre otros factores, favorecen la obesidad. En este sentido, investigadores chilenos reafirman lo reflejado en la encuesta chilena de consumo alimentario 2010-2011, la que informa tendencias tales como un bajo consumo de leguminosas, cereales integrales, frutas y verduras, además de un bajo aporte de fibras, alto consumo de grasas y azúcares simples (Burrows, 2005; MINSAL, 2012b). Las dos últimas conductas alimentarias son favorecidas por la composición nutricional de la gran mayoría de las colaciones consumidas por los escolares chilenos, las que generalmente son golosinas poco saludables, con escaso aporte de fibra dietética, pero de gran aceptabilidad por los niños debido a que son bocadillos fáciles de manipular y que no requieren preparación en la mayoría de los casos (Zamorano *et al.*, 2010).

La fibra dietética es una familia de sustancias, en su mayoría de origen vegetal o fúngico, que no puede ser digerida por las enzimas del tracto digestivo humano. Son polisacáridos estructurales que incluyen celulosa, hemicelulosa, β -glucanos, pectinas, mucílagos, gomas y lignina. Las diferencias estructurales de cada uno de ellos determinan propiedades físicas y químicas diferentes y como consecuencia de ello, la fibra puede categorizarse como soluble e insoluble, condicionando de forma importante sus efectos

fisiológicos. Las fibras solubles en contacto con el agua forman un retículo, originando geles y/o suspensiones de gran viscosidad: en este grupo están las pectinas, algunas hemicelulosas, las gomas, los mucílagos, los β -glucanos y los polisacáridos procedentes de algas. Por otra parte, las fibras insolubles se caracterizan por su escasa capacidad para retener agua y formar soluciones viscosas; ejemplos de fibras poco solubles son la celulosa, diversas hemicelulosas y la lignina (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006; Papatathanasopoulos y Camilleri, 2010).

Los β -glucanos son polisacáridos lineales, compuestos estructuralmente por cadenas de D-glucosa, unidas por enlaces glucosídicos tipo beta. Las fuentes principales de β -glucanos en la dieta humana son la avena, la cebada, el centeno y el trigo; pero también pueden encontrarse en maíz, levaduras, bacterias y algas (Wood, 2007; Havrlentová *et al.*, 2011). En tanto, el glucomanano o goma konjac corresponde a un copolímero lineal randomizado de β -D-glucosa y β -D-manosa, que presentan enlaces (1 \rightarrow 4) y se encuentran en los tallos subterráneos del vegetal denominado konjac (Davé y McCarthy, 1997).

Las estructuras de los (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucanos y del glucomanano tienen un impacto en las propiedades de estos polisacáridos, tales como la disminución del colesterol total y la fracción LDL, y además mantienen la proporción de la fracción HDL, reduciendo el riesgo de enfermedades cardíacas y cardiopatía isquémica (Sood *et al.*, 2008; Havrlentová *et al.*, 2011). Varios estudios también han mostrado que el (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucano es eficaz en la reducción de la glucosa postprandial, lo que se atribuye al aumento de la viscosidad en el tracto digestivo superior (Brennan y Cleary, 2005; Regand *et al.*, 2011).

Una de las propiedades destacadas de los alimentos que contienen fibra dietética es la capacidad para producir saciedad, que se define como la sensación de plenitud al finalizar una comida y determina la próxima ingesta (Loria-Kohen *et al.*, 2011; Bellisle *et al.*, 2012). En este sentido, existen estudios que relacionan tanto el consumo de β -glucanos de avena como de glucomananos de konjac con una menor ingesta de alimentos, y por ende una contribución control del peso (Walsh *et al.*, 1984; Duss y Nyberg, 2004). Sin embargo, aún falta mayor evidencia que relacione el consumo de estos polisacáridos y su efecto sobre la sensación de saciedad.

El objetivo de esta investigación es el desarrollo de una golosina saludable que genere saciedad y presente alta aceptabilidad en escolares, como una posibilidad de mejorar la ingesta de alimentos y colaciones en los colegios.

METODOLOGÍA

Diseño del producto

La golosina saludable desarrollada consistió en una barra alimenticia en base a avena, sabor frutos rojos, adicionada de concentrado de frambuesas, sin colorantes ni preservantes sintéticos, cuya porción de consumo fue de 30 g, con un aporte de 0,75 g de β -glucanos efectivos y de 0,4 g de glucomananos por porción. Dicho aporte de β -glucanos está de acuerdo a lo establecido en la legislación de Chile y de diversos países para hacer uso del mensaje saludable que relaciona estas fibras con un efecto positivo sobre la reducción del colesterol sanguíneo. Para estudiar el efecto sobre la saciedad y la aceptabilidad sensorial en potenciales consumidores, se diseñó una barra control sin adición de β -glucanos ni glucomananos.

Evaluación de saciedad y aceptabilidad sensorial

Para efectuar ambas evaluaciones se seleccionó una muestra de n=39 escolares chilenos no entrenados, de ambos géneros, de estrato socioeconómico medio, cuyas edades fluctuaron entre los 10 y 15 años, quienes testearon ambas barras alimenticias con consentimiento de sus padres o apoderados. Los criterios de exclusión fueron: escolares que presentasen sintomatología gastrointestinal, alergias alimentarias y/o resfríos; también se excluyó a aquellos que no tomaron desayuno y/o consumieron alguna colación extra a las programadas. Estas pruebas fueron realizadas en dos sesiones diferentes, durante el primer recreo de la jornada de clases, a las 9:20 AM.

Durante los días en los que se efectuó la evaluación de los alimentos, los escolares debían consumir un desayuno estándar, el que fue previamente informado y consensuado con los apoderados. Posteriormente, durante el primer recreo (9:20 AM) los escolares debían consumir una de las barras alimenticias, saludable o control, en orden aleatorio determinado a través de un sorteo.

Para la evaluación de saciedad subjetiva que presentaron los alimentos de prueba se utilizó una escala visual análoga (EVA) de 5 puntos, en la que el 1 significa “muero de hambre” y el 5 “Estoy tan lleno(a) que siento náuseas”. Esta encuesta fue aplicada en tres ocasiones para cada barra alimenticia consumida: justo antes de consumir la golosina (tiempo 0), inmediatamente después de consumir la golosina (tiempo 1) y a las dos horas de consumida la golosina (tiempo 2).

Con el fin de medir la saciedad objetiva generada por las barra alimenticias formuladas, luego de 2 horas de ingeridos éstas, los niños recibieron una colación que

consistió en 45 g de galletas dulces, con un aporte de 182 kcal, y se determinó la cantidad de dicha colación que los niños efectivamente ingirieron. Cabe destacar que se tomaron todas las precauciones necesarias para que los escolares no consumieran ninguna colación extra a las programadas.

La evaluación sensorial de aceptabilidad se llevó a cabo de acuerdo a una modificación de lo efectuado por Vivanco *et al.* (2009), en el caso de un establecimiento educacional de la ciudad de Valparaíso, Chile. La ficha de evaluación utilizada correspondió a una escala hedónica gráfica de tipo facial de tres puntos: “no me gusta” (cara triste), “más o menos” (cara indiferente) y “me gusta” (cara feliz); la cual se utilizó para que los niños tuvieran menos dificultad en describir su grado de satisfacción frente a la evaluación de los productos, y así familiarizarlos de mejor forma con un estudio de este tipo (Ávares *et al.*, 2008).

Análisis estadístico

Las variables en estudio se sometieron a pruebas de hipótesis para la búsqueda de existencia de diferencias estadísticamente significativas a un 95% de confianza. El programa que se utilizó fue SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 17 Multilenguaje F.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Saciedad

La sensación de saciedad subjetiva que manifestaron los escolares mediante la aplicación de EVA justo antes de consumir la golosina saludable fue igual a la percibida antes de consumir la barra control ($P > 0,05$). Inmediatamente después de ingerir la barra alimenticia saludable los niños sintieron significativamente menos hambre respecto a cuando ingirieron la barra control. Es decir, la golosina saludable causó una mayor sensación de saciación. Sin embargo, cuando se les consultó por su sensación de hambre-saciedad subjetiva pasadas las 2 horas del consumo de las golosinas, ésta fue mayor después de haber consumido la barra alimenticia control.

En cuanto a la evaluación de la sensación de hambre en los distintos tiempos programados, se registró que en el tiempo 0, (momento previo a la ingesta de la barra alimenticia respectiva); un 54% de los niños indicó que no tenían hambre ni tampoco se sentían satisfechos, un 31% indicó tener un poco de hambre y sólo un 3% (1 niño) respondió que tenía mucha hambre.

En el tiempo 1, (inmediatamente después de la ingesta de la golosina saludable), el 51% de los niños declaró sentirse satisfecho o muy satisfecho (saciación), un 23% contestó no sentir hambre ni tampoco sentirse satisfecho y un 26% manifestó sentir hambre. Finalmente, en el tiempo 2 (dos horas después de ingerir dicha golosina) un 77% de los niños manifestó sentir un poco de hambre o mucha hambre, un 15% indicó no tener hambre ni sentirse satisfecho, mientras que sólo un 8% de los escolares manifestó sentirse saciado.

Los resultados promedio obtenidos para la evaluación de saciedad por medio de EVA se encuentran en la Tabla N°1.

Los resultados de la evaluación de saciedad objetiva indicaron que la golosina saludable adicionada de fibras exhibió un mayor grado de saciedad, ya que sólo el 35% de los niños muestreados consumieron completamente la colación entregada después de 2 h de haber ingerido esta barra alimenticia, a diferencia del menor grado de saciedad objetiva proporcionado por la barra alimenticia control, puesto que en este caso el 100% de los niños consumieron la totalidad de dicha colación entregada (Figura N°1); resultados que no fueron del todo coincidentes al usar EVA, por lo que consideramos que resulta más fiable evaluar saciedad en base a un parámetro objetivo como lo es la cantidad de colación consumida posteriormente en vez de usar una evaluación subjetiva (como EVA), ya que ésta puede estar influenciada por otros factores internos y externos al momento de la prueba. Estos resultados sugieren que el consumo de un producto adicionado de β -glucanos + glucomananos genera saciedad, y es posible que al utilizar dosis mayores podrían observarse efectos más prolongados.

Estudios similares señalan que cereales ricos en β -glucanos como la cebada, generan mayor saciedad en comparación con cereales con bajo o nulo contenido de este tipo de fibra soluble (Schroeder *et al.*, 2009); en un estudio previo relacionaron la ingesta de distintos niveles de β -glucanos de avena y saciedad, demostrando que posterior a la ingesta de β -glucanos (2-5g por porción), la secreción de insulina disminuyó y la liberación de colecistokinina aumentó, regulando de esta manera, la ingesta de la comida siguiente (Beck *et al.*, 2009).

Aceptabilidad

En cuanto a la aceptabilidad de las barras alimenticias en general, se ha visto que su difusión y aceptación por la población iberoamericana ha sido amplia y el crecimiento de su consumo se ha cuadruplicado en la última década a nivel mundial (Ferreira *et al.*, 2009). De acuerdo a la prueba de escala hedónica facial, la aceptabilidad obtenida por la golosina

saludable tipo barra alimenticia para el descriptor “me gusta” fue de un 49%, mientras que la barra alimenticia control obtuvo una aceptabilidad de un 56% para el mismo descriptor. En cuanto al rechazo de las muestras, un 23% y un 18% de los niños indicaron que “no les gustó” la barra alimenticia saludable y control, respectivamente (Figura N°2). Sin embargo, del análisis estadístico de la comparación de aceptabilidad entre la barra alimenticia saludable y la barra alimenticia control no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$).

CONCLUSIONES

El diseño de evaluación que se realizó para evaluar saciedad en forma objetiva mediante el consumo de una colación de manera posterior a la ingesta de las barras alimenticias, resultó ser una herramienta válida, ya que permitió determinar de manera cuantitativa que la barra alimenticia saludable adicionada con β -glucanos + glucomanos generó mayor saciedad de acuerdo con la menor cantidad de galletas que consumieron posteriormente los escolares.

La aceptabilidad de las barras alimenticias en escolares no mostró diferencias estadísticamente significativas, ya que ambas golosinas (saludable y control) fueron bien aceptadas por el grupo objetivo.

Por todo lo anterior, es posible decir que la ingesta sostenida de este tipo de golosina saludable adicionada de fibras podría ayudar al control de la obesidad infantil, y al menor consumo de alimentos con alta densidad de materias grasas y azúcares simples.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto InnovaChile-CORFO, código 10DCO-8632 “Desarrollo de consorcio entre entidades tecnológicas de vanguardia para nuevos productos funcionales base cereal con aporte significativo en la salud humana”.

BIBLIOGRAFÍA

Álvares, S.M., Zapico, J. y de Aguiar-Carracedo, J.A. Adaptación de la escala hedónica facial para medir preferencias alimentarias de alumnos de pre-escolar. *Revista Chilena de Nutrición*. 2008, 35(1): 38-42.

Beck, E.J., Tosh, S.M., Batterham, M.J., Tapsell, L.C. y Huang X.-F. Oat β -glucan increases postprandial cholecystokinin levels, decreases insulin response and extends subjective satiety in overweight subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009, 53(10): 1343-1351.

- Bellisle, F., Drewnowski, A., Anderson, G.H., Westerterp-Plantenga, M. y Martin, C.K. Sweetness, satiation, and satiety. *The Journal of Nutrition*. 2012, 142(6): 1149S-1154S.
- Brennan, C. S. y Cleary, L. J. The potential use of cereal β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-D-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science*. 2005, 42(1): 1-13.
- Burrows, R. Prevención del sobrepeso en la niñez: la mejor estrategia para la prevención de las Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT) del adulto. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 2005, 16(4): 341-350.
- Cancino, R. y Soto, V. Obesidad infantil, un problema de salud pública. *Programa de Diplomado en Salud Pública y Salud Familiar*. Universidad Austral de Chile. Osorno, 2007, 12p.
- Davé, V. y McCarthy, S.P. Review of konjac glucomannan. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1997, 5(4): 237-241.
- Duss, R. y Nyberg, L. Oat soluble fibers (β -Glucans) as a source for healthy snack and breakfast foods. *Cereal Foods World*. 2004, 49(6): 320-325.
- Escudero-Álvarez, E. y González-Sánchez, P. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*. 2006, 21(S2): 61-72.
- Ferreira, V., Flores, A., Fournier, M., Aguilar, V., Apro, N., Giacomino, S., Pellegrino, N. y Olivera-Carrión, M. Estudio de la aceptabilidad en escolares de barras de cereales formuladas con ovoalbúmina, aceite de soja y miel. *DIAETA*. 2009, 27(126): 18-25.
- Havrlentová, M., Petuláková, Z., Burgárová, A., Gago, F., Hlinková, A. y Šturdík E. Cereal β -glucans and their significance for the preparation - a review. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011, 29(1): 1-14.
- Loria-Kohen, V., Gómez-Candela, C., Fernández-Fernández, C., Pérez-Torres, A., Villarino-Sanz, M. y Bermejo, L.M. Impact of two low-calorie meals with and without bread on the sensation of hunger, satiety and amount of food consumed. *Nutrición Hospitalaria*. 2011, 26(5): 1155-1160.
- MINSAL. Encuesta nacional de salud 2009-2010. Ministerio de Salud, Santiago, Chile, 2012a [on-line] <<http://epi.minsal.cl/estudios-y-encuestas-poblacionales/encuestas-poblacionales/encuesta-nacional-de-salud/resultados-ens/>>
- MINSAL. Encuesta nacional de consumo alimentario Chile 2010-2011. Ministerio de Salud de Chile, Santiago, 2012b [on-line] <<http://www.eligevivirsano.cl/wp-content/uploads/2012/01/Encuesta-Nacional-de-Consumo-Alimentario-2010-2011.pdf>>
- Papathanasopoulos, A. y Camilleri, M. Dietary fiber supplements: effects in obesity and metabolic syndrome and relationship to gastrointestinal functions. *Gastroenterology*. 2010, 138(1): 65-72.
- Regand, A., Chowdhury, Z., Tosh S.M., Wolever T.M.S. y Wood P. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glycemic response by modifying starch digestibility. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 297-304.
- Schroeder, N., Gallaher, D.D., Arndt, E.A. y Marquart, L. Influence of whole grain barley, whole grain wheat, and refined rice-based foods on short-term satiety and energy intake. *Appetite*. 2009, 53(3): 363-369.
- Sood, N., Baker, W.L. y Coleman C.I. Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure: systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 88(4): 1167-1175.

Vivanco, J.P., Barra, J., Quitral, V. y Robert, P. Aceptabilidad por parte de consumidores escolares de una golosina desarrollada en base a zanahorias (*Daucus carota* L.) variedad ábaco deshidratadas osmóticamente. *VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA VII)*. Bogotá, Colombia, 2009.

Walsh, D.E., Yaghoubian, V. y Behforooz, A. Effect of glucomannan on obese patients: a clinical study. *International Journal of Obesity*. 1984, 8(4): 289-293.

Wood, P. J. Cereal β -glucans in diet and health. *Journal of Cereal Science*. 2007, 46(3): 230-238.

Zamorano, M., Guzmán, E. e Ibáñez, J. Estudio del consumo y aporte nutricional de bocadillos en escolares de la Región Metropolitana de Chile. *Revista Chilena de Nutrición*. 2010, 37 (4): 439-445.

TABLAS Y FIGURAS

	Barra Saludable	Barra Control	χ^2
Justo antes de consumir la barra alimenticia (Tiempo 0)	2,71±0,69	2,30±0,77	P>0,05
Inmediatamente después de consumir la barra alimenticia (Tiempo 1)	3,23±1,09	2,97±1,16	P≤0,028
120 Minutos después de consumir la barra alimenticia (Tiempo 2)	2,02±0,87	2,35±0,90	P≤0,046

Tabla 1: Saciedad subjetiva promedio obtenida según Escala Visual Análoga (EVA) a través del tiempo monitoreado antes y después de la ingesta de las barras alimenticias saludable y control

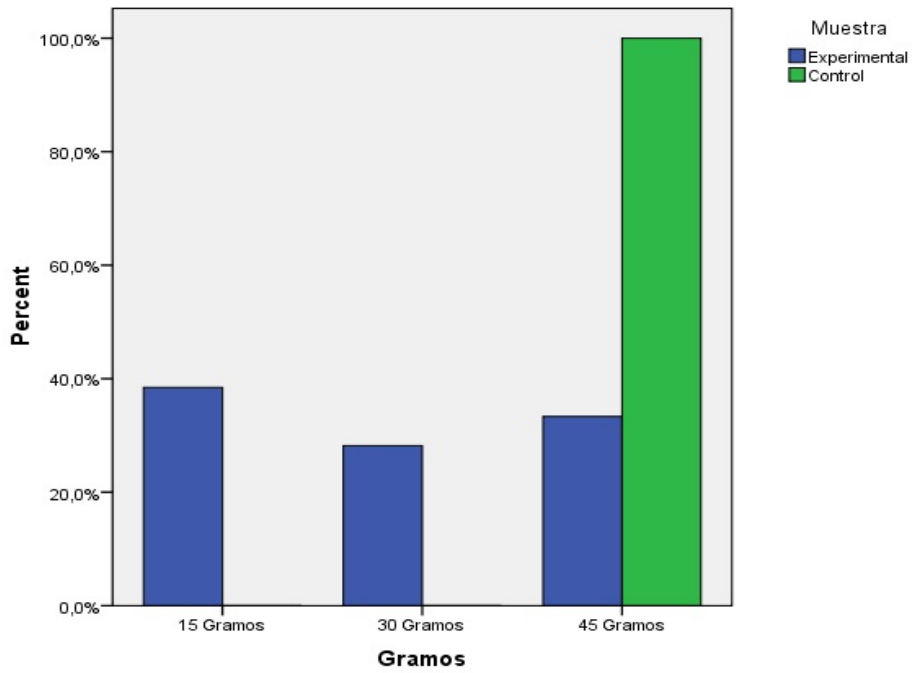


Figura 1: Consumo de galletas [%] por nivel de gramaje, después de dos horas de la ingesta de barras alimenticias experimental (saludable) y control. ($\chi^2 P \leq 0,008$).

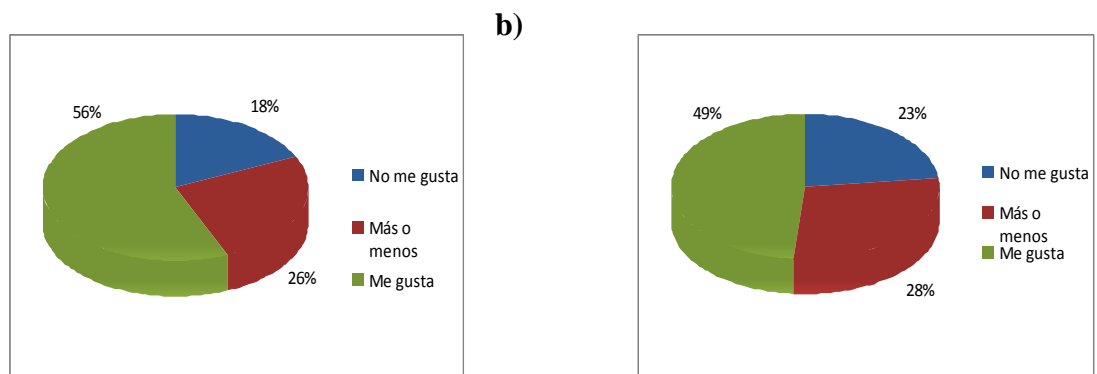


Figura 2: Aceptabilidad [%] obtenida para las barras alimenticias control (a) y saludable (b) mediante evaluación sensorial con escala hedónica facial de 3 puntos ($\chi^2 P > 0,05$).

INCORPORACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES CHILENOS EN MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES PARA EL ENVASADO ACTIVO DE ALIMENTOS

López de Dicastillo, Carol; Galotto, Maria José; Torres, Alejandra; Guarda, Abel

Laboratory of Food Packaging (LABEN)-Technology Faculty - CEDENNA (Center for the Development of Nanoscience and Nanotechnology) - University of Santiago de Chile (USACH) - Chile E-mail: analopez.dediscstillo@usach.cl

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están desarrollando nuevas tecnologías para la conservación de alimentos atendiendo a la mayor demanda de los consumidores hacia alimentos menos procesados y con menor contenido de aditivos químicos. Con esa intención surgen los envases activos. En los últimos años, los materiales activos antioxidantes y/o antimicrobianos han cobrado gran importancia, donde un compuesto antioxidante y/o antimicrobiano se incorpora al material de envase para su posterior liberación al alimento ofreciendo protección hacia reacciones de oxidación y ataque microbiano, alargando su vida útil.

Además, para mejorar el comportamiento y las propiedades de los envases, a los polímeros se les añade una gran variedad de aditivos, entre los que son habituales antioxidantes sintéticos, que se incorporan en diferentes concentraciones para reducir la degradación durante el procesado. Debido a su posible toxicidad que puede derivarse de su migración al alimento, existe también un gran interés en la sustitución de estas sustancias sintéticas por compuestos antioxidantes naturales (Caner et al., 2005). La incorporación de estos compuestos naturales puede tener una doble función, además de proteger al plástico, que su migración al producto envasado pueda producir un efecto antioxidante en el alimento (Balasundram et al., 2006).

Los principios del envase activo y el tipo de procesado para su obtención se basan en las propiedades intrínsecas del propio polímero empleado como material de envase y en las características de las sustancias que se incorporarán dentro del polímero (Catalá y Gavara).

Por otro lado, existe también un gran interés en el desarrollo de nuevos materiales que sean ecológicamente “amigables”, ya sea por el uso de materias primas renovables o disminuyan la acumulación de desechos por medio de la biodegradación. En ese sentido, los biopolímeros son una interesante alternativa a los polímeros convencionales (Tokiwa y Calabria, 2006).

Por todo lo descrito anteriormente, en este trabajo presentamos el estudio y desarrollo de formulaciones para un futuro sistema de envasado activo para el control de la oxidación de alimentos, basado en la incorporación en matrices biodegradables, poli (ácido láctico) (PLA) y acetato de celulosa (AC), de sustancias antioxidantes naturales procedentes de dos compuestos autóctonos chilenos, EXTRACTO A y EXTRACTO B.

Un estudio previo sobre la capacidad antioxidante de dichos extractos se llevó a cabo a partir del análisis del contenido polifenólico y se caracterizó la actividad antioxidante de sus extractos metanólicos y acuosos a partir de los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Posteriormente, en función de su estabilidad térmica, ambos extractos se incorporaron a las matrices biodegradables por extrusión y por la técnica de disolución-evaporación, o más conocida como “casting”, para el posterior desarrollo de un envase activo con propiedades antimicrobianas y antioxidantes destinado a extender la vida útil y la calidad de los alimentos. La actividad antioxidante de los materiales desarrollados se midió a partir de la actividad secuestradora de los radicales DPPH· y ABTS⁺.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos naturales.

Se realizaron extracciones metanólicas y acuosas de ambos compuestos naturales a 40 °C durante 3 horas. Dichos extractos fueron analizados a partir de los siguientes métodos:

Polifenoles totales: el contenido polifenólico se determinó colorimétricamente por el método de Folin-Ciocalteu (Rojas y Narváez, 2009). Los resultados fueron traducidos con curvas de calibración a gramos de ácido gálico (GAE).

Método DPPH: Método de Secuestro de Radicales Libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Este método, desarrollado por Okada y Okada (1998), se basa en la reducción de la absorbancia medida a 517 nm, longitud de onda a la que absorbe el radical estable DPPH·, por la acción del antioxidante. El radical DPPH· es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados que existen, que es de un intenso color morado. Se puede obtener comercialmente no como el ABTS⁺ que hay que generarlo “in situ”. La actividad antioxidante se mide como la reducción de esta absorbancia máxima, según la expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \% I = (A_{\text{MAX}} - A) / A_{\text{MAX}} * 100$$

Se realiza un calibrado de %Inhibición frente a concentración de Trolox para poder estandarizar los resultados y para expresar la actividad antioxidante.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): Mide la capacidad de un compuesto de reducir Fe³⁺ a Fe²⁺, cuyo complejo con el anión TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triacina) presenta una

coloración intensa azul a 595 nm. Esta reacción de reducción se produce por transferencia electrónica (Thaipong et al, 2006).

Método ABTS: El ensayo ABTS o TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) se basa en la capacidad de depuración de antioxidantes de larga vida con el ión $ABTS^{+}$ (ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolina-6-sulfónico). En este ensayo, el compuesto ABTS es oxidado por radicales peróxidos u otros oxidantes a su radical catiónico, el cual es intensamente coloreado, y la actividad antioxidante se mide como la capacidad de los compuestos de las muestras en reducir el color al reaccionar directamente con el radical $ABTS^{+}$ (Re et al, 1999).

Estudio de la estabilidad térmica de los compuestos naturales.

Este estudio es fundamental, ya que nos permitirá obtener información para conocer el tipo de procesado al que podemos someter los compuestos naturales seleccionados. Los compuestos naturales están compuestos por un elevado número de compuestos antioxidantes y antimicrobianos, flavonoides, antocianinas, ácidos orgánicos, etc, y muchos de ellos pierden su capacidad antioxidante con la temperatura.

Con la intención de simular las condiciones de extrusión de los polímeros, los compuestos naturales se exponen a 180 °C en una mufla durante 12 minutos. La capacidad antioxidante y el contenido polifenólico de los extractos se midieron antes y después de la simulación.

Preparación de los materiales activos

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de la estabilidad térmica de los compuestos naturales, se desarrollaron los materiales con EXTRACT A con acetato de celulosa como matriz polimérica por la técnica de extensión/evaporación (“casting”) para evitar la degradación térmica de sus principales compuestos activos, y debido a la mayor estabilidad térmica del EXTRACT B, se obtuvieron materiales con poli (ácido láctico) por extrusión.

Los materiales de acetato de celulosa, AC, se obtuvieron disolviendo 2.5 gr de AC en 50 ml de acetona con agitación constante durante 30 min. Una vez disuelto el polímero se adicionaron EXTRACT A al 5% y citrato de trietilo como agente plastificante, al 5 y 10% (respecto al polímero). La mezcla obtenida fue agitada durante 30 min para alcanzar una completa homogenización de los diferentes componentes. La mezcla final se vertió en una placa Petri de 19 cm de diámetro y se dejó secar en una estufa a 40 °C durante 4 horas.

Los materiales de PLA con EXTRACT B se obtuvieron por extrusión. Para ello, primero se realizó un mezclado físico entre el polímero y el EXTRACT B a dos concentraciones, al 3 y 5%. Posteriormente, el material homogéneo se extruyó en una extrusora de doble tornillo (Scientif LabTech modelo LTE20), con un perfil de temperaturas de 180-190 °C, una velocidad de tornillo de 50 rpm y la temperatura del cabezal a 175 °C. El material fundido se recibió en rodillos de enfriamiento Chill Roll LAbTech LBCR-150, obteniendo films con un espesor aproximado de 80 µm.

Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los materiales desarrollados (T_m , T_c , ΔH_m y ΔH_c) se midieron mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), en un equipo Mettler Toledo modelo DSC 822, previamente calibrado con indio ($T_m = 256$ °C). Aprox. 8 mg de cada muestra fue sometida a un tratamiento térmico dinámico consistente en 3 etapas en el rango de temperaturas entre 25 y 220 °C a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10 °C/min. Las entalpías de cristalización en frío y fusión se obtuvieron a partir de la integración del área de los picos exo y endotérmicos.

Capacidad antioxidante de los materiales

La actividad antioxidante también se midió sobre los materiales desarrollados. Para ello, se pusieron muestras de (1cm x 3cm), aproximadamente 0.03 gr de cada material activo en contacto con disoluciones de radicales libre DPPH· y ABTS⁺ con absorbancia igual a 1, y se midió la cinética de liberación de sus compuestos activos desde el polímero a la disolución acuosa y etanólica, a partir de la reducción de absorbancia a longitudes de onda de 517 nm y 734 nm, características para los radicales DPPH· y ABTS⁺, respectivamente.

La inhibición de estos radicales también se tradujo, a partir de una curva de calibración, a miligramos de Trolox por gramo de material.

RESULTADOS Y DISCUSION

Propiedades térmicas

Los valores de las propiedades térmicas se expresan en la Figura 1 y en la Tabla 1. Como puede observarse, la adición del extracto B a ambas concentraciones no implicó diferencias significativas en los valores de la temperatura de transición vítrea, de cristalización en frío ni fusión del PLA. Se observan, en cambio, un ligero aumento en la entalpía de fusión, seguramente debida al efecto nucleante de los compuestos activos del extracto natural B (López de Dicastillo, 2010).

Un hecho interesante presente en el termograma del PLA en la Figura 1, y no muy común en polímeros, es la aparición de un pico exotérmico aprox. a 113 °C correspondiente a la Tcc, el cual se debe a una disminución de la masa molecular de las cadenas poliméricas y por tanto de su longitud, producto de la degradación del material (MasPOCH, 2008).

Para los materiales con acetato de celulosa y extracto A no se observaron tampoco cambios significativos.

Capacidad antioxidante de los extractos y de los materiales desarrollados

Como se observa en las Figuras 2 y 3, las cinéticas de las actividades antioxidantes como secuestradores de radicales DPPH· y ABTS⁺ siguió perfiles parecidos para los diferentes materiales desarrollados. Desde el punto de vista cinético, la actividad antioxidante fue dependiente de la liberación de los componentes activos de los extractos en las disoluciones acuosa y etanólica de los radicales ABTS⁺ y DPPH·, respectivamente, que a su vez es dependiente de la difusión de estos compuestos a través de la matriz polimérica. A mayor afinidad de los componentes activos por la disolución, y a mayor grado de hinchamiento de la matriz polimérica, se observó mayor liberación, y por lo tanto mayor actividad antioxidante.

Como era de esperar, en el caso de los materiales con PLA y extracto B, a mayor concentración de extracto, se observó mayor liberación y por lo tanto mayor actividad secuestradora de ambos radicales.

A su vez, en el caso de los materiales con acetato de celulosa, debido a su naturaleza fue necesario adicionar citrato de etilo como plastificante. Se realizaron dos materiales a igual concentración de extracto A, pero a dos distintas concentraciones de plastificante para estudiar el efecto de ésta sobre la liberación y actividad antioxidante. Como ya se observó en trabajos anteriores, la liberación de los componentes activos del extracto A y por tanto, su actividad secuestradora de los radicales ABTS⁺ y DPPH· aumenta con la concentración de plastificante, ya que éste permite una mayor movilidad de las cadenas del polímero, permitiendo una mayor liberación (Castro et al., 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados revelaron un alto contenido polifenólico para ambos extractos, aunque con un mayor contenido en el caso del EXTRACTO A, debido principalmente a su elevado contenido en antocianinas. Sin embargo, los estudios de estabilidad térmica revelaron que el EXTRACTO A era muy sensible a temperaturas altas, por lo que no era indicado para el

procesado de polímeros por extrusión. El extracto B, inesperadamente, resultó interesante debido a su elevada estabilidad térmica. En función de ésta, se obtuvieron materiales plásticos activos a partir de extrusión y casting, siendo dichos materiales posteriormente caracterizados en función de sus propiedades térmicas y antioxidantes. Los estudios revelaron que variando la matriz polimérica, la concentración de extracto incorporado, y la concentración de plastificante, podemos alcanzar diferentes niveles de actividad secuestradora de radicales libres.

BIBLIOGRAFÍA

- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Caner, C., Harte, B. (2005). *Journal of the science of food and agriculture*, 85, 39-46.
- Castro, M., López de Dicastillo, C., Vilariño, J. M., Gonzalez, V. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Aceptado recientemente.
- Catalá, R., Gavara R. *Arbor CLXVIII N° 661*, 109-127.
- López de Dicastillo, C., Alonso, J. M., Catala, R., Gavara, R., Hernandez-Muños, P. (2010). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10958-10964.
- Maspoch, M. L., Nascimento, L., Gamez-Perez, J., Santana, O. (2008). *Anuales de Mecanica de La fractura* 1, 263-268.
- Okada, Y., Okada, M. (1998). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 401-406.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). *Free Radical Biology Medicine*, 26, 1231.
- Rojas, D., Narváez, C. E. (2009). *Quim. Nova*, 32 (9), 2336-2340.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006). *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 669–675
- Tokiwa, Y. B., Calabria, T. (2009) *International Journal of Molecular Science* 10, 3722-3742.

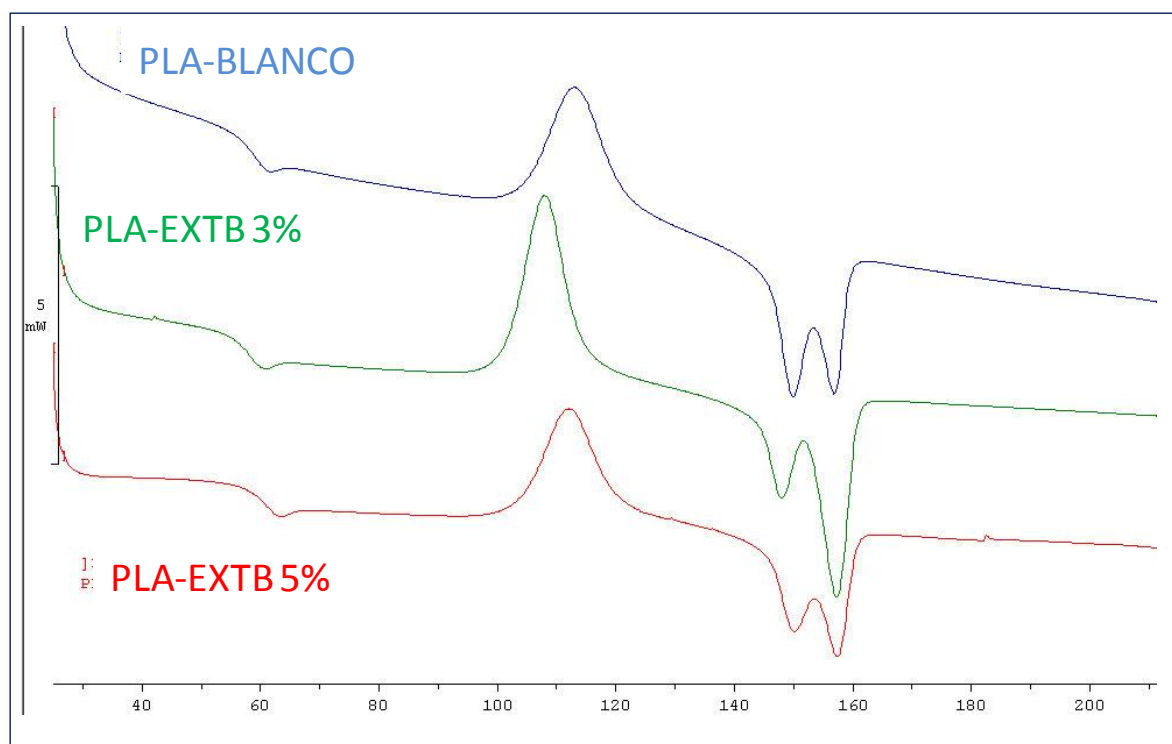


Figura 1. Termograma del segundo calentamiento de los materiales de PLA con el extracto natural B incorporado al 3 y 5%.

Tabla 1. Propiedades térmicas del segundo calentamiento de los materiales de PLA con extracto B.

Sample	Tg	Tff	ΔH_{ff}	Tf	ΔH_f
PLA_BLN	57.82 ± 0.11 a	113.10 ± 0.01 a	27.59 ± 0.01 a	26.79 ± 0.45 a	149.69 ± 0.23 a
PLA_EXTB3%	58.34 ± 1.71 a	110.42 ± 3.42 a	30.49 ± 1.10 a	28.98 ± 0.45 a	157.23 ± 0.29 b
PLA_EXTB5%	58.75 ± 0.41 a	110.93 ± 1.51 a	26.56 ± 2.06 a	26.31 ± 1.73 a	157.37 ± 0.33 b

Tabla 2. Valores de actividad antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos de los compuestos naturales A y B medida a partir de varios métodos.

Metodo AA	Compuesto A		Compuesto B	
	MeOH	H ₂ O	MeOH	H ₂ O
DPPH (gr. Trolox / gr.ext)	0.124 ± 0.005	0.107 ± 0.010	0.0085 ± 0.0011	0.0103 ± 0.0004
ABTS (gr. Trolox / gr.ext)	0.0534 ± 0.0080	-	0.0073 ± 0.0050	-
Polifenoles Totales (gr. Galico/ gr. ext)	0.057 ± 0.001	0.034 ± 0.001	0.0112 ± 0.001	0.012 ± 0.003
FRAP (gr. Trolox / gr.ext)	0.0751 ± 0.0015	0.0506 ± 0.0041	0.0144 ± 0.0001	0.0154 ± 0.0003

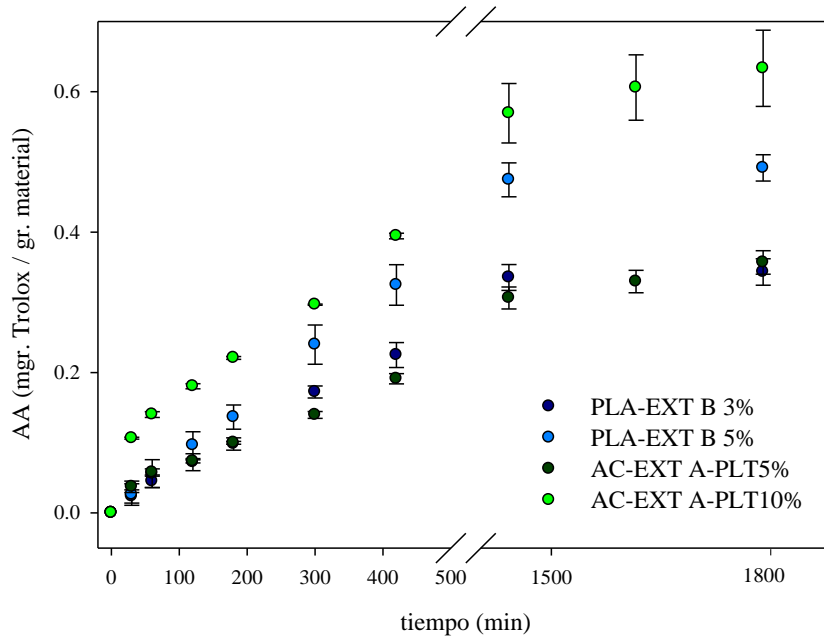


Figura 2. Cinética de actividad secuestradora de radicales DPPH· de materiales desarrollados.

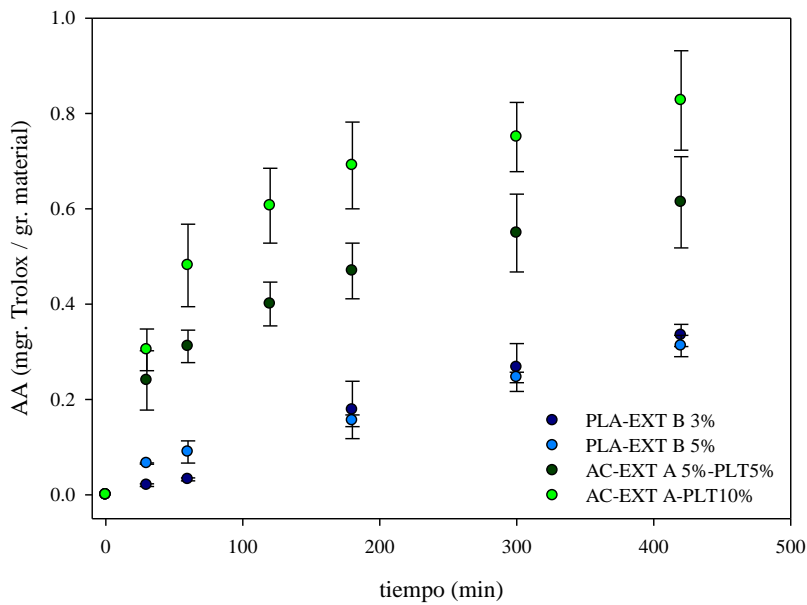


Figura 3. Cinética de actividad secuestradora de radicales ABTS+· de materiales desarrollados.

HARINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* W.) Y SU INFLUENCIA SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS Y FÍSICOQUÍMICAS EN PANETÓN

Beatriz Valcárcel Yamani, Suzana Caetano Da Silva Lannes,

Departamento de Tecnología Bioquímico-Farmacéutica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Sao Paulo, Av.Prof.Lineu Prestes, 580 - Bloco 16, CEP 0550890, Sao Paulo-SP/Brasil – scslan@usp.br, betty.valcarcel@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una mayor demanda de los consumidores por productos diferenciados con calidad y relevantes aspectos nutricionales. La quinua (*Chenopodium quinoa* W.), un pseudocereal autóctono de la región Andina, es un cultivo de alto valor nutritivo y resistente en ambientes adversos. El contenido de proteína de la quinua es elevado manteniendo una composición equilibrada de aminoácidos (KOZIOL, 1992). El uso de la quinua como ingrediente alternativo que podría mejorar el valor nutritivo, sin producir cambios en las propiedades específicas tales como la textura, el volumen, o sabor, ha sido objeto de investigación entre algunos autores (CALDERELLI et al., 2010; PARK y MORITA, 2005; ROSELL et al., 2009).

El panetón es un alimento tradicional procedente de Milán, preparado para el tiempo de Navidad y Año Nuevo en Italia. A pesar de su origen geográfico hoy este producto tiene una difusión nacional e internacional abarcando países de América Latina. Este pan hecho de masa dulce puede ser elaborado con ingredientes opcionales, tales como rellenos de frutas como el albaricoque, almendras, naranja, limón, higo, manzana, sidra, pasas, frutas confitadas, chocolate, entre otros (BENEJAN, STEFFOLANI, LEON, 2009).

Durante la producción del panetón, los principales desafíos son tanto la producción de una masa capaz de mantener la fruta y pasas de uva durante la fermentación y el horneado, como la obtención de un producto que mantenga su calidad durante el almacenamiento (BENEJAN, STEFFOLANI, LEON, 2009).

Debido a sus características nutricionales, la quinua presenta posibilidades de uso en la fabricación de diversos alimentos tales como productos de panadería, siendo una buena alternativa el desenvolvimiento de panetones enriquecidos con harina de quinua.

En este estudio se analiza la textura y el volumen en panetón producido con sustitución parcial de la harina de trigo con harina de quinua en porcentajes de 20 y 30%.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de quinua (en porcentajes de 20 y 30%) sobre algunas propiedades físicas como textura y volumen en muestras de panetón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ingredientes

Harina para panetón Propan 75 (Bunge), gluten (PluryQuímica), levadura (Fermipan), manteca Propan 00 LT (Bunge), margarina sin sal Probisc 80 LT (Bunge), leche en polvo integral (Itambé), gema e clara deshidratadas (Cooperovos), sal (Cisne), azúcar (União), emulsificantes Grindamyl Max-life 25 (Danisco), Dimodan PH 300-A (Danisco) y Panodan 20 (Danisco), esencias para panetón (Grasse), colorantes y harina de quinua (*Chenopodium quinoa* W.).

La distribución de los ingredientes para cada formulación es descrita en la Figura 1. La formulación conteniendo 100% de harina de trigo fue considerada como control. Las masas se prepararon en un mezclador espiral (15 kg) Ferri (Camargo e Gomiero - Brasil).

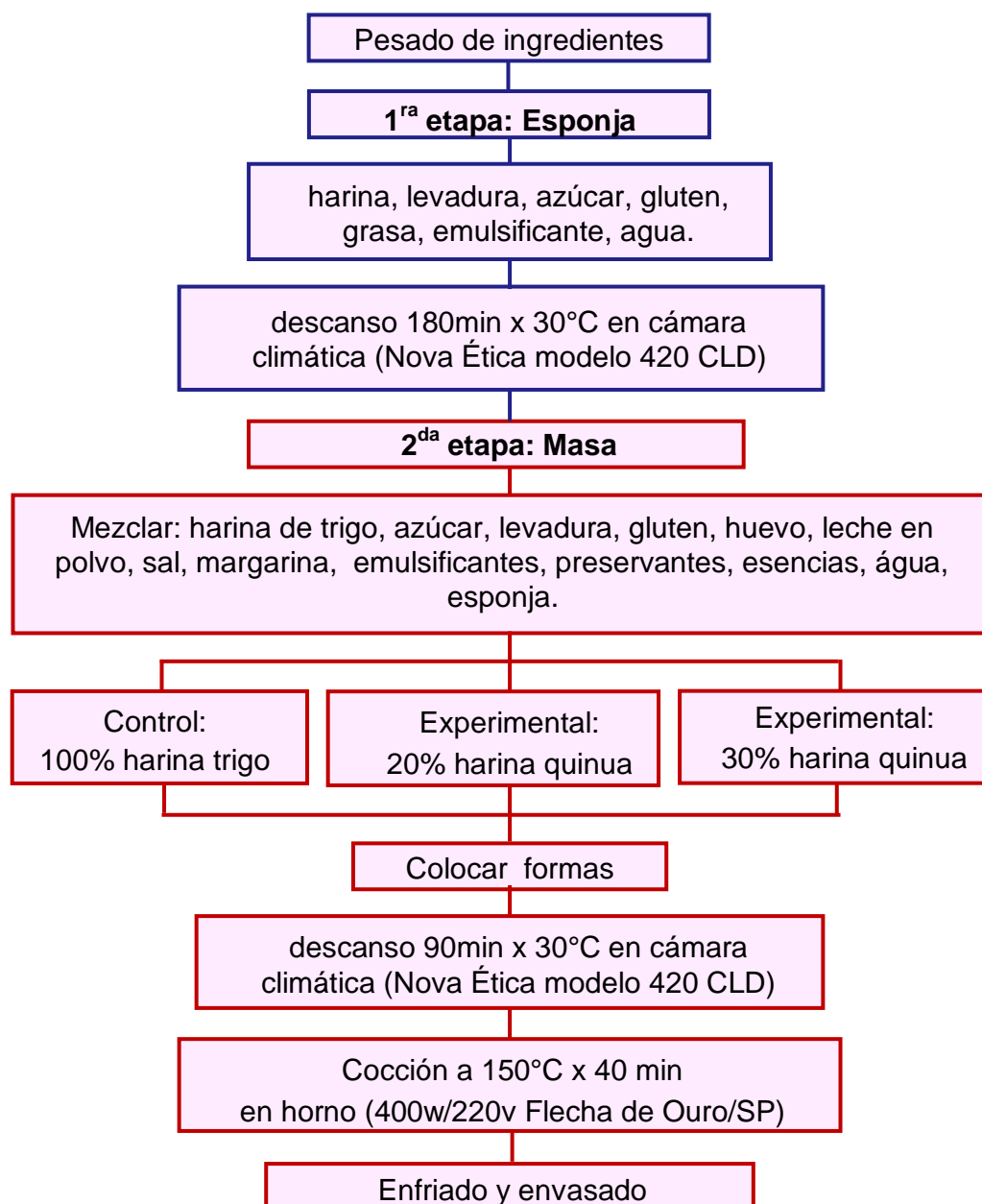


Figura1. Diagrama de elaboración de las muestras de panetón.

Las muestras fueron elaboradas en el Laboratorio de Física Industrial II y planta piloto de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas - Universidad de Sao Paulo. Las masas fueron preparadas sin adición de fruta confitada o uva pasa.

Los parámetros de análisis del perfil de textura (TPA) fueron determinados utilizando un texturómetro TA-XT2 (Stable Microsystems Ltd, UK) provisto de placa de compresión P/75 (75 mm), con dupla velocidad de compresión de 2,0 mm/s, distancia de 40%, fuerza de 100g y tempo de 5s. Los parámetros de textura cuantificados fueron: dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad, y resiliencia.

El volumen se midió utilizando el método de desplazamiento descrito por Nishita, Roberts y Bean (1976).

El contenido de humedad fue determinado a través del método 44-15A de la AACCC (1995).

Todos los análisis fueron realizados en quintuplicata y evaluados utilizando el software Statistica 7.1 (StatSoft Inc., OK, EUA). Los resultados fueron expresos en valores medios \pm desviación estándar (SD). Fue aplicado el test de Hartley a fin de verificar la homogeneidad de las varianzas, y a continuación, las pruebas ANOVA *post hoc* unifactorial y test de Tukey para identificar contrastes entre las muestras con un intervalo de confianza del 95%. Los coeficientes de correlación de Pearson (r) también se calcularon para determinar las correlaciones entre los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis del perfil de textura (TPA) en la miga de las muestras de panetón (Tabla 1 y Figura 2) mostraron un aumento significativa ($p < 0,05$) de la dureza de las muestras cuando comparadas con la muestra control. Este incremento fue observado especialmente en la muestra enriquecida con 30% de harina de quinua, probablemente como resultado de la deficiencia en la extensibilidad de la red de gluten (ROSELL et al., 2009).

Tabla 1. Propiedades de textura en muestras de panetón enriquecidas con harina de quinua*

Muestra	Dureza	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad	Resiliencia
Control	2.80 \pm 0.60 ^b	0.79 \pm 0.03 ^b	0.51 \pm 0.02 ^b	1.46 \pm 0.25 ^a	0.15 \pm 0.01 ^b
Quinua (20%)	3.03 \pm 0.30 ^b	0.85 \pm 0.01 ^a	0.54 \pm 0.03 ^a	1.30 \pm 0.23 ^a	0.18 \pm 0.02 ^a
Quinua (30%)	3.61 \pm 0.74 ^a	0.81 \pm 0.14 ^a	0.56 \pm 0.05 ^a	1.59 \pm 0.31 ^a	0.20 \pm 0.02 ^a

*Media de cinco mediciones \pm SD.

**Valores seguidos de letras diferentes, en la misma columna, indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las muestras.

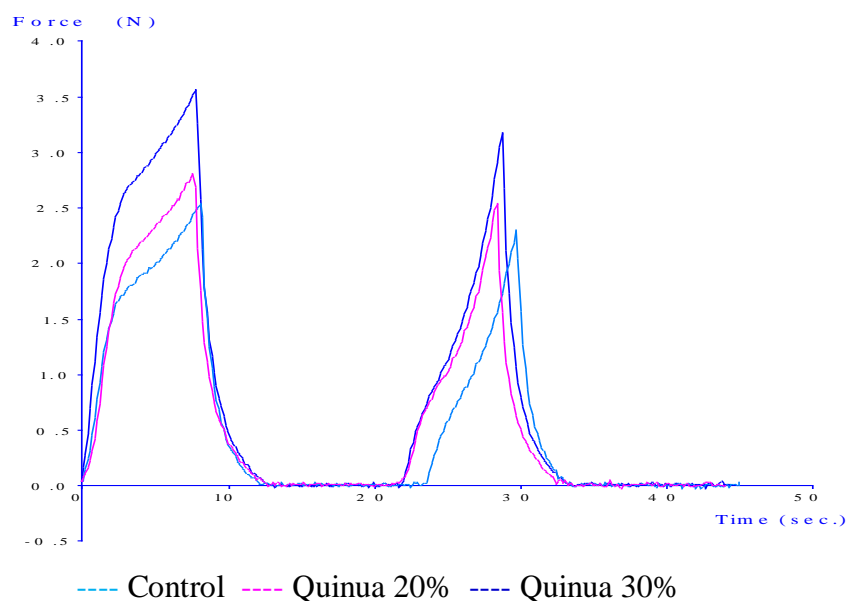


Figura 2. Propiedades de textura en muestras de panetón enriquecidas con harina de quinua.

Ambas formulaciones mostraron elevados valores de elasticidad, cohesividad y capacidad de recuperación en comparación con la muestra control. La adición de 20% y 30% de harina de quinua no afectó significativamente ($p > 0,05$) la masticabilidad en relación a la muestra control. Sin embargo, el análisis de correlación de Pearson indicó una correlación positiva en el aumento de la dureza, resultante de la adición de harina de quinua, con la masticabilidad a pesar de que el valor de $r = 0.943$ no fue significativo ($p = 0,218$) (Figura 3A) (ROSELL et al., 2009).

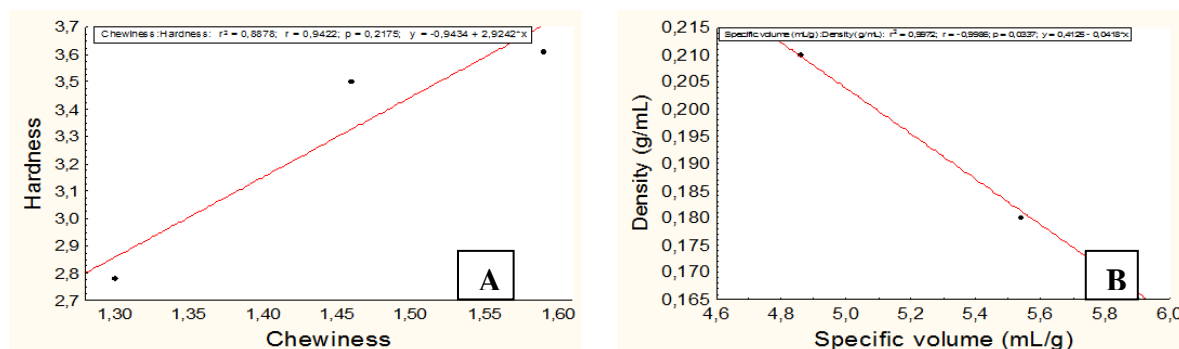


Figura 3. A) Análisis de correlación entre dureza (*hardness*) y masticabilidad (*chewiness*) en muestras de panetón enriquecidas con harina de quinua. B). Análisis de correlación entre volumen (*specific volume*) y densidad (*density*) en muestras de panetón enriquecidas con harina de quinua.

En relación al volumen (Tabla 2), los resultados mostraron que la adición de 20% y 30% de harina de quinua afectaron significativamente ($p < 0,05$) el volumen de las muestras, las mismas que presentaron una disminución del volumen con un consecuente aumento de la

densidad en relación a la muestra control. En ese sentido, el análisis de correlación de Pearson indicó una correlación negativa significativa ($p = 0,03$) con valor de $r = 0.997$. Estos resultados indican una disminución en el volumen específico cuando se incrementa el porcentaje de harina de quinua, lo que resulta en muestras más compactas y con estructuras que presentan mayor dureza (Figura 3B). Por otro lado, esta adición no afectó significativamente la humedad.

Tabla 2. Volumen específico, densidad y humedad de las muestras de panetón enriquecidas con harina de quinua*

Muestra	Volumen específico (mL/g)	Densidad (g/mL)	Humedad (%)
Control	5.82±5.47 ^a	0.17±0.02 ^a	27,27±1,75 ^a
Quinua (20%)	5.54±3.75 ^{ab}	0.18±0.01 ^a	28,24±0,59 ^a
Quinua (30%)	4.86±4.02 ^b	0.21±0.03 ^a	28,67±1,31 ^a

*Media de cinco mediciones ± SD.

**Valores seguidos de letras diferentes en la misma columna representan una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las muestras.

Una disminución en el volumen de la muestra se asocia principalmente a una reducción en el contenido de gluten, lo que conduce a la pérdida de elasticidad de la masa resultando en productos menos aireados (Figura 4). En la estructura de la miga también fue observado un mayor número de orificios redondeados con diámetros menores en comparación con la muestra control con orificios mayores y más largos.

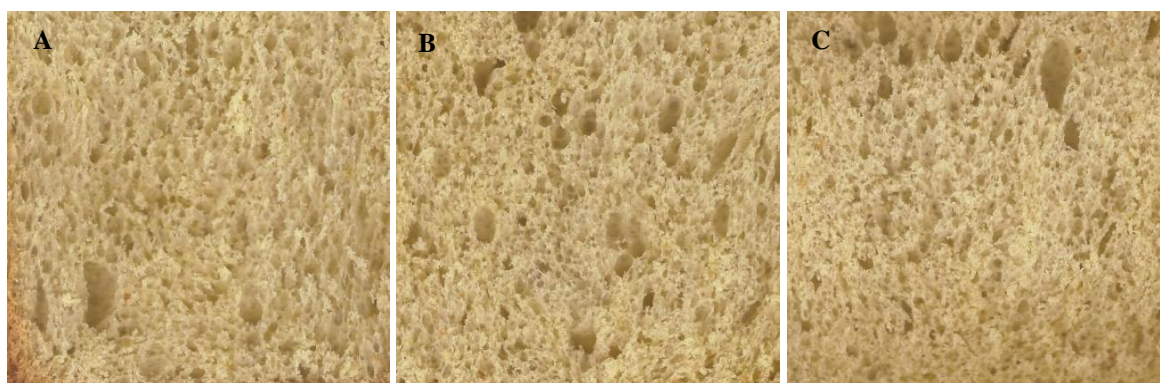


Figura 4. Imagen de la estructura de la miga en muestras de panetón: A) Control), B) 20% de adición de harina de quinua y C) 30% de adición de harina de quinua.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la adición de harina de quinua (20 y 30%) influyó en todos los parámetros de textura, conduciendo a la producción de migas más duras cuando comparadas a la muestra control, y a un aumento de la elasticidad, cohesividad y resistencia. También fue observada una disminución en el volumen de las muestras indicando que un aumento en los porcentajes de adición de harina de quinua podría ser desfavorable para el volumen de las muestras de panetón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association Of Cereal Chemists. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 9ed. St. Paul: AACC, 1995, p.1200.

Benejam, W.; Steffolani, M.E.; León, A.E. Use of enzyme to improve the technological quality of a panettone. *International Journal of Food Science and Technology*, v.44, p.2431-2437, 2009.

Calderelli, V.A.S.; Benassi, M.T.; Visentainer, J.V.; Matioli, G. Quinoa and flaxseed: Potential ingredients in the production of bread with functional quality. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.53, n.4, p.981-986, 2010.

Hallén, E.; Ibanoglu, Ş.; Ainsworth, P. Effect of fermented/germinated cowpea flour addition on the rheological and baking properties of wheat flour. *Journal of Food Engineering*, v.63, p.177-184, 2004.

Koziol, M. J. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and analysis*, San Diego, v.5, n.1, p.35-68, 1992.

Nishita, K.D.; Roberts, R.L.; Bean, M.M. Development of a yeast-leavened rice –based formula. *Cereal Chemistry*, v.53(5), p.626-634, 1976.

Park, S.H.; Morita, N. Dough and breadmaking properties of wheat flour substituted by 10% with germinated quinoa flour. *Food Science and Technology International*. v. 11, n.6, p.471-476, 2005.

Rosell, C.M.; Cortez, G.; Repo-Carrasco, R. Breadmaking use of the anean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*), kiwicha (*Amaranthus caudatus*), and tarwi (*Lupinus mutabilis*). *Cereal Chemistry*, v.86, n.4, p.386-392, 2009.

CHOCOLATE COM BENEFÍCIOS NUTRICIONAIS COMPLEMENTARES: AVALIAÇÃO DE FLUXO

Vanessa Matsumura, Orquídea Vasconcelos dos Santos, Suzana Caetano da Silva Lannes

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 16, CEP 05508000, Sao Paulo-SP/Brasil –scslan@usp.br

INTRODUÇÃO

O chocolate, um produto derivado do cacau, é consumido desde as civilizações mais antigas, sendo que já foi considerado uma bebida sagrada pelos maias e astecas, que a utilizavam em rituais e cerimônias.^{1,2} O chocolate consiste em uma dispersão sólida de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*), além de partículas de açúcar, aditivos, lecitina (emulsificante) e aromatizantes, devendo conter no mínimo 25% de sólidos totais de cacau, segundo a legislação brasileira.³

A árvore de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), também conhecida como castanha-do-pará é uma oleaginosa encontrada principalmente na Amazônia, e de grande importância para o agronegócio brasileiro. Suas sementes são conhecidas por seu alto conteúdo de lipídeos, sendo que o óleo extraído é foco de interesses acadêmicos e industriais; no entanto, os processos de extração desse óleo geram subprodutos, dentre eles a farinha de castanha-do-brasil, de alto conteúdo proteico. A possibilidade de incorporação da farinha na formulação de chocolates com maior teor proteico permite um maior aproveitamento econômico da castanha-do-pará, além do desenvolvimento de um alimento com propriedades funcionais.⁴

Os alimentos produzidos devem seguir as normas e padrões vigentes para, dessa forma, garantir a qualidade do produto final e a saúde do consumidor. Para a produção de bombons com características funcionais, além de outros produtos alimentícios, é de grande importância que seja realizada a avaliação físico-química e microbiológica, atendendo aos padrões de qualidade exigidos pela legislação.⁶ A determinação da reologia dos chocolates também é fundamental em todo processo de fabricação de produtos de chocolate, sendo importante para o controle de qualidade do produto e para produção industrial, visando à obtenção de produtos de alta qualidade e de textura bem definida. No caso de produtos de chocolate, a reologia é geralmente determinada por dois parâmetros: viscosidade aparente e tensão de escoamento (*yield stress*).⁸

O objetivo deste trabalho é o preparo de chocolates com maior teor proteico, utilizando-se a farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil, e a determinação das suas propriedades físico-químicas e reológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Confecção dos bombons de 0, 5, 10 e 20% com Castanha-do-Brasil: Foi utilizado chocolate meio amargo Nestlé (Brasil) e farinha parcialmente desengordurada de Castanha-do-Brasil (FCF/USP, Brasil). Para temperagem dos chocolates foi utilizado temperadeira TemperChoco, UNIVERSAL (Brasil). Após a temperagem, foram realizadas adições de 0, 5, 10 e 20% de Castanha-do-Brasil para a confecção dos bombons.

Caracterização física da farinha parcialmente desengordurada de Castanha-do-Brasil; e dos bombons com 0, 5, 10 e 20% de Castanha-do-Brasil:

Granulometria: Para a determinação granulométrica da farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil foi realizada a metodologia do Instituto Adolfo Lutz⁷, utilizando-se de um conjunto de peneiras da série Granutest® (Brasil) com um agitador de peneiras 0701 tipo magnético.

Caracterização física e físico-química do extrato parcialmente desengordurado de Castanha-do-Brasil; e dos bombons com 0, 5, 10 e 20% de Castanha-do-Brasil:

Umidade: tanto para a farinha de Castanha-do-Brasil quanto para os chocolates, pesou-se 2,0g de amostra (em triplicata), em estufa a 105° C por um dia. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e pesadas. O teor de umidade foi calculado segundo a **equação 1**.⁷

$$Umidade (\%) = \frac{100xN}{P}$$

Cinzas: Foram pesadas 5,0g de amostra (triplicata), após mufla a 550°C. Os cadinhos foram resfriados e pesados. O teor de cinzas foi calculado segundo a **equação 2**.⁷

$$Cinzas (\%) = \frac{100xN}{P}$$

Proteína: No caso da farinha, foram pesadas 300,0 mg de amostra (em triplicata) em tubos de micro Kjeldahl. A % de nitrogênio total e a % de proteínas foram calculadas segundo as **equações 3 e 4**, respectivamente. O fator de conversão usado foi de **5,46**.

$$Nitrogênio Total (\%) = \frac{VxNxfx0,014x100}{m}$$

$$Proteínas (\%) = \%Nitrogênio Total x F$$

No caso dos chocolates, foram pesadas 200,0 mg de amostra (em triplicata). O procedimento foi o mesmo da análise da farinha, e os cálculos foram realizados segundo as **equações 3 e 4**. O fator de conversão usado para os cálculos foi de **6,25** (para outros alimentos).

Lipídeos: Para a Castanha-do-Brasil, pesou-se 5g (em triplicata). Após aproximadamente 4 horas de extração, o solvente foi evaporado e os balões foram colocados em estufa a 70°C por uma hora, e pesados. O cálculo do teor de lipídeos foi realizado a partir da **equação 5**.⁷

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{ML}{P} \times 100$$

Para os chocolates, procedeu-se a uma hidrólise prévia, no qual 5,0g de amostra (em triplicata). A extração foi realizada do mesmo modo da farinha e para o cálculo do teor de lipídeos utilizou-se a **equação 5**.¹⁰

Análise reológica dos bombons com 0, 5, 10 e 20% de Castanha-do-Brasil:

Foi utilizado o equipamento Modular Advanced Rheometer System, HAAKE MARS® (*Thermo Electron Corporation*, Alemanha); e as determinações foram realizadas à temperatura de 40°C, com um sensor cone placa (C35/1 Ti polido) (amostra do chocolate) e um placa-placa PP20 Ti D=20mm (amostras com 5, 10 e 20%), ensaio rotacional com taxa controlada (CR), em três passos: (1) 0,00 1/s a 65,00 1/s, t = 180 s; (2) 65,00 1/s, t = 60 s; (3) 65,00 1/s a 0,00 1/s, t = 180 s. As análises foram realizadas em triplicata.¹⁰

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização física e físico-química da farinha parcialmente desengordurada de Castanha-do-Brasil:

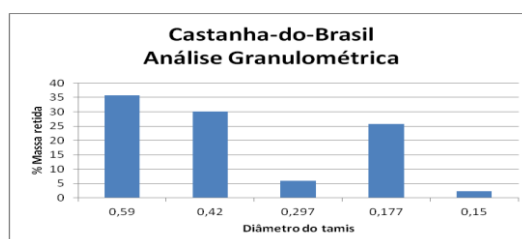


Figura 1. Distribuição da porcentagem da massa de Castanha-do-Brasil acumulada por abertura do tamis.

Tabela 1. Cálculo do teor de umidade da farinha de Castanha-do-Brasil.

Farinha de Castanha do Brasil	%Protídios	%Lipídeos	%Cinzas	% Umidade
Média±desvio padrão (n:3)	32,39±0,38	30,22±0,04	8,76±0,08	5,32±0,13

Caracterização físico-química dos bombons com 0, 5, 10 e 20% de Castanha-do-Brasil:

Tabela 2. Valores de umidade das amostras de bombons.

Amostra	% umidade(média±desvio padrão)
Sem castanha	1,86±0,22
5%	2,11±0,46
10%	1,87±0,39
20%	1,70±0,16

Tabela 3. Valores do teor de cinzas das amostras de bombons.

Amostra	% cinzas(média±desvio padrão)
Sem castanha	1,30±0,06
5%	1,59±0,10
10%	1,88±0,04
20%	2,14±0,02

Tabela 4. Valores do teor de lipídeos das amostras de bombons.

Amostra	% lipídeos(média±desvio padrão)
Sem castanha	32,86±0,22
5%	30,70±1,51
10%	31,16±0,19
20%	30,56±0,90

Tabela 5. Valores do teor de proteína das amostras de bombons.

Amostra	% proteínas(média±desvio padrão)
Sem castanha	5,41±0,01
5%	6,93±0,04
10%	8,41±0,33
20%	9,92±0,24

Análise reológica dos bombons com 0, 5, 10 e 20% de Castanha-do-Brasil: Os resultados das análises são descritos a seguir.

Tabela 6. Valores de tensão de cisalhamento e viscosidade das amostras de bombons.

Amostra	Tensão inicial (Pa)	Viscosidade (Pa.s)
Chocolate amargo	16,58± 3,91	1,88± 0,06
Chocolate amargo + 5%	12,11±1,74	1,97±0,14
Chocolate amargo + 10%	16,9±2,99	3,69±0,06
Chocolate amargo + 20%	35,35±11,8	2,07±0,59

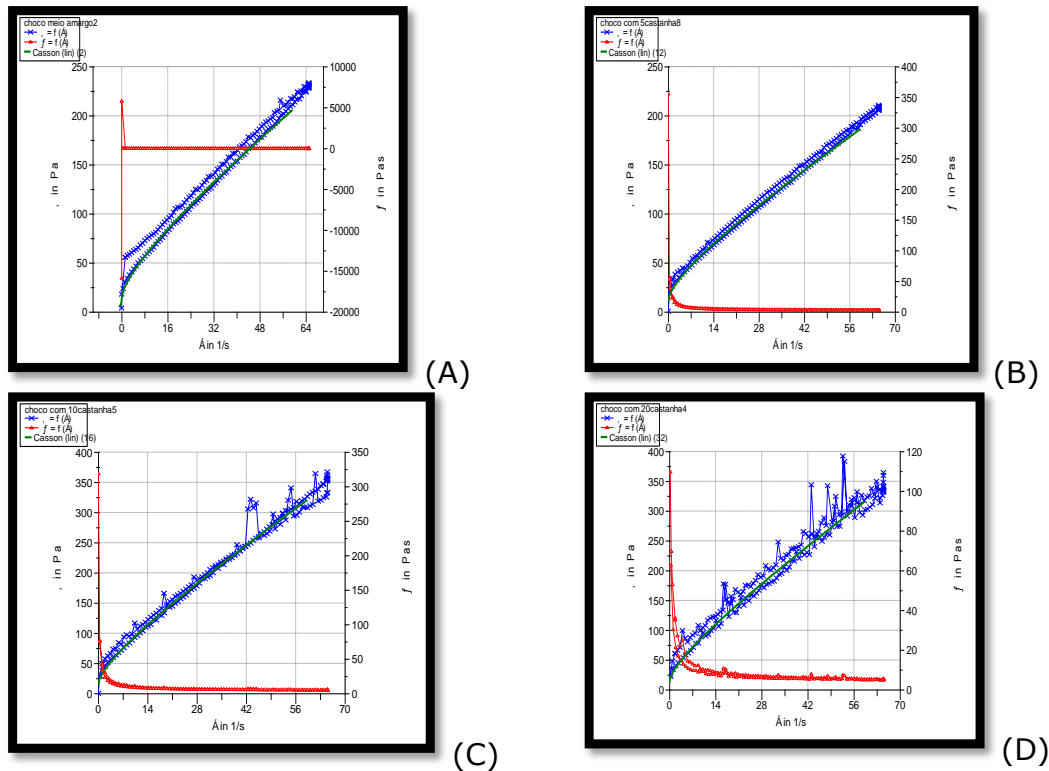


Figura 2. Curvas de fluxo da tensão (Pa) versus taxa de cisalhamento (s^{-1}) do chocolate amargo (A), chocolate amargo + 5% farinha de castanha do Brasil (B), chocolate amargo + 10% farinha de castanha do Brasil (C), chocolate amargo + 20% farinha de castanha do Brasil (D)

A farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil apresenta uma granulometria fina. Observa-se, porém, uma variedade no tamanho dos grânulos devido às variações nas porcentagens de massa retida nas peneiras. A maior porcentagem de farinha (35,73%) ficou retida no tamis de abertura 0,590 mm possivelmente devido à formação de aglomerados dos grânulos. A farinha apresenta um alto teor proteico, de 32,39%, quando comparada a outras farinhas, como a de mandioca (0,85 a 2,58%) e inhame (cerca de 4,75%), podendo ser uma importante fonte proteica para produção de alimentos funcionais. O valor de umidade de 5,32% está de acordo com a legislação brasileira tomando como base a farinha de mandioca, a qual é estabelecida um valor máximo de 13%. Com relação ao teor de cinzas, o valor de 8,76% está acima do permitido pela legislação brasileira referente à farinha de mandioca, cujo máximo permitido é de 1,5%, esse alto valor pode ser decorrente da maior presença de macro e micronutrientes. Portanto, os resultados obtidos das análises físico-químicas da farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil são compatíveis com os resultados obtidos por Vasconcelos⁴.

Os bombons com 0, 5, 10 e 20% de castanha-do-brasil apresentaram teores de umidade de 1,86; 2,11; 1,87; e 1,70%, respectivamente, encontrando-se dentro do limite

máximo permitido para chocolates de acordo com a legislação brasileira, de 3,0%. Com relação ao teor de cinzas ou resíduo mineral fixo, os bombons apresentaram valores de 1,30; 1,59; 1,88; e 2,14%, respectivamente, concluindo-se que quanto maior o teor de castanha adicionado ao chocolate, maior é o teor de cinzas. Isso pode ser explicado pelo alto teor de cinzas apresentado pela farinha de castanha-do-brasil. Todos apresentaram teor de cinzas dentro do limite estipulado pela legislação brasileira de 2,5%³. Com relação ao teor proteico, os valores obtidos foram de 5,41; 6,93; 8,41; e 9,92%, respectivamente. Portanto, com o aumento do teor de castanha nos bombons, há um aumento do teor proteico, o que já era esperado, uma vez que a farinha tem um alto conteúdo proteico. Com relação ao teor de lipídeos, os bombons apresentaram valores de 32,86%; 30,70%; 31,16%; e 30,56%, respectivamente, o que está de acordo com a legislação brasileira que determina um limite mínimo de 25,0% para chocolates. Não é observada relação entre o aumento do teor de castanha e o conteúdo de lipídeos.

Os chocolates são fluidos considerados do tipo plásticos de Bingham, ou seja, são newtonianos com uma tensão de cisalhamento inicial maior que zero, uma vez que necessitam de uma tensão inicial para começarem a escoar e, então, exibem uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação.¹¹ Esse comportamento pode ser observado na **figura 2**, que exibem um comportamento relativamente linear e uma tensão de cisalhamento inicial maior que zero. Observa-se um alto grau de variação na relação entre tensão e taxa de cisalhamento, o que pode ser explicado devido ao maior teor de castanha-do-brasil, que produz aglomerados de partículas, tornando o produto heterogêneo e produzindo variações no seu comportamento. De acordo com os resultados obtidos, observa-se em geral um relativo aumento nos valores de tensão de cisalhamento inicial com o aumento do teor de castanha-do-brasil (16,58; 12,11; 16,9; 35,35 Pa, para 0, 5, 10 e 20% de castanha-do-brasil, respectivamente), o que pode ser explicado pela maior presença de sólidos granulares, gerando maior resistência à deformação. Com relação à viscosidade, uma medida de resistência interna de uma substância ao fluxo quando submetida a uma tensão, observa-se relativamente um aumento de viscosidade com o aumento do teor de castanha (1,88; 1,97, 3,69; 2,07 Pa.s para 0, 5, 10 e 20% de castanha-do-brasil, respectivamente), o que pode ser explicado pelo fato de que com o aumento dos sólidos granulares ocorre um aumento da resistência ao escoamento. No entanto, foi observado um grande grau de variação nos valores obtidos para tensão inicial e viscosidade, isso pode ser explicado devido ao fato da adição de farinha de castanha-do-brasil proporcionar um produto heterogêneo e particulado, portanto,

maior é a dificuldade de se obter amostras homogêneas, tornando-se necessária a determinação de um grande número de réplicas para se obter valores mais representativos. Portanto, os bombons produzidos com o extrato desengordurado de farinha de castanha-do-brasil, apresentaram bons aspectos físico-químicos, encontrando-se em geral dentro dos valores determinados pela legislação brasileira. Já com relação à reologia do produto, seriam necessárias novas determinações aumentando-se o número de réplicas para que se confirme o comportamento reológico observado neste projeto.

CONCLUSÕES

O elevado teor proteico dessa farinha, a torna uma alternativa de substituição parcial ou total na elaboração de produtos de chocolate. Suas características funcionais mostram as possibilidades de substituição e agregação de características necessárias na elaboração de diversos produtos, como chocolates e confeitos;

Obteve-se uma formulação adequada de chocolate, bem como os parâmetros de processo, com tempo pequeno de produção, mostrando-se o equipamento adquirido muito bom para trabalhos de pesquisa;

Os resultados encontrados nas análises físico-químicas dos chocolates elaborados com farinha de castanha-do-Brasil não apresentaram elevação lipídica, com considerável aumento proteico; a reologia dos chocolates foi difícil de ser acertada devido ao auto conteúdo de partículas presentes.

BIBLIOGRAFIA

- Fiocruz, Simplesmente Divino. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/>> . Acesso em: 08 de julho de 2013.
- Richter, M.; Lannes, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 357-369, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 12, de 1978 (Publicada no DO em 24 de julho de 1978). Brasília. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78.pdf>. Acesso em 08 de julho de 2013.
- Santos, O. V. *Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos*. 2012. 215f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.
- Zenebon, O.; Pascuet, N. S. (Coord.) Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz, 4. ed., p. 32-62, 477-483, 805-818, São Paulo, 2008.
- Gonçalves, E. V.; Lannes, S. C. S. Reologia de chocolate. *Food Science and Technology*, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 845-851, 2010.

Association Of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of AOAC International*. 17.ed. CD-ROM, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº554, de 30 de agosto de 1995. Estabelece a norma de identificação e qualidade, acondicionamento e transporte de farinhas de mandioca para fins de comercialização. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 1995.

Bailey, W. J.; Weir, I. S. Investigation of methods for direct rheological model parameter estimation. *Journal of Petroleum Science Engineering*, v.21, p.1-13, 1998.

Lannes, S. C. S. Cupuaçu: uma abordagem para sua utilização como substituto do cacau. 2008. 144p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Schetty, O.; Anker, P.; Junker, E.; Kleinert, J. *Schweizerisches lebensmittelbuch*. 5.ed. S.l.: s.n., 1969. v.3, cap.36C, p.47-51 (método 36 C/04). [Fotocópia].

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A BIOACESSIBILIDADE DE FERRO E ZINCO EM FEIJÃO-CAUPI

Elenilda de Jesus Pereira¹; Lucia Maria Jaeger de Carvalho¹; Daniela Soares Viana¹; Joyce Tavares Miranda¹; Roberto Eugênio Pereira Figueiredo¹; Sidinéa Cordeiro de Freitas²; José Luiz Viana de Carvalho²; Juliana de Oliveira Santos²; Epaminondas Silva Simas²; Maurisrael de Moura Rocha³; Kaesel Jackson Damasceno e Silva³

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Ilha do Fundão. Rio de Janeiro, RJ

E-mail: lucijaeger@gmail.com

²Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501. Rio de Janeiro, RJ.

³Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650. Teresina, PI.

INTRODUÇÃO

O ferro é importante no desenvolvimento físico, neurológico e mental de indivíduos saudáveis e, a carência deste micronutriente na alimentação pode causar anemia, doença esta ainda prevalente, no século XXI, que atinge de 2 a 3 bilhões de pessoas em todo o mundo (KRAEMER e ZIMMERMANN, 2007; COZZOLINO, 2005).

A anemia traz inúmeras conseqüências para o organismo de indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades. Na infância, essa doença afeta o desenvolvimento ponderal e o aprendizado escolar, já nos adultos, a principal conseqüência é a diminuição da capacidade produtiva. Em gestantes, os efeitos da anemia por deficiência de ferro incluem maior risco de morbidade e mortalidade maternos e, nos recém-natos ocorrência de baixo peso ao nascer (WHO, 2005; BRITO *et al.*, 2003). Crianças são consideradas anêmicas quando os níveis de hemoglobina sanguínea são inferiores a 11 g/dl (TEIXEIRA-PALOMBO & FUJIMORI, 2006).

Segundo a OMS, nos países em desenvolvimento, 52% das mulheres grávidas e 48% das crianças entre 5 e 14 anos estão anêmicas, o que significa que, aproximadamente, 2 milhões de crianças em idade pré-escolar estão em risco de deficiência em ferro (TEIXEIRA-PALOMBO & FUJIMORI, 2006; COZZOLINO, 2005).

Por outro lado, o zinco se constitui em importante mineral presente na dieta humana, por ser cofator de mais de 300 enzimas, necessários para o crescimento e desenvolvimento normais (SHANKAR e PRASAD, 1998). A deficiência de zinco pode levar ao aumento de casos de morbidade e mortalidade, prejudicando o crescimento e desenvolvimento normais de crianças, atraso na maturação sexual, lesões na pele, alopecia, apetite deficiente, além de diminuir a resistência às doenças, especialmente, às infecções (HAMBRIDGE *et al.*, 1987;

BHUTTA et al., 2000). A deficiência de zinco pode ser prevenida por modificações na dieta, fortificação de alimentos com este nutriente ou suplementação.

Programas governamentais de suplementação de ferro e zinco são implantados, porém uma grande parcela da população não chega a ser beneficiada devido a problemas com a distribuição em áreas ou regiões de difícil acesso, como as ribeirinhas, entre outras (COSTA et al., 2006). Uma alternativa para que essas populações possam ter alimentação adequada e disponível encontra-se na agricultura familiar, onde pequenos cultivos podem ser implantados em pequenas áreas e com baixo custo.

A cultura do feijoeiro está presente em 107 países, o que inclui um grande número de gêneros e espécies. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos produtos agrícolas de grande valor econômico e fornece nutrientes como proteínas, ferro, zinco e vitaminas e, combinado com o arroz, constitui a base da alimentação da população brasileira (CHAGAS, 1994). Considerados importantes fontes protéicas na dieta da população mundial, em especial nos países onde o consumo de proteína animal é limitado, por razões econômicas ou religiosas e culturais, os grãos de feijão comum também constituem a melhor fonte vegetal de ferro, com 5,3 - 8,5 mg/100g, e por isso, um aliado no combate às carências nutricionais (ANTUNES *et al.*, 1995; BRIGIDE, 2002).

Por outro lado, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) também conhecido como feijão-de-corda é um dos alimentos mais importantes para a população das regiões Norte e Nordeste do Brasil, por se constituir na principal fonte de proteína vegetal de populações carentes e ser uma excelente fonte de ferro e zinco. A cultivar BRS Xiquexique (subclasse comercial branco) apresenta elevados teores de ferro (77,41 ppm) e de zinco (53,66 ppm), os quais são importantes na nutrição de crianças, mulheres gestantes e idosos (FREIRE FILHO et al., 2011).

No entanto, o ferro de origem de vegetal é relativamente pouco absorvido (1 a 6%) quando comparado ao ferro presente nos alimentos de origem animal (até 22%). O feijão apresenta uma quantidade significativa de zinco, mas sua biodisponibilidade pode ser comprometida devido ao alto teor de fatores antinutricionais que limitam a utilização de seu potencial nutritivo para os seres humanos como os ftatos e a tripsina (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

A importância que o feijão representa na dieta da população brasileira, pela presença de micronutrientes como ferro e zinco e a necessidade de que grupos de baixo poder aquisitivo tenham acesso a alimentos com elevados teores desses micronutrientes e, conseqüentemente, melhorem seu *status* nutricional, tornam o consumo de feijão-caupi um

importante aliado no combate às deficiências nutricionais. Avaliar a bioacessibilidade de ferro e zinco em feijão caupi é importante porque crianças e gestantes possuem uma ingestão deficiente e o estudo da bioacessibilidade permite desenvolver estratégias de planejamento para o combate às carências nutricionais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioacessibilidade de ferro e de zinco das cultivares de feijão-caupi BRS Xiquexique, BR 17 - Gurguéia e BRS Guariba nos grãos crus e cozidos em panela de pressão com e sem imersão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de sementes das cultivares de feijão-caupi BRS Xiquexique, BR 17 - Gurguéia e BRS Guariba, que foram cultivadas e fornecidas pela Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí.

Os grãos de feijão-caupi de cada cultivar foram submetidos a dois diferentes métodos de cozimento: com e sem imersão prévia em água, cozidos em panela sob pressão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os grãos de feijão foram imersos em água deionizada, por um período, de aproximadamente, 16 horas, com as panelas tampadas, a temperatura ambiente. Em seguida, foram cozidos aproveitando-se a água imersão. Para o cozimento dos grãos não imersos previamente em água, foi adicionada água deionizada na proporção de 100 g do grão para um volume de 500 ml de água.

Os cozimentos foram realizados em panela de pressão com capacidade para 3 litros, revestidas de teflon (marca Panex). Todas as amostras foram congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a execução das análises.

A determinação da bioacessibilidade de ferro e de zinco foi realizada nas amostras de feijão-caupi de acordo com o método *in vitro* descrito por Luten et al. (1996) envolvendo simulação de digestão gastrintestinal, com as modificações adequadas.

Todas as amostras foram trituradas em um misturador de aço inoxidável e submetidas à digestão gástrica simulada através da incubação com pepsina (pH 2,0) a 37°C por 2 h. A acidez titulável foi medida em uma alíquota de digestão gástrica, ajustando o pH para 7,5 com 0,2 mol / L de hidróxido de sódio na presença de uma mistura de extrato de bile – pancreatina (4+ pancreatina g 25g de extrato de bile 0,1 mol de bicarbonato de sódio por L). A acidez titulável foi definida como a quantidade de 0,2 mol/L de hidróxido de sódio necessária para atingir um pH de 7,5.

A determinação da bioacessibilidade foi realizada pelo método descrito por Luten e colaboradores (1996). A bioacessibilidade foi calculada pela fórmula: Bioacessibilidade (%) = $100 \times Y/Z$, onde Y é o conteúdo do elemento da fração da bioacessibilidade (mg elemento mineral/ 100g de grãos), e Z é o total de zinco ou de ferro (mg elemento mineral/100g de grãos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O maior percentual da bioacessibilidade do ferro nos grãos crus foi de 3.65% na cultivar BRS Xiquexique (Tabela 1). Após o cozimento em panela de pressão com imersão, a bioacessibilidade do ferro mostrou variação de 21.57% (BRS Tumucumaque) a 6.46% (BRS Aracê) e, sem imersão de 34.94% (BRS Tumucumaque) a 10.98% (BR 17 - Gurguéia). Tanto em panela comum com e sem imersão, a cultivar BR 17- Gurguéia apresentou o percentual mais elevado para a bioacessibilidade de ferro (8.92% e 8.72%), respectivamente. Os resultados mostraram que o percentual de bioacessibilidade de ferro, em panela de pressão sem imersão, apresentaram um percentual elevado para todas as cultivares quando comparado ao cozimento com imersão (Tabela 1). Se compararmos com as testemunhas BRS Guariba e Gurguéia, a BRS Xiquexique apresenta um comportamento similar no cozimento sem imersão com a BRS Guariba e superior a BR 17 - Gurguéia e, nos métodos de cozimento descritos foi maior quanto ao ferro em grãos crus para a cultivar BRS Xiquexique (3.65%). Os resultados mostram que a bioacessibilidade de ferro apresentou percentual mais elevado após o cozimento em panela de pressão com e sem imersão quando comparado ao cozimento em panela comum.

Tabela 1. Bioacessibilidade de ferro em cultivares de feijão caupi em grãos crus e diferentes métodos de cozimento

Cultivares	Bioacessibilidade Ferro(%)				
	Grão Cru	Panela de Pressão		Panela Comum	
		Sem Imersão	Com Imersão	Sem Imersão	Com Imersão
BRS Xiquexique	3.65 ^a	17.12 ^a	6.85 ^a	2.94 ^a	6.78 ^a
BRS Tumucumaque	3.30 ^c	34.94 ^c	21.57 ^b	5.84 ^c	5.65 ^a
BRS Aracê	2.62 ^d	14.84 ^d	6.46 ^c	6.91 ^c	2.40 ^a
BRS Guariba	2.65 ^d	17.28 ^e	13.98 ^d	4.72 ^d	6.83 ^b
BR-17 Gurguéia	2.21 ^b	10.98 ^b	8.24 ^a	8.72 ^b	8.92 ^a

Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente em 5% de probabilidade.

Na determinação da bioacessibilidade do zinco o maior percentual encontrado em grãos crus foi de 47.5% (BRS Guariba) (Tabela 2), enquanto que cozido em panela comum com imersão, o maior percentual foi de 45.91% para a BRS Tumucumaque e em panela comum sem imersão foi de 52.78% na BRS Guariba. Em panela de pressão com imersão, o percentual variou de 45.6% (BRS Guariba) a 24.33% (BRS Xiquexique) e, sem imersão, de 45.1% (BRS Guariba) a 36.40% (BR 17- Gurguéia).

O percentual de zinco também se mostrou elevado para a cultivar BRS Xiquexique, em panela de pressão sem imersão, quando comparado ao cozimento com imersão(Tabela 2). O percentual de bioacessibilidade de zinco foi superior ao do ferro em todas as cultivares e tratamentos térmicos e, a BRS Guariba foi a que apresentou o maior percentual para zinco (52.78%).

Avaliando-se a cultivar BRS Xiquexique observa-se que a mesma responde melhor quando o cozimento é realizado sem imersão com um aumento de aproximadamente 2,5 vezes para o ferro e 1,8 vezes para o zinco.

Tabela 2. Bioacessibilidade de zinco em cultivares de feijão caupi em grãos crus e diferentes métodos de cozimento

Cultivares	Bioacessibilidade Zinco (%)				
	Grão Cru	Panela de Pressão		Panela Comum	
		Sem Imersão	Com Imersão	Sem Imersão	Com Imersão
BRS Xiquexique	38.20 ^a	43.24 ^a	24.33 ^a	42.75 ^a	45.12 ^a
BRS Tumucumaque	39.50 ^a	37.52 ^c	40.50 ^c	38.81 ^a	45.91 ^b
BRS Aracê	38.62 ^a	44.70 ^c	44.68 ^c	42.81 ^a	31.01 ^c
BRS Guariba	47.50 ^b	45.10 ^c	45.60 ^c	52.78 ^b	40.90 ^d
BR-17 Gurguéia	38.80 ^a	36.40 ^b	43.70 ^b	43.46 ^a	37.10 ^a

Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente em 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a bioacessibilidade de ferro apresentou percentual mais elevado após o cozimento em panela de pressão com e sem imersão prévia quando comparado ao cozimento em panela comum. O percentual de bioacessibilidade de zinco foi superior ao do ferro em todas as cultivares e tratamentos térmicos e, a BRS Guariba foi a que apresentou o maior percentual para zinco (52.78%).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa *HarvestPlus* e a Embrapa - Monsanto Fundo de Pesquisa (BioFORT), Embrapa Agroindústria de Alimentos, Embrapa Meio Norte e a FAPERJ.

REFERÊNCIAS

- Antunes, P. L.; Bilhalva, A. B.; Elias, M.; Soares, G.J.D. Valor nutricional de Feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2. *Revista Brasileira de Agrociência*, 1(1), 1995.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, MD. Método 990.08, item 9.2.39, p. 46 – ICP. 16^a edição. 3^a revista. 1997.
- Bhutta, Z.A.; Bird, S.M.; Black, R.E.; Brown, K.H. et al. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1516–1522, 2000.
- Araújo, R. S. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos. p.786, 1996.

BRASIL. Embrapa Tabuleiros Costeiros Meio Norte. BRS Xique-Xique – Cultivar de feijão-caupi rica em ferro e zinco. Junho/2008.

Brigide, P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior Luiz de Queiroz - Piracicaba, 58p. 2002.

Chagas, J.M. Considerações sobre a cultura de feijão de inverno em Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, 7, 178, 1994.

Costa, G.; Queiroz-Monici, K.; Reis, S.; Oliveira, A. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327-330, 2006.

Cozzolino, S.M.F. Biodisponibilidade de Nutrientes. Barueri - SP. Editora Manole Ltda. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Brasil. 76-87. 2005.

Freire Filho, F.R.; Ribeiro, V.Q.; Rocha, M.M.; Damasceno-Silva, K.J.; Nogueira, M.S.R.; Rodrigues, E.V. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.

Hambridge, K.M.; Casey, C.E.; Krebs, N.F. Zinc. In: Mertz W, ed. Trace elements in human and animal nutrition, 5th ed. *Volume 2*. Orlando, FL, Academic Press, p.1–137, 1987.

Luten, J. et al., Inter-laboratory trial on the determination of the in vitro iron dialyzability from food. *Journal of Science Food Agricultural*, 72, 415-24, 1996.

Kraemer, K.; Zimmermann, M.B. "Nutritional Anemia", Sight and Life Press, ISBN 3-906412-33-4. 2007.

Ramírez-Cárdenas, L.; Leonel, A.J.; Costa, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 200-213, 2008.

Shankar, A. H.; Prasad, A. S. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, suppl. 2, 475 - 635, 1998.

Teixeira,P.; Nery, C.; Fujimori, E. Conhecimentos e práticas de educadoras infantis sobre anemia. *Revista Brasileira Saude Materno Infantil*. Recife, 6(2), 209-216, 2006.

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO USO DE ENZIMAS COMERCIAIS NA CLARIFICAÇÃO DE POLPA DE CAGAITA (*EUGENIA DYSENTERICA* DC.)

Flávio de Souza Neves Cardoso¹, Lucia Maria Jaeger de Carvalho¹, Monica Freiman de Souza Ramos¹, Maria Gabriela Bello Koblitz², Gisela Maria Dellamora Ortiz¹

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902 – Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

2. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Escola de Nutrição de Nutrição, Av. Pasteur, 296, CEP 22290-250 – Rio de Janeiro – RJ, Brasil

INTRODUÇÃO

A cagaita (fruto da *Eugenia dysenterica* DC) é uma fruta do cerrado brasileiro com grande potencial econômico. É consumida *in natura* e também na forma de produtos processados como sorvetes, licores, geléias e sucos. A cagaiteira possui um grande potencial para aproveitamento em sistemas de produção agrícola, pois possui produção elevada e relativamente estável no decorrer dos anos, potencial dos frutos para produtos processados, boa convivência com pastagens, alta tolerância ao estresse hídrico, edáfico e biótico, resistência ao fogo e facilidade de produção de mudas por semente e de estabelecimento no campo entre outros fatores (VIEIRA *et al.*, 2006). O fruto da cagaiteira apresenta valor energético total de 20,01 kcal•100g⁻¹ e na sua composição 94,34% de umidade (m/m), 0,82% de proteína (m/m), 0,44% de lipídeos (m/m), 3,08% de carboidratos (m/m), 1,04% de fibra alimentar (m/m) e 0,28% de resíduo mineral fixo (m/m) segundo Silva et al. (2008). Os teores de vitamina C da cagaita (18,28 mg/100 g) são superiores aos encontrados em muitas frutas convencionalmente cultivadas, como a banana madura e a maçã Argentina (6,4 e 5,9 mg•100g⁻¹, respectivamente). As técnicas de conservação mais utilizadas em sucos e polpas de fruta são a pasteurização e a concentração térmica. Ambas as técnicas utilizam temperaturas elevadas que provocam perdas nutricionais e alteração de cor e sabor ao produto final. Devido a estes fatores tem aumentado a busca por processos não térmicos que causem uma menor alteração nutricional e organoléptica no produto final em relação à matéria prima. Dentre estes, destacam-se os processos de separação por membranas, como a microfiltração, ultrafiltração e a osmose inversa que, por serem conduzidos a temperatura ambiente, não envolvendo mudança de fase, permitem a manutenção das características dos produtos (CARVALHO & SILVA, 2010, CIANCI *et al.*, 2005). A utilização de sucos de frutas clarificados por processos com membranas já é uma realidade no mercado internacional e, trabalhos científicos reportam formas de utilização da tecnologia de membranas, quer seja na elaboração de bebidas gaseificadas, energéticas e isotônicas. Sucos que apresentam alta

viscosidade e turbidez aumentam o tempo de processo por reduzir o fluxo de permeado e exigem uma maior pressão de trabalho. Os sucos que apresentam alta viscosidade tornam o processo de clarificação por membrana mais difícil, pois aumentam o tempo de processo e exigem uma maior pressão de trabalho o que demanda um maior esforço da bomba de alimentação e um maior desgaste das membranas. O tratamento de polpas de frutas com enzimas pectinolíticas é essencial para indústria de suco por garantir um alto rendimento em um tempo curto de processamento, pela alta qualidade sensorial do produto obtido e por reduzir a quantidade de resíduos produzidos. As pectinases comerciais são preparações que contêm uma variedade de enzimas fúngicas que apresentam atividade de pectinesterase, poligalacturonase e pectinaliase, além de atividade celulolítica e hemicelulolítica. O objetivo deste trabalho foi fazer uma análise preliminar da atividade de pectinase e celulase das enzimas comerciais Novozym®33095, Pectinex® Ultra Clear, Pectinex® Ultra SP-L e Celluclast®1.5L, além de avaliar o efeito da combinação das pectinases com a celulase comercial sobre luminosidade da polpa de cagaita.

MATERIAL E MÉTODOS

A matéria-prima utilizada para os experimentos de luminosidade foi polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), proveniente de frutos maduros e colhidos em dezembro de 2012 na cidade de Chapada Gaúcha no estado de Minas Gerais. A polpa de cagaita foi mantida sob congelamento a -18°C até a realização das análises.

Enzimas: pectinase comercial Novozym®33095, Pectinex® Ultra Clear, Pectinex® Ultra SP-L e a celulase comercial Celluclast®1.5L. Todas as enzimas foram doadas pela empresa *Novozymes Latin America* Ltda.

A atividade de pectinase foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959) utilizando pectina cítrica como substrato e o ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto.

A atividade de celulase foi determinada utilizando papel de filtro Whatman no. 1 como substrato e glicose como padrão segundo Ghose (1987). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto.

A determinação da luminosidade da polpa de cagaita foi determinada pela medida da transmitância em espectrofotômetro a 540 nm. (SINGH, KUMAR & SHARMA, 2012).

Análise estatística: Para avaliação das enzimas comerciais no aumento da luminosidade da polpa de cagaita durante a hidrólise, cada pectinase comercial foi utilizada em conjunto com a celulase Celluclast® 1.5L. Foi realizado um planejamento experimental utilizando como parâmetros a concentração de pectinase comercial, a concentração de celulase comercial e temperatura de hidrólise. A reação enzimática ocorreu sob agitação de 70 rpm durante 30 minutos. Para avaliação preliminar da significância das variáveis testadas e seu comportamento no processo foi utilizado um planejamento fatorial completo em 3 níveis de variação com 4 repetições do ponto central utilizando o software STATISTICA 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Figura 1, a pectinase Pectinex® Ultra Clear apresentou a maior atividade de pectinase entre as enzimas pectinolíticas, 77,6 U/mL.

A pectinase Pectinex® Ultra Clear também apresentou alta atividade de celulase quando comparada com as demais pectinases comerciais, como pode ser observado na Figura 2. A celulase comercial Celluclast®1.5L apresentou a maior atividade de celulase como já era esperado.

Todas as enzimas se mostraram eficientes no aumento da luminosidade da polpa de cagaita após a hidrólise. Os diagramas de Pareto nas Figuras 3, 4 e 5 mostram as variáveis independentes, concentração de pectinase, concentração de celulase e temperatura e suas interações que foram significativas para o incremento de luminosidade no nível de confiança $p=0,05$. Os resultados revelaram que a aplicação de celulase em conjunto com as pectinases comerciais foi bastante significativa na obtenção de melhores resultados de luminosidade como pode ser observado na Figura 3, 4 e 5.

A análise de variância para incremento de luminosidade foi significativa no nível de significância $p=0,05$ para todas as enzimas utilizadas na hidrólise da polpa de cagaita. O coeficiente de determinação (R^2) também se mostrou bastante elevado em todos os casos analisados: Pectinex Ultra-SP e Celluclast 1.5L, $R^2=0,82$; Pectinex Ultra Clear e Celluclast 1.5L, $R^2=0,80$ e Novozym 33095 e Celluclast 1.5L, $R^2=0,95$.

Nas Figuras 6, 7 e 8 é possível observar que a concentração de celulase influenciou significativamente o aumento da luminosidade da polpa de cagaita após a hidrólise no uso de todas as enzimas comerciais. O aumento da concentração das pectinases comerciais utilizadas resultou em um acréscimo na luminosidade da polpa de cagaita. A temperatura utilizada durante a hidrólise influenciou de forma distinta no aumento da luminosidade. Na aplicação

da enzima Pectinex SP-L, o aumento da temperatura resultou em uma diminuição da luminosidade. Quando foi utilizada a enzima Novozym 33095, o aumento da temperatura levou a um aumento na luminosidade. Com a enzima Pectinex Ultra Clear a temperatura teve pouca influência sobre a luminosidade da polpa de cagaita. A Pectinex® Ultra SP-L apresentou os maiores resultados de luminosidade de polpa de cagaita após hidrólise entre as pectinases utilizadas (Figuras 6, 7 e 8).

CONCLUSÕES

Todas as enzimas se mostraram eficientes no aumento da luminosidade da polpa de cagaita após a hidrólise. Os resultados estatísticos preliminares revelaram que a aplicação de celulase em conjunto com as pectinases comerciais foi bastante significativa na obtenção de melhores resultados de luminosidade. A Pectinex® Ultra SP-L apresentou os maiores resultados de luminosidade de polpa de cagaita após hidrólise entre as pectinases utilizadas. Portanto todas as enzimas comerciais testadas podem ser utilizadas na clarificação de polpa de cagaita.

BIBLIOGRAFIA

- Carvalho, L.M.J, Silva, C.A.B. Clarification of pineapple juice by microfiltration. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 828-832. 2010.
- Cianci, F.C., Silva, L.F.M, Cabral, L.M.C.& Matta, V.M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(3), 579-583, 2005.
- Ghose, T.K.. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 59, No. 2, pp. 257—268, 1987.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.
- Silva, M.R., Lacerda, D.B.C.L., Santos, G.G.S. & Martins, D.M.O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, 38(6),1790-1793, 2008a
- Singh, A.; Kumar, S. & Sharma, H.K. Effect of enzymatic hydrolysis on the juice yield from Bael Fruit (*Aegle marmelos Correa*). *American Journal of Food Technology*, 7 (2), 62-72, 2012
- Veira, R.F.; Costa, T.S.A.; Silva, D.B.; Ferreira, F.R. & Sano, S.M Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. 2006.

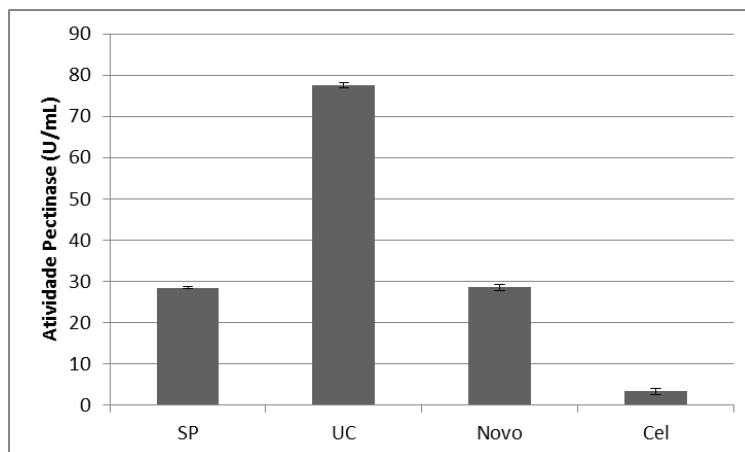


Figura 1. Atividade de pectinase das enzimas comerciais Pectinex® Ultra SP-L (SP), Pectinex® Ultra Clear (UC), Novozym®33095 (Novo) e Celluclast®1.5L.

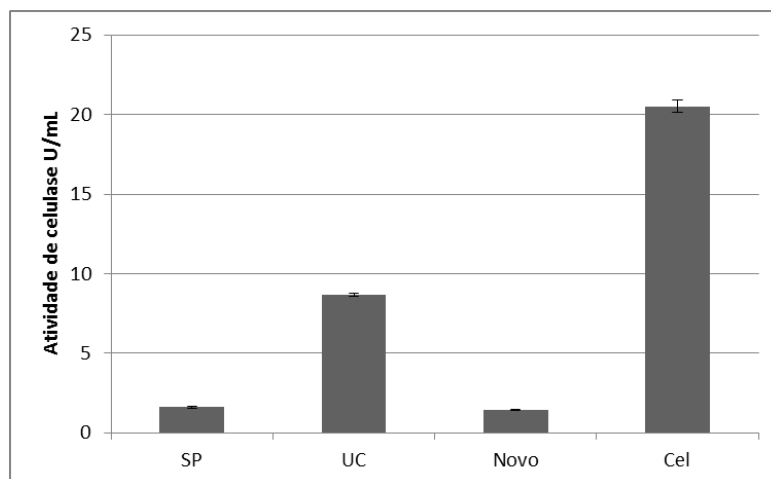


Figura 2. Atividade de celulase das enzimas comerciais Pectinex® Ultra SP-L (SP), Pectinex® Ultra Clear (UC), Novozym®33095 (Novo) e Celluclast®1.5L.

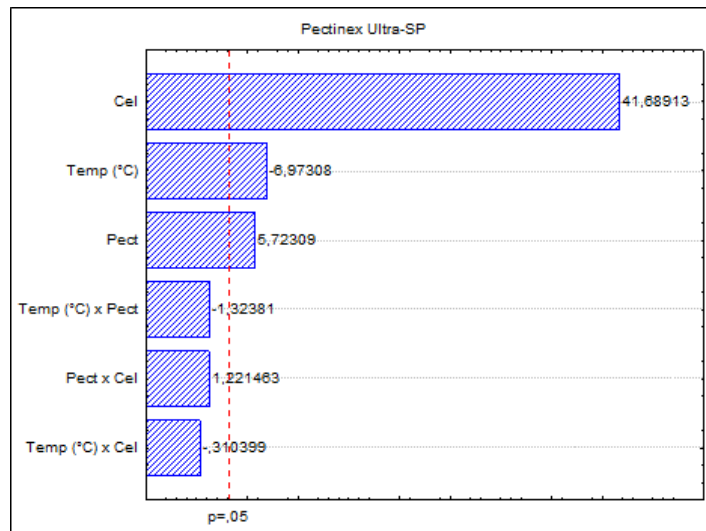


Figura 3. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável dependente incremento de luminosidade da polpa de cagaita após hidrólise utilizando a pectinase Pectinex Ultra-SP e Celluclast 1.5L. Parâmetros: concentração de Pectinase (Cel), concentração de pectinase (Pect) e temperatura (°C).

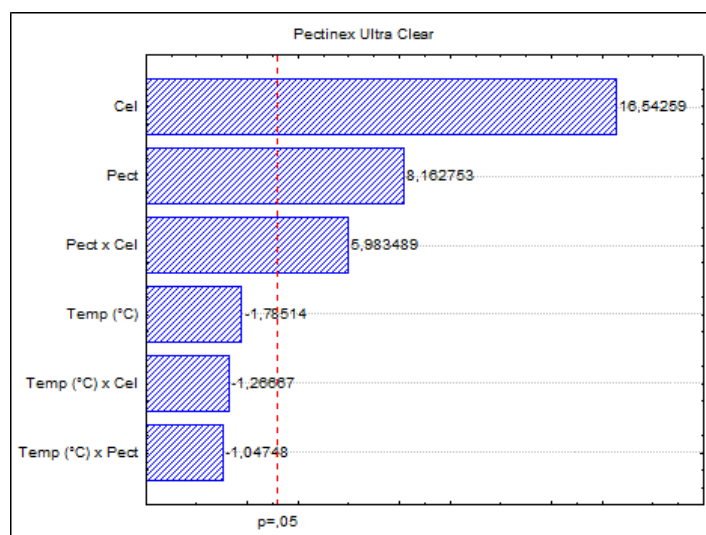


Figura 4. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável dependente incremento de luminosidade da polpa de cagaita após hidrólise utilizando a pectinase Pectinex Ultra Clear e Celluclast 1.5L. Parâmetros: concentração de Pectinase (Cel), concentração de pectinase (Pect) e temperatura (°C).

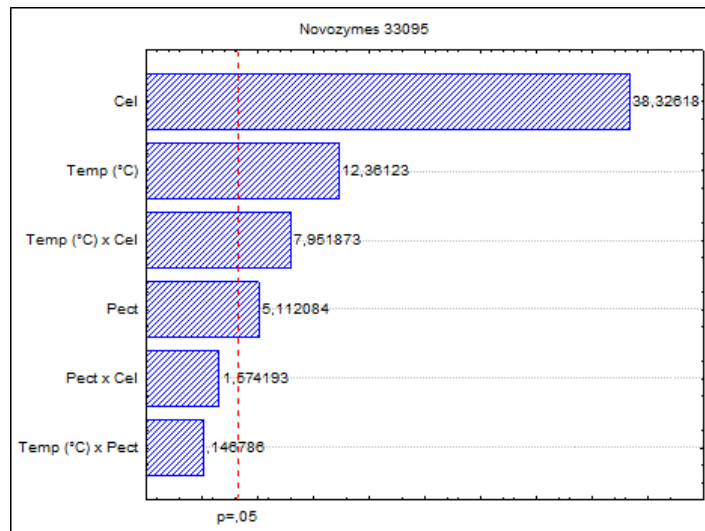


Figura 5. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável dependente incremento de luminosidade da polpa de cagaita após hidrólise utilizando a pectinase Novozym 33095 e Celluclast 1.5L. Parâmetros: concentração de Pectinase (Cel), concentração de pectinase (Pect) e temperatura (°C).

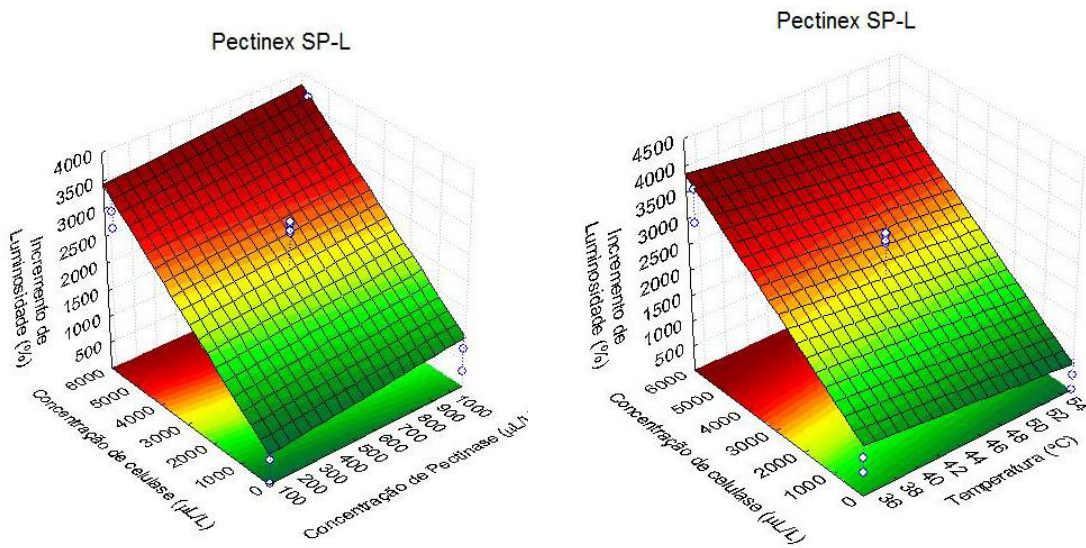


Figura 6. Superfície de resposta do incremento de luminosidade da polpa de cagaita após a hidrólise com Pectinex SP-L e Celluclast 1.5L em função do Concentração de pectinase ($\mu\text{L/L}$) x Concentração de celulase ($\mu\text{L/L}$) e Concentração de celulase x Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

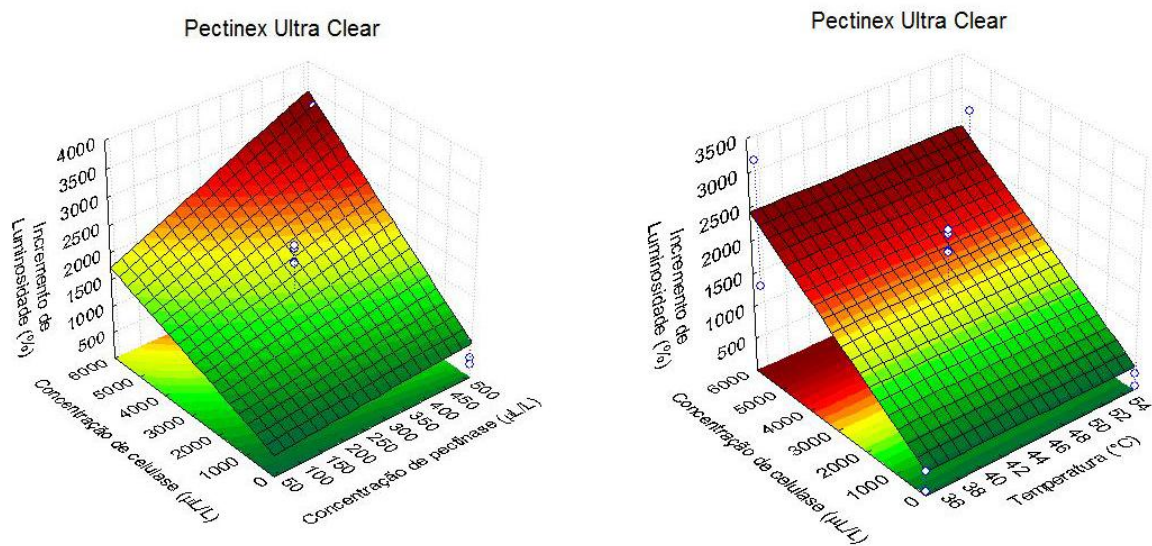


Figura 7. Superfície de resposta do incremento de luminosidade da polpa de cagaita após a hidrólise com Pectinex Ultra Clear e Celluclast 1.5L em função do Concentração de pectinase ($\mu\text{L/L}$) x Concentração de celulase ($\mu\text{L/L}$) e Concentração de celulase x Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

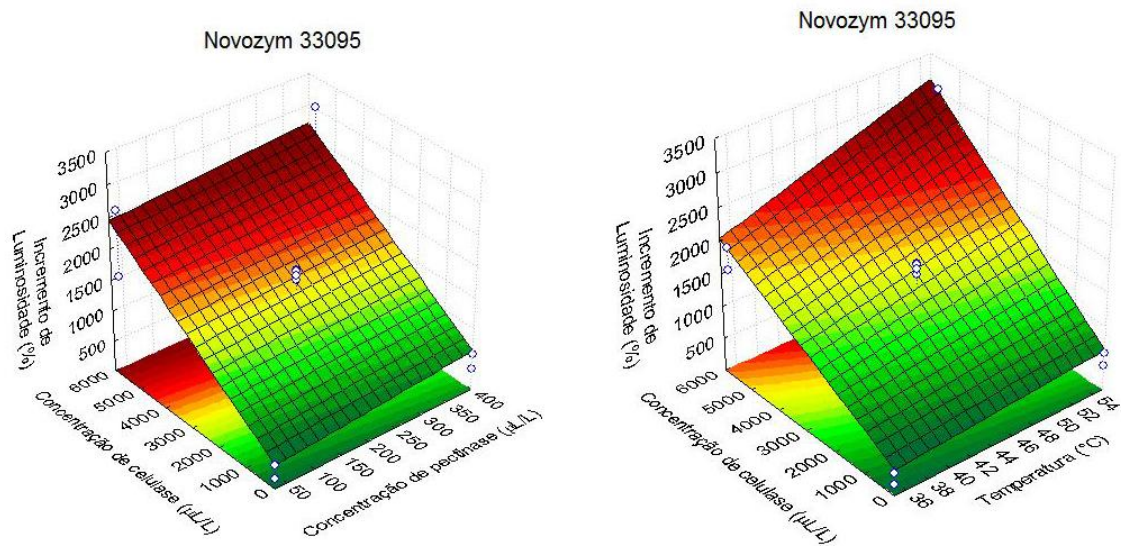


Figura 8. Superfície de resposta do incremento de luminosidade da polpa de cagaita após a hidrólise com Novozym 33095 e Celluclast 1.5L em função do Concentração de pectinase ($\mu\text{L/L}$) x Concentração de celulase ($\mu\text{L/L}$) e Concentração de celulase x Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

CAROTENOIDES EM *TALINUM PANICULATUM* CRUA E COZIDA POR IMERSÃO EM ÁGUA E REFOGADA

Déborah Alves Gondim^{1*}, Patrícia Barros Gomes¹, Pedro Henrique Fernandes do Monte¹, Guilherme Silva Cruz¹, Ana Claudia de Macedo Vieira², Lucia Maria Jaeger de Carvalho¹

1 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco L, Subsolo, Laboratório de Tecnologia e Análise Instrumental de Alimentos, sala 17, CEP 21941902 – Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

2 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco A, Laboratório de Farmacobotânica, sala A2-024, CEP 21941902 – Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

INTRODUÇÃO

A planta *Talinum paniculatum* (Jack). Gaertn., também conhecida como Beldroega Grande e João Gomes, pertence à família Portulacaceae sendo uma espécie herbácea anual que se desenvolve em todo o Brasil ocupando-se em locais com mais umidade e sombreados, tendo sua origem na América Central e na costa oeste da América do Sul (.AMORIM, 2009). Apresenta folhas simples e carnosas, pequenas flores róseas ou alaranjadas e sua propagação se dá por meio de sementes. Autores como KINUPP E BARROS (2008) analisaram o teor de proteínas e sais minerais de *T. paniculatum*, entre outras espécies e os resultados reforçam o emprego da espécie como alimento para animais e para a alimentação humana, comprovando a riqueza de nutrientes de folhas e caules jovens. Além de seu potencial como alimento, LORENZI E MATOS (2002), ressaltam a utilização da espécie como medicinal.

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela coloração de muitas folhas, frutos e flores, e muitos deles, quando consumidos, estão relacionados à redução de doenças crônico-degenerativas e doenças cardiovasculares devido a sua extrema importância no organismo com sua atividade antioxidante e pró-vitáminica A. No gênero *Talinum* foram identificados os carotenóides da espécies *T. triangulare* (AMORIM et al, 2009) mas, não há estudos para *T. paniculatum*.

Tendo em vista essa utilidade, o objetivo principal do presente estudo foi identificar e quantificar os carotenoides presentes na espécie *Talinum paniculatum* crua, cozida em água e refogada.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em duas estações diferentes (outono e inverno), dividida em três partes iguais e duas delas foram submetidas a métodos de cozimento (cozida por

imersão em água e refogada). As amostras foram então trituradas e armazenadas a temperatura de aproximadamente 8 °C.

As análises para a determinação do teor de carotenoides totais foram realizadas em espectrofotômetro (SPECORD 210 mod. ANALYTIKJENA) na faixa do espectro visível e leitura no comprimento de onda a 450nm.

As análises para a determinação do conteúdo de β -caroteno do padrão (extraído da cenoura *Daucus carota*) e das amostras bem como seus isômeros *trans* e *cis*, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters 2695 - Modelo Alliance, com detector UV/visível Waters 996 Fluorescence, rede de Diodo UV/Vísivel de 350nm a 600nm operado pelo software Empower. A coluna utilizada para as análises foi a C30 YCM Carotenoid S-3 (4,6mm x 250mm) da Waters. A fase móvel foi composta de 80% metanol (Tedia, grau CLAE) e 20% de éter metil tercbutílico (Tedia, grau CLAE). As condições de análise foram: fluxo 0,8 mL/min; injeção automática de 25mL do extrato obtido da amostra; temperatura 30°C e tempo total de análise de 60 minutos. A amostra crua de *T. paniculatum* foi retirada do acondicionamento refrigerado e

colocada por, aproximadamente ,10 min, para que atingisse a temperatura ambiente

Para a determinação dos carotenóides totais bem como aquelas do β -caroteno e seus isômeros *cis* e *trans*, foram pesados, inicialmente, em balança digital, *Bel Engineering*, modelo MA0434/05, devidamente calibrada, 5 gramas da amostra. Para evitar perdas de amostra durante a transferência de recipientes foram pesadas

15,5 g, no *graal* e adicionando 3 g de celite (454 – Tedia). Na etapa de extração dos carotenóides foram realizadas adições de 25 mL de acetona para a maceração formando-se uma pasta, a qual foi transferida para funil com placa sinterizada (5 μ m) acoplado a um kitasato de 250 mL e filtrada à vácuo. Este procedimento foi

repetido por 3 vezes até que a amostra fosse esgotada (incolor). O extrato obtido foi transferido para funil de separação de 500 mL, contendo 40 mL de éter de petróleo. A remoção da acetona do extrato foi realizada com água-ultrapura (Milli-Q) adicionada, lentamente, para evitar a formação de emulsão. A fase inferior foi descartada, sendo este procedimento repetido quatro vezes, isto é, até que não mais houvesse resíduo de

acetona na fase aquosa. O extrato foi transferido para balão volumétrico de 50 mL, utilizando-se funil

contendo 15 gramas de sulfato de sódio anidro e o volume completado com éter de petróleo. A seguir, foi realizada a leitura da amostra, em espectrofotômetro, na faixa do espectro visível no comprimento de onda de 450 nm. Para a identificação e quantificação do

b-caroteno e seus isômeros *cis* e *trans* retirou-se uma alíquota de 2 mL do extrato, anteriormente, obtido e secou-se em frasco âmbar sob fluxo de nitrogênio. A amostra (extrato seco) foi, então, diluída em 100 mL de acetona, sob agitação em vortex *Genie 2* (Scientific Industries) e transferida para frasco âmbar de 2mL para as análises por CLAE. Cabe ressaltar que extrato foi saponificado com 10% de KOH em metanol por 16 horas antes de ser analisado por CLAE segundo o método de RODRIGUEZ-AMAYA (2002) .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações médias de carotenoides totais foram de 61,1 µg/g na planta crua; 79,9 µg/g na refogada e, 71,7 µg/g naquela cozida por imersão em água sendo valores estes considerados elevados.

Foram também identificados o α -caroteno (18,43±1,17 µg/g), o β -caroteno (38,68±3,39 µg/g), os isômeros 13 e 9-Z- β -caroteno nas concentrações de 4,92±0,45 µg/g e 0,93±0,14 µg/g, respectivamente, nas amostras cruas, conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 1.

Nas amostras cozidas por imersão em água os teores de α -caroteno, β -caroteno e dos isômeros 13 e 9-Z- β -caroteno foram de 0,91±0,35µg/g; 42,35±3,46µg/g; 4,41±3,21µg/g e 6,88±0,91µg/g, respectivamente enquanto que nas amostras refogadas foram de 0,30±0,05µg/g; 54,33±1,17µg/g; 16,65 ±0,49µg/g e 7,54±0,25 µg/g, respectivamente. O β -caroteno foi o carotenoide mais abundante em todas as amostras analisadas tendo em vista possuir cerca de 100% de atividade pró-vitamina A.

AMORIM et al (2009) identificaram a presença de β -caroteno e luteína em na fração hexânica do extrato de folhas *T. triangulare*. Tais resultados apontam para um possível padrão dentro do gênero *Talinum* e ajudam a reforçar a importância destas espécies como alternativas para a alimentação humana. KINUPP E BARROS (2008) destacam a importância da diversificação das espécies vegetais consumidas como alimentos na dieta regular dos seres humanos como forma de ampliar o espectro e, não só fornecer novas opções em termos de paladar mas, também em termos nutricionais.

Adicionalmente, observou-se aumento nos teores de β -caroteno nas amostras após o cozimento de *T. paniculatum* tendo sido mais elevado na amostra cozida e refogada.

Houve, também, aumento nos teores dos isômeros 13 e 9-Z do β -caroteno após ambos os tipos de cozimento, sendo estes teores mais elevados nas amostras de *T. paniculatum* refogadas. A formação destes isômeros é esperada tendo em vista que o aquecimento promovido pelo cozimento (calor) conduz a isomerização do β -caroteno (ROCK *et al.*, 1998;

SCHIEBER, 2005 e, LIN *et al.*, 2005. Vários autores reportam esta ocorrência em diferentes matrizes de origem vegetal como a abóbora (NEVES, 2011), mandioca (OLIVEIRA, 2006) e tomate (LIN *et al.*, 2005). A isomerização *trans-cis* é reportada por como sendo a causa principal do efeito do processamento térmico. A formação destes isômeros conduz a uma redução do seu valor nutricional visto que apresentam baixa atividade pró-vitamina A.

A luteína e outros carotenoides foram identificados, porém não quantificados porém, presentes nas amostras analisadas. Na Figura 1, pode ser observado o cromatograma da amostra crua de *T. paniculatum*.

Não foram encontrados na literatura dados sobre a composição em carotenoides da *T. paniculatum* crua ou quando submetida a diferentes métodos de cozimento, o que dificultou uma melhor discussão dos resultados obtidos no presente estudo.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos possibilitaram a compreensão do valor nutricional da *T. paniculatum* quanto aos carotenoides presentes. O β -caroteno foi o carotenoide mais abundante na amostra cozida e consumida na forma refogada. Uma vez que o β -caroteno possui atividade pró-vitamina A de cerca de 100%, o consumo da planta neste tipo de preparação pode aumentar o aporte de pró-vitamina A e de antioxidantes na dieta promovendo benefícios à saúde humana.

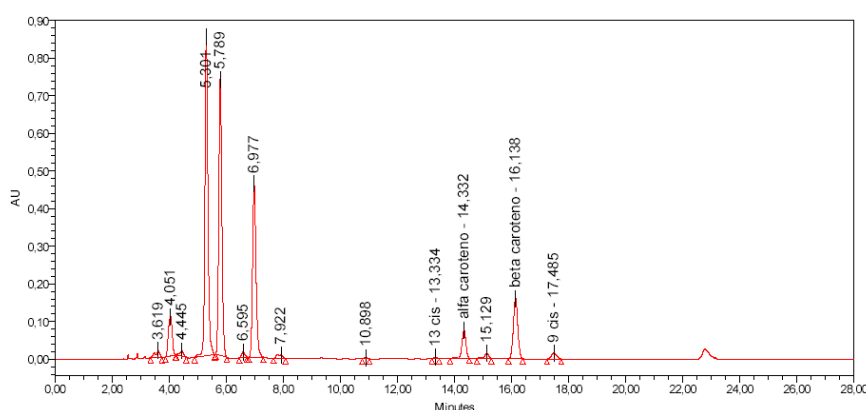


Figura 1. Cromatograma obtido após análise cromatográfica por CLAE da *Talinum paniculatum* crua

BIBLIOGRAFIA

- Amorim, A. P. Barboza, H. T. G., Oliveira, M. C. C., Carvalho, M. G., Junior, A. R. C. Identificação de carotenoides em extrato hexânico das folhas de *Talinum triangulare* (Portulacaceae). 32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009. São Paulo.
- Brasileiro, B. G. Germinação e produção de compostos fenólicos em plantas de *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd (Portulacaceae) tratadas com homeopatia. Tese de Doutorado pela Universidade Federal de Viçosa. 2010.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- Kinupp, V. F. & Barros, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(4): 846-857, 2008.
- Rodriguez-Amaya, D.B. A scheme for obtaining standars and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry*, 78, 389-398, 2002.
- Lin, C. H., Chen, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during processing. *European Food Research Tecnology*, 221, 274-280, 2005.
- Neves, A. C. L. Carotenoides em abóbora amarela (*Cucurbita moschata* Duch.) creoula crua e retenção real de α e β -caroteno após diferentes tipos de cozimento. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2011.
- Oliveira, A. R. G. Avaliação e estudo da retenção de carotenoides totais e b-caroteno em mandioca amarela mansa e brava. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2006.
- Rock, C. L., Lovaldo, J. L., Emenhiser, C., Ruffin, M. T., Flatt, S. W. & Schwartz, S.J. Bioavaility of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *Journal of Nutrition*, 128, 913-916, 1998.
- Rodriguez-Amaya, Delia. *A guide do carotenoid analysis in food*. Washington: ILSI Press, 1999.
- Wondracek, D.C. Análise quantitativa e qualitativa de carotenóides em acessos de maracujás-do-cerrado. IX Simpósio Nacional do Cerrado, 2008. Brasília.
- Schieber, A, Carle, R. Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technologiactal, analytical and nutricional implications. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 416-422, 2005

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM GÉIS DE AÇAÍ

Lucia Maria Jaeger de Carvalho, Amanda Soares Pinto, Juliana Alves da Silva, Pedro Henrique Fernandes do Monte, Roberto Eugenio Pereira Figueiredo, Daniele Osório Pacheco, Jacqueline Carvalho-Peixoto, Mirian Moura e Mônica Freiman de Souza Ramos.

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902 – Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

INTRODUÇÃO

Na atualidade existe um grande interesse no estudo do estresse oxidativo (EO) devido, principalmente, à ação constante no organismo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) geradas nos processos inflamatórios, por algumas disfunções biológicas ou provenientes dos alimentos (Halliwell, 1995; Visioli, 2000). Configura-se, essencialmente, num desequilíbrio entre a produção de várias espécies reativas e a habilidade dos mecanismos protetores naturais do organismo que compõem e previnem efeitos adversos (Sies, 1985; Jenkins, 2000).

O exercício físico é um dos fatores que pode aumentar a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio como parte das reações metabólicas devido ao treinamento muscular induzindo, desta forma, ao EO (Davies, 1982; Record *et al.*, 2001 e Bloomer *et al.*, 2005 e 2006). Estudos sugerem o papel fundamental do EO sobre todo o desempenho do treinamento físico gerando patologias como artrite, doenças coronarianas, choque hemorrágico e doenças crônicas como o câncer, AIDS (Barclay, 1991), danos aos músculos, redução da capacidade imunológica (Lee, 2000).

O açaí (*Euterpe oleracea*) roxo é um fruto que pode ser utilizado no enriquecimento de diversos tipos formulações alimentícias, incluindo produtos funcionais, tendo composição rica em flavonoides (elevado teor de antocianinas e polifenóis) além de ser, amplamente, cultivado no Brasil e comercializado na forma de polpa congelada podendo, também, ser utilizado após sua secagem (liofilizada). Os géis existentes no mercado, normalmente, possuem cafeína (que reduz a percepção de esforço, pois modifica o limiar da dor), histidina (um analgésico natural que neutraliza o acúmulo de ácido lático nos músculos), maltodextrina (carboidratos complexos que garantem energia duradoura durante a prática), além das vitaminas C e E, que oferecem defesa contra os danos causados nos tecidos musculares pelos radicais livres, atuando contra o envelhecimento precoce. O gel formulado com polpa de açaí liofilizado contendo elevado conteúdo de polifenóis pode ser

uma opção viável ao mercado de consumidores praticantes de atividade física. O objetivo do presente estudo foi elaborar e determinar os fenólicos totais de quatro formulações de géis energéticos funcionais de açaí.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do produto em gel energético funcional com polpa liofilizada de açaí foi realizado no Laboratório de Tecnologia e Análise Instrumental de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

Após 8 horas para sua obtenção, a polpa foi liofilizada por 3 dias, de acordo com a capacidade do equipamento com duração total de cerca de 12 horas, em liofilizador da marca Labconco, modelo *Freeze dryer 8* e, congelada a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o sistema de congelamento rápido foi interrompido e, o de vácuo acionado, para que a maior parte da água livre da polpa fosse sublimada.

A polpa liofilizada foi acondicionada em sacos de polietileno de alta densidade com revestimento de alumínio para impedir a incidência de luz e, conseqüentemente, preservar seus constituintes, sendo, a seguir selados a vácuo, e armazenados sob congelamento ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a realização dos experimentos e análises.

As formulações dos géis (G1, G2, G3 e G4) foram pré-definidas segundo planejamento fatorial 2^2 (Montgomery & Runger, 2003).

A formulação básica inicial dos géis para a seleção do produto final foi composta por açúcares (maltodextrina, glicose) em concentrações variadas, polpa de açaí liofilizada e, como coadjuvantes a goma locuste, água filtrada e o ácido cítrico na quantidade suficiente para o efeito desejado (q.s.p.).

A determinação do conteúdo total de compostos fenólicos e de antocianinas foi realizada, tendo em vista que a estas análises em amostras ricas geralmente está associada com forte atividade antioxidante, possivelmente, correlacionados com o conteúdo de fenólicos totais e antocianinas dos alimentos em estudo (Rufino et al, 2007; 2009 e 2010; Schauss et al., 2006; Velioglu et al., 1998).

Os fenólicos totais (FT) dos 4 (quatro) géis elaborados foram determinados pelo método espectrofotométrico, com leitura a 760 nm, utilizando-se o reagente de *Folin-Ciocalteu*, segundo metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), em triplicata.

Foi pesado 1mL do gel, transferido para um balão volumétrico de 100mL e seu volume completado com água destilada. Para o preparo do extrato aquoso de açaí, pesou-

se 1g de polpa de açaí liofilizada das amostras selecionadas, e suspensas em um balão volumétrico de 200 mL, com volume final ajustado com água destilada.

Após este procedimento as amostras foram colocadas em banho de ultrassom por 15 minutos e filtradas duas vezes, armazenadas em geladeira a aproximadamente 4 °C por 12 horas (*overnight*).

Após este período foram, novamente, colocadas em banho de ultrassom, por 15 minutos. Os extratos foram diluídos 10 vezes para todas as amostras realizadas até as análises. Os resultados foram comparados a curva de ácido gálico, que foi obtida com diferentes concentrações. As reações ocorreram em tubos de ensaio de 5mL, utilizando-se 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%), 0,5 mL de extrato aquoso para a amostra ou 0,5mL de água destilada em substituição a amostra para o branco e 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ a 7,5%. As amostras, em triplicata, foram colocadas, para promover a reação, durante 2 horas, em local escuro, antes das leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (UV mini 1240-UV-vis, Shimadzu®) a 760nm. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes em ácido gálico para 1g de peso fresco de amostra de polpa liofilizada (µg de EAG /g PF) e, para o gel expressas em EAG. 100 mL de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos quanto aos fenólicos totais, expressos em equivalentes de ácido gálico por 100g de produto, variaram de $230,56 \pm 3,69$ (G1) a $346,67 \pm 8,24$ (G4). Os géis 3 e 4, com concentrações de polpa de açaí liofilizada mais elevadas, apresentaram maior conteúdo de fenólicos totais, o que era esperado porém foram adequadas à dose mínima para o efeito antioxidante após sua ingestão pelos praticantes de atividade física, tendo sido utilizados no ensaio clínico com praticantes de atividade física pelo fato de se poder obter melhor resposta.

Na Tabela 1 podem ser observados os teores de fenólicos totais dos 4 géis de açaí, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100mL, analisados segundo o método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Na Figura 1 pode ser observada a curva padrão de ácido gálico para a determinação dos fenólicos totais

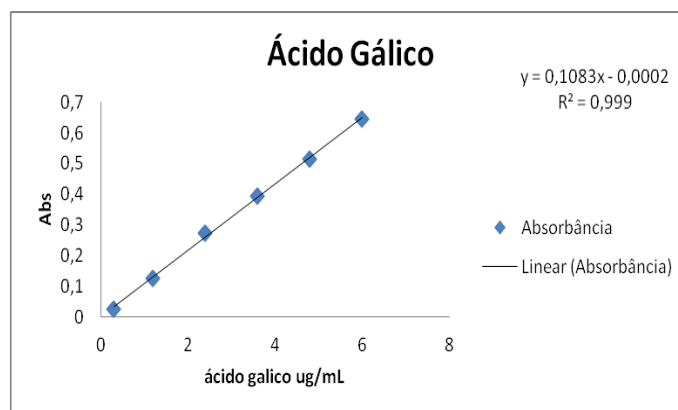


Figura 1. Curva de calibração do ácido gálico para análise dos fenólicos totais da polpa de açaí liofilizada

Tabela 1. Fenólicos totais presentes nos 4 géis adicionado de diferentes concentrações de polpa de açaí liofilizada

Amostras	Fenólicos Totais (EAG/ 100mL amostra)
G1	230,56 ± 3,69
G2	203,67 ± 8,86
G3	322,03 ± 3,48
G4	346,67 ± 8,24

Média = ±; DP = desvio-padrão e, n = 3

Kuskoski et al. (2006) estudaram polpas congeladas de amora, açaí, morango e uva e verificaram teores de fenólicos totais com valores de 118,9; 136,8; 132,1 e 117,1 mg EAG/100g, respectivamente.

Santos et al. (2008) ao analisarem 12 polpas de açaí encontraram valores de fenólicos totais entre 182,95 EAG/100g e 598,95 EAG/100g . Os valores obtidos nesse estudo foram similares aos encontrados pelos autores citados.

CONCLUSÕES

Os géis produzidos apresentaram aparência mais atrativa quanto a cor, viscosidade e textura comparados à produtos similares encontrados no mercado consumidor. O produto pode ser uma alternativa viável para praticantes de atividade física visto que em estudos complementares promoveram redução do estresse oxidativo promovido pelo exercício físico.

BIBLIOGRAFÍA

- BARCLAY, J. K. & M. HANSEL. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Canadian Journal of Physiology Pharmacol.*, 69, 279 -284, 1991.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., Mckenzie, M. J. & Consitt, L. A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of Strength Conditions Reseach*, 19, 276-285, 2005.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., Mckenzie, M. J. & Consitt, L. A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of antioxidant supplements. *Med Sci Sports Exerc.*, 38, 1098-105, 2006.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemistry Biophysic Research*, 107, 1198 -1205, 1982.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. & Arouma, O. I. *Food Chem. Toxicol.* 33, 601, 1995.
- Kuskoski, E. M. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), Dec. 2005.
- Kuskoski, E.M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, 36(4), Aug. 2006.
- Lee, C. Y. & Man-Fan Wan, J. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *Journal of Nutrition*, 130, 2932-2937, 2000.
- Jenkins, R. R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *American Journal do Clinical Nutrition*, 72, 670S-674S, 2000.
- Montgomery, D. C. & Runger, G. C. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiro. 2^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003. 433 p.
- Record, I. R., Dreosti, I. E. & Mcinerney, J. K. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *British Journal of Nutrition*, 85, 459-464, 2001.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. Comunicado técnico - metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 2007. 4 p.
- Rufino, M. S. M. et al. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH[•] system. *Food Chemistry*, 114, 693-695, 2009.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Sauracalixto, F. & Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4) 996-1002, 2010.
- Schauss, A.G., Wu, X., Prior, R.L, Ou, B., Patel, D., Huang, D., & Kababick, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22):8598-603, 2006.
- Sies, H. Oxidative stress. Introductory remarks. In: Oxidative Stress (Sies, H., ed.), pp. 1–8. *Academic Press, London, U.K.* 1985.

Singleton, V. L.J. & Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-58, 1965.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117, 1998.

Visioli, F., Keaney Jr., J. F. & Halliwell, B.. *Cardiovascular Research*, 47, 409, 2000.

INTEGRACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CRIOCONCENTRACIÓN EN PLACA Y BLOQUE APLICADAS A SOLUCIONES DE SACAROSA

Moreno^{1,2,3} F. L., Raventos² M., Hernández² E., Gulfo² R., Robles C³., Ruiz³ Y.

¹ Doctorado en Biociencias, Universidad de La Sabana, Campus Universitario del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía – Cundinamarca – Colombia.

² Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología, Universidad Politécnica de Cataluña (UPC) C/ Esteve Terradas, 8. 08860 Castelldefels –Barcelona- España

³ Ingeniería de Producción Agroindustrial, Universidad de La Sabana, Campus Universitario del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía – Cundinamarca – Colombia.

INTRODUCCIÓN

La crioconcentración (CC) es una técnica para la eliminación de agua de soluciones alimentarias por congelación (Sánchez et al., 2009). La solución se enfría por debajo de su punto de congelación para formar cristales de hielo que posteriormente son removidos. De acuerdo con la formación de los cristales de hielo, se distinguen tres técnicas de crioconcentración: la CC en suspensión, la CC en película, en equipos de placas o tubulares y conocida también como progresiva y la CC en bloque, también llamada CC por congelación -descongelación (Aider y de Halleux, 2009; Sánchez et al., 2011).

La única técnica utilizada a nivel industrial es la CC en suspensión. Es una técnica eficiente en cuanto a la pureza del hielo y el índice de concentración logrados (Van der Ham et al., 2004). La desventaja de esta técnica radica en que los medios para remover los cristales de hielo en suspensión, hacen que la inversión requerida para su implementación y los costos operativos sean altos (Aider y de Halleux, 2009; Miyawaki et al., 2005; Sánchez et al., 2009). Por este motivo diversos investigadores estudian otras técnicas de crioconcentración (Petzold y Aguilera, 2013).

La crioconcentración en placa también llamada CC en película descendente consiste en la circulación del fluido a crioconcentrar sobre una placa refrigerada en la que crece el hielo, el cual es retirado posteriormente (Sánchez et al., 2011). Esta técnica fue estudiada por Raventós, et al., (2007) para concentrar soluciones de sacarosa. Flesland (1995) propuso la crioconcentración en placas multietapa acoplada a la osmosis inversa para la desalinización de agua. Recientemente se ha estudiado la recuperación de solutos retenidos en el hielo de soluciones de sacarosa (Gulfo et al., 2013). La crioconcentración en bloque consiste en congelar completamente la solución a crioconcentrar y luego descongelarla parcialmente para

recuperar una fracción líquida concentrada (Aider y de Halleux, 2009; Nakagawa et al., 2010; Moreno et al., 2014; Moreno et al., 2013)

Con la CC en placa es posible incrementar la concentración de la solución, pero se deben recuperar los solutos retenidos en el hielo. La CC en bloque funciona muy bien para bajas concentraciones de sólidos (Moreno et al., 2014). El objetivo de este estudio es proponer un proceso para crioconcentrar soluciones de sacarosa integrando las técnicas de CC en placa, la descongelación fraccionada y la CC en bloque.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los datos reportados por Raventós et al., (2007) de CC en placa de soluciones de sacarosa para predecir el comportamiento de la concentración de la solución crioconcentrada y del hielo remanente. Los datos utilizados corresponden a una solución de sacarosa de 5% en peso, crioconcentrada en cuatro etapas sucesivas en un crioconcentrador multi-placas. La solución se hizo circular sobre placas refrigeradas de modo que creció el hielo sobre ellas. Se hizo seguimiento de la concentración de la solución y del hielo por refractometría (Atago DBX-55, España).

Para estudiar la recuperación de los solutos retenidos en el hielo se utilizaron los datos de descongelación fraccionada reportados por Gulfo et al, (2013). Se tomaron muestras de las placas de hielo y se descongelaron en una cámara a temperatura ambiente. Se recolectaron 10 fracciones de igual masa y se determinó la concentración de cada una de ellas por refractometría.

Después de realizados los balances de materia de las operaciones de CC en placa y el deshielo se preparó una solución de sacarosa a una concentración correspondiente a las mezclas de las fracciones diluidas provenientes del deshielo, que fue 0.9% de sacarosa. Se sometió a crioconcentración en bloque siguiendo los protocolos mencionados por Moreno et al. (2014). En un recipiente cilíndrico provisto de doble chaqueta se congelaron las muestras totalmente a una temperatura de -10°C desde el centro del recipiente. Posteriormente se descongeló la muestra desde el exterior del recipiente a una temperatura de 20°C . Las temperaturas se logran mediante dos baños termostáticos (Polystat, Cole Parmer, USA) que envían una mezcla etilen glicol-agua a la temperatura deseada. Se recuperaron 10 fracciones de igual masa y se determinó su concentración por refractometría. Se utilizaron las siguientes variables de respuesta:

Índice de concentración (CI): Es la relación entre la concentración de solutos en el líquido crioconcentrado ($C_s \text{ liq}$) y en la solución inicial ($C_s 0$) (Nakagawa et al., 2009)

Fracción de líquido recuperado (f): es la masa de líquido crioconcentrado (m_{liq}) respecto a la masa de solución inicial (m_0). El producto entre la fracción de líquido y el índice de concentración se conoce como porcentaje de recuperación de solutos (%Y) (Moreno et al., 2014).

Eficiencia de concentración (Eff): Es la diferencia porcentual entre la concentración en el líquido crioconcentrado ($C_{s liq}$) y en el hielo residual ($C_{s ice}$). (Hernández, et al. 2010)

RESULTADOS

Crioconcentración en placa

En la Fig. 1. se presentan los porcentajes de sacarosa que se pueden obtener en la crioconcentración en placa. La concentración de sacarosa en la solución crioconcentrada y en el hielo se incrementa con las etapas. Cada etapa tiene un tiempo aproximado de una hora de proceso. Fue posible incrementar la solución desde 5% hasta 19.8% de sólidos en 6 etapas (Raventós et al. 2007). Se logra incrementar cuatro veces la concentración, recuperando un 32% de los solutos y con una eficiencia de concentración del 86%. La crioconcentración en placa permitió concentrar en forma efectiva la solución, pero el hielo aún retiene solutos en concentraciones hasta del 5% que deben ser recuperados.

Deshielo

Con los datos reportado por Golfo et al. (2013) se calcularon las concentraciones obtenidas al final de la etapa de deshielo de cada una de las placas de hielo obtenidas en las 6 etapas de crioconcentración en placas. Estos cálculos corresponden a un proceso de deshielo que se detiene en una fracción de líquido en la cual el índice de concentración es menor a 1, es decir, cuando se empiezan a separar las fracciones diluidas.

La concentración de sacarosa en el hielo después del deshielo fraccionado está por debajo de 2%, con lo cual se logra recuperar una gran cantidad de los solutos retenidos durante la congelación en placas. El efluente del deshielo contiene un porcentaje bajo de sacarosa pero aún puede ser posible una mayor recuperación mediante el uso de la crioconcentración en bloque de las fracciones diluidas provenientes del deshielo.

Crioconcentración en Bloque

Se realizó la crioconcentración en bloque de una solución con 0.9% de sacarosa correspondiente a la concentración de la mezcla de las fracciones diluidas provenientes de las cuatro primeras etapas de deshielo. Se obtuvieron los índices de concentración presentados en la Fig. 3. Los índices de concentración de las primeras fracciones descongeladas fueron los

más altos. Esto se debe a que la dirección de descongelación es opuesta a la congelación, o que favorece la elución de solutos (Moreno et al., 2014). Adicionalmente, los solutos se difunden hacia las gotas que se descongelan y se separan en las primeras fracciones (Nakagawa et al., 2009). El índice de concentración descendió con la descongelación hasta obtener índices menores que uno. En este punto es posible separar dos corrientes, una concentrada al 1.5% de sacarosa y una diluida al 0.3%. En este punto se recuperó un 95% de la sacarosa contenida en la solución inicial.

Propuesta de integración de técnicas

Con base en los resultados obtenidos en la crioconcentración en placa, el deshielo fraccionado y la crioconcentración en bloque, es posible proponer un proceso que integre las tres técnicas que busque incrementar la concentración de la solución y al mismo tiempo obtener un efluente final con baja concentración de sacarosa.

La propuesta de integración de las técnicas es presentada en la Fig. 4. Se presentan los balances de materia para una base de cálculo de 1000 kg/h de solución que ingresa al proceso. Se presenta la masa de la solución y su concentración en cada corriente. Las concentraciones son calculadas en base a los resultados presentados anteriormente para cada técnica individual.

El proceso inicia con 6 etapas de crioconcentración en placa. La fracción concentrada obtenida en cada etapa pasa a la siguiente etapa, mientras que la fracción diluida, el hielo, es sometido a la descongelación fraccionada. Después del deshielo fraccionado se procede a separar dos corrientes, una concentrada y otra diluida.

La fracción diluida obtenida en la etapa 5 y 6 de la CC en placa tienen una concentración superior a la de la solución inicial, por lo cual pueden ser recirculadas sin necesidad de someterse a deshielo y CC en bloque. Las demás fracciones diluidas son mezcladas y se obtiene una corriente de 1517.5 kg/h con 0.9% de sólidos que serán sometidos a crioconcentración en bloque. Después de esta técnica se obtiene una corriente diluida con 0.31%, que puede ser considerada como el efluente final con alta pureza.

Con el proceso propuesto es posible incrementar la concentración de la solución desde 5% hasta un 19.8% y obtener un efluente con 0.31% de sacarosa. Los indicadores del proceso se presentan en la Tabla 1. Con la combinación de las tres técnicas propuestas es posible incrementar la recuperación de solutos desde 38.9% hasta un 95.4%, obtener un índice de concentración de 3.95 e incrementar la eficiencia de concentración hasta el 98.5%. Esto demuestra la ventaja operativa de la integración de las técnicas de crioconcentración.

CONCLUSIONES

Mediante la criocentración en placa es posible cuadruplicar la concentración de una solución acuosa de sacarosa de 5°Brix, puesto que el nivel de concentración alcanzado dependerá en gran parte de la concentración inicial. Con el deshielo fraccionado, se consigue recuperar hasta un 50% de los solutos retenidos en el hielo. Mediante la criocentración en bloque se consigue obtener un efluente con 0.3% de sacarosa, suficientemente puro para un interés industrial.

Con la integración de las tres técnicas de criocentración se propone un proceso que supone una alternativa viable a los sistemas industriales basados en la tecnología de criocentración en suspensión, por la mayor simplicidad técnica y de los equipos de criocentración de película y de bloque.

REFERENCIAS

- Aider, M., de Halleux, D., 2009. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 679-685.
- Aider, M., Ounis, W. B., 2012. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1), 195-202.
- Flesland, O., 1995. Freeze concentration by layer crystallization. *Drying technology*, 13, 1713-1739.
- Gulfo, R., Auleda, J.M., Moreno, F.L., Ruiz, Y., Hernández, E., Raventós, M., 2013. Multi-plate freeze concentration: Recovery of solutes occluded in the ice and determination of thawing time. *Food science and technology international*. <http://dx.doi.org/10.1177/1082013213489127>
- Hernández, E., Raventós, M., Auleda, J.M., Ibarz, A. 2010. Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 130-136.
- Miyawaki, O., Liu, L., Shirai, Y., Sakashita, S., Kagitani, K., 2005. Tubular ice system for scale-up of progressive freeze-concentration. *Journal of Food Engineering*, 69, 107-113.
- Moreno, F.L., Raventós, M., Hernández, E., Ruiz, Y., 2014. Block freeze-concentration of coffee extract: effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. *Journal of Food Engineering*, 120, 158-166.
- Moreno, F.L., Robles, C.M., Sarmiento, Z., Ruiz, Y., Pardo, J.M., 2013. Effect of separation and thawing mode on block freeze-concentration of coffee brews. *Food and Bioprocess Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.02.007>
- Nakagawa, K., Maebashi, S., Maeda, K., 2009. Concentration of aqueous dye solution by freezing and thawing. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 87(5), 779-787.
- Nakagawa, K., Maebashi, S., Maeda, K., 2010. Freeze-thawing as a path to concentrate aqueous solution. *Separation and Purification Technology*, 73(3), 403-408.

Petzold, G., Aguilera, J.M., 2013. Centrifugal freeze concentration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.05.010>

Raventós, M., Hernández, E., Auleda, J.M., Ibarz, A., 2007. Concentration of aqueous sugar solutions in a multi-plate cryoconcentrator. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 577-585.

Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J.M., Raventós, M., 2011. Review: freeze concentration technology applied to dairy products. *Food science and technology international*, 17(1), 5-13.

Sánchez, J., Ruiz, Y., Auleda, J.M., Hernández, E., Raventós, M., 2009. Review. Freeze Concentration in the Fruit Juices Industry. *Food Science and Technology International*, 15(4), 303-315.

Sánchez, J., Ruiz, Y., Raventós, M., Auleda, J.M., Hernández, E., 2010. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 644-651.

Van der Ham, F., Seckler, M.M., Witkamp, G.J., 2004. Eutectic freeze crystallization in a new apparatus: the cooled disk column crystallizer. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 43(2), 161-167.

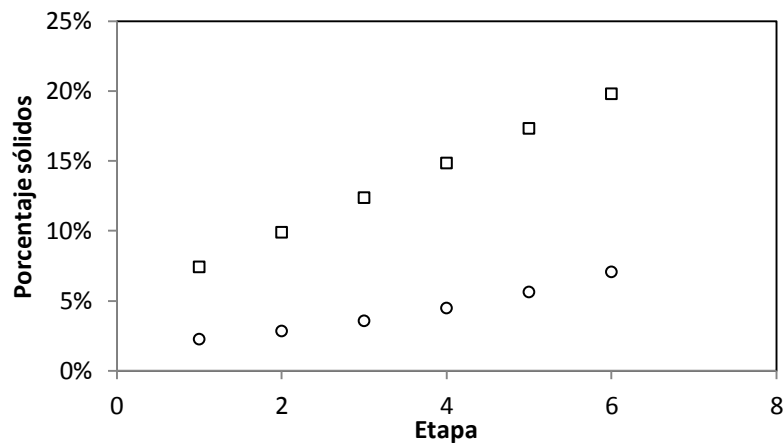


Figura 1. Contenido de sólidos en el líquido (□) y el hielo (○) durante la crioconcentración en placa

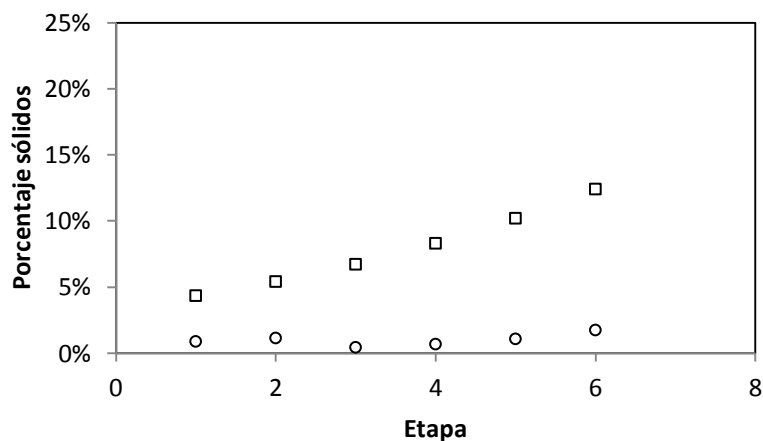


Figura. 2. Contenido de sólidos en el líquido (□) y el hielo (○) durante el deshielo fraccionado.

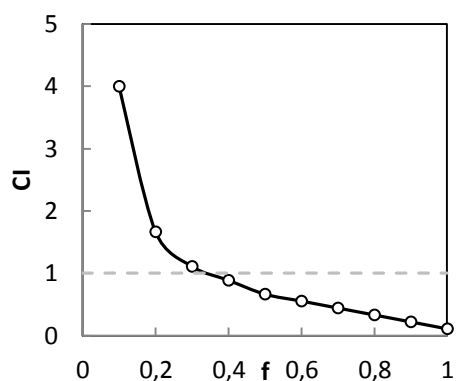


Figura 3. Índice de concentración durante la crioconcentración en bloque.

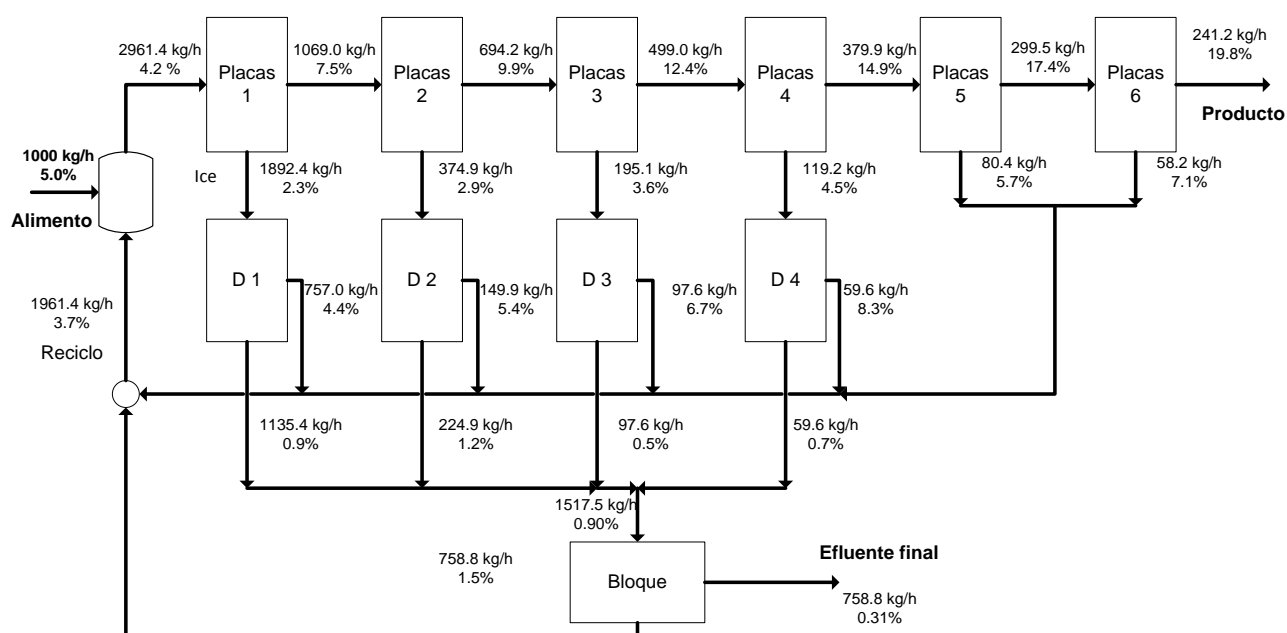


Figura 4. Integración de técnicas de crioconcentración en placa, deshielo fraccionado (D) y bloque.

Tabla 1. Resultados finales de la integración de técnicas.

	Recuperación de solutos (%)	Índice de concentración	Eficiencia de concentración (%)
CC en Placa	0.389	3.95	86.1%
CC en Placa + deshielo	0.503	3.95	95.4%
CC en Placa + deshielo + bloque	0.954	3.95	98.5%

COMPARATIVA TÉCNICA, ENERGÉTICA Y ECONÓMICA DE TRES SISTEMAS DE CONCENTRACIÓN EN UNA INDUSTRIA DE ZUMOS: CASO ESTUDIO

Moreno^{1,2,3} F. L., Raventos² M., Hernández² E., Gulfo² R. y Ruiz³ Y.

¹Doctorado en Biociencias, Universidad de La Sabana, Campus Universitario del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía – Cundinamarca – Colombia.

²Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología, Universidad Politécnica de Cataluña (UPC) C/ Esteve Terradas, 8. 08860 Castelldefels –Barcelona- España

³Programa de Ingeniería de Producción Agroindustrial, Universidad de La Sabana, Campus Universitario del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía – Cundinamarca – Colombia.

INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria es común encontrar productos que requieren ser concentrados, bien sea para mejorar el costo del proceso productivo o para ser transportados posteriormente, por esta razón se han desarrollado tecnologías que permiten realizar esta operación, como son la evaporación, la concentración por membranas y la criocentración.

La evaporación presenta retos a superar en términos del deterioro de componentes termo sensibles de los productos tratados, adicionalmente los consumos energéticos comúnmente son elevados. En contraste, se están desarrollando tecnologías de concentración que permitan una afectación mínima de la calidad de dichos productos como la criocentración y la concentración con membranas, estas tecnologías eventualmente permitirían también disminuir los consumos energéticos.

En el presente trabajo, se plantea un caso de estudio de una industria de zumo que procesa 10.000 kg/h de zumo de naranja, se plantean tres alternativas para la concentración del zumo: una evaporación con cuádruple efecto, una concentración por membranas previa a la evaporación y finalmente una etapa de criocentración previa a la evaporación. El zumo de partida tiene un contenido en sólidos de 10 °Brix y se pretende alcanzar los 75 °Brix de concentración final. En el estudio de caso se muestra una evaluación del coste de producción, centrado en análisis de consumos energéticos, mediante el acoplamiento de diferentes tecnologías de concentración.

METODOLOGÍA

A continuación se presentan la información utilizada y supuestos realizados, para estimar los costes de producción de la concentración del zumo de naranja.

Para concentrar 10.000 kg/h en una industria de zumo, se plantean tres alternativas:

- Evaporación cuádruple efecto
- Una etapa de membranas previa a la evaporación
- Una etapa de crioconcentración previa a la evaporación

El zumo de partida tiene un contenido en sólidos de 10 °Brix y se pretende alcanzar los 75 °Brix.

- Ratio evaporación: considerando un evaporador de 4 efectos el consumo de vapor estimado es 0,3 kg de vapor por cada kg de agua eliminada (Thijssen 1981; TASTE evaporator <http://www.jbtfoodtech.com>, sept. 2013). El coste de vapor utilizado obtenido a partir de gas natural para consumos industriales es de 0,038 € por kg (Eurostat 2012)

- Se estima una potencia instalada de las membranas: 30 kW. El coste de la energía eléctrica para consumos industriales es de 0,1447 €/kWh (Eurostat 2012)

En la tabla 1 se presentan los valores de flujo estimados en cada etapa, así como de concentración y sólidos totales.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Estimación del coste de cada opción

A continuación se presentan los cálculos realizados para la estimación del coste de cada una de las opciones requeridas.

Opción 1: Evaporación

- Cálculo del agua a evaporar. En el proceso actual, la evaporación es la única operación que se realiza, por lo que si se parte de un flujo inicial de 10.000 kg/h y se alcanza un concentrado de 1.330 kg/h, el agua a evaporar es de 8.670 kg/h.

- Consumo de vapor. Teniendo en cuenta que la cantidad necesaria de vapor para eliminar 1kg de agua es de 0,30 kg (a 0,038 €/kg), resulta un total de 98,8 €/h. Esto corresponde a 0,10 €/kg de concentrado de zumo a 75°Brix.

- Consumo de electricidad. Según la bibliografía consultada (Thijssen 1981), el consumo eléctrico para evaporador de 4 efectos son 8 kWh/ton agua eliminada. El agua eliminada por hora 8.670 kg, que equivale a un coste de 10 €/h. Esto corresponde a 0,010 €/kg de concentrado de zumo a 75°Brix.

- El coste energético total es por tanto de: 0,11€/kg de zumo concentrado a 75°Brix.

Opción 2: Membranas y Evaporación

- Cálculo del agua a evaporar: en este caso, si en el evaporador van 2.800 kg/h y el concentrado es de 1.327 el agua a evaporar es de 1.473 kg/h.

- Consumo de vapor: Teniendo en cuenta que la cantidad necesaria de vapor para eliminar 1kg de agua es de 0,30 kg (a 0,038 €/kg), resulta un total de 16,8 €/h. Esto corresponde a 0,017 €/kg de concentrado de zumo a 75°Brix.
- Consumo eléctrico. En total la potencia a instalar se estima en 35 kW (Molinari et al. 1995) a 0,1447 €/kWh, resulta un coste de 5,1 €/h, que corresponde a 0,006 €/kg de concentrado de zumo a 75°Brix
- Consumo de otros gastos. Se incluyen los gastos por reposición de membranas y CIP un total de 0,02 €/kg de zumo concentrado a 75°Brix.
- El coste energético total es por tanto de 0,043 €/kg de zumo concentrado a 75°Brix .

Opción 3: Crioconcentración y Evaporación

- Cálculo del agua a evaporar: si en el evaporador van 2000 kg/h y el concentrado es de 1.323 kg/h, el agua a evaporar es de 677 kg/h.
- Consumo de vapor: Teniendo en cuenta que la cantidad necesaria de vapor para eliminar 1kg de agua es de 0,30 kg (a 0,038 €/kg), resulta un total de 7,72 €/h. Esto corresponde a 0,0078 €/kg de concentrado de zumo a 75°Brix.
- Consumo de electricidad. Según la bibliografía consultada (Thijssen 1981; Scholz 2001), el consumo eléctrico para FC 4 etapas y condensación +35°C se estima en 85 kWh/ton agua eliminada. El agua eliminada por hora 8000 kg, que equivale a un costo de 98,4 €/h. Esto corresponde a 0,099 €/kg de concentrado de zumo a 75°Brix.
- El coste energético total es por tanto de 0,107 €/kg de zumo concentrado a 75°Brix.

RESULTADOS COMPARATIVOS

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados obtenidos:

Como se puede comprobar en los resultados, el ahorro energético que resultaría de aplicar el pretratamiento con membranas sería de un 60%. Este resultado coincide con la bibliografía consultada, siendo la tecnología de membranas la que menor consumo energético por kg de concentrado obtiene.

En relación a la crioconcentración, el ahorro estimado es mucho menor (3%), debido básicamente al alto coste de operación del proceso.

CONCLUSIONES

No existe una tecnología óptima para todos los procesos. El resultado depende de las características del producto a tratar. La característica más significativa para escoger la tecnología a aplicar es la concentración que se desea alcanzar, la calidad del producto y el coste del proceso.

La evaporación es la tecnología que alcanza concentraciones más elevadas. La desventaja principal es la degradación térmica del producto. Es también la tecnología más madura y optimizada mediante el uso del múltiple efecto y la recompresión mecánica de vapor.

La ventaja principal de las membranas es que no existe un cambio de fase durante el proceso.

La criocentración es una tecnología joven que alcanza concentraciones elevadas sin mermar las características del producto. La desventaja principal de esta tecnología está en la baja disponibilidad de equipos comerciales y que éstos están protegidos por patentes.

BIBLIOGRAFÍA

Thijssen, H.A.C. and Van Der Malen, B. 1981. Implications on quality of energy savings in the concentration of foods. *Resources and Conservation* 67: 287-299.

Lemmer, S., Kolmp, R., Ruemekorf, R. and Scholz, R. 2001. Preconcentration of Wastewater through the Niro Freeze Concentration Process. *Chem. Eng. Technol.* 24, (5): 485-488

Molinari, R., Gagliardi, R., and Drioli, E. 1995. Methodology for estimating of primary energy with membrane operations in industrial processes. *Desalination.* 100: 125-137

Tabla 3.- Datos del proceso de concentración

	Alimentación	Concentrado
Flujo total (kg/h)	10.000	1.330
Sólidos totales (°Brix)	10	75
Sólidos totales (kg/h)	1.000	997,5

Tabla 4.- Parámetros de la planta de ósmosis inversa y evaporación

MEMBRANAS + EVAPORACIÓN	Alimentación	UF retentado	UF permeado	OI retentado	OI permeado	Evaporador	Concentrado
Flujo total (kg/h)	10.000	1.000	9.000	1.800	7.200	2.800	1.327
Sólidos totales (°Brix)	10	37	7	35	0,1	35,5	75
Sólidos totales (kg)	1.000	370	630	625	7,2	995	995

Tabla 5.- Parámetros de la planta de crioconcentración y evaporación

CRIOCONCENTRACIÓN + EVAPORACIÓN	Alimentación	Hielo eliminado	Evaporador	Concentrado
Flujo total (kg/h)	10.000	8.000	2.000	1.323
Sólidos totales (°Brix)	10	0,1	49,5	75
Sólidos totales (kg)	1.000	8	992	992

Tabla 6.- Comparación de consumo por kg de concentrado

Tecnología	Consumo (€/kg concentrado)	Ahorro energético
Evaporación	0,11	-
Membranas + Evaporación	0,043	60 %
Crioconcentración +Evaporación	0,107	3 %

MODELO CONCEPTUAL DE LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES EN MUESTRAS DE ZANAHORIA

Angiorama, Marina¹, Roda, Fernando^{1,3}, Patti, Miguel¹, Salvia, Romina¹, Ybalo, Carolina¹ Y Lima, Julio^{1,2}

¹ Facultad de Química, Universidad del Centro de Estudios Latinoamericano, Av. Pellegrini 1332, (2000) Rosario, Argentina

² Carrera de Ingeniería en Alimentos, ECANA, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, Sáenz Peña 456, (6000) Junín, Argentina

³ CIFASIS - CONICET, 27 de Febrero 210 bis, (2000) Rosario, Argentina

INTRODUCCIÓN

Con frecuencia, los protocolos experimentales involucrados en la investigación biotecnológica se presentan en forma poco descriptiva y con escasa información. Con el aumento de la complejidad en los métodos experimentales, las especificaciones de las técnicas de laboratorio se vuelven más extensas e intrincadas. Si los técnicos expertos no están presentes, los laboratorios encuentran dificultades para monitorizar el funcionamiento de las distintas operaciones que se realizan. Por ello, hay una creciente necesidad de representar estos protocolos en una forma no ambigua, eficiente y suficientemente detallada como para que agentes no expertos puedan replicar y supervisar las acciones originales (Klingström et al., 2013).

La Ingeniería de Conocimiento desempeña en este sentido un papel clave al ofrecer métodos y criterios para gestionar eficientemente el conocimiento de dominio (Studer et al., 2000). Se propone abordar esta problemática mediante el diseño de un Sistema Experto, un sistema de información que facilita la gestión y explotación del conocimiento propio de la experiencia humana. Los sistemas expertos se desarrollan para solucionar problemas de distintos orígenes, capturando la destreza de consultores expertos. Como el término "experto" es sinónimo de competencia y especialización, el éxito de un sistema de este tipo se debe a que solamente trata un dominio limitado (Hayes-Roth et al., 1983; Buchanan y Shortliffe, 1985).

El aspecto fundamental para el éxito de un sistema experto es realizar, en forma correcta, la conceptualización de la "experticia" del técnico en forma de Mapas de Conocimientos. La posterior transformación de dichos Mapas en un modelo formal adecuado a un paradigma de programación, permite plasmar un sistema de este tipo.

Los sistemas expertos se desarrollaron con mayor o menor éxito durante los últimos treinta años. En la actualidad suelen aplicarse a los sistemas industriales, por lo común en

conjunto con otras técnicas de Inteligencia Artificial como las redes neuronales y los algoritmos genéticos. En muchos casos se integran a grandes sistemas de información industrial y hay un importante número de aplicaciones para detección y diagnóstico de fallas, monitorización y control de procesos industriales y procedimientos de laboratorio. Los sistemas expertos son realmente positivos cuando se los entiende como complementos de la tarea de los expertos humanos y no como reemplazantes de ellos (Nurminen et al., 2003).

Cuando un experto realiza su tarea, pone en juego sus conocimientos, los cuales son de dos tipos: los “públicos” como es el conocimiento de la tecnología y de los detalles técnicos de los equipos y el proceso, y los “privados”, generados por sus experiencias y que constituyen la heurística de su tarea (Gómez et al., 1997). Dentro de ellos hay conceptos o elementos principales por donde versa toda su tarea y otros elementos secundarios ligados a los anteriores.

El objetivo de este trabajo fue lograr la modelización conceptual de la monitorización de operaciones de laboratorio a partir de los conocimientos propios de un técnico experto en dichas tareas utilizando técnicas de Ingeniería del Conocimiento. La actividad principal fue lograr la identificación de los puntos en los cuales pueden producirse fallas en el desarrollo analítico, tal como lo hace el experto, en el marco de los principios del análisis químico y siguiendo una metodología genérica de conceptualización propuesta por el Ingeniero del Conocimiento. El equipo multidisciplinario de expertos y profesionales informáticos aplicó el enfoque a un protocolo de determinación analítica del contenido de azúcares en muestras de zanahorias.

METODOLOGÍA

Para realizar el trabajo se utilizó la Metodología de desarrollo de Sistemas Basados en Conocimientos denominada I.D.E.A.L. Esta metodología es apta para la generación de modelos computacionales con requisitos abiertos y diversidad, reutilizables e integrables (Gómez et al., 1997) y plantea las distintas etapas a seguir para desarrollar un sistema de este tipo. De ellas, se realizaron las más singulares: la adquisición y la conceptualización de los conocimientos que domina el experto (Lima, 2012).

La determinación analítica de la concentración de azúcares en muestras de zanahorias se realiza mediante una determinación colorimétrica utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (Martínez Trujillo, 2003). La primera tarea del procedimiento de determinación de azúcares consiste en la preparación de muestras a partir del material inicial (en este caso jugo de zanahorias). De la muestra preparada se separan dos partes que se procesan en forma distinta:

una de ellas para determinar la concentración de azúcares reductores y la otra para poder determinar la concentración total de azúcares (azúcares reductores y no reductores en conjunto) mediante la transformación de los azúcares no reductores a reductores. Luego se someten ambas a una reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), un compuesto de color amarillo-naranja, que en medio alcalino se transforma en ácido diaminosalicílico (DAS) de color rojo, gracias a la acción de azúcares reductores. La cantidad de DNS que se transforma en DAS es proporcional a la concentración de azúcares reductores en el medio de reacción, y se obtiene a partir de la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. Para la Adquisición del Conocimiento así como para precisar la Definición del Problema se realizaron numerosas entrevistas con el técnico experto en el procedimiento de análisis. A la vez, se adquirieron los conocimientos públicos acerca de las técnicas analíticas utilizadas (Rubinson y Rubinson, 2001). La conceptualización de la tarea realizada por el experto se concretó en un Modelo Conceptual que se corresponde con la estructura y la funcionalidad conceptual del sistema. Ese modelo se plasmó en el Mapa de Conocimientos del comportamiento del Experto en la detección de fallas producidas durante las distintas etapas del procedimiento analítico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La conceptualización se desarrolló en dos etapas, una de Análisis y una de Síntesis. Durante la primera etapa se identificaron los conocimientos estratégicos, tácticos y fácticos utilizados por el experto cuando realiza la tarea de monitorización del procedimiento. Además se identificaron las formas mediante las cuales el experto usa esos conocimientos para tomar una decisión (metaconocimientos). El experto seguía una metodología conservativa en la detección de fallas por la cual, la presunción de falla era considerada como una falla real. Esto permitió simplificar la incertidumbre lógica de los conocimientos fácticos.

Durante la segunda etapa se obtuvieron dos modelos, uno Estático y otro Dinámico, que se corresponden con la estructura y la funcionalidad conceptual del sistema. Los conocimientos obtenidos se registraron mediante documentos gráficos. En el Modelo Estático, se identificaron siete conceptos (*MATERIA PRIMA, MATERIAL EN ANALISIS, OPERACION, REACTIVO, ELEMENTO, DETERMINACION, SERVICIO*), los cuales se definieron con alta precisión en un Diccionario de Conceptos y se caracterizaron totalmente en una Tabla Concepto-Atributo-Valor. Se estableció el Modelo Relacional (Figura 1), donde se determinaron las relaciones existentes entre los conceptos identificados y se realizó un Glosario de Términos, donde se explicita la terminología específica que utiliza el experto

durante su tarea. Los conocimientos estratégicos se documentaron en forma gráfica como pasos de distinto nivel a partir de un Arbol de Descomposición Funcional. Los conocimientos tácticos se documentaron mediante seudorreglas y los conocimientos fácticos puestos en juego durante la tarea se documentaron mediante Tablas de descripción de atributos. El Modelo Dinámico incluyó todas las tareas y procesos que, actuando sobre el modelo anterior, constituyeron el modelo funcional de comportamiento del experto. El Modelo se documentó mediante gráficas donde se explicitaron la jerarquía de las distintas tareas y mediante tablas donde dichas tareas quedaron definidas y descriptas en su totalidad. Para cada tarea se definió el proceso necesario para realizarla. Por último, el Modelo Conceptual completo del comportamiento del experto se integró en un mapa de conocimientos. En la Figura 2 se muestra el Mapa de Conocimientos del contexto de la verificación de la determinación del contenido de azúcares.

El Modelo obtenido fue evaluado por el experto en numerosas oportunidades y corregido en función de los errores detectados en cada caso. En varias sesiones de adquisición de conocimientos, el experto evaluó la representación de los conocimientos estratégicos que eran propios al desempeño de su tarea. Analizó especialmente que no hubiese omisión de las tareas y también la priorización de algunas de ellas. Se validó del Árbol de Descomposición Funcional y de cada uno de los pasos y subpasos que lo componen. Con respecto al análisis de los conocimientos y metaconocimientos tácticos, el grupo de trabajo conformado por los Ingenieros del Conocimiento y el experto, realizaron una revisión de todas las seudorreglas planteadas. La metodología que se siguió fue la siguiente: el experto fue planteando posibles situaciones y luego se evaluó si, ante un dado caso, las representaciones definidas se correspondían con las tácticas que él hubiese realizado. El resultado fue satisfactorio. Una vez lograda la especificación de los conocimientos fácticos, junto con el experto se realizaron revisiones exhaustivas de las definiciones logradas a fin de asegurar su calidad, tanto en lo referente a la completitud, como a la claridad de las mismas.

CONCLUSIONES

La fidelidad del Modelo Conceptual es determinante para el éxito de estos sistemas y por lo tanto merece especial atención. El Modelo obtenido se considera completo y correcto. El dominio de la aplicación no presentó características complejas, y hubo repetitividad de ciertos elementos en la determinación (pipetas, uso de la estufa, etc.). Esto permitió que rápidamente se interpretara la problemática, se extrajeran los conocimientos básicos y se

establecieran las relaciones existentes entre ellos.

Sobre la base del Modelo obtenido, se está en condiciones de avanzar hacia la implementación de un primer prototipo de Sistema Experto. Esto no es difícil, ya que el modelo ha sido construido para facilitar una programación orientada a objetos sobre una plataforma comercial afín al desarrollo de sistemas basados en conocimientos. Otra actividad mucho más simple es la implementación de un Manual sobre papel o un software interactivo, para seguir el desarrollo de la determinación química analizada, utilizable cuando el experto no se encuentra disponible para hacer esa tarea. Consistiría en una guía, con la cual y sobre una serie de hechos obtenidos en forma experimental, se puede llegar a inferir si se produce alguna falla en el procedimiento.

Por último, se destaca que el modelo obtenido es un elemento reusable para otros estudios analíticos similares, adecuándolo a la situación en cuestión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buchanan, B.; Shortliffe, E., *Rule-Based Expert Systems*, Ed. Addison Wesley (1985)
- Gómez, A.; Juristo, N.; Montes, C.; Pazos, J., *Ingeniería del conocimiento*, Ed. CEURA (1997)
- Hayes-Roth, F.; Waterman, D.; Lenat, D., *Building Expert Systems*, Ed. Addison Wesley (1983)
- Klingström, T.; Soldatova, L.; Stevens, R.; Roos, T.; Swertz, M.; Müller, K.; Kalaš, M., *Workshop on Laboratory Protocol Standards for the Molecular Methods Database*, New biotechnology 30 (2), 109–13 (2013)
- Lima, J., *Ingeniería de Conocimiento y Producción de Mermeladas*, Edit. EAE (2012)
- Martínez Trujillo, M., *DNS: una técnica de cuantificación de azúcares reductores empleada en el laboratorio de catálisis enzimática del TESE*, Tecnocultura 6, 7-9 (2003)
- Nurminen, J.; Karonen, O.; Hätönen, K., *What makes expert systems survive over 10 years*, Expert Systems with Applications 24 (2), 199-211 (2003)
- Rubinson, K.; Rubinson, J., *Análisis Instrumental*, Pearson Educación SA, 92-115, 280-332 (2001)
- Studer, R.; Decker, S.; Fensel, D.; Staab, S., *Situation and Prospective of Knowledge Engineering* (En Cuenca, J.; Demazeau, Y.; Garcia, A.; Treur, J. (Eds.), *Knowledge Engineering and Agent Technology*, IOS Series on Frontiers in Artificial Intelligence and Applications: 52, IOS Press (2000)

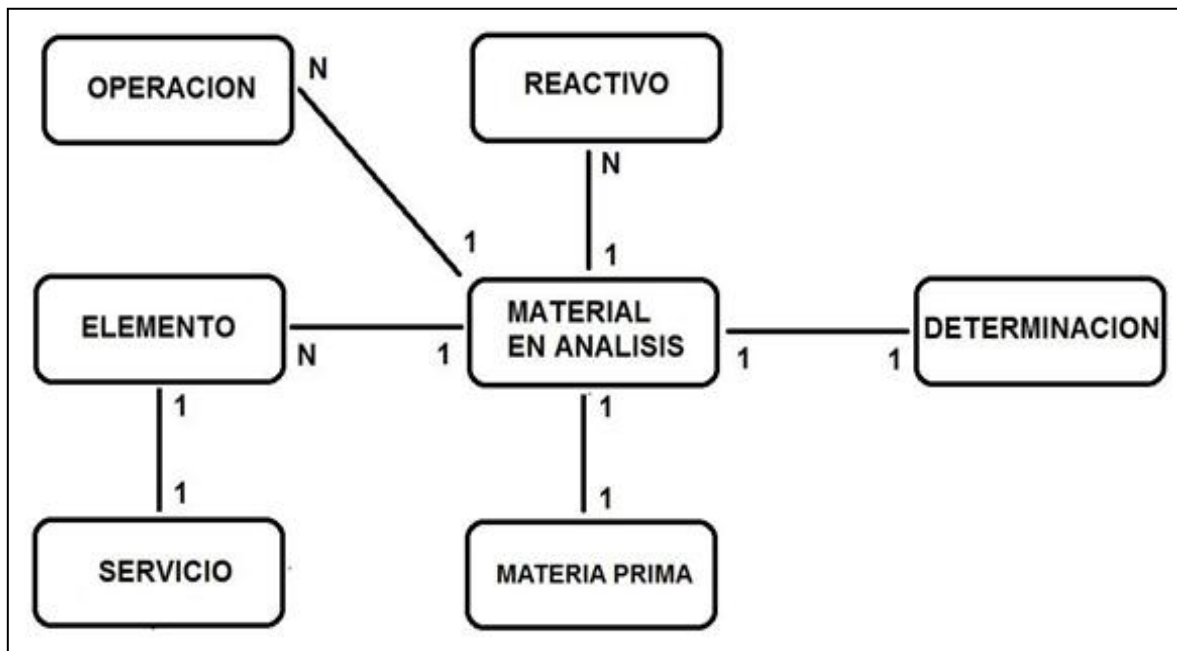


Figura 1: Modelo Relacional

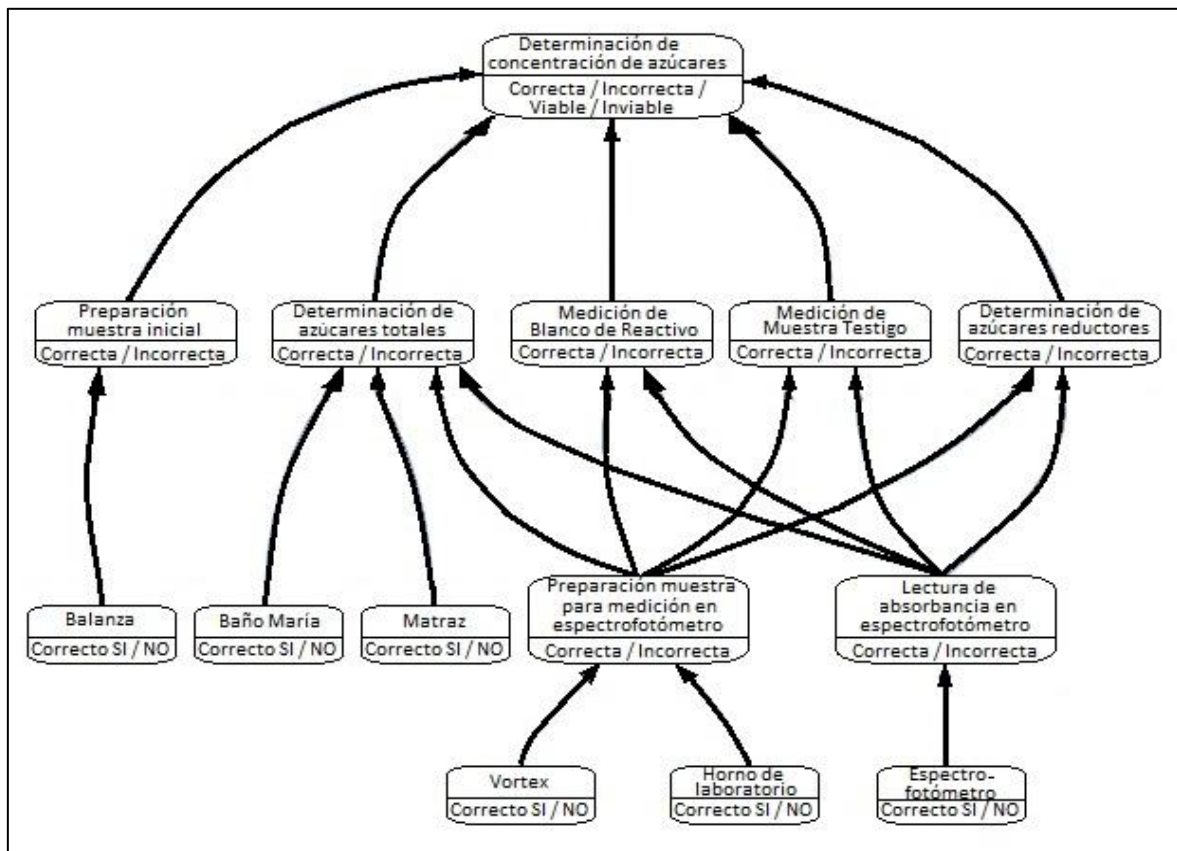


Figura 2: Mapa de Conocimientos del contexto

PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP. EM CORTES DE FRANGOS PROCEDENTES DO MAIOR EXPORTADOR MUNDIAL DE CARNE DE AVES – BRASIL

Brizio, A.P.D.R¹; Fagundes, G. A¹

¹Laboratório 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

1 INTRODUÇÃO

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2012) a carne de frango tem se consolidado como uma das mais importantes fontes de proteína animal para a população brasileira, onde o consumo per capita atingiu 44Kg em 2011, apresentando um incremento de 5,6% em relação ao ano anterior. Associado a isso, houve um aumento de 11,4% na produção de carne de frango no Brasil, o que garantiu a terceira posição no ranking mundial entre os países produtores e a primeira em exportação.

Estas informações evidenciam a importância da produção avícola para o mercado brasileiro de carnes. Juntamente com o aumento desta produção, ressaltam-se as crescentes exigências do mercado consumidor com relação à segurança do produto ofertado.

De acordo com Kich *et al.* (2011), qualidade e segurança no processamento industrial é o grande interesse de produtores, consumidores e fiscais em saúde pública no mundo inteiro. A avicultura brasileira, por sua vez, tem se mostrado atenta a estas exigências de mercado, preocupando-se com os aspectos nutricionais e higiênico-sanitário dos alimentos.

No entanto, apesar dos avanços tecnológicos, a carne de aves ainda é passível de contaminação bacteriana por determinados micro-organismos causadores de zoonoses em alimentos. A *Salmonella* spp. é um dos principais micro-organismos patogênicos que podem contaminar a carne de frango, pois o trato intestinal das aves é um dos reservatórios naturais desse tipo de organismo (SILVA; GIBBS, 2012).

A determinação deste patógeno é uma ferramenta essencial para a avaliação de perigos e o posterior estudo dos riscos associados ao consumo de produtos avícolas. Nesse sentido, esta pesquisa busca avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em cortes de frango congelados procedentes da exploração industrial do Brasil.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta investigação foi desenvolvida em abatedouros de aves, todos exportadores (com Serviço de Inspeção Federal – SIF), localizados no sul do Brasil.

Pesquisou-se a presença de *Salmonella* spp. em um total de 176 amostras de cortes de frango congelados (asa, coxa, sobrecoxa e peito de aves) no período de janeiro de 2013 e agosto de 2013.

As amostras foram colhidas semanalmente após a saída do sistema de congelamento, em embalagens primárias originais de cada empresa, sendo imediatamente colocadas em caixas térmicas com gelo para o envio ao laboratório.

As análises de detecção de *Salmonella* spp. foram realizadas em triplicata para cada amostra, segundo metodologia descrita pela *American Public Health Association* - APHA (2001), com modificações pertinentes relacionadas à substituição do caldo de pré-enriquecimento por água peptonada tamponada 1%.

Amostras de 25 gramas foram adicionadas a 225mL de água peptonada tamponada 1%, homogeneizadas e incubadas a $41 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1mL das amostras para 10mL de caldo tetracionato-verde brilhante (Merck, Alemanha) e para 10mL para caldo Selenito Broth (Merck, Alemanha) e incubadas a $41 \pm 2^\circ\text{C}$ durante de 24 horas. A partir desses caldos, realizou-se o plaqueamento em diferentes meios de cultura: Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT-4 Merck, Alemanha) e Mac-Conkey (Merck, Alemanha), sendo incubados a 37°C durante 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos utilizando-se ágar lisina descarboxilase (LIA), ágar tríplice açúcar ferro (TSI), caldo uréia e meio SIM (SIM Medium). O resultado foi expresso como presença ou ausência de *Salmonella* spp.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma das amostras de cortes de frango congelados apresentou presença para *Salmonella* spp. Resultados diferentes foram relatados por outros pesquisadores no sul do Brasil, como Medeiros *et al.* (2011) que avaliaram carcaças e cortes congelados de frango em 15 estados brasileiros e obtiveram 3,8% (7/180) de positividade para *Salmonella* spp. no Estado do Rio Grande do Sul; Borsoi *et al.* (2010) estudaram a incidência do patógeno em produtos avícolas provenientes do varejo da região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul e encontraram 12,2% (22/180) de *Salmonella* spp.; e Conceição *et al.* (2007) que quantificaram *Salmonella* spp. em produtos avícolas oriundos da cidade de Pelotas/RS/Brasil e encontraram 15,8% (7/120) de positividade nas suas amostras.

Estudos realizados por Mani-López *et al.* (2012) e Funk *et al.* (2001) mostram que as principais razões para a baixa prevalência de *Salmonella* spp. em produtos avícolas esta na identificação de meios para reduzir ou eliminar o patógeno antes do abate das aves, e nas

medidas de controle tomadas para diminuir a contaminação cruzada durante o processamento destas aves.

Conclusões que corroboram com os dados disponibilizados pelo Serviço de Inspeção dos Estados Unidos (FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, 1990), os quais relatam que pesquisas realizadas em diferentes abatedouros localizados nos Estados Unidos da América mostraram que antes do abate, a incidência média de *Salmonella* spp. nas aves vivas foi de 5% e, após a etapa final do processamento dos produtos esta contaminação aumentou para valores de quantificação próximos de 36%.

A ausência do patógeno nas amostras avaliadas sugere que os estabelecimentos amostrados nesta pesquisa realizam a aplicação eficaz de programas de qualidade em suas granjas e incubatórios de criação de aves, assim como, a aplicação de controles de processo que visam cuidados higiênico-sanitários durante o abate das aves e o processamento dos seus produtos derivados.

4 CONCLUSÕES

A ausência de *Salmonella* ssp. nas amostras de cortes de frango congelados analisadas indicam que as empresas brasileiras amostradas cumprem com os preceitos das boas práticas de fabricação, elaborando produtos que não representam risco à saúde dos consumidores. No entanto, a variação de resultados entre outros estudos de quantificação do patógeno em produtos avícolas tornam relevante o seu contínuo monitoramento.

5 REFERÊNCIAS

American Public Health Association (Apha). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4thEd., APHA International, Washington. DC, 2001.

Borsoi, A.; Moraes, H.L.S.; Salle, C.T.P.; Do Nascimento, V.P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*, v.40, n.11, p.2338-2342, 2010.

Conceição, R.C.S.; Hentges, A.; Moreira, A.N.; Vasconcellos, F.A.; Ângelo, I.M.R.; Carvalho, J.B.; Aleixo, J.A.G.; Timm, C.D. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.66, n.1, p.31-34, 2007

Funk, J.A.; Davies P.R.; Nichols, M.A. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology*, v.83, p.45-60, 2001.

Kich, J.D.; Coldebella, A.; Morés, N.; Nogueira, M.G.; Cardoso, M.; Fratamico, P.M.; Call, J.E.; Fedorka-Cray, P.; Luchansky, J.B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility

in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p.307-313, 2011.

Mani-López, E.; García, H. S.; López-Malo, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, v.45, p.713-721, 2012.

Medeiros, M.A.N.; Oliveira, D.C.N.; Rodrigues, D.P.; Freitas, D.R.C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Revista Panameña de Salud Publica*, v. 30, n. 6, 2011

Silva, F.V.M.; Gibbs, P.A. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, v.45, p.695-699, 2012.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2011/2012. Disponível em: http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php. Acesso em: 29 de maio de 2013.

MODELAMIENTO POR LÓGICA DIFUSA DE LA PREFERENCIA Y ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE CORAZONES DE ALCAHOFA (*Cynara scolymus* L.) MARINADAS EN CONSERVA

Víctor Vásquez-Villalobos⁽¹⁾, Julia Vásquez Angulo⁽¹⁾, Eduardo Méndez Reyna⁽¹⁾

¹ Escuela de Ing. Agroindustrial. Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

INTRODUCCIÓN

El análisis sensorial es una ciencia interdisciplinaria a través del cual los panelistas utilizando complejas interacciones de los sentidos, pueden determinar la preferencia o aceptabilidad de los productos. Su evaluación está basada en respuesta a estímulos cuyas sensaciones son: intensidad, magnitud, duración, calidad, placer o descontento. Los estímulos pueden ser cuantificados por métodos físico-químicos y las sensaciones por procesos psicológicos (Cavalcanti *et al.*, 2013). La evaluación es realizada por medio de los órganos sensoriales, obteniéndose información que es generalmente vaga e imprecisa y dependiendo de los sentidos y conocimiento sobre las características evaluadas, puede ser distinta. Uno de los grandes problemas asociados al análisis sensorial es conseguir que la respuesta humana sea precisa y se pueda determinar cuantitativamente. Espinilla *et al.* (2008) sostienen que este problema puede mejorarse modelando la información sensorial de forma cualitativa mediante etiquetas lingüísticas, la que ha producido buenos resultados a la hora de modelar la información cualitativa en diversos campos de aplicación. Mukhopadhyay *et al.* (2013) por otro lado manifiestan que la percepción humana es siempre difusa y la opinión de los evaluadores es lingüística. Por lo que resulta más realista llevar a cabo evaluaciones usando variables lingüísticas en lugar de valores numéricos.

Zadeh (1965) fue el primero en divulgar una novedosa forma de caracterizar incertidumbres no probabilísticas, al cual le llamó “Lógica Difusa” (LD), que encarna la naturaleza de la mente del ser humano y la cual contrasta con la tradicional lógica booleana. Un sistema difuso, se basa en un conjunto difuso, pertenencia o membresía difusa y variables difusas. El sistema consta de un fuzificador, una base de conocimiento (reglas de base), un motor de inferencia y un defuzificador. La base del conocimiento es una colección de reglas difusas “si-entonces”. El término LD denota un enfoque de modelado, donde se describen las dependencias funcionales entre las variables de entrada y salidas, mediante el conjunto de reglas y siguiendo el razonamiento con los operadores de intersección (AND), unión (OR) y negación (NOT). El dominio de los valores de entrada y salida se subdividen en

conjuntos difusos de acuerdo a estimaciones razonablemente tecnológicas. La fuzificación significa que el grado de membresía de un determinado valor de entrada al conjunto difuso es calculado (Inan *et al.*, 2011).

La aplicación de los conceptos difusos en el área de la evaluación sensorial es relativamente reciente. Los usos de la LD en el control de la calidad en los alimentos, destacan tres áreas: (i) la representación de la evaluación sensorial realizada por un equipo, operador o consumidor; (ii) la medida indirecta de las propiedades en los alimentos y (iii) el diagnóstico, la supervisión y el control de la calidad (Ávila-de Hernández y González-Torrivilla, 2011).

El razonamiento difuso ha sido aplicado a la evaluación sensorial de paneles, así como al control de calidad relacionados al proceso de alimentos y aspectos sensoriales. Las respuestas correspondientes a atributos sensoriales como el aspecto, sabor y firmeza, pueden ser transformadas a conjuntos difusos y manipuladas de acuerdo a la matemática difusa o borrosa (Mohammadi *et al.*, 2011).

Dentro de este contexto la presente investigación tuvo como objetivos modelar por LD la preferencia sensorial (*ps*) y la Vida Útil de la Aceptabilidad Sensorial (VUAS) de corazones de alcachofa marinadas en conserva por pruebas aceleradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Corazones de alcachofa variedad Imperial Star, aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), aceite de soya (*Glycine max*), aceite de oliva extravirgen (*Olea europea*), especias (Italian season y paprika), frascos de vidrio de 250 mL, vinagre al 10% (pH: 2.4), autoclave horizontal de 17 m³ y el software Matlab 7.0.

Métodos: Corazones de alcachofa de diámetro 6.55±2.05 cm fueron cortadas en cuatro partes simétricas, escaldadas en una solución con vinagre (pH 3.15±0.35) por 10 minutos, a una temperatura de 87.5 ±3.5°C. Después de colocarse en los envases se adicionó 20 mL de aceite vegetal con 0.35 g de especias, asegurándose un peso de 117.5±3.5 g; luego se agregó líquido de gobierno (agua: 83%, vinagre: 15% y sal: 2%) a una temperatura de 87.5±3.5°. La adición del aceite vegetal fue de cinco proporciones (mL) con: sacha inchi SI, aceite de soya S y aceite de oliva O, de acuerdo a T1 (SI:15, S:5, O:0), T2 (SI:10, S:10, O:0), T3 (SI:10, S:5, O:5), T4 (SI:5, S:15, O:0), T5 (SI:2, S:12, O:6). Las conservas se pasteurizaron a 100°C por 15 minutos, tomando como referencia al *Clostridium pasteurianum*, y se almacenaron 22 °C y 65% HR durante 10 días.

Análisis sensorial por la prueba de Ordenamiento o Ranking: Se realizó por un panel semi-entrenado de 15 personas, para conocer la mayor preferencia tanto para sabor (s) del producto como de la transparencia del líquido de gobierno (t). Las muestras fueron ordenadas acuerdo a su preferencia, de menor a mayor (escala de 1 al 5).

Evaluación de la preferencia sensorial (ps) con LD: Se utilizó la interface gráfica del *Fuzzy Logic Toolbox* de Matlab. La ps fue evaluada a través por dos operaciones difusas de intersección (AND) y unión (OR) del s y t respectivamente. Se aplicó funciones de pertenencia triangular en todos los casos, utilizándose el método de *Mamdani* para la defuzificación. Según Amelia (2012) los modelos expertos difusos utilizan el enfoque *Mamdani*, señalando que en comparación con el modelo Takagi-Sugeno-Kang, el enfoque *Mamdani* es mejor para descubrir el conocimiento humano comprensible.

Las funciones de pertenencia para el s fue: desagradable (0, 0, 1.25), poco desagradable (0, 1.25, 2.5), no agradable/no desagradable (1.25, 2.5, 3.75), poco agradable (2.5, 3.75, 5), agradable (3.75, 5, 5); para la t fueron: turbio (0, 0, 1.25), casi turbio (0, 1.25, 2.5), turbio/claro (1.25, 2.5, 3.75), casi claro (2.5, 3.75, 5), claro (3.75, 5, 5); y para la ps fue: muy baja (0, 0, 1.25), baja (0, 1.25, 2.5), media (1.25, 2.5, 3.75), alta (2.5, 3.75, 5), muy alta (3.75, 5, 5). La defuzificación de la ps se realizó a través de 25 reglas lingüísticas.

Estimación de Vida Útil de Aceptabilidad Sensorial (VUAS) por pruebas aceleradas: La conserva con mayor ps fue sometida a tres temperaturas: 37, 49 y 55°C y evaluadas de acuerdo a su Aceptabilidad Sensorial (AS) mediante una prueba de escala no estructurada en cuanto al s , en una escala de “me desagrada” a “me agrada” (0 a 10) y en cuanto a t desde una escala de “turbio” a “claro” (0 a 10). Para esta evaluación participaron los mismos panelistas semi-entrenados.

Estimación de VUAS por pruebas aceleradas con LD: Se evaluó con la operación difusa de intersección (AND) el s y la t respectivamente, utilizándose un universo del discurso 0 a 10, con funciones de pertenencia triangular para s y t . Las funciones de pertenencia para el s fue: desagradable (0, 0 2.5), poco desagradable (0, 2.5, 5), no agradable/no desagradable (2.5 5 7.5), poco agradable (5, 7.5, 10), agradable (7.5, 10, 10). Para la t fueron: turbio (0, 0 2.5), casi turbio (0, 2.5, 5), turbio/claro (2.5, 5, 7.5), casi claro (5, 7.5, 10), claro (7.5, 10, 10). Para la AS la función de pertenencia fue igualmente triangular, con un universo del discurso de 0 a 5 de acuerdo a: muy baja (0, 0, 1.25), baja (0, 1.25, 2.5), media (1.25, 2.5, 3.75), alta (2.5, 3.75, 5), muy alta (3.75, 5, 5), La defuzificación de la AS se realizó igualmente a través de 25 reglas lingüísticas. Posteriormente la AS se ajustó en función del tiempo a una cinética de orden cero cuyas ecuaciones sirvieron para determinar la VUAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis sensorial: En la Tabla 1 se observa las calificaciones de los panelistas para la prueba Ranking con respecto a la transparencia (t) y sabor (s), así como los resultados obtenidos para la preferencia sensorial (ps) empleando la LD. La intersección difusa (Figura 1) presento el mejor desempeño para el modelamiento, obteniéndose el mejor valor de ps de 3.30 para el tratamiento T3 ($p < 0.05$) (conserva con 50% de sachá inchi, 25% de aceite de oliva y 25% de aceite de soya), el que coincidentemente muestra en la prueba Ranking para la t y s , un promedio de 4.27 y 3.93 respectivamente (Rojas, *et al.*, 2011). Con la unión difusa (Figura 2) se obtuvo un valor menor de ps de 2.47 para el tratamiento T3 y en este sentido la intersección difusa muestra un resultado más consistente. El Test de Ordenamiento o Ranking es un método de respuesta subjetiva, que permite seleccionar las mejores muestras, sin proporcionar información analítica sobre ellas y constituye un excelente pre-entrenamiento para los panelistas (Wittig de Penna, 2001). Según Abdullah y Amad (2011) es Test Ranking es uno de los métodos de evaluación ampliamente utilizado para decidir el mejor alimento disponible en el mercado competitivo de hoy. Sin embargo, no es siempre un proceso directo, especialmente cuando se trata con lingüística difusa de evaluación múltiatributos. Singh *et al.* (2012) reportan análisis difusos a partir de atributos sensoriales, utilizando datos lingüísticos obtenidos por evaluación sensorial, utilizando la prueba Ranking con función difusa de distribución de membresía triangular.

Estimación de VUAS por pruebas aceleradas: En la Figura 3 se muestra los resultados de la AS para las pruebas aceleradas evaluadas por LD, las cuales se ajustaron para una cinética de orden cero, obteniéndose valores de R^2 de 0.9719, 0.8525 y 0.878 para las temperatura de 37, 49 y 55°C respectivamente. Las evaluaciones se detuvieron después de sobrepasar el límite del contenido del Índice de Peróxido (IP) de 15 meq de O_2 activo/kg de aceite que se obtuvo a los 119, 24 y 14 días para las temperaturas de 37, 49 y 55°C respectivamente (Rojas *et al.*, 2011). Los datos obtenidos partieron de una evaluación de AS de un Test de Panel Piloto utilizando una Escala No Estructurada (ENE) para indicar una probable reacción del consumidor frente a un nuevo producto. En la ENE el juez expresa la intensidad del atributo percibido entre dos extremos, la asignación de la intensidad queda a criterio de la persona con un determinado valor (Grándes, 2008), por lo que no es expresada dentro de un rango de valoración sino como un valor puntual.

Según Mohammadi *et al.*, (2011) las formas convencionales de cuantificar y analizar las respuestas sensoriales no son confiables, debido a que los supuestos subyacentes son irrazonables e inverificables. Debido a que el razonamiento y pensamiento humano son naturalmente borrosos, se ha aplicado el concepto de conjunto difuso por un número de

investigadores en realización y análisis de las evaluaciones sensoriales humanas. Los conjuntos difusos no se limitan a un valor determinista, así pueden tener un mérito en la evaluación sensorial, porque las expresiones humanas en sentimiento para los alimentos, son más difusos que deterministas. Los conjuntos difusos proporcionan los métodos matemáticos que pueden representar la incertidumbre de la expresión de los seres humanos. Las relaciones de los conjuntos difusos son analizadas matemáticamente por razonamiento difuso.

Para un valor máximo de AS de 3.75 dentro del conjunto difuso de AS “alta” (Figura 4), se determinó un valor de vida útil de aceptación sensorial (VUAS) a 20°C de 296 días con un R^2 de 0.997, para un valor de AS de 3.125 en un conjunto difuso entre “alta e inicio de una AS media” el valor de VUAS a 20°C fue de 569 días con R^2 de 0.998. Ambos valores fueron menores que el tiempo determinado para corazones de alcachofa marinados en conserva, evaluando el IP, que fue de 892 días (Rojas, *et al.*, 2011). Al respecto Ávila-de Hernández y González-Torrivilla (2011) sostienen que los productos que se destinan a la alimentación deben cumplir parámetros de calidad microbiológicos, físicos y nutricionales. Sin embargo, el cumplimiento de estos aspectos no es suficiente. Su calidad no estará plenamente definida si a esas características no se le suman las organolépticas, y es allí donde la aceptación de un producto es un factor de decisión muy importante.

CONCLUSIONES

La intersección presentó el mejor desempeño para el modelamiento por LD, obteniéndose el mejor valor de ps global de 3.30 para el tratamiento T3 ($p < 0.05$) con 10 mL de aceite de sacha inchi, 5 mL de aceite de soya y 5 mL de aceite de oliva.

Se determinó por pruebas aceleradas y modelamiento por LD que la VUAS de corazones de alcachofa, es de 296 días a 20°C manteniendo una AS “alta” y que a los 569 días la AS cambia de “alta a inicio de una AS media”. Ambos valores fueron menores que el tiempo de 892 días determinado por pruebas aceleradas, evaluando el Índice de Peróxido.

REFERENCIAS

Abdullah, L.; Ahmad, N. 2011. Chocolate cakes preference using ranking fuzzy numbers. *Journal of Quality Measurement and Analysis*. JQMA. 7(2): 65-73.

Amelia, L. 2012. Modelling of palm oil production using fuzzy expert system. Universitas Esa Unggul. Pp. 4. Disponible en: <http://www.esaunggul.ac.id/article/modelling-of-palm-oil-production-using-fuzzy-expert-system/>

Ávila-de Hernández, R.; González-Torrivilla, C. 2011. La evaluación sensorial de bebidas a base de fruta: una aproximación difusa. *Universidad, Ciencia y Tecnología*. 15(60):171-182.

Cavalcanti1, M.; da Silva, F.; Cavalcanti, J.; Florentino, E.; Florêncio, I.; Moreira, R. 2013. Aplicação da lógica fuzzy na análise sensorial de pão de forma enriquecido. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 17(2): 208-215.

Espinilla, M.; Martínez, L.; Pérez, L.G.; Liu, J. 2008. Modelo de Evaluación Sensorial con Información Lingüística Multigranular para el Aceite de Oliva. XIV Congreso Español sobre Tecnologías y Lógica fuzzy. Pp. 249-255.

Grandés, G. 2008. Evaluación sensorial y fisicoquímica de néctares mixtos de frutas a diferentes proporciones. Universidad de Piura. Disponible en: http://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1553/ING_464.pdf?sequence=1

İnan, Ö.; Arslan, D.; Taşdemir, Ş; Özcan, M. 2011. Application of fuzzy expert system approach on prediction of some quality characteristics of grape juice concentrate (Pekmez) after different heat treatments. *J Food Sci Technol*. 48(4): 423-431.

Mohammadi, T.; Salehi, F.; Razavi, S. 2011. Sensory Acceptability Modeling of Pistachio Green Hull's Marmalade Using Fuzzy Approach. *International Journal of Nuts and Related Sciences*. 2(2): 48-55.

Mukhopadhyay, S.; Majumdar, G.C.; Goswami, T.K.; Mishra, H.N. 2013. Fuzzy logic (similarity analysis) approach for sensory evaluation of *chhana podo*. *LWT - Food Science and Technology*. 53: 204-210.

Rojas, C.; Arteaga, H.; Barraza, G.; Mendez, E.; Miano, C. 2011. Estimación de la vida útil de corazones de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) marinados en conserva y el contenido de omega 3 y omega 6. *Scientia Agropecuaria* (1): 207-211.

Singh, K.P.; Mishra, A.; Mishra, H.N. 2012. Fuzzy analysis of sensory attributes of bread prepared from millet-based composite flours. *LWT - Food Science and Technology*. 48: 276-282.

Wittig de Penna, E. 2001. Evaluación Sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/wittinge01/index.html

Tabla1. Evaluación de los panelistas de la transparencia (*t*) y sabor (*s*) de las conservas de alcachofa por la prueba Ranking y preferencia sensorial (*ps*) por intersección difusa

Panelistas	T1			T2			T3			T4			T5		
	Ranking		LD	Ranking		LD	Ranking		LD	Ranking		LD	Ranking		LD
	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>ps</i>	<i>t</i>	<i>S</i>	<i>ps</i>	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>ps</i>	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>ps</i>	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>ps</i>
1	4	1	1.22	2	3	1.98	5	5	4.6	3	2	1.98	1	4	1.55
2	1	1	1.22	4	4	3.78	3	2	1.98	5	3	3.02	2	5	2.50
3	3	1	1.22	5	4	3.78	4	5	3.78	2	2	1.98	1	3	1.25
4	3	3	3.02	4	4	3.78	5	5	4.60	1	2	1.22	2	1	1.22
5	2	1	1.22	3	5	3.02	5	2	1.98	1	3	1.25	4	4	3.78
6	2	2	1.98	3	3	3.02	5	1	1.22	4	5	3.78	1	4	1.55
7	3	1	1.22	2	3	1.98	5	5	4.60	4	4	3.78	1	2	1.22
8	4	2	1.98	3	4	3.02	5	5	4.60	2	1	1.22	1	3	1.25
9	2	3	1.98	3	4	3.02	4	5	3.78	5	1	1.22	1	2	1.22
10	3	4	3.02	4	3	3.02	4	5	3.78	2	2	1.98	1	1	1.22
11	3	2	1.98	2	3	1.98	4	5	3.78	5	1	1.22	1	4	1.55
12	1	1	1.22	3	3	3.02	4	2	1.98	5	5	4.60	2	4	1.98
13	1	2	1.22	2	4	1.98	4	5	3.78	5	3	3.02	3	1	1.22
14	3	1	1.22	5	5	4.60	2	4	1.98	1	3	1.25	4	2	1.98
15	4	1	1.22	3	5	3.02	5	3	3.02	1	4	1.55	2	2	1.98
Promedio	2.6	1.73	1.66	3.2	3.8	3.00	4.27	3.93	3.30	3.07	2.73	2.20	1.8	2.8	1.70

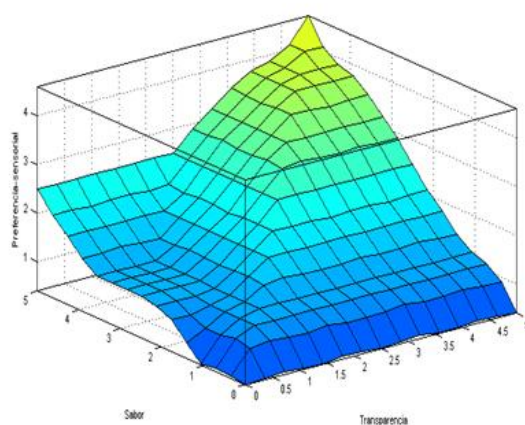


Figura 1. Superficie de respuesta de la preferencia sensorial (*ps*) por intersección difusa de sabor (*s*) y transparencia (*t*).

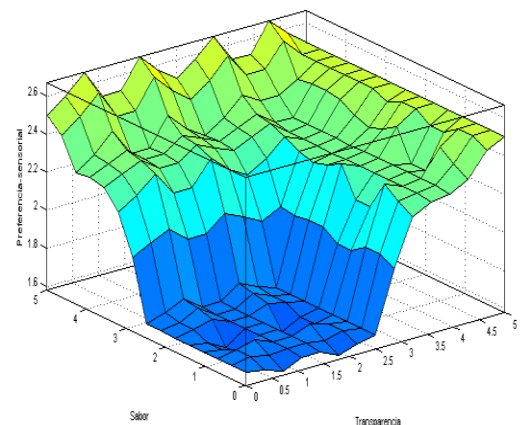


Figura 2. Superficie de respuesta de la preferencia sensorial (*ps*) por unión difusa de sabor (*s*) y transparencia (*t*).

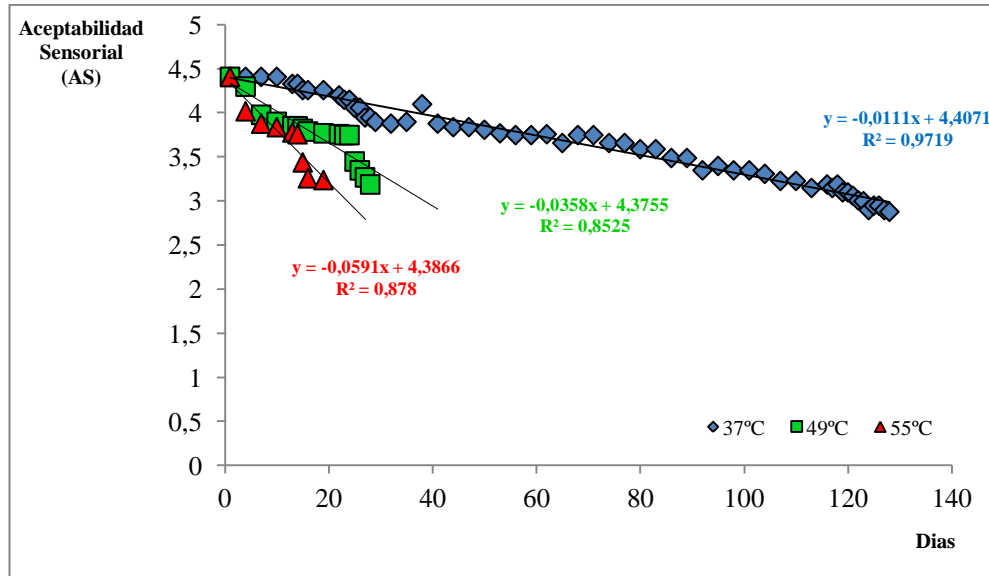


Figura 3. Cinética de orden cero de la Aceptabilidad Sensorial (AS) en pruebas aceleradas en corazones de alcachofa marinados en conserva.

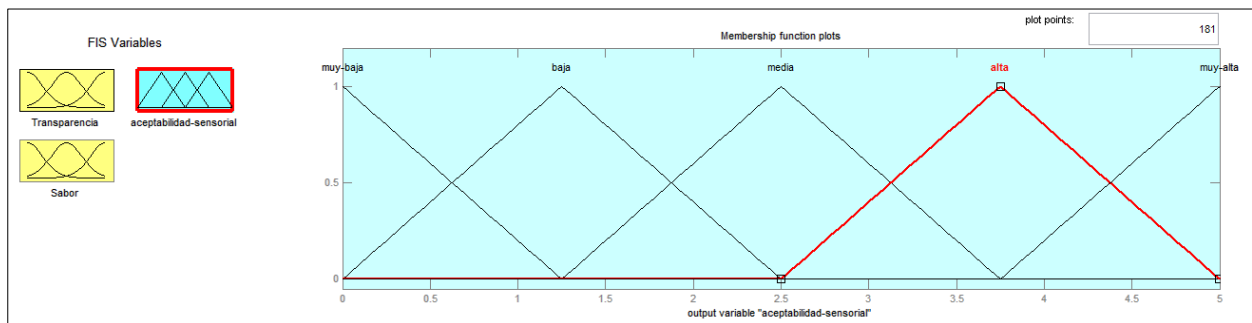


Figura 4. Conjunto difuso Aceptabilidad Sensorial (AS) con funciones de pertenencia triangulares.

DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA COMO BIOFUNGICIDAS PARA O CONTROLE DOS FUNGOS *ASPERGILLUS FLAVUS* E *ASPERGILLUS PARASITICUS*.

Vera Aparecida de Oliveira Tiera¹, Juliana do Santos Gabriel¹, Ricchard Hallan Viegas de Souza¹, Marcio José Tiera¹, Mirelle Takaki¹, Amanda Manchini Dias¹.

¹ Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas- UNESP.

1.INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos avanços foram alcançados na busca de uma agricultura sustentável, sobretudo no controle de pragas e no aumento da produção de alimentos. O progresso nessa área requer o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas que não agridam a natureza, diminuindo assim o impacto no meio ambiente. Neste tema, uma atenção especial tem sido dada à quitosana, um polissacarídeo natural, obtido a partir da desacetilação da quitina, que é encontrada abundantemente na natureza. A quitosana e seus oligômeros apresentam um espectro de aplicações bastante amplo, dentre as quais se destaca seu uso como fungicidas e bactericidas biodegradáveis (ALBURQUENQUE, 2010). A atividade de quitosana contra diferentes microrganismos tais como bactérias, fungos e leveduras tem sido demonstrada na literatura, e têm recebido uma atenção especial nos últimos anos (VINSOVA, 2011). Uma das potenciais aplicações encontra-se no controle dos fungos que atacam diferentes tipos de grãos como o amendoim, soja, milho, centeio, cevada e outros cereais, sementes oleaginosas, nozes, castanha-do-brasil e produtos curados, dentre outros. Em Particular, os fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente o *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são considerados economicamente importantes (BINDER, 2007; ZHANG, 2009; FAJARDO, 1994), pois estão relacionados com problemas na produção e no consumo de grãos pelo mundo todo e produzem micotoxinas, como as aflatoxinas, causadoras de necrose aguda, cirrose e carcinoma de fígado em diversas espécies de animais e humanos (PATERSON, 2010). A atividade metabólica dos fungos cresce com o aumento de umidade dos grãos. A partir de um determinado valor limite, denominado “umidade crítica”, esta atividade é muito acelerada, promovendo a degradação de proteínas, de carboidratos, de fosfolipídios e outros compostos, originando substâncias lipossolúveis que contaminam o óleo, afetando a cor, o aroma e o sabor (PEDRO, 2013). A ocorrência das aflatoxinas é maior no amendoim porque este é o substrato preferido pelos fungos. Embora quitosana possua uma atividade antimicrobiana natural, a eficiência apresentada não é

suficiente para inibir o crescimento e proliferação dos fungos, e a utilização de fungicidas químicos é ainda uma necessidade, para inibir o crescimento de vários microrganismos. Este trabalho teve por objetivo aumentar a atividade antifúngica de quitosana, por meio de modificações em sua estrutura, pela introdução de grupos amônio quaternários e grupos hidrofóbicos. O estudo foi realizado tendo como alvo os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* e as eficiências antifúngicas foram discutidas e correlacionadas às mudanças estruturais.

2.MATERIAIS E MÉTODOS.

Os derivados foram sintetizados a partir de quitosana desacetilada, por um processo em duas etapas para introdução de grupos amino terciários (DEAE), grupos amônio quaternários (Pr e Pt) e grupos dodecil (dod). Os derivados foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-H) e as massas moleculares determinadas por viscosidade. A Tabela 1 apresenta os resultados de caracterização para as três séries de polímeros estudados e a Figura 1 mostra as estruturas dos polímeros. As cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* foram gentilmente cedidas pela Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria - CBMAI, Campinas - São Paulo, Brasil, e foram mantidas em batata dextrose ágar (BDA), no escuro, a 25 ± 2 ° C. Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de petri de 9,0 cm, utilizando BDA (batata-dextrose-ágar) como meio de cultura. As soluções estoque dos polímeros foram preparadas solubilizando-se as massas em 50,0 mL de ácido acético 1%. As soluções foram mantidas sob agitação até completa solubilização. Como controle utilizou-se 50,0 mL de ácido acético 1%. O pH de todas as soluções foram ajustados para 5,0. O meio BDA foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos e, em seguida, adicionado às soluções de quitosana e ao controle. A mistura foi transferida para as placas de Petri e após a solidificação, 2,0 µL de solução contendo Tween 80 e esporos do fungo foi adicionado em um orifício de 3,0 mm no centro de cada placa. Os ensaios foram realizados em quadruplicada e os diâmetros das colônias fúngicas foram medidos no 3º, 5º e 7º dia. O índice de inibição do fungo pelos polímeros foi determinado empregando a seguinte equação:

$$I_{(\%) } = \left(1 - \frac{D_a}{D_b}\right) \times 100$$

onde D_a é a média do diâmetro da colônia nas placas contendo os polímeros e D_b é a média dos diâmetros das colônias nas placas controle.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito fungicida foi avaliado pelo índice de inibição do desenvolvimento e crescimento dos fungos (Figura 2), o qual foi determinado como proposto por Guo e colaboradores [GUO, 2006; GUO, 2007]. A atividade fungicida contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foram testados para quitosana e seus derivados na faixa de 0,01 a 1,0 g/L. Os derivados substituídos somente com grupos propil (Pr), pentiltrimetilamônio (Pt) e dietilaminoetil (DEAE) apresentaram apenas uma inibição modesta do crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus*, que variou de 7 a 20%, e mostrou-se semelhante aquela obtida com quitosana desacetilada (Figura 3). A atividade antifúngica da quitosana tem sido atribuída à interação das cadeias catiônicas com os resíduos carregados negativamente de macromoléculas expostas na superfície da célula fúngica, levando ao vazamento dos eletrólitos intracelulares e outros constituintes (MUZZARELLI, 2001). Portanto, em pH 5,0 praticamente todos os grupos amino livres da CH estão protonados e possuem uma densidade de carga positiva elevada, como no caso dos derivados quaternários. Entretanto, esses derivados são solúveis em uma ampla faixa de pH, sendo portanto mais hidrofílicos do que a CH. Consequentemente, estes derivados interagem menos eficientemente com a parede celular dos fungos, resultando em índices de inibição ligeiramente menores quando comparados com quitosana (VIEGAS, 2013). Além disso, para quitosana e os derivados hidrofílicos (CH, CHD e CH-DEAE₄₃) o aumento da concentração não interferiu de forma significativa no crescimento do fungo (Figura 3). O mesmo resultado foi observado para os derivados CH-Pr₈₀, CH-Pentil₇₅ que exibiram índices de inibição de 5 a 20% (TAKAKI, 2013). Entretanto, os resultados mostraram que para todos os derivados anfifílicos o aumento da concentração aumenta drasticamente a atividade fungicida/fungistática (Figuras 3 e 4). No caso dos derivados Dod_x-CH-DEAE_z, como mostrado na Figura 3, a inibição completa do crescimento do fungo foi observada na concentração de 1,0 g/L. Na Figura 4 são apresentados os índices de inibição em função da concentração para os derivados quaternários Dod₇-CH-Pr₅₀ e Dod₅-CH-Pentil₇₅. Como pode ser observado da Figura 4, esses derivados apresentaram inibição crescente com o aumento da concentração do polímero. A maior atividade antifúngica desses derivados pode ser atribuída presença dos grupos dodecil ligados a cadeia de quitosana, o que permite uma maior interação com a parede celular do fungo. Para os derivados anfifílicos das séries Dod_x-CH-Pr_z e Dod_x-CH-Pentil₇₅, contendo de 5 a 15% o aumento da concentração resulta em aumento abrupto no índice de inibição, e para concentrações maiores que 0,6 g/L, esses derivados inibiram quase que completamente

o crescimento dos fungos. Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) diminuíram de 4,0 g/L para a quitosana desacetilada para valores de 0,25-0,50 g/L para os derivados (VIEGAS, 2013). Portanto, aumento do índice de inibição com o aumento da concentração é evidente, indicando que a concentração do biopolímero é um fator determinante tanto na inibição do *A. flavus* como para *A. parasiticus*. Entretanto como pode ser observado da Figura 5, maiores eficiências foram obtidas com os derivados anfifílicos contendo graus de substituição de 5 a 15% de grupos dodecil, indicando que derivados muito hidrofóbicos (Dod₃₀-CH-Pr50, Dod₃₀-CH-Pentil₇₅, Dod₂₈-CH- DEAE₄₃, Dod₃₉-CH- DEAE₄₃) perdem gradualmente a atividade antifúngica. Esse resultado está em concordância com trabalhos recentes da literatura (SAJOMSANG, 2009), e pode ser atribuído à formação de agregados com alta estabilidade, o que diminui a disponibilidade das cadeias para à interação com a parede celular dos fungos.

4.CONCLUSÃO

Derivados anfifílicos de quitosana podem ser sintetizados pela introdução de grupos amino terciários, amônioquaternários e grupos dodecil em sua estrutura, com bom controle do conteúdo hidrofóbico. Os derivados anfifílicos apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, o que pode ser atribuído ao aumento na força de interação com a parede celular dos fungos. Os resultados mostraram que a atividade antifúngica aumenta com a concentração de polímero e com conteúdo hidrofóbico, entretanto os resultados indicam que o grau de substituição ótimo encontra-se na faixa de 3 a 15% . Os derivados contendo graus de substituição nessa faixa inibem completamente o crescimento dos fungos na faixa de concentração de 0,3 a 0,6 g/L. Os resultados indicaram que a presença de grupos hidrofóbicos favorece a interação com a parede celular do fungos, e que derivados anfifílicos de quitosana possuem um grande potencial como biofungicidas.

5.AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2012/03619-9). Mirelle Takaki agradece a bolsa de estudos FAPESP (2013/16021-7).

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alburquenque C, Bucarey Sa, Neira-Carrillo A, Urzúa B, Hermosilla G, Tapia Cv. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Med Mycol* 2010;48(8):1018–23.
- Binder Em, Tan Lm, Chin Lj, Handl J, Richard J. Worldwide. Occurrence of myco-toxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol* 2007;137(3–4):265–82.
- Fajardo Je, Waniska Rd, Cuero Rg, Pettit Re. Phenolic-compounds in peanut seeds – enhanced elicitation by chitosan and effects on growth and aflatoxin B-1 production by *Aspergillus flavus*. *Food Biotechnol* 1994;8(2–3):191–211.
- Guo, Z.Y.; Xing, R.; Liu, S.; Zhong, Z.; Ji, X.; Wang, L.; Li, P. The influence of the cationic of quaternized chitosan on antifungal activity. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 118, 214–217.
- Guo, Z.Y.; Chen, R.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Wang, P. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydr. Res.* 2006, 341, 351–354.
- Muzzarelli, Raa, Muzzarelli C, Tarsi R, Miliani M, Gabbanelli F, Cartolari M. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomacromolecules* 2001; 2(1): 165-169.
- Pedro, R.O.; Takaki, M., Gorayeb, T.C.C.; Del Bianchi, V.L.; Thomeo, J.C.; Tiera, M.J.; Tiera, V.A.O. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiol. Res.* 2013, 168, 50–55.
- Sajomsang, W.; Tantayanon, S.; Tangpasuthadol, V.; Daly, W.H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Carbohydr. Res.* 2009, 344, 2502–2511.
- Takaki, M., Pedro, R. O, Tiera, M.J., Viegas, R. H. F., Gabriel, J. S., Dias, A. M., Tiera, V. A. O., Synthesis, characterization and study of quaternary derivatives of chitosan: *in vitro* study against *Aspergillus. Flavus*. In *Advances in Chitin Science Volume XIV*, 2013. In print.
- Viegas, R. H. F. ; Pedro, R .O.; Gabriel, J. S.; Tiera, M.J. ; Takaki, M. ; Tiera, V.A.O. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Molecules* (Basel. Online) 2013, 18, 4437-4450.
- Vinsova, J.; Vavrikova, E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities—A review. *Curr. Pharm. Design* 2011, 17, 3596–3607.

Tabela 1. Propriedades e graus de substituição (DS) dos derivados modificados com propiltrimetilamônio (Pr), pentiltrimetilamônio (Pentil), dietilaminoetil (DEAE) e dodecil (Dod).

Polímero	Razão**		DS(%)**	Mv (g/mol) x10 ³
	Dod/Gluco	[η] (mL/g)	Grupos Dodecil	
Série Propiltrimetilamônio (Pr)				
CH [§]	-	267.7	-	27.2
CH-Pr ₈₀ [*]	-	101.3	-	8.1
Dod ₁₀ -CH-Pr ₈₀	0.10		8.3	
Dod ₁₅ -CH-Pr ₈₀	0.15		14.1	
Dod ₃₀ -CH-Pr ₈₀	0.30		29.0	
CH-Pr ₅₀ [*]	-	142.6	-	12.3
Dod ₅ -CH-Pr ₅₀	0.10		7.1	
Dod ₁₅ -CH-Pr ₅₀	0.15		9.4	
Dod ₃₀ -CH-Pr ₅₀	0.30		27.1	
Série Pentiltrimetilamônio (Pentil)				
CH ^{§§}	-	195,2	-	18.3
CH-Pentil ₇₅ [*]	-	74,6	-	5.6
Dod ₅ -CH-Pentil ₇₅	0.05		4.81	-
Dod ₃₀ -CH-Pentil ₇₅	0.30		24.1	-
Série Dietilaminoetil (DEAE)				
CH ^{§§§}		13,1		0,62
CH-DEAE ₄₃		-		-
Dod ₅ -CH-DEAE ₄₃	0,06	5,0		-
Dod ₂₈ -CH- DEAE ₄₃	0,37	28,0		-
Dod ₃₉ -CH- DEAE ₄₃	0,45	39,0		-

^{§, §§, §§§} Graus de desacetilação por ¹H-NMR: 98.2, 99,0 e 99,9%. ^{*}Determinado por RMN-¹H como 83.0, 48.0 e 74,1% respectivamente. ^{**}Razão molar de dodecilaído (Dod) por unidades de glucosamina (Gluco).

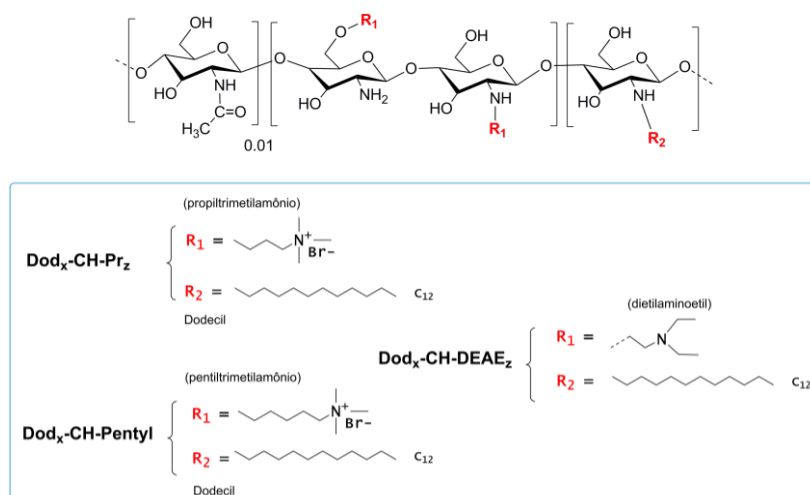


Figura 1. Estrutura dos derivados anfífilos de quitosana.

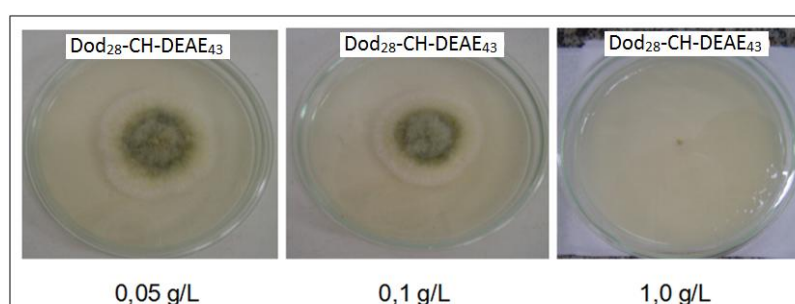


Figura 2. Imagens do ensaio microbiológico com o derivado Dod₂₈-CH-DEAE₄₃, nas concentrações de 0,05, 0,1 e 1,0 g L⁻¹, contra o fungo *A. flavus* no sétimo dia de incubação.

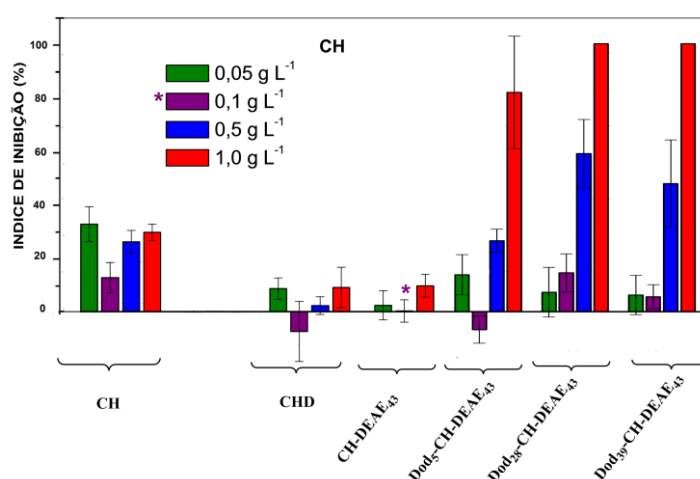


Figura 3. Índice de inibição em função da concentração para quitosana (CH), quitosana degradada (CHD) e os diferentes derivados anfífilos da série Dod_x-CH-DEAE₄₃.

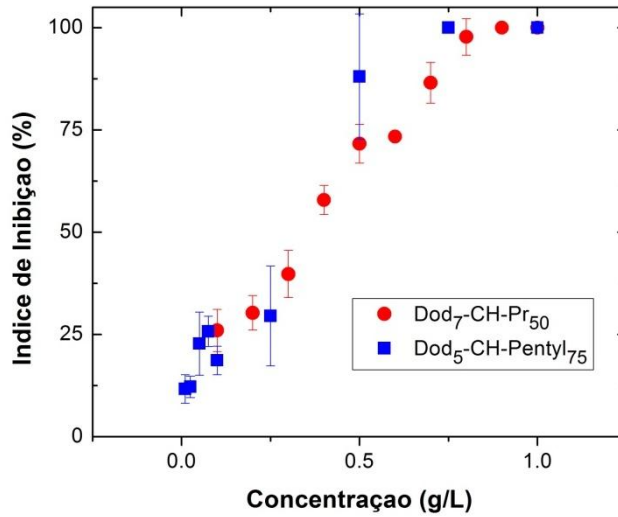


Figura 4. Índice de inibição em função da concentração para os derivados anfífilicos da série Dod₇-CH-Pr₅₀ e Dod₅-CH-Pentyl₇₅.

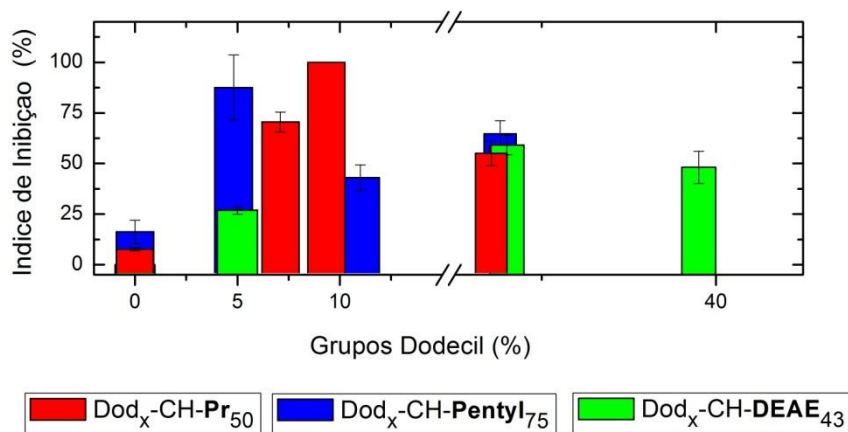


Figura 5. Índice de inibição em função da % de grupos dodecil para os diferentes derivados anfífilicos da série Dod_x-CH-Pr₅₀, Dod_x-CH-Pentyl₇₅ e Dod_x-CH-DEAE₄₃.

OBTENCIÓN DE NUEVOS TIPOS DE MELÓN CHARENTAIS PARA EL MERCADO MEDIANTE EL DESARROLLO DE LÍNEAS DE INTROGRESIÓN

C. Esteras^{1*}, C. Roig¹, A. Monforte², B. Picó¹

¹Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad (COMAV-UPV) Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (España).

*criesgo@upvnet.upv.es

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universitat Politècnica de València (UPV)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ciudad Politécnica de la Innovación (CPI), Ed. 8E, C/Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia (España).

INTRODUCCIÓN

La biotecnología se ha convertido en uno de los pilares básicos en horticultura para consolidar y abrir nuevos mercados. La aplicación de nuevas estrategias biotecnológicas está permitiendo no sólo el aumento de la producción de los principales cultivos, sino también, y muy especialmente, la mejora de la calidad de los mismos y el desarrollo de productos nuevos con características atractivas para el consumidor.

La generación de líneas de introgresión (ILs), es una nueva estrategia que facilita el desarrollo de nuevos productos a partir del aprovechamiento de la variabilidad natural. Estas líneas permiten incrementar la variación de los cultivos, desenmascarando la variabilidad, a menudo oculta, existente en variantes exóticas y transfiriéndola a fondos genéticos de variedades élite. A partir del híbrido F1 entre los dos parentales seleccionados, donante (con características de interés, muchas veces exótico) y recurrente (tipo comercial a mejorar), se realizan retrocruces (BCs) sobre el parental recurrente durante varias generaciones, hasta obtener líneas idénticas a éste, excepto en el fragmento cromosómico introgresado del genoma exótico. En su conjunto la colección tiene todo el genoma exótico representado, con una introgresión en cada línea.

En melón (*Cucumis melo* L.), las colecciones de líneas de introgresión resultan de especial interés para explotar la gran diversidad intraespecífica de la especie, especialmente a nivel de fruto (revisado por Esteras *et al.*, 2012). Las clasificaciones más recientes (Pitrat, 2008) describen hasta 13 variedades o morfotipos diferentes agrupados en dos subespecies: *melo* y *agrestis*.

La obtención de este tipo de líneas se ha impulsado recientemente, al reducirse el número de generaciones necesarias de selección, debido a la disponibilidad de grandes colecciones de marcadores de tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) derivados de

proyectos de secuenciación (Blanca *et al.*, 2011, 2012), y a la existencia de mapas genéticos densos (Díaz *et al.*, 2011).

La primera colección de líneas de introgresión de melón fue desarrollada por Eduardo *et al.* (2005), utilizando como parental donante la entrada PI 161375 (“Songwhan Charmi”, subsp. *agrestis* var. *chinensis*) de origen coreano, que presenta resistencias a plagas y enfermedades de etiología fúngica y viral, y como parental recurrente el tipo con mayor importancia comercial en España, el melón “Piel de Sapo”, de la subsp. *melo* var. *inodorus*.

En el contexto de la mejora de la calidad del melón y en el marco del proyecto europeo Plant KBBE (SAFQIM), hemos desarrollado una nueva colección de ILs, empleando como variedad exótica la variedad japonesa *Ginsen Makuwa* (subsp. *agrestis* var. *conomon* tipo *makuwa*) y como variedad receptora el cultivar *Vedrantais*, un tipo *Charentais* (subsp. *melo* var. *cantalupensis*), de gran interés comercial en Europa. En el proceso de desarrollo de la colección estamos observando líneas con características diferenciales que pueden ser de interés en el mercado. Una de estas líneas produce melones de tamaño muy reducido, maduración climatérica retrasada y alto contenido en azúcares, cuyo desarrollo se describe en el presente estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La población de partida de esta investigación se originó a partir de un cruzamiento original entre la variedad *Ginsen Makuwa* (subsp. *agrestis* var. *conomon* tipo *makuwa*, procedente de Japón) con un alto contenido en azúcar, que actuó como parental donante (MAK) y el cultivar *Vedrantais*, tipo *Charentais* (subsp. *melo* var. *cantalupensis*) que actuó como parental recurrente (VED) (Figura 1). A partir de la F1 de este cruzamiento se obtuvo una primera generación de retrocruzamiento, BC1 (F1 x VED), de la cual se cultivaron 15 plantas. Cada una de estas plantas se empleó como parental femenino en cruces con el parental recurrente VED, produciéndose 14 frutos BC1, con semilla BC2. Se germinaron un total de 404 plantas, entre los 14 lotes de semillas BC2. Esta población se genotipó utilizando una plataforma Sequenom, con un set de marcadores distribuidos por todo el genoma, de forma que se preseleccionaron 85, por tener como máximo 8 introgresiones del parental donante MAK cada una. Estas 85 plantas BC2 se transplantaron a invernadero, se cultivaron, fenotiparon y se utilizaron de nuevo como parentales femeninos en una nueva generación de retrocruzamiento con el parental VED, para producir la población BC3. Además del genotipo, se tuvo en cuenta el fenotipo de los frutos BC2 con semilla BC3 para seleccionar un set de 26 frutos BC2 con semillas BC3 para genotipar de nuevo y continuar con el

desarrollo de las líneas. Utilizando estas 26 familias BC3 se genotiparon un total de 363 individuos con el mismo set de marcadores utilizados para la BC2, seleccionándose 103 plantas BC3, con un máximo de 4 introgresiones por planta, para su transplante a invernadero. Estas plantas ya genotipadas, se fenotiparon también y se obtuvo la semilla de la siguiente generación de retrocruce BC4 o la primera de fijación mediante autofecundación. Entre estas líneas, ya genotipadas y fenotipadas, se observan individuos con características interesantes que se describen en este trabajo.

En todos los casos el fenotipado se ha realizado siguiendo el descriptor de melón, en el que se evalúan principalmente características de calidad de fruto como peso, forma, firmeza y espesor de la carne, pH, sólidos solubles y coloración, entre otros caracteres.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras cuatro generaciones de retrocruzamiento y selección asistida por el genotipado con SNPs, se han obtenido diversas líneas con características de interés. En la Tabla 1 se muestran las medias para los parentales y para cada una de las generaciones de retrocruzamiento, para ocho de los caracteres con mayor importancia en calidad.

Cabe destacar la obtención, en todas las generaciones BC1, BC2, BC3 y BC4, de individuos con frutos con mayor contenido en sólidos solubles que los parentales. De hecho, se ha detectado una introgresión de Makuwa en el grupo de ligamiento (LG) X que aumenta el dulzor. También se han encontrado tipos con niveles más altos de glucosa, fructosa y sacarosa, así como de algunos ácidos como cítrico y málico. Se han detectado frutos con diversas formas, con cambios en el reticulado externo y en la coloración de la pulpa, carácter estrechamente relacionado con el contenido en carotenos.

Entre las variantes identificadas en la generación BC4 hemos seleccionado una que presenta frutos de tamaño muy reducido (con un peso medio de 305 g, frente a los 713 g de media del parental Vedrantaís). Este menor tamaño encontrado podría dar lugar en un futuro a la comercialización de cantalupos con características organolépticas similares a Vedrantaís (igual fondo genético), pero con un tamaño adecuado a la demanda actual. Esta línea presenta una única introgresión en el LG IV, donde se habían descrito varios QTL, uno responsable del peso del fruto, otro del contenido en glucosa y otro relacionado con la proporción de pulpa del fruto (Díaz *et al.*, 2011). En la Figura 2 se muestra, para dos de los caracteres estudiados (peso y sólidos solubles), la genealogía de esta línea desde la BC1. Esta línea no sólo presenta el tamaño reducido, sino que además muestra una mayor firmeza de la carne que los parentales, con un valor medido con penetrómetro de 3,1 frente a 0,8 y 1,4 de MAK y

VED respectivamente, posiblemente debido a un menor intensidad del climaterio en la maduración (característica derivada del parental Makuwa) (Tabla 1), y un nivel de dulzor superior, con 13,8 °Brix, frente a 10,2 y 11,5 de los parentales (Tabla 1). Por otra parte, estos frutos fueron algo más achatados y presentaron una cavidad algo menor, lo que resulta también positivo desde el punto de vista comercial.

El hecho de haber realizado selección asistida por marcadores tipo SNP en las primeras generaciones de retrocruzamiento ha permitido que en sólo 4 retrocruces se hayan obtenido ya líneas que resultan de interés para la mejora por tener muy pocas introgresiones del donante. Sin embargo, aún es necesaria la fijación de la introgresión que presenta esta línea en el grupo de ligamiento IV, para lo que es necesario un ciclo de autofecundación y el estudio del comportamiento de estas líneas en diferentes ambientes para una mejor evaluación.

CONCLUSIONES

Como consecuencia de varias generaciones de retrocruzamiento y selección con SNPs dirigida a regiones específicas del genoma hemos desarrollado nuevas variedades de melón de tipo *Charentais* con características diferenciales de los tipos normalmente encontrados en los mercados. Variedades con mayor contenido en sólidos solubles o en carotenos en la pulpa, y variantes para la forma y el tamaño del fruto. Uno de los tipos más interesantes es una variedad con una introgresión genómica del grupo de ligamiento IV que desarrolla frutos muy pequeños, de peso entre 250-350 g en comparación con los frutos de alrededor de 1Kg que se suelen encontrar en los mercados, con un contenido elevado en azúcares y una mayor vida postcosecha. Estos materiales pueden emplearse para el desarrollo de “mini” melones con características organolépticas similares a los tipos *Charentais*.

BIBLIOGRAFÍA

Blanca J, Cañizares J, Ziarsolo P, Esteras C, Mir G, Nuez F, Garcia-Mas J, Picó B: Melon transcriptome characterization. SSRs and SNPs discovery for high throughput genotyping across the species. *The Plant Genome* 2011, 4(2):118-131.

Blanca J, Esteras C, Ziarsolo P, Pérez D, Fernández-Pedrosa V, Collado C, Rodríguez de Pablos R, Ballester A, Roig C, Cañizares J, Picó B: Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genomics* 2012, 13:280.

Diaz A, Fergany M, Formisano G, Ziarsolo P, Blanca J, Fei Z, Staub JE, Zalapa JE, CuevasHE, Dace G, Oliver M, Boissot N, Dogimont C, Pitrat M, Hofstede R, Koert P, Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, Cohen S, Schaffer A, Katzir N, Xu Y, Zhang H, Fukino N, Matsumoto S, Garcia-Mas J, Monforte AJ: A consensus linkage map for molecular markers

and Quantitative Trait *Loci* associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biol 2011, 11:111.

Eduardo I, Arus P, Monforte AJ: Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. Theor Appl Genet 2005, 112:139–148.

Esteras C, Nuez F, Picó B: Genetic diversity studies in Cucurbits using molecular tools. En: Cucurbits: Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits. Editado por Wang Y, Behera TK y Kole C. New Hampshire: Science Publishers Inc, Enfield; 2012:140-198.

Pitrat M: Melon (*Cucumis melo* L.). En: Handbook of crop breeding, vol I: Vegetables. Editado por Prohens J, Nuez F. Springer, New York, USA; 2008:283–315.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado ha estado parcialmente financiado por los proyectos SAFQIM (PIM2010PKB-00691) y por la Acción complementaria de la Generalitat Valenciana (ACOMP/2013/141).

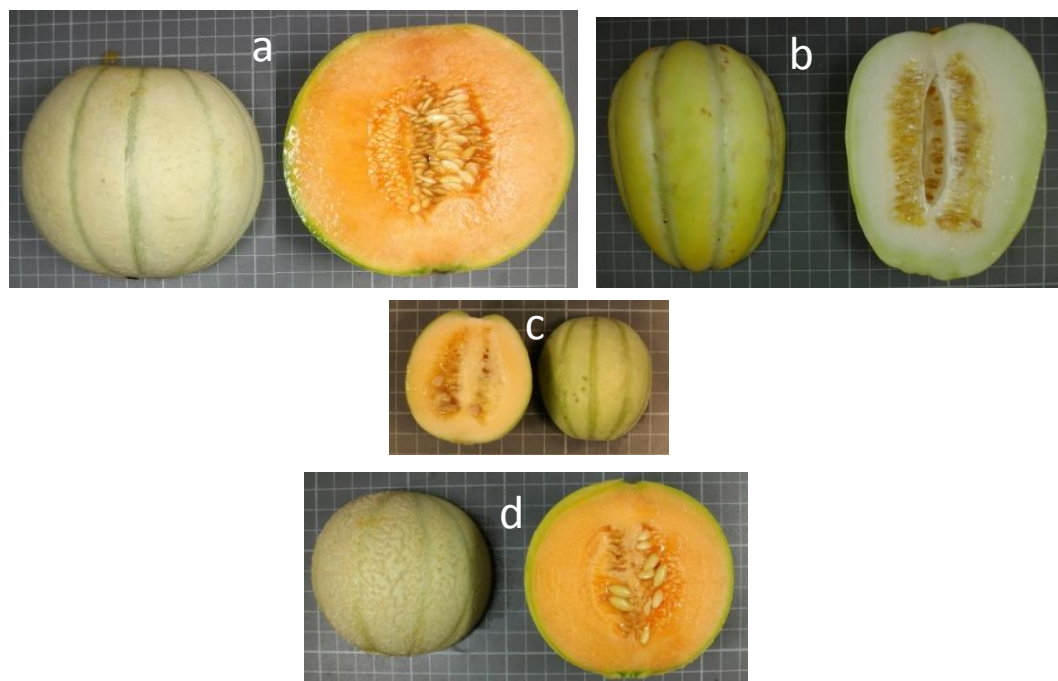
Tabla 1. Caracterización de los parentales, F1 y los distintos retrocruces realizados para algunos de los caracteres de fruto analizados.

GENOTIPO	PESO (g)	LONGITUD (mm)	ANCHURA (mm)	ESPESOR CAVIDAD (mm)	SOLIDOS SOLUBLES (°Brix)	pH	FIRMEZA CARNE (kg)	FORMA=L/A ¹
media MAK	339,2±63,9 ²	62,7±49,4	50,9±39,5	46,8±3,5	10,2±1,8	6,4±1,3	0,8±0,6	1,203±0,051
media VED	713,0±155,5	100,0±9,0	109,0±10,0	47,4±6,6	11,5±1,8	6,0±0,0	1,4±1,1	0,922±0,037
media F1	173,1±76,0	80,0±21,0	63,0±12,0	39,8±5,9	5,4±1,9	5,4±0,5	1,7±0,8	1,295±0,302
media BC1	590,9±192,3	96,0±13,0	103,0±11,0	51,0±9,1	11,7±2,6	5,8±0,5	2,5±2,2	0,937±0,069
media BC2	840,9±344,0	113,6±22,5	116,7±16,8	52,0±9,0	9,8±1,4	6,0±0,6	3,0±1,7	0,969±0,118
media BC3	884,4±218,0	111,6±16,1	116,7±16,5	51,5±6,4	11,3±1,7	5,8±0,5	2,9±1,4	0,960±0,103
media descendencia de la madre de la línea de “mini-melones” (BC4)	773,6±392,0	106,6±23,4	115,0±20,9	54,8±8,5	13,5±1,1	5,8±2,3	3,6±0,3	0,921±0,069
media planta “mini-melones” (BC4)³	305,5±40,3	75,0±4,2	87,5±3,5	44,7±0,2	13,8±0,7	6,0±0,0	3,1±0,4	0,857±0,014

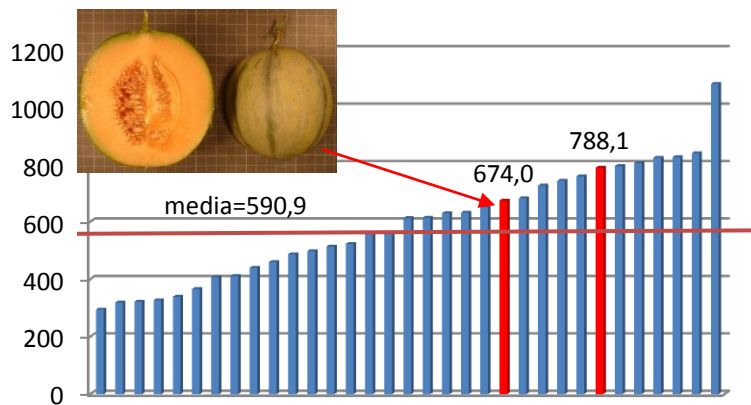
¹Parámetro de forma calculado como el cociente longitud/anchura

²Media y desviación típica para cada carácter

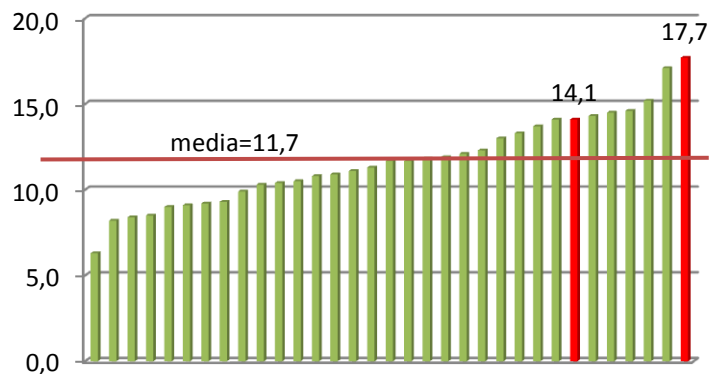
³Media de varios frutos


Figura 1. Frutos de los parentales VED (a), MAK (b), F1 (c) y de la línea de “mini-melones” (d). Aparecen sobre un fondo con cuadrados de 1 cm de lado.

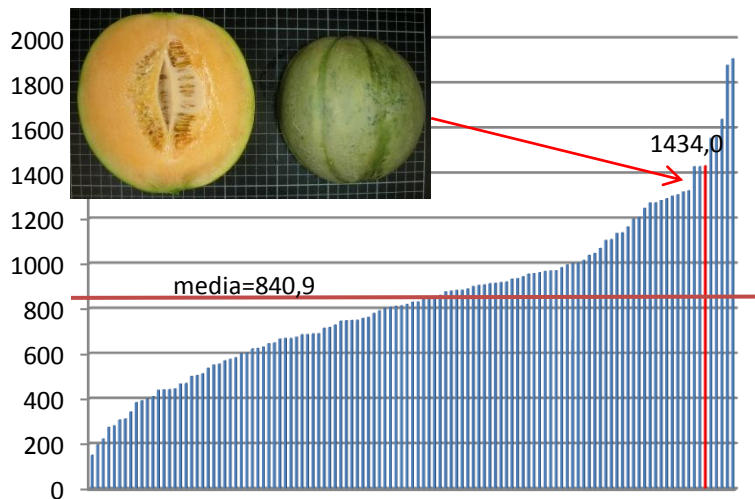
PESO BC1



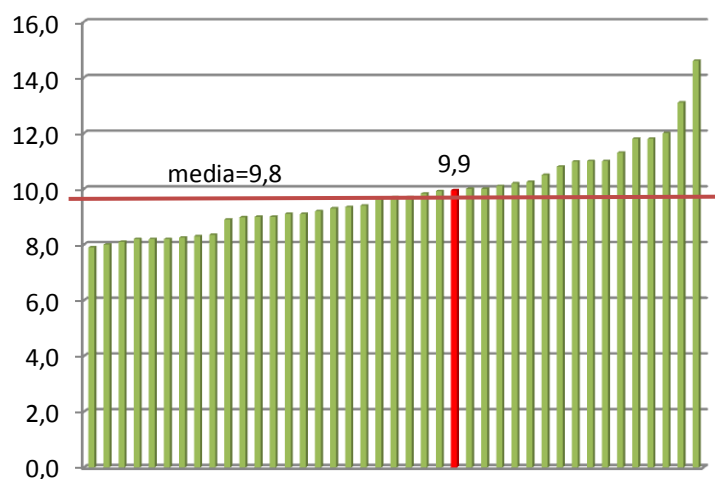
SÓLIDOS SOLUBLES BC1



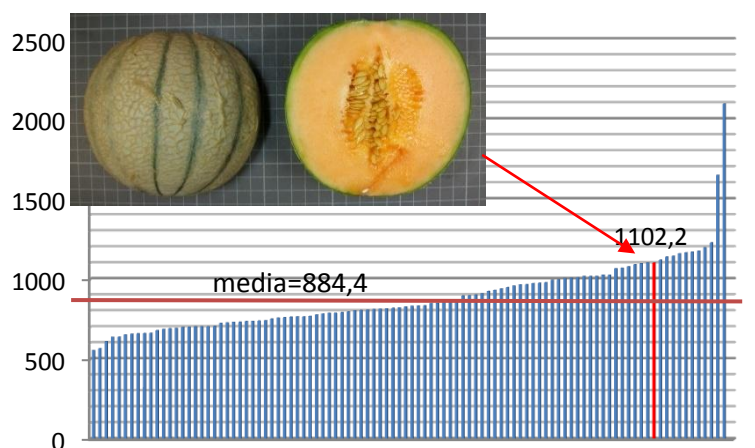
PESO BC2



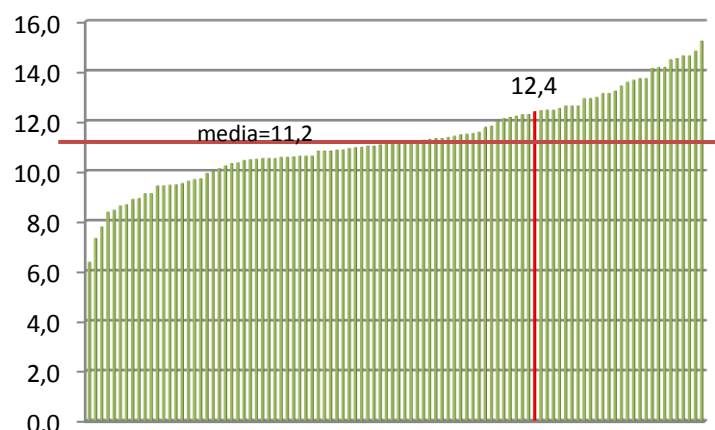
SÓLIDOS SOLUBLES BC2



PESO BC3



SÓLIDOS SOLUBLES BC3



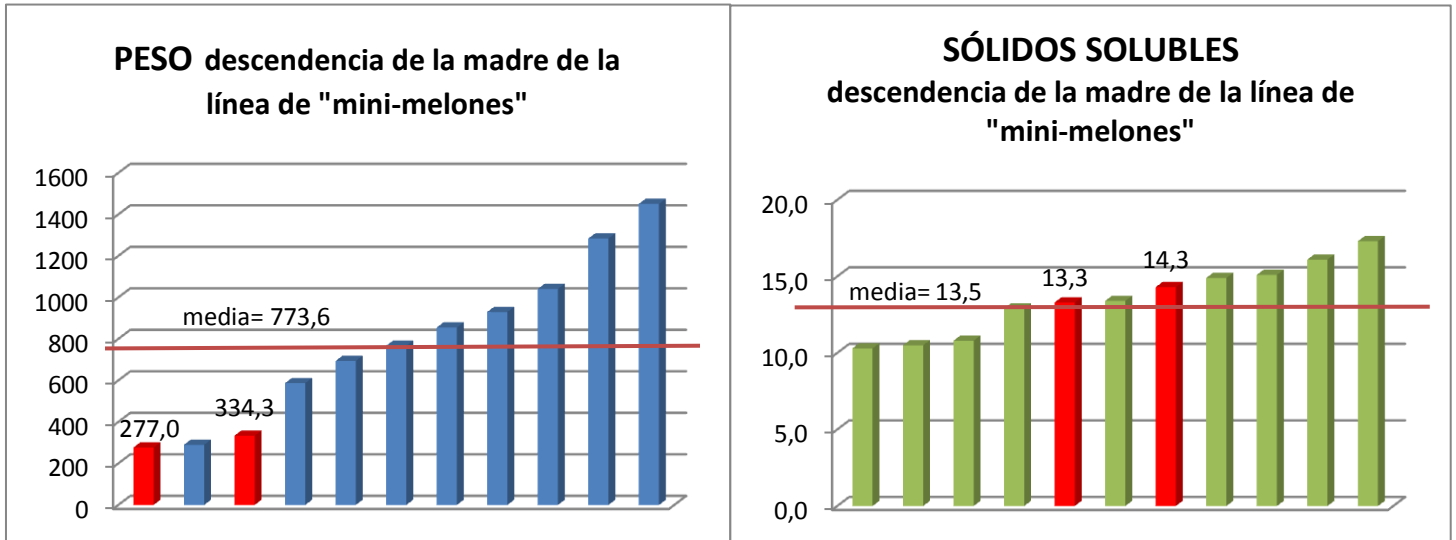


Figura 2. Gráfico de barras que muestra los valores y la media en las diferentes generaciones de retrocruce para los caracteres peso y sólidos solubles. Se muestra la genealogía de la línea de interés que dio lugar a los “mini-melones”. En rojo se indica el/los fruto/s de la planta de cada generación que ha dado lugar a esta línea. También se presentan fotos de estos frutos.

*Peso en g, sólidos solubles en °Brix.

EL AROMA DEL MELÓN: NUEVAS ESTRATEGIAS DE MEJORA DE LA CALIDAD

Picó, B.^{1*}; Esteras, C.¹; Ruiz, JJ.²; Ruiz-Beviá, F.³

¹Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad (COMAV-UPV) Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia (España). *mpicosi@btc.upv.es

²Departamento de Biología Aplicada. EPSO, Universidad Miguel Hernández. Ctr. De Beniel, km 3,4 -03314-, Orihuela.

³Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Alicante. Apd. 99. Alicante.

INTRODUCCIÓN

La calidad del fruto de melón (*Cucumis melo*) es un parámetro complejo en el que intervienen muchos factores (Fernández-Trujillo *et al.*, 2011). Uno de los aspectos más importantes, y a la vez más difícil de evaluar, es el patrón de compuestos volátiles responsables del aroma de esta fruta.

Existen algunos estudios previos que analizan el patrón de volátiles en distintos cultivares de melón. Dada la diversidad de cultivares y de técnicas utilizadas, los resultados suelen ser bastante variables, tanto dentro como entre estudios, y sólo en algunas ocasiones se estudia el cambio en el patrón de volátiles durante el proceso de maduración (Beaulieu y Grimm, 2001; Wang *et al.*, 1986; Aubert y Bourger 2004; Kourkoutas *et al.*, 2006; Lucchetta *et al.*, 2007; Obando Ulloa *et al.*, 2010; Hwan Oh *et al.*, 2011).

La especie *C. melo* es enormemente variable. Según la última clasificación hecha por Pitrat (2008) incluye dos subespecies, con hasta 15 variedades botánicas. Entre las variedades botánicas de mayor interés comercial se encuentran las variedades *cantalupensis* e *inodorus*. La primera incluye a los melones de tipo cantalupo y la segunda a los melones de tipo español, como Piel de sapo, Amarillos, etc. La variabilidad en relación al patrón de aromas está por explotar en la especie y muchas de las variedades botánicas incluyen tipos con patrones de aromas singulares todavía por estudiar.

El perfil de aromas es de especial interés en los melones de tipo cantalupo, de maduración climatérica y fruto muy aromático. En este trabajo hemos analizado el cambio en el patrón de compuestos volátiles durante la maduración del fruto en dos cultivares pertenecientes a dos tipos comerciales de la variedad botánica *cantalupensis* (Charentais y Ogen). Se trata de dos cultivares con orígenes y características muy distintos y que representan dos de los tipos comerciales de mayor interés en este grupo de melones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon dos variedades de melón climatérico, *Cucumis melo* subsp. *melo* variedad botánica *cantalupensis*, uno de tipo Charentais, la variedad Vedrantaís, y otro de tipo Ogen, la variedad NoyYzre'el, ambas procedentes de la colección de germoplasma de melones de tipo cantalupo mantenida en el COMAV (Figura 1). A pesar de pertenecer a la misma variedad botánica, se trata de dos melones bastante distintos. El melón de tipo Charentais, de origen francés, es ligeramente acostillado, de corteza grisácea, que sólo cambia ligeramente de color en la madurez, y de carne naranja. El melón de tipo Ogen, desarrollado en Israel a partir de una variedad procedente de Hungría, es más redondeado, de corteza verde que cambia a naranja en la madurez, y de pulpa verde claro. El tipo Ogen es a partir del que se derivaron los primeros híbridos de tipo Galia. Ambos son aromáticos, pero presentan un patrón de aromas diferente.

Varias plantas de cada variedad se cultivaron en los invernaderos del COMAV-UPV en ciclo de primavera-verano. Se llevaron a cabo polinizaciones manuales para poder precisar la fecha de cuajado. Se tomaron frutos de cada una de las variedades a los 25 días después de la polinización (DDP), siendo este estado previo al estado de madurez comercial. Además, se tomaron muestras de frutos en el estado de madurez comercial, a los 36 DDP para el tipo Charentais y a los 40 DDP para el tipo Ogen. Por último, frutos cogidos en madurez comercial se almacenaron a temperatura ambiente y se analizaron 10 días después, para ver la variación en postcosecha.

Las muestras se recogieron, con un sacabocados de 1cm, de 4 puntos de la zona central de la pulpa y se congelaron con nitrógeno líquido. Se trituraron y se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su análisis. Cinco gramos de cada muestra se estabilizaron con 1 ml de una solución saturada de cloruro de calcio. La muestra así tratada se colocó en un baño térmico a 50°C y se recuperaron los volátiles durante 30' mediante Micro Extracción en Fase Sólida (SPME) y posterior Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS).

Se identificaron, empleando patrones, los distintos compuestos y se calculó la cantidad relativa de cada uno de ellos. Además, para analizar las diferencias entre los perfiles aromáticos de cada variedad se llevó a cabo un análisis de componentes principales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron 35 compuestos volátiles, cuyas proporciones relativas variaron claramente con el grado de madurez del fruto (Figura 2). No se tuvieron en cuenta para el

análisis los compuestos minoritarios (con menos del 1% de presencia relativa), ni los compuestos de alto peso molecular (con tiempos de retención superiores a 38 minutos).

Los resultados indican que antes de que se inicie el proceso de maduración, el contenido en compuestos volátiles es muy inferior al de la madurez comercial, detectándose un número de compuestos claramente inferior (Figura 2). Además, el tipo de compuestos identificados es distinto.

Frutos inmaduros

En los frutos inmaduros no aparecen ésteres y predominan los aldehídos y los alcoholes, siendo los primeros los más frecuentes. De hecho, son los aldehídos hexanal y pentanal los compuestos más frecuentes, que suponen en ambos genotipos más del 50% y el 10% de la cantidad total de compuestos identificados, respectivamente, seguidos del 2-pentenal y del 2-heptenal con menores porcentajes. Todos estos aldehídos desaparecen en el fruto maduro. Los alcoholes más frecuentes son los de cuatro y cinco átomos de carbono, el 1-pentanol, el 2-metil-2-propanol y el 2-metil-2-butanol. Cada uno de estos alcoholes no supone más del 6% del total de los compuestos identificados en los frutos inmaduros. Al igual que los aldehídos, los alcoholes desaparecen en los frutos maduros.

La mayoría de los compuestos se encuentran en cantidades similares en la pulpa de ambos cultivares. Sin embargo, es destacable que en la pulpa del tipo Ogen se detectan cantidades significativas de alfa-terpinoleno (un 10% del total), lo que indica una composición diferencial de los compuestos volátiles incluso en frutos inmaduros, coherente con el distinto origen de estos cultivares.

Frutos maduros y sobremaduros

En los frutos maduros y sobremaduros los compuestos mayoritarios son los ésteres (acetato de etilo, acetato de 2-metil-butilo, acetato de isobutilo, acetato de hexilo, acetato de butilo, acetato de bencilo). A pesar de que los compuestos mayoritarios se detectan en las dos variedades, su proporción relativa es distinta. Por ejemplo, en el cultivar Vedrantais el éster mayoritario es el acetato de etilo (un 40% del total frente a un 10% en el tipo Ogen), mientras que en el cultivar NoyYizre el los más frecuentes son el acetato de 2 metil-butilo y el acetato de isobutilo (alrededor del 30 y del 20% respectivamente en comparación con el 10 y el 9% en Vedrantais). Así mismo, se detectan otros ésteres minoritarios y algunos compuestos azufrados específicos de variedad (Figura 2), que podrían también contribuir al aroma diferencial de estas dos variedades. Es la variedad Vedrantais la que presenta un patrón de aromas más complejo, con un mayor número de compuestos específicos (seis ésteres y dos compuestos azufrados).

Los compuestos detectados en los frutos en madurez comercial no estaban presentes en los frutos inmaduros, alcanzan su máximo en el fruto de madurez comercial y en general se reducen en el fruto sobremaduro, a excepción del acetato de etilo y algunos de los compuestos azufrados que sufren un aumento en los frutos sobremaduros. En los frutos sobremaduros también se identifican algunos compuestos nuevos, no detectados en los otros estados de maduración, que son específicos de variedad (3 hidroxí-2-butanona, isobutanoato de etilo y hexanoato de etilo, específicos de Vedrantaís, y acetato de 5-decenilo y acetato de fenilpropilo, específicos del tipo Ogen).

Existen estudios anteriores en los que se trata de identificar los compuestos volátiles de la pulpa de melón (Beaulieu y Grimm, 2001; Wang *et al.*, 1986; Aubert y Bourger 2004; Kourkoutas *et al.*, 2006; Lucheta *et al.*, 2007; Obando Ulloa *et al.*, 2010; Hwan Oh *et al.*, 2011). Se llevan a cabo con distintas metodologías y cultivares, por lo que es difícil comparar los resultados obtenidos. En general, suele detectarse la presencia de aldehídos, como el hexanal, en frutos inmaduros, aunque en algunos casos aparecen aldehídos de mayor peso molecular que los encontrados en nuestro estudio (Beaulieu y Grimm, 2001; Hwan Oh *et al.*, 2011). Todos los estudios detectan un incremento de los ésteres durante la maduración del fruto, siendo el acetato de etilo y el acetato de 2-metil-butilo los mayoritarios. También se describe la presencia de compuestos azufrados en algunos de estos estudios (Lucheta *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunos casos los ésteres coexisten en los frutos maduros con una cantidad no despreciable de aldehídos y alcoholes, que sólo se detectan a nivel de trazas en nuestro análisis. Las diferencias indicadas no resultan sorprendentes, dada la gran variabilidad de cultivares analizados en los estudios previos.

Nuestros resultados y la comparación con algunos estudios anteriores confirman la gran variabilidad existente en los perfiles de aromas de los distintos tipos de melones. Dada la complejidad de los perfiles, el análisis multivariante es una buena herramienta para clasificarlos. En nuestro caso un análisis de componentes principales ha permitido comparar los perfiles aromáticos de los melones analizados con perfiles previamente obtenidos con la misma metodología (Kourkoutas *et al.*, 2006). La Figura 3 muestra como el perfil de fruto maduro del cultivar Vedrantaís es prácticamente idéntico al del cantalupo de pulpa naranja analizado por Kourkoutas *et al.* (2006), pero claramente distinto del tipo Galia, también cantalupo, pero de carne verde claro, analizado en ese mismo estudio. Así mismo, a pesar de que la variedad Ogen fue la que se empleó en el desarrollo de los melones de tipo Galia, el cultivar Noy Yzra'el parece presentar un perfil de aromas diferencial del cultivar Galia, lo que da una idea de la diversidad de perfiles en los tipos cantalupos.

CONCLUSIONES

El estudio realizado ha permitido obtener un perfil de aromas durante el proceso de maduración y postcosecha para dos cultivares de tipo cantalupo con distinto origen y características comerciales. A pesar de existir aspectos comunes, hemos observado diferencias en los perfiles de aromas, que son coherentes con las distintas características de los dos cultivares y con la amplia variación en la especie. La metodología desarrollada, de posible aplicación a una colección mayor de cultivares representativos de la variación en la especie, y la información obtenida resultan de utilidad para el desarrollo de nuevos tipos de melón con perfiles específicos de aromas.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado ha estado parcialmente financiado por los proyectos SAFQIM (PIM2010PKB-00691) y por la Acción complementaria de la Generalitat Valenciana (ACOMP/2013/141).

BIBLIOGRAFÍA

- Aubert C, Bourger, N: Investigation of volatiles in Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars. *J Agric Food Chem* 2004, 52:4522-4528.
- Beaulieu JC, Grimm CC: Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J Agric Food Chem* 2001, 49:1345-1352.
- Fernández-Trujillo JP, Picó B, Garcia-Mas J, Álvarez JM, Monforte AJ: Breeding for fruit quality in melon. En: Jenks MA, Bebeli P (eds) *Breeding for Fruit Quality*. Chapter 12. 2011. Wiley-Blackwell Ames, IA, USA.
- Hwan Oh S, Lim BS, Hong SJ, Lee SK: Aroma volatile changes of netted muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit during developmental stages. *Hort Environ Biotechnol* 2011, 52 (6): 590-595.
- Kourkoutas D, Elmore JS, Mottran DS: Comparison of the volatile compositions and flavor properties of cantaloupe, Galia and honeydew muskmelons. *Food Chemistry* 2006, 97: 95–102.
- Lucchetta L, Manríquez D, El-sharkawy I, Flores FB, *et al.*: Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. *J Agric Food Chem* 2007, 55: 5213-5220.
- Obando-Ulloa JM, Ruiz J, Monforte AJ, Fernández-Trujillo JP: Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon. *Food Chemistry* 2010, 118:815-822. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.068>.
- Pitrat M: Melon (*Cucumis melo* L.). En: Prohens J, Nuez F (ed) *Handbook of Crop Breeding Vol I: Vegetables*. Springer, New York, USA, 2008, pp 283–315.

Wang Y, Wyllie SG, Leach DN: Chemical changes during the development and ripening of the fruit of Cucumis melo (cv. Makdimon). J Agric Food Chem 1986, 44: 210-216.



Figura 1. Frutos de los dos genotipos analizados: Cultivar NoyYizra'el de Tipo Ogen (izquierda) y Cultivar Vedranta'is de tipo Charentais (derecha).

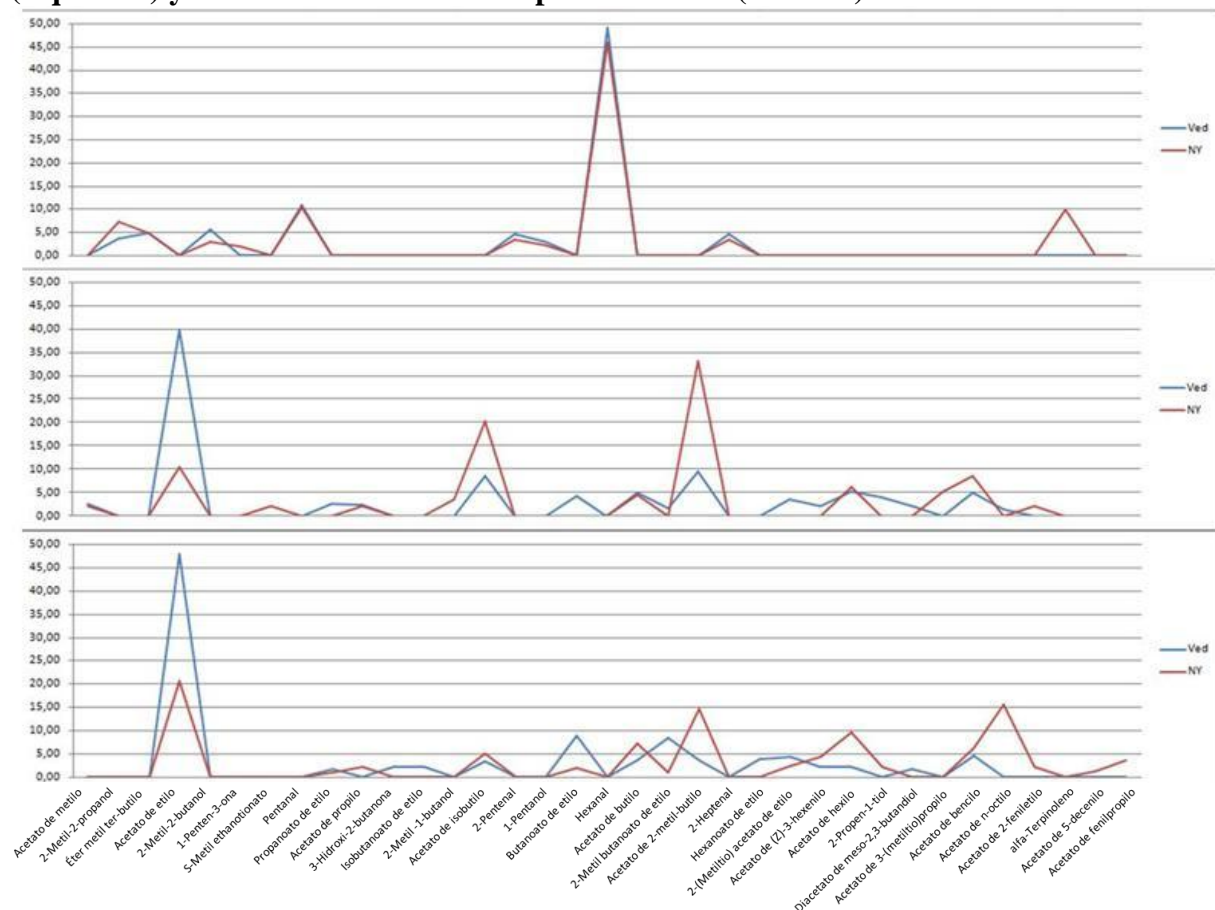


Figura 2. Porcentaje relativo de cada uno de los 35 compuestos aromáticos detectados en la pulpa de los dos cultivares analizados: Cultivar NoyYizra'el (rojo) y Cultivar Vedranta'is (azul), a los 25 días después de la polinización (DDP) (gráfico superior), en la madurez comercial (gráfico central) y en frutos sobremaduros (gráfico inferior).

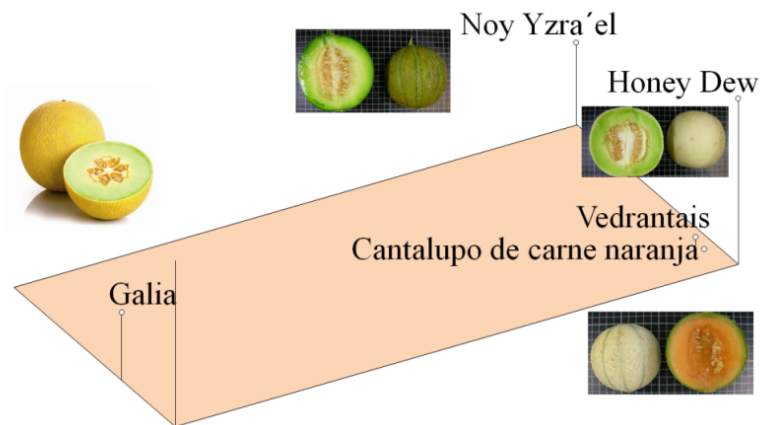


Figura 3. Análisis de componentes principales realizado a partir del perfil aromático de los dos cultivares analizados en este estudio (Cultivar NoyYizra´el y Cultivar Vedrantaïs) y de 3 cultivares analizados con la misma metodología por Kourkoutas *et al.*, (2006), un tipo Galia, un cantalupo de carne naranja, y el cultivar Honeydew (no climatérico, perteneciente a la variedad *inodorus* de *Cucumis melo*).

INFLUENCIA DE ULTRASONIDOS Y MICROONDAS EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN INFUSIONES DE HOJA DE ESTEVIA

Ángela Periche, Marisa Castelló, Ana Heredia, Isabel Escriche, Ana Andrés

Universidad Politécnica de Valencia,
Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo,
Departamento de Tecnología de Alimentos
Camino de Vera, s/n 46022.

INTRODUCCIÓN

La estevia (*Stevia rebaudiana*) es una planta perenne originaria de Paraguay perteneciente a la familia Asteraceae (Goyal et al., 2010). La principal característica de la hoja de estevia es su elevado sabor dulce, entre 250-300 veces superior al de la sacarosa, consecuencia de la presencia de glucósidos de esteviol (Ghanta et al., 2007). El uso más común de la hoja de estevia está dirigido a la extracción y purificación de los esteviosidos con el fin de obtener un edulcorante natural acalórico, aunque la hoja de la planta posee otras propiedades terapéuticas y antioxidantes que le proporcionan los diferentes compuestos fenólicos y flavonoides, presentes en ella (Tadhani et al., 2007; Shukla et al., 2009; Muanda et al., 2011). De ahí el creciente interés en el uso no solo de los esteviosidos aislados sino de extractos acuosos de hoja deshidratada de estevia. Estos extractos podrían consumirse a modo de infusión o ser incorporados a diferentes formulaciones alimentarias como zumos, galletas, mermeladas, golosinas, etc. La EFSA (European Food Safety Authority) reconoció la seguridad de los extractos de hoja de estevia para uso alimentario en noviembre de 2011 (EFSA, 2011). La separación de los principios activos de la hoja deshidratada o fresca puede realizarse fácilmente por medio de una extracción acuosa. Sin embargo, en ciertos casos la aplicación de elevadas temperatura y tiempos prolongados de extracción pueden conducir a la pérdida de las propiedades antioxidantes. La aplicación tanto de ultrasonidos como de energía de microondas podría aumentar la velocidad de transferencia de materia y por tanto el rendimiento de extracción de compuestos antioxidantes a partir de material vegetal, y por tanto de hojas de estevia. Algunos procesos en los que se ha aplicado con éxito serían la extracción de compuestos antioxidantes a partir de cáscaras de cítricos (Ya-Qin Ma et al., 2009) y de aceites y polifenoles en semillas de uva (Da Porto et al., 2012).

Por otro lado, las ondas electromagnéticas a la frecuencia de microondas provocan un movimiento interno de migración y rotación de las moléculas bipolares, principalmente el agua, al intentar orientarse en el campo electromagnético. Una de las principales ventajas de

este método es la notable reducción del tiempo de extracción con respecto al método convencional. En este contexto, Jawad et al. (2012) lo han aplicado con éxito la energía de microondas en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de mandarina.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos y de energía microondas en el proceso de extracción de compuestos antioxidantes a partir de hoja deshidratada de estevia. Concretamente, se ha evaluado el efecto de la temperatura y tiempo de extracción convencional, con ultrasonidos y microondas sobre la capacidad antioxidante total, contenido en fenoles totales y flavonoides totales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia prima y preparación de la muestra

El trabajo se ha llevado a cabo utilizando hojas de estevia (*Stevia rebaudiana*) deshidratada de producción ecológica de la marca Raab Vitalfood, adquiridas en el mercado local. Se realizaron extracciones sólido-líquido de hojas deshidratadas de estevia en agua en una relación constante producto:disolvente de 1:100 (p/p) mediante tres técnicas diferentes: extracción convencional a presión atmosférica (50, 70, 90 y 100 °C durante 1, 5, 20 y 40 minutos); energía de microondas (potencia relativa de 1,98 W/g de infusión durante 1, 2, 3 y 5 minutos y a 3,30 W/g de infusión durante 1 y 2 minutos) y ultrasonidos (50, 70 y 90 °C durante 1, 5 y 20 minutos). Posteriormente, los extractos acuosos se filtraron con papel de filtro y se dejaron enfriar para llevar a cabo los análisis que se realizaron por triplicado.

Determinación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante (AA) del extracto de hoja se midió según el método descrito por Shahidi et al. (2006) con algunas modificaciones. A 0,1 mL de la muestra diluida en metanol se le añadieron 3,9 mL de una disolución de DPPH de 0,024 g/L y después de 30 minutos se midió la absorbancia A 515 nm. La actividad antioxidante (%) de las muestras fue calculada en función de la siguiente expresión: $AA(\%) = (A_{t=0} - A_{t=30}) / A_{t=0}$. Donde $A_{t=0}$ es la absorbancia inicial del DPPH y $A_{t=30}$ es la absorbancia de la muestra después de 30 minutos. La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de Trolox.

Determinación de fenoles totales

Las muestras fueron analizadas por el método colorimétrico modificado de Folin-Ciocalteu (Sakanaka et al., 2004). Para ello, 0,125 mL de una dilución conocida del extracto fueron añadidos a una cubeta con 0,5 mL de agua destilada. A continuación se adicionaron 0,125 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla se mantuvo en reposo durante 6 minutos y

después se le añadieron 1,25 mL de una disolución de sodio carbonato al 7% y 1 mL de agua destilada. El color evolucionó durante 90 minutos y la absorbancia fue medida a 760 nm. La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de ácido gálico.

Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides fue determinado usando el método colorimétrico descrito por Bhatti et al. (2007). Un volumen de 0,25 mL de una dilución conocida de la muestra se mezcló con 1 mL de agua destilada en una cubeta. A continuación se le añadieron 0,075 mL de una disolución de nitrato sódico al 5%. Después de 6 minutos, se añadieron 0,150 mL de cloruro de aluminio al 10% y la mezcla se dejó reposar durante 5 minutos antes de añadirle 0,5 mL de hidróxido sódico 1M. Finalmente se adicionaron 2 mL de agua destilada y se midió la absorbancia inmediatamente a 510 nm. La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de (+)-catequina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de las condiciones de extracción en infusiones de estevia sobre el contenido de fenoles totales

En la figura 1 se presentan el contenido en fenoles totales, expresados como mg de ácido gálico eq./g estevia, según el método de extracción y sus variables (tiempo, temperatura o potencia). La extracción convencional consiguió un mayor rendimiento en la obtención de fenoles totales cuando se trabajó 90°C. Un aumento de la temperatura hasta los 100 °C no mejoró en ningún caso la extracción, probablemente debido al deterioro sufrido por los compuestos fenólicos al alcanzar temperaturas de ebullición tal y como observó Liazid et al. (2007) que determinados compuestos fenólicos dejaban de ser estables. Por otra parte, el aumento en el tiempo de proceso no mejoró la extracción de fenoles a excepción de 70 °C.

Respecto a la extracción de fenoles totales con ultrasonidos, el efecto del tiempo fue más significativo que la temperatura, sin presentarse unas diferencias tan marcadas entre 50 y 90°C como en el método convencional. En este caso, la máxima extracción de fenoles totales se centrarían en el empleo de tiempos de proceso más elevado y temperaturas más bajas (50°C durante 20 min), lo que conlleva la ralentización del proceso y pueden haber interacciones con otros componentes susceptibles de sufrir deterioro a prolongadas exposiciones de ultrasonidos. Otros autores que observaron que a temperaturas mayores de 50 °C con extracción asistida por ultrasonidos no mejoraron la extracción de fenoles totales en cáscara de cítricos (Ya-Qin Ma et al., 2009; Kamran et al., 2010). Sin embargo, a

diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, estudios previos ponen de manifiesto que los ultrasonidos mejoran la extracción de fenoles de otros productos (Mason et al., 1996; Vinatoru et al., 2001).

En cuanto a la extracción por microondas, potencias superiores a 3,30 W/g de infusión para tiempos superiores a 2 minutos implicaron la ebullición y desbordamiento de la muestra. Para los tiempos de proceso en los que se trabajó a las dos potencias, no se registraron diferencias significativas en la cantidad de fenoles extraídos. Considerando la potencia aplicada de 1,98 W/g de infusión, sí que se evidenció un aumento de la extracción de fenoles a 3 y 5 minutos.

Influencia de las condiciones de extracción en infusiones de estevia sobre el contenido de flavonoides totales

La figura 2 presenta los resultados de flavonoides, expresados como mg de catequina eq./g estevia, según el método de extracción y sus variables (tiempo, temperatura o potencia). Como en el caso de los fenoles totales, la mayor extracción de flavonoides tuvo lugar cuando se utilizó el método convencional y se trabajó a 90°C. Además, en este caso, el incremento en la temperatura aumentó la extracción de flavonoides, incluso a temperaturas de ebullición (100 °C), lo que pondría de manifiesto la mayor termorresistencia de estos compuestos en comparación con los fenoles. En la extracción con ultrasonidos, tampoco el aumento en la temperatura contribuyó a mejorar la extracción de flavonoides, aunque el tiempo de proceso sí. En el caso de la aplicación de microondas, la extracción de flavonoides siguió la misma tendencia que en la extracción de fenoles, obteniéndose la mayor extracción de flavonoides utilizando una potencia de 1,98 W/g de infusión durante 5 minutos.

Influencia de las condiciones de extracción en infusiones de estevia sobre la actividad antioxidante

En la figura 3 se presentan los resultados de actividad antioxidante, expresados como mg trolox eq./g estevia, según el método de extracción y sus variables (tiempo, temperatura o potencia). La extracción convencional resultó ser el método más efectivo para preservar, al máximo, la capacidad antioxidante de las hojas de estevia. Así, mientras la extracción convencional permite obtener valores de actividad antioxidante de hasta 131 mg trolox eq./g estevia a 90 °C y 20 minutos, tanto con ultrasonidos como con microondas la actividad antioxidante se sitúa entorno a un valor medio de 100 mg trólox eq./g estevia en las condiciones más favorables. Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los de otros autores que consiguieron un incremento del rendimiento en la extracción asistida por ultrasonidos (Vinatoru et al., 2001). Sin embargo, Inglett et al. (2009) obtuvieron una menor

actividad antioxidante por extracción con microondas, ya que la energía aplicada por el microondas podría degradar determinados compuestos antioxidantes.

Al igual que ocurre con los fenoles, en el método convencional, un aumento de temperatura por encima de los 90°C resultó tener un efecto negativo, posiblemente debido a la inestabilidad de los compuestos antioxidantes a elevadas temperaturas (Inglett et al., 2009). Cuando se aplicaron ultrasonidos, los extractos con mayor actividad antioxidante fueron aquellos obtenidos a 70°C durante 1 minuto, no existiendo influencia del tiempo de extracción. En cuanto a la aplicación de energía de microondas, aumento la actividad antioxidante de los extractos de estevia conforme aumento el tiempo de extracción. Respecto al efecto de la potencia aplicada, la actividad antioxidante sigue la misma tendencia que ocurre con los compuestos fenólicos y flavonoides.

CONCLUSIONES

La extractabilidad de los compuestos antioxidantes en la infusión de hojas de estevia se vio afectada por el método de extracción, así como por la temperatura y en menor medida por el tiempo de extracción. La aplicación de ultrasonidos y la energía de microondas degradan los compuestos antioxidantes presentes en los extractos acuosos de estevia. La extracción convencional consiguió un mayor rendimiento en la obtención de actividad antioxidante (90°C y 20 minutos). Aunque ni la extracción por ultrasonidos ni por microondas mejoraron la extracción de estos compuestos respecto a la convencional, hay que destacar que la extracción por microondas es la que obtuvo valores más cercanos a la convencional reduciendo así el tiempo de extracción de 20 a 5 minutos.

BIBLIOGRAFÍA

Bhatti, H., Iqbal, Z., Chatha, S., Bukhari I. (2007). Variations in oil potential and chemical composition of *Eucalyptus crebra* among different districts of Punjab-Pakistan. *International Journal of Agricultural and Biology*, 9, 136-138.

Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2012). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) sedes. *Ultrasonics Sonochemistry* xxx (2013) xxx–xxx.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011) Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *Journal* 2011; 9(1):1972

Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A., Chattopadhyay, S. (2007). Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 10962–10967.

- Goyal, S., Samsher, K., Goyal, R.K. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 1-10.
- Inglett, G.E., Rose, D.J., Chen, D., Stevenson, D.G., Biswas, A. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) with or without microwave irradiation. *Food Chemistry* 119 (2010) 1216–1219.
- Jawad A., T.A.G. Langrish (2011). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 162–174.
- Liaqid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C.G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 1140 (1–2), 29–34.
- Muanda, F., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Science and Technology*. 44,1865-1872.
- Kamran M, Abert-Vian M., Fabiano-Tixier, Dangles O., Chemat F. (2009). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119 (2010) 851–858.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y. (2004). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89, 569-575.
- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C.M., Wall, D.S. (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99, 478-483.
- Shukla S., Mehta A., Menta P., Bajpai V. (2011) Antioxidant ability and phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*. doi:10.1016/j.etp.2011.02.002.
- Shukla S., Mehta A., Bajpai V. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food Chemistry Toxicology*. 47, 2338-2343.
- Tadhani, M., Patel, V., Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 323–329.
- Vinatoru, F. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303–313.
- Ya-Qin, M., Jian-Chu C., Dong-Hong L., Xing-Qian Y. (2008). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 16 (2009) 57–62.

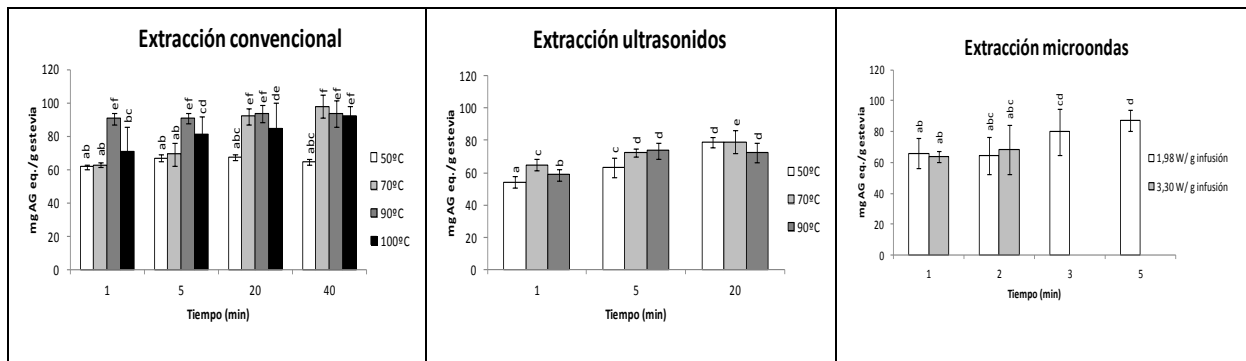


Figura 1. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico equivalentes/g hoja de estevia) en función de la temperatura y el tiempo de extracción.

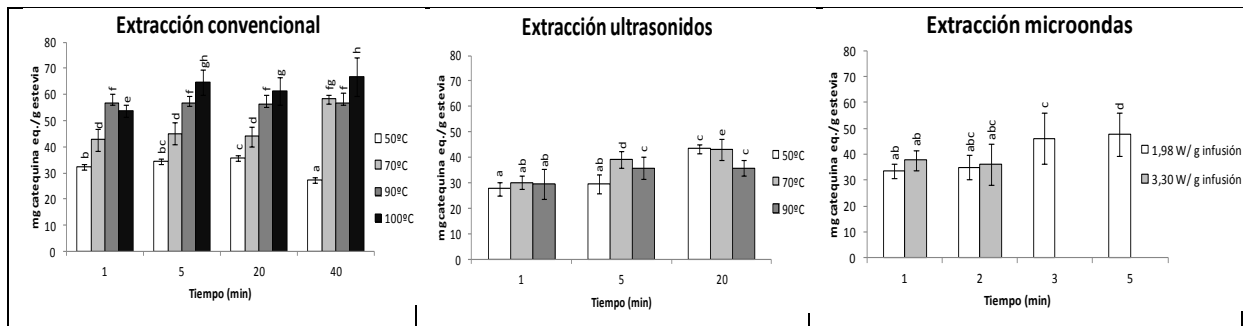


Figura 2. Contenido en flavonoides totales (mg catequina equivalentes/g hoja de estevia) en función de la temperatura y el tiempo de extracción.

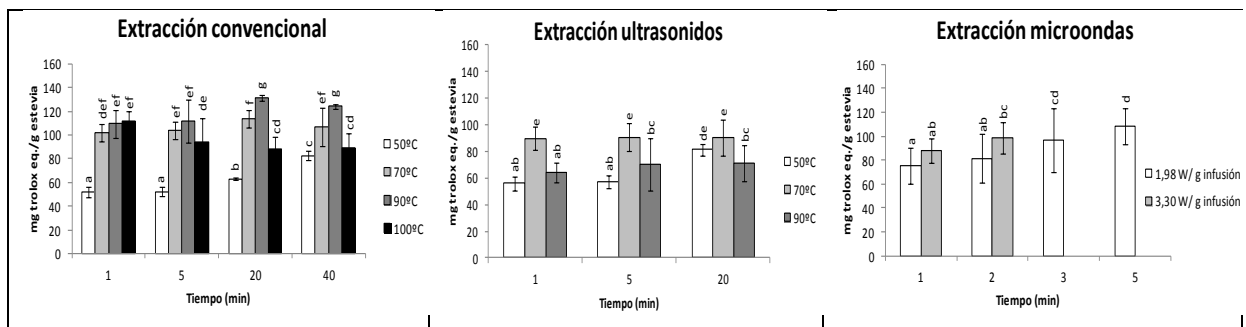


Figura 3. Contenido en antioxidantes totales (mg Trolox equivalentes/ g hoja de estevia) en función de la temperatura y el tiempo de extracción.

CARACTERIZACIÓN DE ESPUMAS DULCES SALUDABLES FORMULADAS CON ISOMALTULOSA Y OLIGOFRUCTOSA

Ángela Periche, Marisa Castelló, Ana Heredia, Eva Doménech, Isabel Escriche, Ana Andrés

Universidad Politécnica de Valencia,
Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo,
Departamento de Tecnología de Alimentos
Camino de Vera, s/n 46022.

INTRODUCCIÓN

El consumo de dulces y golosinas debido a su elevado contenido en azúcares ha estado siempre unido al desarrollo de caries, a la subida del nivel de glucosa en sangre y al aumento de peso. Por ello, la sociedad y la industria del dulce está cada vez más concienciada en la importancia de la alimentación en la salud. Estos problemas pueden reducirse reemplazando los azúcares convencionales por otros edulcorantes alternativos disponibles recientemente en el mercado, como la isomaltulosa y la oligofructosa, que presentan ventajas adicionales.

La oligofructosa es un oligosacárido lineal formado por entre 10 y 20 monómeros de fructosa, unidos por enlaces β (1 \Rightarrow 2) y que pueden contener una molécula inicial de glucosa. Es una fibra soluble con carácter prebiótico y por lo tanto mejora la salud del tracto gastrointestinal. Además, mejora la absorción del calcio, tiene un nivel calórico 3 veces inferior al de la sacarosa y es del 30-50% del poder edulcorante del azúcar común.

La isomaltulosa es un disacárido reductor y es comercialmente producida a partir de la sacarosa por la reorganización enzimática del enlace glucosídico entre la glucosa y fructosa (Beneo-Palatinit, 2010a). En cuanto a su apariencia es similar a la sacarosa y su poder edulcorante está comprendido entre un tercio y la mitad de la misma (Lina *et al.*, 2002; Beneo-Palatinit, 2010a,b; Bebyal, 2012). Si bien, la solubilidad de la isomaltulosa es más baja en comparación con la sacarosa (29%). Aunque, tiene las mismas calorías que muchos otros azúcares (4kcal/g), tiene bajo índice glicémico e insulinémico. Al contrario de la sacarosa, la isomaltulosa es anticariogénica debido a su fuerte enlace molecular. Apenas es fermentada por los microorganismos ambientales u orales ya que no la utilizan como sustrato, y en consecuencia no se producen ácidos nocivos capaces de atacar al esmalte dental, evitando así la formación de carie dental (Beneo-Palatinit, 2010b; Bucke y Cheetham, 1986).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la sustitución de sacarosa y jarabe de glucosa de las espumas dulces convencionales por distintas combinaciones de

isomaltulosa y oligofruktosa, considerando también diferentes porcentajes de gelatina, sobre su humedad, actividad de agua, textura y color. Además, también se tuvo en cuenta el nivel de gelatina empleado en la formulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Isomaltulosa (Beneo-Palatinit; Germany), sacarosa (Azucarera Ebro S.L.; Spain), oligofruktosa (Frutalose OFP, Sensus, Netherlands), glucose syrup 43 DE (Emilio Peña, S.A., Spain), almidón (Roquette, France), gelatina A 220 Bloom (Junca Gelatines S.L.; Spain), aroma de fresa (Flavorix Aromáticos S.A.; Spain), colorante natural (Roha Europe S.L.; Spain) and sunflower oil (Koipesol, Spain) se utilizaron para la formulación de las espumas dulces.

Procedimiento de elaboración

Las espumas dulces se formularon con un 4-6 % de gelatina, 36% de agua y 58-60% de azúcares (Edwards, 2002). Además, se añadieron 0,2 ppm colorante y 0,5 ppm de aroma a fresa. Se estudiaron cuatro mezclas de azúcares diferentes. Las muestras control (código S) preparados con 40% de sacarosa y 60% de jarabe de glucosa. El resto de muestras se prepararon combinando diferentes azúcares: isomaltulosa:oligofruktosa (30:70, w/w) (código: I30); isomaltulosa:oligofruktosa (50:50, w/w) (código: I50); isomaltulosa:oligofruktosa (70:30, w/w) (código: I70). El porcentaje de gelatina (4, 5 o 6%) se indica al lado de los códigos. Se estudiaron un total de 12 muestras.

Se utilizó un robot de cocina (Thermomix, TM31, Vorwerk, Germany) para la mezcla de los azúcares y el agua manteniéndolo a temperatura de ebullición durante 10 minutos a 300 rpm.

Esta mezcla se agitó hasta alcanzar los 60°C y se midieron el pH y los °Brix. La gelatina se disolvió en agua en un ratio 1:2 (w/w) y se añadió a la mezcla de azúcares junto con el colorante y aroma. Se mezcló durante 5 minutos a 60°C and 300 rpm y 10 minutos más a 1860 rpm para la incorporación de aire al producto. Por último, se vertió la mezcla en moldes de silicona recubiertos con aceite y se dejó enfriar en una cámara a 20 °C durante 24 horas. Las muestras se sacaron de los moldes y se llevaron a cabo los análisis de textura, color, actividad de agua y humedad.

Determinaciones analíticas

Sólidos solubles, pH, humedad y actividad de agua

En el jarabe inicial se analizaron: los sólidos solubles (°Brix) (medidos con un refractómetro at 20 °C, ATAGO 3 T), y el pH (por un pH-metro, SevenEasy, Mettler Toledo). En el producto final se analizaron: la humedad (AOAC, 20.103, 2000) y la actividad de agua (higrómetro de punto de rocío, Aqualab, 4TE). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Color

Las medidas de color se llevaron a cabo utilizando un espectrocolorímetro (MINOLTA modelo CM-3600d) conectado a un ordenador que incorpora el software SpectraMagic. Antes de cualquier análisis se realizó la calibración del equipo con un patrón negro, calibración del cero, y con un patrón blanco, calibración del blanco, habiendo previamente colocado la esfera mediana, MAV, de 8 mm de diámetro. Se obtuvieron las coordenadas del espacio CIE L*a*b (CIELAB) utilizando como referencia el observador 10° y el iluminante primario D₆₅.

Textura

La textura de las espumas dulces se determinó mediante un análisis de perfil de textura (TPA) utilizando un texturómetro (TA.XT.plus Texture Analyser, UK). El análisis consiste en una doble compresión con una sonda cilíndrica de 45 mm de diámetro de base plana a una velocidad constante de 1 mm/s y un porcentaje de deformación del 50%. La determinación se realizó por triplicado. De la curva resultante fuerza-tiempo se cuantificaron los siguientes parámetros definidos por Bourne (1978) como: dureza(N) (pico máximo de fuerza durante la primera compresión), elasticidad (la altura que la muestra recupera durante el tiempo entre la primera y segunda compresión, cohesividad (ratio del área de la fuerza positiva durante la segunda compresión y la primera) y gomosidad (N) (dureza x cohesividad).

Todos los análisis se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados de los °Brix y pH del jarabe de cada formulación, así como la humedad y la actividad de agua de las espumas dulces obtenidas en función del porcentaje de sustitución de azúcares convencionales y del porcentaje de gelatina empleado. Por otra parte, en la tabla 2 se presentan los valores de los F-ratio del ANOVA realizado para todas las variables estudiadas.

El contenido en sólidos solubles de la fase líquida (°Brix) fue menor en el caso de las muestras formuladas con sacarosa y jarabe de glucosa, que en el resto de los casos. Si bien, este contenido en sólidos solubles fue aumentando en las formulaciones con mayor concentración de isomaltulosa. En relación al pH del jarabe, ocurrió lo contrario, disminuyó en las formulaciones con mayor concentración de isomaltulosa respecto al control, formulada con jarabe de glucosa. En este sentido, la bajada en el pH en las muestras formuladas con isomaltulosa-oligofruktosa podría suponer un aumento en la vida útil de este tipo de productos. Respecto a los resultados de humedad de las espumas dulces, en general, todos los casos se encuentran comprendidos en el rango recomendado para este tipo de productos [15-22%] (Torres, 2011) a excepción de las formuladas con jarabe de glucosa, a diferencia de las formuladas solo con azúcares granulados. Además, el análisis estadístico (tabla 2) pone de manifiesto que hay un efecto significativo de la composición pero no del porcentaje de gelatina utilizado. Por lo tanto, la combinación de los azúcares en su forma granulada isomaltulosa-oligofruktosa disminuyó el porcentaje de agua de las muestras con independencia de la cantidad de gelatina utilizada. Las muestras control y las I70 presentaron mayor actividad de agua con respecto a la I30 y I50, esto pone de manifiesto la menor disponibilidad de agua suponiendo una ventaja para estas últimas muestras alargando de esta forma la vida útil del producto. En resumen, la formulación I30 tiene un menor contenido de a_w , similar contenido en sólidos solubles que la control y humedad dentro del rango recomendado por Edwards (2002) garantizando de esta forma una mayor estabilidad del producto.

La figura 1 muestra los gráficos de interacción para los valores de elasticidad, dureza, cohesividad y gomosidad de las espumas dulces formuladas con distintos niveles de sustitución de los azúcares convencionales por isomaltulosa y oligofruktosa obtenidos a partir del ensayo de perfil de textura instrumental (TPA). La elasticidad es uno de los parámetros que más caracteriza la textura de este tipo de productos gracias a la incorporación de gelatina, la cual proporciona una textura visco-elástica a éstos y una espuma estable, delicada y elástica (PB Gelatins, 2012; Hamann *et al.*; 2006). Es de destacar que todas las muestras presentaron una elevada elasticidad, valores en torno a 0,9; y similar a la formulación control (S), a excepción de las formuladas con un 70% de isomaltulosa que presentó valores muy por debajo al resto (0,50-0,65). Por lo que la sustitución de las mezclas de azúcares convencionales por isomaltulosa-oligofruktosa (I30 y I50), sería factible al no modificar sustancialmente este parámetro. El análisis estadístico (tabla 2) reveló diferencias estadísticamente significativas únicamente para el factor azúcares, no influyendo en este

parámetro el % de gelatina ni su interacción. En cuanto a la dureza, se puede apreciar un incremento significativo de este parámetro en la formulación I70. Este fenómeno podría estar relacionado con la formación de cristales de isomaltulosa (constatado visualmente) en la etapa de enfriamiento de estas muestras (I70) como consecuencia de la baja solubilidad de este disacárido a temperatura ambiente (Mitchell, 2006). El efecto del porcentaje de gelatina cambió en función del tipo de formulación, existiendo una interacción estadísticamente significativa entre ambas variables tal y como refleja el resultado del ANOVA (Tabla 2). Al igual que ocurre con la dureza, las formulaciones estudiadas en este trabajo presentaron una cohesividad similar a las espumas formuladas con los azúcares convencionales (S). La cohesividad es un indicativo de la estabilidad estructural y por tanto, una elevada cohesividad repercute positivamente en la calidad del producto. La gomosidad es el resultado de la interacción entre la dureza y las fuerzas de cohesión que actúan a nivel estructural. De hecho, el efecto de las variables de formulación (mezcla de azúcares y porcentaje de gelatina) sobre este parámetro siguió una pauta similar a la descrita para la dureza.

En la figura 2 se presentan la luminosidad frente a la coordenada a^* y los valores de las muestras en el diagrama cromático b^*a^* en función del tipo de azúcares así como del % de gelatina empleados en la formulación. Como se puede observar, en todos los casos el porcentaje de gelatina fue el factor que influyó más significativamente en la luminosidad y en las coordenadas a^* y b^* (Tabla 2). Concretamente, las muestras con menor porcentaje de gelatina presentaron la menor luminosidad para todas las formulaciones, especialmente para el control (S). En el caso de las muestras S y I70, a medida que aumentó el porcentaje de gelatina, aumentó la luminosidad. En las muestras I30 e I50 tuvieron más luminosidad las muestras con un 5% de gelatina. Es decir, que aunque para todos los casos, un 4 % de gelatina, supondría un descenso de la luminosidad, no se observó un aumento proporcional con el aumento en el porcentaje de gelatina utilizado en todos los casos. Respecto a la coordenada a^* , de nuevo el porcentaje de gelatina tuvo un mayor efecto significativo que la formulación considerada o la interacción entre ambos factores. Las espumas que contenían un 4% de gelatina, presentaron mayores valores de coordenada a^* , especialmente en las formulaciones S e I70. Este comportamiento, indicaría que las muestras con menor contenido en gelatina presentaron una tendencia hacia colores más rojizos. En cuanto a la coordenada b^* , las diferencias debidas al porcentaje de gelatina utilizado, fueron menores que en la L^* y en a^* . Sólo se observó un aumento significativo de la coordenada b^* en las muestras I30 con un 4% de gelatina. En cualquier caso, los valores de la coordenada b^* registrados fueron muy

pequeños, por lo que las diferencias encontradas no supondrían grandes desviaciones del color en la posición del diagrama cromático b^*a^* .

CONCLUSIÓN

Las espumas dulces formuladas con isomaltulosa (30% y 50%) y oligofructosa independientemente del nivel de gelatina empleado alcanzaron valores de actividad de agua menor que la formulada con azúcares convencionales, lo que indicaría la posible mayor estabilidad microbiana de esta formulación. Además, las espumas dulces con mayor porcentaje de isomaltulosa (70%) mostraron valores de dureza muy superiores a las convencionales, asociados al menor contenido de humedad de las mismas ($17\pm 2\%$), no siendo recomendable para el desarrollo de este tipo de productos. Sin embargo, en cuanto al parámetro de la elasticidad, fundamental en este tipo de productos, las muestras I30 y I50 tienen un valor similar a la convencional. Por último, el porcentaje de gelatina fue el factor que influyó más significativamente sobre los parámetros de color. Las nuevas espumas dulces respecto a la convencional registraron mayor luminosidad, menores valores de coordenada a^* (color menos rojizo) y la coordenada b^* presentó tendencias distintas en función de la combinación de edulcorantes y gelatina utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International (17th edition). Gaithersburg, MD, USA.

BEBYAL. (2012). Byaltulosa. [en línea]. Fecha de consulta: 29 de mayo de 2012. Dirección URL: <http://bebyal.com.mx/Edulcorantes/Byaltulosa.pdf>

BENEO-PALATINIT. (2010a). Palatinose™ – The only toothfriendly sugar for optimized energy supply. [en línea]. Fecha de consulta: 29 de mayo de 2012. Dirección URL: [http://www.beneo-palatininit.com/en/Food Ingredients/Isomaltulose/What is Isomaltulose/FAQ/](http://www.beneo-palatininit.com/en/Food%20Ingredients/Isomaltulose/What%20is%20Isomaltulose/FAQ/)

BENEO-PALATINIT. (2010b). PALATINOSE™ – The functional carbohydrate providing better energy. [en línea]. Fecha de consulta: 28 de junio de 2012. Dirección URL: [http://www.beneo-palatininit.com/en/Food Ingredients/Isomaltulose/What is Isomaltulose/Palatinose-Brochure EN 1.pdf](http://www.beneo-palatininit.com/en/Food%20Ingredients/Isomaltulose/What%20is%20Isomaltulose/Palatinose-Brochure%20EN%201.pdf)

Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. Food technology, 32, 62-66.

Bucke, C.; Cheetham, P.S.J. (1986). Method of reducing dental plaque formation with products for human or animal consumption using isomaltulose sucrose substitute. United States Patent nº 4,587,119.

Edwards, W. P. (2002). La ciencia de las golosinas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 200 pp.

Hamann, D.D.; Zhang, J.; Daubert, C.R.; Foegeding, E.A.; Diehl Jr, K.C. (2006). Analysis of compression, tension and torsion for testing food gel fracture properties. *Journal of Texture Studies*, 37(6): 620-639.

Lina, B.A.R.; Jonker, D.; Kozianowski, G. (2002). Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40:1375-1381.

Mitchell, H.L. (2006). *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Editorial Blackwell Publishing Ltd. Oxford. 432pp.

Pb Gelatins. (2012). Propiedades estabilizantes del batido y la espuma. [en línea]. Fecha de consulta: 27 de junio de 2012. Dirección URL: http://www.pbgelatins.com/es/applications/food_applications/confectionary/

Torres, J. D. (2001). Las industrias de chocolates, dulces y turrone.

Tabla 1. °Brix y pH del jarabe y humedad (%) y actividad de agua de las espumas dulces en función del grado de sustitución de los azúcares convencionales por distintos porcentajes de isomaltulosa y oligofruktosa y del porcentaje de gelatina utilizado.

Formulación	Jarabe			Producto: Espuma dulce	
	% Gelatina	°Brix	pH	Humedad (%)	a _w
S	4			27.24(1.4) ^d	0.821 ^d
	5	72.1(1.5) ^a	6.70(0.18) ^d	24.1(0.6) ^c	0.851 ^e
	6			25.24(1.5) ^d	0.820 ^d
I30	4			20.8(1.3) ^b	0.716 ^a
	5	73.7(0.5) ^b	6.31(0.12) ^c	22.06(0.6) ^c	0.733 ^b
	6			20.6(0.9) ^b	0.754 ^b
I50	4			20.6(0.4) ^b	0.758 ^b
	5	74.2(0.7) ^b	5.8(0.2) ^b	19.7(1.4) ^a	0.799 ^c
	6			22.2(0.5) ^c	0.796 ^c
I70	4			17.6(0.4) ^a	0.832 ^d
	5	74.4(1.2) ^b	5.61(0.09) ^a	17(2) ^a	0.870 ^e
	6			18.4(2) ^a	0.826 ^d

S: control (jarabe de glucosa: 60% y sacarosa: 40%). I30 (Isomaltulosa: 30% y oligofruktosa: 70%). I50 (Isomaltulosa: 50% y oligofruktosa: 50%). I70 (Isomaltulosa: 70% y oligofruktosa: 30%).

Tabla 2. Valores del Cociente F-ratio del ANOVA

	Azúcares (A)	Gelatina (G)	Interacción (AxG)
x _w	41.93 ^{***}	0.96 ^{ns}	1.99 ^{ns}
a _w	87.08 ^{***}	14.12 ^{***}	3.17 ^{**}
Dureza	174.93 ^{***}	3.95 ^{**}	4.64 ^{***}
Gomosidad	248.82 ^{***}	16.18 ^{***}	13.40 ^{***}
Elasticidad	122.27 ^{***}	1.38 ^{ns}	1.40 ^{ns}
Cohesión	949.77 ^{***}	2.14 ^{ns}	6.14 ^{***}
L	154.51 ^{***}	254.92 ^{***}	68.95 ^{***}
a	15.64 ^{***}	52.02 ^{***}	7.05 ^{***}
b	38.21 ^{***}	4.4 [*]	24.32 ^{***}
c	15.98 ^{***}	55.29 ^{***}	5.82 ^{***}
h	31.87 ^{***}	1.35 ^{ns}	24.47 ^{***}

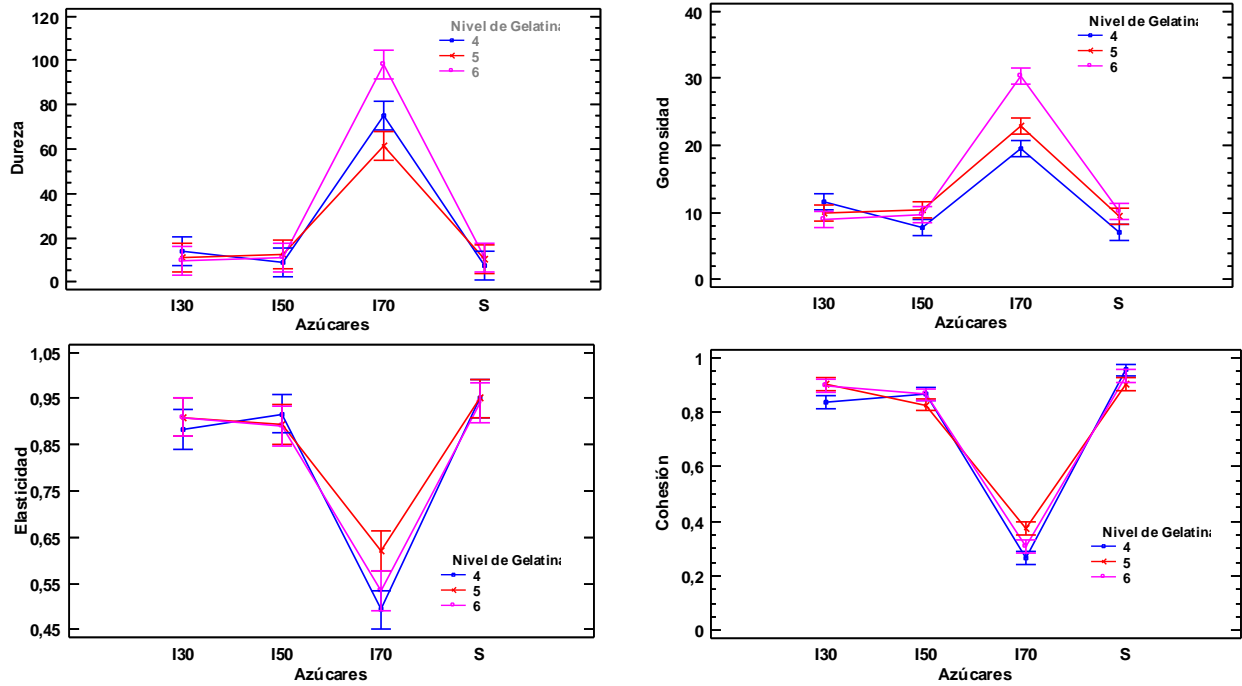


Figura 1. Gráficos de interacción para los valores de dureza, gomosidad, elasticidad, cohesión de las espumas control y las formuladas con diferentes proporciones de isomaltulosa y oligofruktosa.

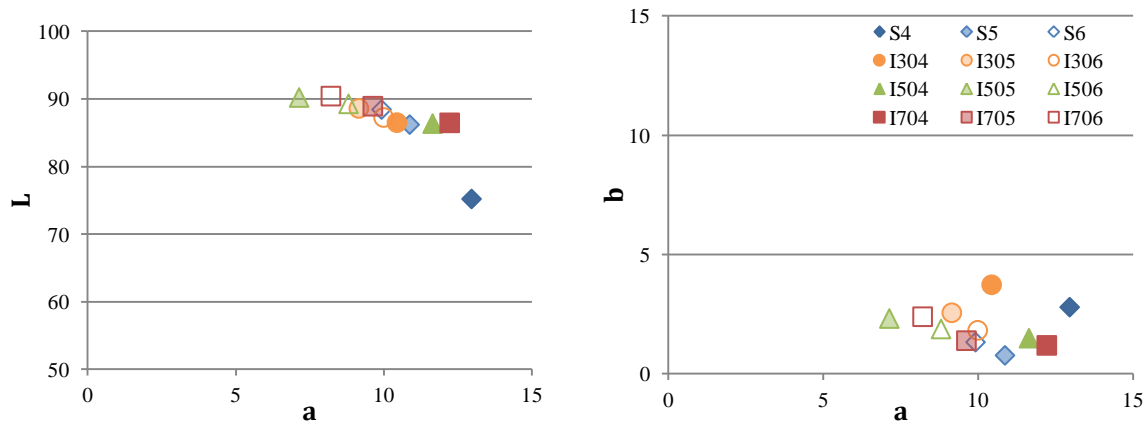


Figura 2. Planos cromáticos L*a* y b*a*.

S: control (jarabe de glucosa: 60% y sacarosa: 40%). I30 (Isomaltulosa: 30% y fructosa: 70%). I50 (Isomaltulosa: 50% y fructosa: 50%). I70 (Isomaltulosa: 70% y fructosa: 30%). El porcentaje de gelatina (4, 5 y 6%) se indica con los números 4, 5 y 6, respectivamente.

EFFECTO DEL MATERIAL DE ENVASADO EN LA HUMEDAD, ACTIVIDAD DE AGUA, COLOR Y TEXTURA DE ESPUMAS DULCES SALUDABLES FORMULADAS CON ISOMALTULOSA Y OLIGOFRUCTOSA.

Ángela Periche, Marisa Castelló, Ana Heredia, Isabel Escriche, Ana Andrés

Universidad Politécnica de Valencia,
Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo,
Departamento de Tecnología de Alimentos
Camino de Vera, s/n 46022.

INTRODUCCIÓN

El consumo de golosinas está relacionado con problemas de salud como son la caries dental, el sobrepeso y la diabetes como consecuencia de su elevado contenido en azúcares. Afortunadamente, en el mercado existen en la actualidad alternativas saludables a los edulcorantes convencionales con características tecnológicas adecuadas para su uso en alimentación, como son la isomaltulosa y la oligofructosa. En concreto, la isomaltulosa es un disacárido isómero de la sacarosa, pero que presenta la ventaja de no ser cariogénico y de liberarse lentamente en sangre. Por otra parte, la oligofructosa es una fibra soluble dulce que tiene carácter prebiótico y contribuye a la mejor absorción del calcio.

Para poder distribuir este tipo de productos, como en la mayoría de alimentos, se necesita un soporte físico que le confiera protección y alargue lo máximo posible su vida útil. Esto se consigue con la selección de un envase adecuado. En el caso de las golosinas, el principal problema que se conoce por el efecto del tiempo de almacenamiento es el endurecimiento de las mismas como consecuencia de pérdida de actividad agua. En este sentido, considerando el criterio del nivel de barrera al vapor de agua, los materiales de envasado que presentan mayor permeabilidad al mismo son desde el vidrio, como el más estanco, hasta todo el abanico de materiales plásticos, con mayor o menor flexibilidad, ya sea tipo tarrina o tipo bolsa. Además, no hay que olvidar que la compra de este tipo de productos se realiza habitualmente por impulso y por tanto, es muy importante que el contenido del envase sea visible, por lo que la transparencia es también una propiedad necesaria en el material que se utilice para la conservación de las golosinas.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la evolución de la humedad, actividad de agua, color y textura de espumas dulces formuladas con edulcorantes saludables (isomaltulosa y oligofructosa) a lo largo del almacenamiento en función del tipo de envase utilizado (vidrio, tarrina o plástico).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Isomaltulosa (Beneo-Palatinit; Germany), sacarosa (Azucarera Ebro S.L.; Spain), oligofruktosa (Frutalose OFP, Sensus, Netherlands), glucose syrup 43 DE (Emilio Peña, S.A., Spain), almidón (Roquette, France), gelatina A 220 Bloom (Junca Gelatines S.L.; Spain), aroma de fresa (Flavorix Aromáticos S.A.; Spain), colorante natural (Roha Europe S.L.; Spain) and sunflower oil (Koipesol, Spain) se utilizaron para la formulación de las espumas dulces.

Procedimiento de elaboración de las espumas dulces

Las espumas dulces se formularon con 4% de gelatina, 36% de agua y 58-60% de azúcares (Edwards 2002). También, se añadió 0.2 ppm colorante y 0.5 ppm de aroma a fresa. Se estudiaron cuatro mezclas de azúcares diferentes. Las muestras control (código S) se prepararon con 40% de sacarosa y 60% de jarabe de glucosa. El resto de muestras se prepararon combinando diferentes azúcares: isomaltulosa:oligofruktosa (30:70, w/w) (código: I30); isomaltulosa:oligofruktosa (50:50, w/w) (código: I50); isomaltulosa:oligofruktosa (70:30, w/w) (código: I70). El porcentaje de gelatina (4, 5 o 6%) se muestra al lado de los códigos. Se estudiaron un total de 12 muestras.

Se utilizó un robot de cocina (Thermomix, TM31, Vorwerk, Germany) para la mezcla de los azúcares y el agua manteniéndolo a temperatura de ebullición durante 10 minutos a 300 rpm. Esta mezcla fue agitada hasta alcanzar los 60°C y se midió el pH y los °Brix. La gelatina se disolvió en agua en un ratio 1:2 (w/w) y se añadió a la mezcla de azúcares junto con el colorante y aroma. Se mezcló durante 5 minutos a 60°C and 300 rpm y 10 minutos más a 1860 rpm para la incorporación de aire al producto. Por último, se vertió la mezcla en moldes de silicona recubiertos con aceite y se dejó enfriar en una cámara a 20 °C durante 24 horas. Las muestras se sacaron de los moldes y se llevaron a cabo los análisis de textura, color, actividad de agua y humedad.

Determinaciones analíticas

Humedad y actividad de agua

En el producto final se analizaron la humedad (AOAC, 20.103, 2000) y la actividad de agua (higrómetro de punto de rocío (Aqualab, 4TE).

Color

Las medidas de color se llevaron a cabo utilizando un espectrocolorímetro (MINOLTA modelo CM-3600d) conectado a un ordenador que incorpora el software

SpectraMagic. Antes de cualquier análisis se realizó la calibración del equipo con un patrón negro, calibración del cero, y con un patrón blanco, calibración del blanco, habiendo previamente colocado la esfera mediana, MAV, de 8 mm de diámetro. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se obtuvieron las coordenadas del espacio CIE L^*a^*b (CIELAB) utilizando como referencia el observador 10° y el iluminante primario D₆₅.

Textura

La textura de las espumas dulces se determinó mediante un análisis de perfil de textura (TPA) utilizando un texturómetro (TA.XT.plus Texture Analyser, UK). El análisis consistió en una doble compresión con una sonda cilíndrica de 45 mm de diámetro de base plana a una velocidad constante de 1 mm/s y un porcentaje de deformación del 50%. La determinación se realizó por triplicado. De la curva resultante fuerza-tiempo se cuantificaron los siguientes parámetros definidos por Bourne (1978) como: dureza (N) (pico máximo de fuerza durante la primera compresión), elasticidad (la altura que la muestra recupera durante el tiempo entre la primera y segunda compresión, cohesividad (ratio del área de la fuerza positiva durante la segunda compresión y la primera) y gomosidad (N) (dureza x cohesividad).

Todos los análisis se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra los resultados de humedad y actividad de agua de las muestras control y las formuladas con isomaltulosa y oligofruktosa envasadas en bolsa, tarrina y vidrio a lo largo de 2 meses de envasado. Los resultados obtenidos de humedad se mantuvieron constantes a partir del día 30 en todos los envases a excepción de los envasados en tarrina que disminuyeron hasta el día 60. En cuanto a la actividad de agua se mantuvo más estable en vidrio para las dos formulaciones. En la formulación de isomaltulosa y oligofruktosa la actividad de agua disminuyó durante el almacenamiento evitando así un posible crecimiento microbiano.

La figura 2 muestra los parámetros de textura analizados (dureza, gomosidad, elasticidad y cohesión) durante los dos meses de almacenamiento de las muestras en los distintos envases. Se puede observar que a partir del día 20 las muestras tuvieron un valor de dureza mucho mayor, si bien hay que destacar que en las envasadas en bolsa ese cambio en la dureza no fue tan pronunciado. No obstante, las muestras formuladas con los edulcorantes saludables fueron ligeramente más duras que las control. En cuanto a la gomosidad, destacar

que este parámetro tuvo el mismo comportamiento que la dureza hasta el día 30, sufriendo una disminución de la misma al día 45 para luego recuperarse al final. Sin embargo este cambio, no se observó para las envasadas en bolsa. Respecto a la elasticidad, las muestras envasadas en bolsa tuvieron una elasticidad menor a partir del día 30, aunque esta disminución no fue excesivamente importante. En cuanto a la cohesión, presentó una evolución inversa a la dureza, disminuyendo a partir del día 30 y para las muestras envasadas en bolsa se mantuvo más o menos constante en el tiempo.

En términos de color, la figura 3 muestra la luminosidad y las coordenadas a y b de las muestras durante los 2 meses de almacenamiento. La luminosidad se mantuvo más estable en todos los casos en bolsa, observándose solo una pequeña variación a lo largo del tiempo. Además las muestras formuladas con isomaltulosa y oligofructosa obtuvieron una luminosidad mayor en todos los casos. La coordenada a* también se mantuvo más estable las muestras almacenadas en bolsa, aunque las muestras control tuvieron un mayor valor de coordenada a y por tanto un color un poco más rojizo. Respecto a la coordenada b*, aumentó cuando las muestras se almacenaron en bolsa no habiendo diferencias muy notables entre las muestras control y las formuladas con isomaltulosa y oligofructosa.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que las espumas dulces formuladas con isomaltulosa y oligofructosa, son estables en el tiempo, sobre todo cuando son envasadas en bolsa porque conservan mejor la textura y el color del producto que son parámetros muy valorados por parte del consumidor en este tipo de productos.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International (17th edition). Gaithersburg, MD, USA.

BEBYAL. (2012). Byaltulosa. [en línea]. Fecha de consulta: 29 de mayo de 2012. Dirección URL: <http://bebyal.com.mx/Edulcorantes/Byaltulosa.pdf>

BENEO-PALATINIT. (2010a). Palatinose™ – The only toothfriendly sugar for optimized energy supply. [en línea]. Fecha de consulta: 29 de mayo de 2012. Dirección URL: http://www.beneo-palatinit.com/en/Food_Ingredients/Isomaltulose/What_is_Isomaltulose/FAQ/

BENEO-PALATINIT. (2010b). PALATINOSE™ – The functional carbohydrate providing better energy. [en línea]. Fecha de consulta: 28 de junio de 2012. Dirección URL: http://www.beneo-palatinit.com/en/Food_Ingredients/Isomaltulose/What_is_Isomaltulose/FAQ/

palatinit.com/en/Food_Ingredients/Isomaltulose/What_is_Isomaltulose/Palatinose-Brochure_EN_1.pdf

Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food technology*, 32, 62-66.

Bucke, C.; Cheetham, P.S.J. (1986). Method of reducing dental plaque formation with products for human or animal consumption using isomaltulose sucrose substitute. United States Patent nº 4,587,119.

Edwards, W. P. (2002). *La ciencia de las golosinas*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 200 pp.

Hamann, D.D.; Zhang, J.; Daubert, C.R.; Foegeding, E.A.; Diehl Jr, K.C. (2006). Analysis of compression, tension and torsion for testing food gel fracture properties. *Journal of Texture Studies*, 37(6): 620-639.

Lina, B.A.R.; Jonker, D.; Kozianowski, G. (2002). Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40:1375-1381.

Mitchell, H.L. (2006). *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Editorial Blackwell Publishing Ltd. Oxford. 432pp.

Pb Gelatins. (2012). Propiedades estabilizantes del batido y la espuma. [en línea]. Fecha de consulta: 27 de junio de 2012. Dirección URL: http://www.pbgelatins.com/es/applications/food_applications/confectionary/

Torres, J. D. (2001). Módulo de las industrias de chocolates, dulces y turrone. Curso de Especialista en Tecnología de Alimentos. Título Propio Universidad Politécnica de Valencia.

FIGURAS

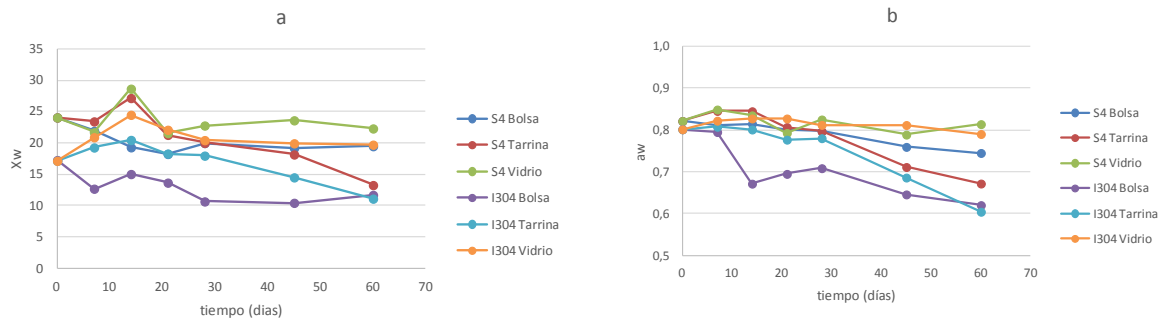


Figura 1. Evolución de la humedad y la actividad de agua de las muestras control y las formuladas con isomaltulosa y oligofruktosa envasadas en bolsa, tarrina y vidrio.

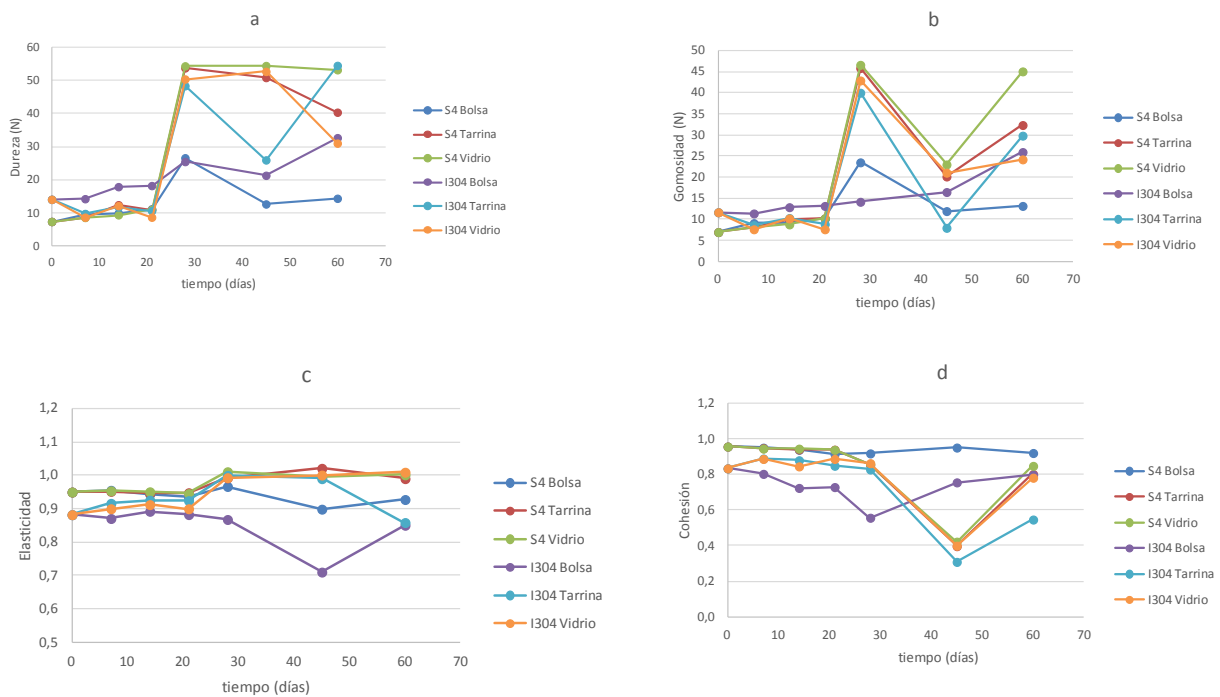


Figura 2. Evolución de los parámetros de textura de las muestras control y las formuladas con isomaltulosa y oligofruktosa envasadas en bolsa, tarrina y vidrio.

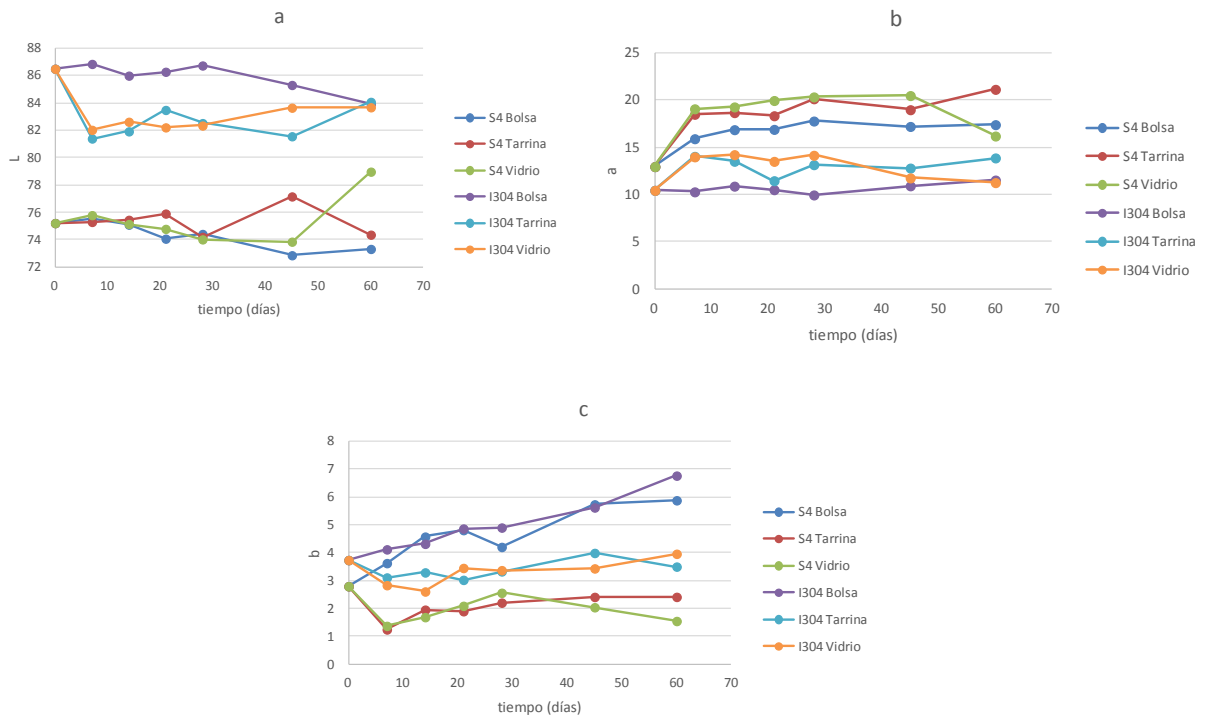


Figura 3. Evolución de los parámetros de color de las muestras control y las formuladas con isomaltulosa y oligofruktosa envasadas en bolsa, tarrina y vidrio.

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE SALVADO DE ARROZ EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y MICROESTRUCTURALES DE FILMS BIODEGRADABLES BASADOS EN DIFERENTES ALMIDONES

Cano, A.^{*(1)}, Jiménez, A.⁽¹⁾, Cháfer, M.⁽¹⁾, Chiralt, A.⁽¹⁾, González, C.⁽¹⁾

amcaem@upvnet.upv.es

⁽¹⁾Instituto de Ingeniería de Alimentos para el desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 48022 Valencia, España.

INTRODUCCIÓN

La gran problemática ambiental generada por el uso de plásticos derivados del petróleo hace necesaria la búsqueda de alternativas como el uso de materiales biodegradables (Chen et al., 2008). Los materiales biodegradables más utilizados para obtener films son los polisacáridos, las proteínas y los lípidos (Falguera et al., 2011). Dentro del grupo de los polisacáridos de origen vegetal, destaca el elevado uso de almidón, que proviene de cereales como el maíz o el trigo, de leguminosas como el guisante o de tubérculos como la patata y la yuca. Tiene estructura granular y está compuesto por dos macromoléculas: la amilosa (estructura lineal) y la amilopectina (estructura ramificada). Ambos polímeros son los responsables de la cristalización del almidón y en consecuencia, de cambios en las propiedades mecánicas como el aumento de la rigidez (Talja et al., 2007). El almidón se utiliza en la obtención de films por su facilidad para formar una matriz continua, por su baja permeabilidad al oxígeno y por su contribución en la conservación de los alimentos (Jiménez et al. 2012). Además es especialmente atractivo por ser una materia prima biodegradable y económica (Chen et al., 2008) sin olores, sabores y transparente (Vásconez et al., 2009). Sin embargo, tiene pobres propiedades mecánicas y alta permeabilidad al vapor del agua (Lafargue et al., 2007, Phan The et al., 2009, Wu et al., 2010). Con el objetivo de mejorar estas propiedades, barrera y mecánicas, investigaciones recientes han analizado el efecto de incorporar fibras naturales de origen vegetal como material de relleno (Fama et al., 2009). El salvado de arroz es un subproducto de la industria del arroz que se obtiene al eliminar la cáscara del grano en la operación de blanqueo y representa alrededor del 10% en peso. Los usos tradicionales del salvado de arroz han sido para alimentación animal, aunque su interesante composición lo convierte en una materia prima de interés para desarrollar diferentes aplicaciones, como por ejemplo formando parte de la composición de films comestibles (Dias et al., 2010, Adebisi et al., 2008, Gnanasambandam et al., 1997).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la incorporación del salvado de arroz, sobre las propiedades microestructurales y físicas (permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, propiedades ópticas y mecánicas) de films de almidón de guisante, patata y yuca, tras 1 y 5 semanas de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la obtención de los films se utilizó almidón de guisante y de patata suministrados por Roquette Laisa España, S.A. (Benifaio, España) y almidón de yuca procedente de Asia Modified Starch CO; LTD (Kalasin, Tailandia). El salvado de arroz fue cedido por la Arrocería Antonio Tomás, S.L. (Sollana, Valencia, España). Como plastificante se utilizó glicerol suministrado por Panreac Química S.A. (Castellar de Vallès, España).

Obtención de los films

Se prepararon 6 formulaciones 3 a base de agua destilada, almidón de guisante, patata y yuca al 2% (g/100 g dispersión) y glicerol al 25% (g/100 g polímero) y 3 en las que se incorporó el salvado de arroz al 10% (g/100 g polímero). Para llevar a cabo las dispersiones se gelatinizó el almidón en un baño con agua a 100°C durante 30 minutos. A continuación, se añadió el glicerol y el salvado de arroz y se mezcló todo en el rotor –estator ultraturrax D125 a vacío a 13500 y 20500rpm durante 1 y 3 minutos, respectivamente. Los films se obtuvieron vertiendo 1,5g de sólidos en placas de teflón de 150 mm de diámetro. A continuación, las muestras se dejaron secar durante 48 horas a una HR de 45 (± 2) % y a una temperatura de 25 (± 1) °C. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se almacenaron en desecadores a 53 % HR, utilizando una disolución saturada de nitrato de magnesio 6-hidrato (Panreac química, S.A, Castella del Vallés, España) y a una temperatura de 25 °C. Las muestras se analizaron a diferentes tiempos de almacenamiento, tras 1 (T0) y 5 (Tf) semanas.

Caracterización de los films

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, England) de acuerdo al método estándar D882 (ASTM, 1992). Para cada formulación, se prepararon 8 muestras que se montaron en unas pinzas para el ensayo de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, England) con una separación inicial y velocidad de elongación del film de 50 mm y 50 mm·min⁻¹, respectivamente. A partir de las curvas fuerza-distancia obtenidas se calculó

el módulo de elasticidad (ME), la tensión de fractura (TS) y la deformación hasta el punto de fractura (% ϵ).

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó según una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (Mc Hugh et al., 1994) para un gradiente de humedad relativa 53-100 % y temperatura de 25 °C. 4 replicas por formulación fueron montadas en copas de aluminio de 3.5 cm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica). El estudio de la permeabilidad se realizó mediante controles de peso de cada copa con una balanza electrónica (± 0.00001 g) (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 2 horas. La transmisión de vapor de agua se determinó a partir de la pendiente obtenida en el análisis de regresión de los datos del peso frente al tiempo, dividido por el área del film.

La permeabilidad al Oxígeno se determinó por medio de un Sistema Ox-Tran 1/50 (Mocon, Minneapolis, USA) a 25°C (ASTM Standard Method D3985-95, 2005). La muestra (50 cm²) se colocó en una celda y neumáticamente fue ubicada en el lugar del equipo para llevar a cabo el ensayo a una HR de 53%. Para ello, los films se expusieron a una corriente de nitrógeno por una cara y por la otra a una corriente de oxígeno puro. Un sensor registra el oxígeno permeado y la permeabilidad al oxígeno (PO) se calculó dividiendo la tasa de transmisión de oxígeno entre la diferencia de presión parcial de oxígeno en las dos caras. Cada muestra se evaluó por duplicado.

La transmitancia interna (Ti) de los films, como medida de la transparencia de los films fue determinada a partir de la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple de los espectros de reflexión (Hutchings, 1999). Los espectros de reflexión sobre fondo blanco y fondo negro se determinaron con un espectrocolorímetro MINOLTA, modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo, Japan). Las determinaciones se realizaron por triplicado sobre la cara del film que había estado en contacto con el aire durante el secado.

Para la medida del brillo se utilizó un Brillómetro Multi-Gloss 268, MINOLTA de acuerdo a la norma D523 (ASTM, 1999), se realizaron las medidas por triplicado a un ángulo de incidencia de 60° respecto a la normal sobre un fondo negro estándar.

El análisis de la microestructura de los films se realizó tras equilibrar los films en P₂O₅ durante 2 semanas. Con el fin de analizar la distribución de los componentes en los films se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL®, modelo JSM-5410. De las muestras se observó tanto la superficie como la sección transversal de los mismos con un voltaje de aceleración de 11 KV. Para observar el comportamiento de los materiales (logaritmo del modulo DMT) a escala nano se uso un microscopio de fuerza atómica

(NanoScope®, Multimode 8, Bruker AXS, Inc. Santa Barbara, California, USA) con el software PeakForce QNM (Quantitative NanoMechanics).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD). Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El módulo de elasticidad (ME), la tensión de fractura (TS) y la deformación hasta el punto de fractura (%E) son parámetros útiles para describir las propiedades mecánicas de los films, y se relacionan estrechamente con su estructura (Mc Hugh and Krochta, 1994). La Tabla 1 muestra los valores de dichos parámetros obtenidos para cada una de las formulaciones objeto de estudio, tanto a 1 como a 5 semanas de acondicionamiento (T^a 25°C y HR 53%).

El efecto de la incorporación de salvado de arroz fue diferente a cada tiempo de almacenamiento. A T₀, la incorporación de salvado de arroz fue significativa ($p < 0.05$) sólo en los valores del modulo de elasticidad (ME) y del porcentaje de elongación (% ϵ) de los films de almidón de guisante, haciendo los films más rígidos y menos extensibles. Por el contrario a T_f, al incorporar salvado a los films de almidón disminuyen significativamente ($p < 0.05$) todos los parámetros (ME, TS y % ϵ), respecto a los films formados sólo con almidón.

El efecto del tiempo de almacenamiento también fue significativo ($p < 0.05$). En general se observó un aumento notable de la rigidez (mayor ME), y de la resistencia mecánica (mayor TS) y una pérdida importante de la extensibilidad (menor % ϵ) de los films. Esto es consecuencia del proceso de retrogradación del almidón a lo largo del tiempo, que ocasiona una mayor proporción de zonas cristalinas. Este efecto fue más acusado en los films formulados con almidón de yuca, probablemente debido a que poseen mayor proporción de amilopectina, la principal responsable de la retrogradación del almidón.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos en los parámetros mecánicos para los films de almidón puro fueron similares a los obtenidos por otros autores (Zhang and Han, 2006, Chen et al., 2008, Phan The et al., 2009, Da Matta et al., 2011, Souza et al., 2011).

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) se muestran en la Tabla 2 para los films de almidón (con y sin salvado) a 25°C y con una gradiente de humedad relativa de 53 a 100%. Inicialmente, los films formulados con almidón puro mostraron valores de PVA muy similares, entre 5,4 y 6 g mm/ kPa h m², del orden de los obtenidos por otros autores en estudios similares (Han et al., 2006, Ma et al., 2008).

La incorporación del salvado de arroz no afectó a los valores de PVA, excepto en el caso de la yuca donde aumentó significativamente ($p < 0.05$). El tiempo de almacenamiento no tuvo un efecto claro sobre la PVA de los films estudiados y las variaciones fueron poco notables.

En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos de permeabilidad al oxígeno (PO) a 53% de humedad y 25°C, para los films de almidón de guisante son del mismo orden que los publicados por Mehyar y Han (2004). Todos los films analizados tienen valores bajos de PO y no se vieron diferencias significativas ($P < 0,05$) por la adición de salvado de arroz. En general, los valores de PO disminuyeron ($p < 0.05$) durante el almacenamiento. Esta disminución puede ser debida a que los cristales formados durante la retrogradación actúan de barrera al paso del oxígeno asumiendo que la fase cristalina es impermeable (Shen et al., 2010).

La Tabla 2 muestra además los valores de transmitancia interna (Ti) de los films a 450 nm. Los films de almidón puro presentaron mayor transparencia ($p < 0.05$), lo que está relacionado con una estructura más homogénea respecto a los films con salvado. Respecto al envejecimiento, no se encontraron diferencias significativas en la transparencia de los films.

Los valores de brillo medidos con un ángulo de incidencia de 60° para los distintos films también se muestran en la Tabla 2. Como se puede observar, a tiempo inicial, todos los films de almidón de guisante y yuca, puros o compuestos, mostraron valores mayores ($p < 0,05$) que los obtenidos para el almidón de patata. Esto indica que los films de almidón de patata fueron menos brillantes y presentaron superficies más rugosas, tal y como se observó en las micrografías obtenidas en el SEM (Tabla 3). En general, tanto la adición del salvado de arroz como el tiempo de almacenamiento disminuyeron ligeramente el brillo de los films ($p < 0.05$).

En la Tabla 3 se muestran las micrografías de la superficie y la sección transversal de los distintos films mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los films de almidón puros muestran superficies lisas y estructuras compactas coincidiendo con lo observado por otros autores (Wu et al., 2010). Lo mismo ocurre con las secciones transversales, esto puede deberse a que no existe ningún tipo de material que introduzca discontinuidades en la

estructura. Las micrografías superficiales de almidón de patata (con o sin salvado) se mostraron más rugosas que las de yuca y guisante, dato coincidente con los menores valores de brillo encontrados en estos films.

La adición del salvado se muestra en forma de protuberancias de mayor o menor tamaño dependiendo de la disposición de las partículas de salvado en la matriz continua de almidón. Este hecho se puede correlacionar con el mayor espesor detectado en diferentes puntos de estos films compuestos. Además, en las secciones transversales de estos films se pudieron observar formaciones lineales orientadas en el sentido de secado de los films. Esto puede estar relacionado con la formación de asociaciones de amilosa cristalina tipo V con lípidos u otras moléculas apolares (Famá et al., 2004).

También se muestran en la Tabla 3 las micrografías de las superficies de los films observadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) dónde puede observarse el log del Modulo DMT el cual indica la resistencia del film en cada uno de los puntos de la superficie observada, indicando los colores más oscuros menores valores de log Modulo DMT. Los films de almidón puros mostraron superficies homogéneas, mientras que en las micrografías obtenidos de los films compuestos se observan las fibras dispersas por toda la matriz (puntos más claros) indicando un incremento de la rigidez (mayores valores de ME) tal y como se muestra en los valores de las propiedades mecánicas.

CONCLUSIONES

Las propiedades de los films a base de almidón de guisante, de patata y de yuca con salvado de arroz se vieron afectadas por la incorporación del salvado de arroz y el tiempo de almacenamiento. La incorporación de salvado de arroz en la matriz de almidón produce films más rígidos, menos extensibles y transparentes. El envejecimiento también provoca cambios en las propiedades físicas, asociados a la retrogradación del almidón: films menos permeables al oxígeno y extensibles. La microestructura de los films se correlaciona con propiedades físicas como el brillo, transparencia o rigidez.

De todos los films analizados, los formulados a base de almidón de guisante presentaron las mejores propiedades por su mejor resistencia mecánica, mayor brillo y menores permeabilidades al vapor de agua y al oxígeno.

REFERENCIAS

- Adebisi, A.P., Adebisi, A.O., Jin, D., Ogawa, T., Muramoto, K. (2008). Rice bran protein-based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 476-483.
- ASTM (1992). Standard methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In: Annualbook of American Standard Testing Methods. Designation (D882-91). Philadelphia, Pa:ASTM
- ASTM. (1995). Standard test methods for water vapour transmission of materials. Standard designations: E96-95 Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. (pp. 406e413).
- ASTM. (1999). Standard test methods for specular gloss. Designation (D523). In Annual book of ASTM standards, Vol. 06.01. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882 Annual book of American standard testing methods. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. (pp. 162e170).
- ASTM. (2005). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a Coulometric sensor. Standard Designation: D3985-05 Annual book of American society for testing materials, West Conshohocken, PA, USA.
- Chen, J., Liu, Ch., Chen, Y., Chen Y., Chang, P.R. (2008). Structural characterization and properties of starch/konjac glucomannan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 74, 946-952.
- Dias, A.B., Müller, C.M.O., Larotonda, F.D.S., Laurindo, J.B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51, 213-219.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303.
- Famá, L., Gerschenson, L., Goyanes, S. (2009). Starch-vegetable fibre composites to protect food products. *Carbohydrate Polymers*, 75, 230-235.
- Famá, L., Rojas, A.M., Goyanes, S., Gerschenson, L. (2004). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *Swiss Society of Food Science and Technology*.631-639.
- Gnanasambandam, R., Hettiarachchy, N.S., Coleman, M. (1997). Mechanical and barrier properties of rice bran films. *Journal of Food Science*, 62 (2), 395-398.
- Hutchings, J.B. (1999). Food and Colour Appearance, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A.(2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26, 302-310.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A.(2012). Edible and biodegradable starch films: A review. *Food Bioprocess Technol*, DOI. 10. 1007/S11947-012-0835-4.
- Lafargue, D., Lourdin, D., Doublier, J.L. (2007). Film-forming properties of a modified starch/k-carrageenan mixture in relation to its rheological behavior. *Carbohydrate Polymers*, 70, 101-111.

Mc Hugh, T. H. y Krochta, J. M. (1994). Water vapour permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.

Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A., Luu, D. (2009). Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90, 548-558.

Vásconez, M.B., Flores, S.K., Campos, C.A., Alvarado, J., Gerschenson, L.N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42, 762-769.

Wu, H., Liu, Ch., Chen, J., Chen, Y., Anderson, D.P., Chang, P.R. (2010). Oxidized pea starch/chitosan composite films: Structural characterization and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 118, 3082-3088.

TABLAS
Tabla 1. Modulo elástico (ME), resistencia a la tracción (TS) y porcentaje de elongación (%E) de los films de almidón puro (guisante-G, patata-P y yuca-Y) y de los films compuestos con salvado (G-S, P-S y Y-S) a 2 tiempos de almacenamiento (T0 y Tf)

	ME(MPa)		TS(MPa)		%E	
	T0	Tf	T0	Tf	T0	Tf
G	417(41) ^{a1}	964(88) ^{a2}	14.2(1.3) ^{a1}	24(2) ^{a2}	10(2) ^{a1}	4.7(0.9) ^{a2}
G-S	663(229) ^{b1}	610(72) ^{b1}	16(7) ^{a1}	6.5(0.9) ^{b2}	3.1(0.9) ^{b1}	1.3(0.2) ^{b2}
P	40(24) ^{a1}	430(44) ^{a2}	3.04(0.79) ^{a1}	11.6(1.5) ^{a2}	29(3) ^{a1}	9.4(1.8) ^{a2}
P-S	36(9) ^{a1}	460(98) ^{a2}	1.6(0.4) ^{b1}	5.8(1.4) ^{b2}	25(13) ^{a1}	1.6(0.6) ^{b2}
Y	20(7) ^{a1}	771(171) ^{a2}	1.7(0.4) ^{a1}	12.5(1.7) ^{a2}	48(9) ^{a1}	1.8(0.5) ^{a2}
Y-S	33(9) ^{a1}	543(137) ^{b2}	1.2(0.5) ^{a1}	6(4) ^{b2}	42(24) ^{a1}	1.2(0.7) ^{b2}

a y b, diferente letra en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre formulaciones (con y sin salvado)

1 y 2, diferente número en la misma fila indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos tiempos de almacenamiento (T0 y Tf)

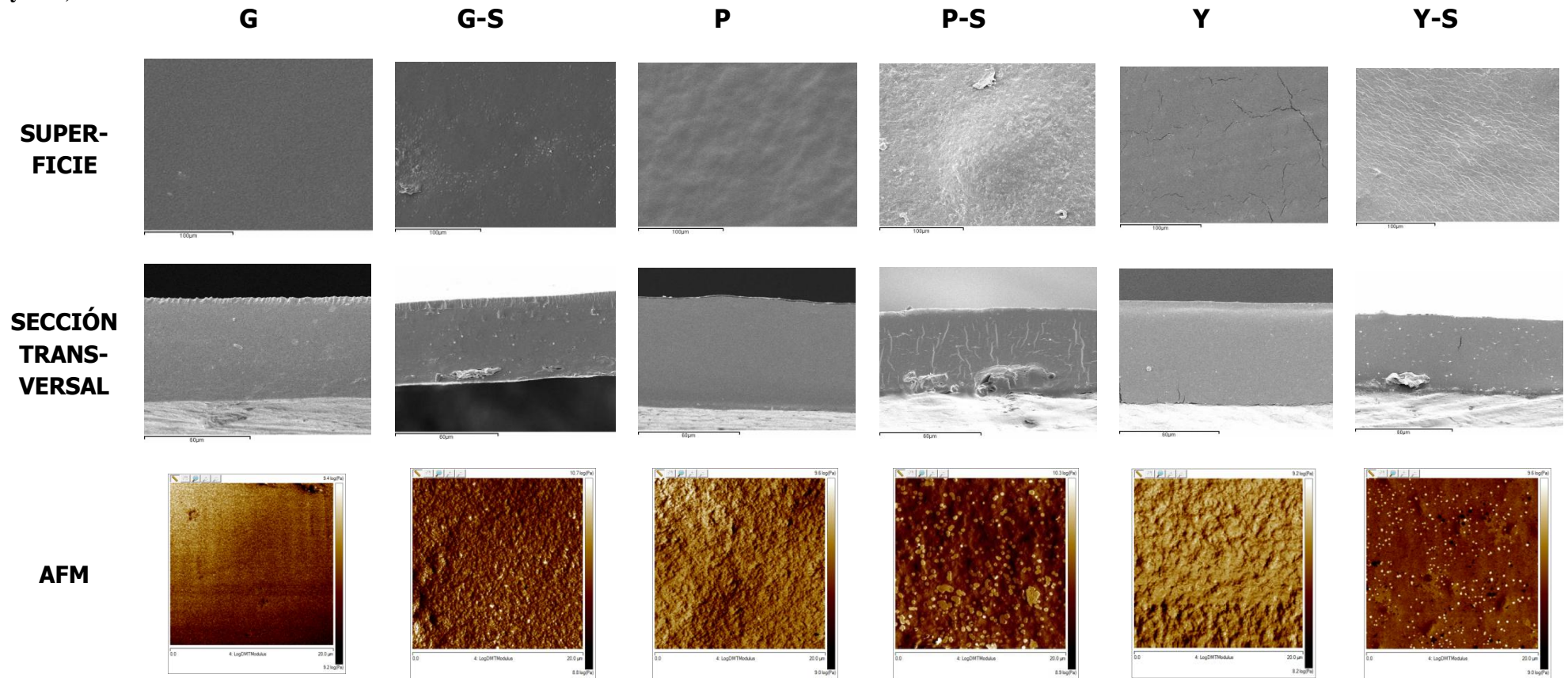
Tabla 2. Brillo, transmitancia interna (Ti), permeabilidad al vapor de agua (PVA) y permeabilidad al oxígeno (PO) de los films de almidón puro (guisante-G, patata-P y yuca-Y) y de los films compuestos con salvado (G-S, P-S y Y-S) a dos tiempos de almacenamiento (T0 y Tf)

	Brillo 60°		Ti (450nm)		PVA (g.mm.kPa ⁻¹ h ⁻¹ m ⁻²)		PO (10 ⁻¹⁴ cm ³ m ⁻¹ s ⁻¹ KPa ⁻¹)	
	T0	Tf	T0	Tf	T0	Tf	T0	Tf
G	47(17) ^{a1}	33(8) ^{a1}	85.4(1.6) ^{a1}	87.09(0.12) ^{a1}	6.0(0.3) ^{a1}	6.7(0.7) ^{a1}	2.5(1.8) ^{a1}	1.8(1.3) ^{a1}
G-S	30(4) ^{b1}	20(5) ^{b2}	81.7(0.2) ^{b1}	82.3(0.5) ^{b1}	6.35(0.18) ^{a1}	6.3(0.4) ^{a1}	4.5(0.9) ^{a1}	1.84(0.07) ^{a2}
P	9.9(0.9) ^{a1}	9.7(1.9) ^{a1}	85.9(0.4) ^{a1}	85.09(0.54) ^{a1}	6.1(0.5) ^{a1}	7.2(0.2) ^{a1}	3(2) ^{a1}	2.2(1.6) ^{a1}
P-S	6.45(1.07) ^{b1}	8.2(0.7) ^{b2}	79.1(1.4) ^{b1}	81.35(1.02) ^{b1}	8.1(0.9) ^{a1}	6.5(0.7) ^{a2}	4.93(0.19) ^{a1}	3.06(0.19) ^{b2}
Y	18(4) ^{a1}	16(5) ^{a1}	84.9(0.4) ^{a1}	86.6(0.4) ^{b1}	5.4(0.4) ^{a1}	6.8(0.5) ^{a2}	4.2(0.4) ^{a1}	2.42(0.01) ^{b2}
Y-S	16(3) ^{a1}	11(3) ^{a2}	81.7(0.7) ^{b1}	82.0(0.3) ^{b1}	7.5(0.4) ^{b1}	5.1(0.8) ^{b2}	5.46(0.07) ^{a1}	3.6(0.0) ^{b2}

a y b, diferente letra en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre formulaciones (con y sin salvado)

1 y 2, diferente número en la misma fila indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos tiempos de almacenamiento (T0 y Tf)

Tabla 3. Micrografías de SEM y AFM de los films de almidón puro (guisante-G, patata-P y yuca-Y) y de los films compuestos con salvado (G-S, P-S y Y-S)



APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES EN QUESO TRONCHÓN: EFECTO ANTIFÚNGICO Y CALIDAD SENSORIAL

Cano, A.^{*(1)}, **Cháfer, M.**⁽¹⁾, **Chiralt, A.**⁽¹⁾, **Molina, P.**⁽²⁾, **Santamarina, P.**⁽³⁾, **Borrás, M.**⁽²⁾, **Beltran, M.C.**⁽²⁾, **Rosello, J.**⁽³⁾, **González, C.**⁽¹⁾

amcaem@upvnet.upv.es

⁽¹⁾Instituto de Ingeniería de Alimentos para el desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 48022 Valencia, España.

⁽²⁾Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 48022 Valencia, España.

⁽³⁾Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 48022 Valencia, España.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la demanda de alimentos más sanos, seguros y obtenidos con un mínimo impacto ambiental, ha llevado a potenciar investigaciones en el ámbito de la industria alimentaria, centradas fundamentalmente en garantizar la trazabilidad y seguridad en la obtención de alimentos el máximo respeto con el medio ambiente y la salud del consumidor, minimizando y buscando alternativas al uso de aditivos químicos sintéticos para la conservación de los alimentos, minimizando el uso de envases y desarrollando nuevos materiales más respetuosos con el medio ambiente (Directiva 94/62/CE). En este sentido, la tecnología de recubrimientos comestibles (RC) surge como una alternativa prometedora, ya que las materias primas empleadas en su formulación son de origen natural (proteínas, lípidos y polisacáridos) y por tanto biodegradables y seguras con el entorno. Además, pueden incorporar otros componentes que ayuden a mejorar las propiedades finales del recubrimiento como antioxidantes, antimicrobianos y antifúngicos (Sánchez et al., 2010). Entre los polisacáridos más utilizados para obtener RC, los formados a base de quitosano han tenido gran interés debido a los prometedores resultados obtenidos al aplicarlos sobre algunos alimentos tales como frutas, carne y pescado (Pastor et al., 2005 y Sánchez et al., 2008). El quitosano forma recubrimientos con buenas propiedades mecánicas, barrera y además presenta actividad antimicrobiana y antioxidante (Vargas et al., 2012). Sin embargo, posee un baja barrera al vapor de agua, con lo que se hace necesario la incorporación de compuestos lipídicos como ácidos grasos o aceites esenciales para su mejora. A pesar de la enorme funcionalidad del quitosano, existen muy pocos estudios sobre su utilización para mejorar la

calidad y vida útil de productos perecederos tales como los quesos (Fajardo et al., 2010; Di Pierro et al., 2011; Del Nobile et al., 2009).

Los quesos pueden ser sustrato en el crecimiento de diferentes tipos de hongos que presentan una intensa actividad lipolítica y proteolítica. Este crecimiento puede resultar deseable para algunos tipos de quesos, pero en otros (como queso fresco y tierno) puede contribuir al deterioro del producto. En estos casos, la industria quesera ha desarrollado procedimientos para controlar e incluso evitar el crecimiento de mohos en la superficie de los quesos durante la maduración y la distribución. Una de las soluciones más comunes a este problema es la aplicación de piramicina en su superficie, un antibiótico de amplio espectro de actuación, que queda en la corteza (muchas veces todavía no desarrollada) y por tanto, forma parte de la fracción comestible del mismo, sino es eliminada por el consumidor. A pesar de que su empleo se encuentra bastante extendido en la industria quesera, no existen apenas estudios de investigación que aborden los problemas relacionados con la ingestión y sus efectos a largo plazo, por este motivo su uso como aditivo en la industria quesera resulta en ocasiones polémico, puesto que se trata de un medicamento.

Debido a sus propiedades antifúngicas, los recubrimientos compuestos a base de quitosano y aceites esenciales podrían representar una alternativa natural al uso de antibióticos, con el objetivo de aumentar la vida útil y la comercialización de los quesos.

Bajo esta línea de investigación, el objetivo del presente trabajo ha sido aplicar recubrimientos comestibles a base de quitosano (CH) y aceites esenciales de orégano (O) o romero (R) sobre queso Tronchón de la Comunidad Valenciana elaborados de forma tradicional, como alternativa a los antibióticos comunes utilizados por la industria alimentaria para el control fúngico en quesos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Dispersiones Formadoras de Films

Para obtener las DFF se preparó una dispersión de quitosano de alto peso molecular (CH) con un grado de deacetilación del 75.6% (Sigma-Aldrich, USA) al 1.5% (p/p) con ácido acético glacial al 0.5% (v/v), de Panreac Química S.L.U. (España) dejando la dispersión en agitación durante toda la noche para su completa disolución. Los aceites esenciales de romero (R) y orégano (O) procedentes de Herbes del Molí (España), se añadieron en un ratio polímero:aceite de 1:0.5 y se homogenizó la mezcla con un Ultraturrax T25 (Jankel & Kunkel, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos.

Aplicación de las dispersiones formadoras de films

Se realizaron 3 fabricaciones de quesos: la primera fue el lote control (C)-piramicina (P), la segunda se recubrió con CH-O y la tercera con CH-R. Todas las aplicaciones de las DFF se realizaron por inmersión, sumergiendo los quesos dentro de la dispersión antifúngica a base de CH-O o CH-R durante 30 segundos. A continuación, se dejó que el excedente de recubrimiento goteara antes de transportar los quesos a la cámara de maduración. La mitad de la producción de quesos fue recubierta 2 veces y la otra mitad 3. Las aplicaciones se realizaron en días sucesivos y entre las diferentes aplicaciones los quesos permanecieron en la cámara de maduración. La aplicación de piramicina fue directamente sobre el queso después del oreo y antes de introducir los quesos en la cámara de maduración. Los quesos control no sufrieron ningún tratamiento.

Análisis realizados

Se realizó un seguimiento del peso de 8 muestras de cada formulación (C, P, CH-O-2, CH-O-3, CH-R-2, CH-R-3) para determinar la pérdida de peso de los quesos durante 15 días que permanecieron en la cámara de maduración a una temperatura de 10°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) y una humedad relativa de 85% ($\pm 5\%$).

El seguimiento de crecimiento de hongos se realizó a través de un control visual de los quesos mediante un recuento de colonias en función del tiempo de almacenamiento. Resaltar que en todas las fabricaciones se realizaron análisis de identificación de los hongos que crecieron en la superficie de los mismos.

Para obtener la tasa y el coeficiente de respiración (TR y CR) de los quesos, se introdujeron los quesos enteros en un bote de vidrio y se midió la concentración de %O₂ y CO₂ con un analizador de gases (Dansensor CheckMate 9900, España). Se tomaron 10 medidas a lo largo del día de análisis y a las 24 horas de la primera toma, entre las diferentes medidas los quesos se guardaban en la cámara de maduración. El análisis se realizó a tiempo inicial (día siguiente al último recubrimiento-T₀) y a tiempo final (último día de maduración en cámara a 10°C y 80% de HR-T_{fi}). Para poder obtener la TR y CR, también fue necesario medir la densidad de los quesos. Para ello se tomaron muestras de volumen conocido y se analizaron mediante el método descrito por Cerqueira et al., 2010. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

La medida de pH se realizó mediante lectura directa en 3 muestras de cada lote con el pH-metro 25+ (Crison, España). Se tomaron medias tanto a T₀, T_{fi} y a los 15 días de estar los

quesos almacenados en nevera a 4°C (T_{f2}), simulando el almacenamiento que haría el consumidor con este tipo de quesos una vez comprado.

Para medir la a_w se tomaron muestras del interior y de la superficie de los quesos y se realizó la medida directamente en el equipo AQUA LAB (Dew Point Water Activity Meter 4TE) a 25°C. Todas las muestras se analizaron por triplicado a los tres tiempos de análisis (T_0 - T_{f1} - T_{f2}).

El análisis sensorial de las muestras se realizó en la sala de catas del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo que sigue las directrices marcadas por la norma UNE 87-004-79. El análisis se realizó por un panel de catadores semi-entrenado con el objetivo de evaluar los siguientes atributos mediante una escala jerárquica de 9 puntos: apariencia, aroma, textura, sabor y agrado general. Las muestras se presentaron codificadas, a temperatura ambiente y por separado tras estar almacenadas a vacío en la nevera durante 5 días.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD). Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del control de peso (Figura 2) muestran que los quesos control (C), y tratados con piramicina (P) pierden peso de forma similar. En cambio, los recubiertos con aceites esenciales mostraron una pérdida de peso significativamente menor ($p < 0.05$) debido a la barrera al vapor de agua que ejercen los recubrimientos aplicados.

Como se puede observar en las fotografías obtenidas del control visual en la Figura 1, la piramicina tiene un alto poder antifúngico, mientras la ausencia de recubrimiento lleva al crecimiento muy rápido de hongos (3 días). El crecimiento localizado de los hongos en las 2 concavidades típicas de los quesos control (C) se atribuye a una humedad mayor que caracteriza esta zona del queso, que favorece el crecimiento primero de *Mucor* y días más tarde de *Penicillium*.

En cuanto a los quesos recubiertos con CH-O, en los quesos recubiertos 2 veces se aprecia la aparición de una colonia de *Mucor* el día 10 y otra el día 11 en quesos diferentes, aumentando ligeramente su tamaño hasta el final de la maduración pero sin multiplicarse.

También, se desarrollan algunas colonias de *Penicillium* en 5 de los 8 quesos controlados a partir del día 14. En cambio, en los quesos recubiertos 3 veces con la misma formulación (CH-O), no se observa el crecimiento de ninguna colonia durante los 15 días de maduración (Figura 4). En el grupo de los quesos recubiertos con CH-R, en los quesos con 2 recubrimientos las primeras colonias de *Penicillium* aparecen el día 9, multiplicándose a lo largo de la maduración. Tan sólo una colonia de *Mucor* aparece en uno de los quesos el día 10. En cuanto a los quesos recubiertos 3 veces, la primera colonia de *Penicillium* aparece el día 9; al final del periodo de maduración se observan en 5 quesos. Por lo general, la aplicación de 3 recubrimientos resultó más eficaz que la de 2. Sin embargo, se nota una diferencia entre los 2 grupos, ya que las formulaciones con orégano (O) tuvieron más poder antifúngico, comparable al obtenido por el antibiótico (piramicina). Además se observa un poder antifúngico diferente entre ambos aceites puesto que el de O inhibió mejor el crecimiento de *Penicillium* y por el contrario el de R, no permitió el crecimiento de *Mucor*.

Como se puede observar en la Tabla 1 donde se muestran los resultados obtenidos de tasa de respiración, es evidente que la aplicación tanto de la piramicina como de quitosano y aceite esencial, disminuyó la respiración de los quesos, en términos de consumo de O₂ como de producción de CO₂. En la tabla también se puede observar que en los quesos tratados, el coeficiente de respiración es significativamente mayor ($p < 0.05$) al principio de la maduración que cuando ha terminado dicho periodo, debido al efecto antimicrobiano de los mismos. Estos resultados se encuentran en concordancia con los microbiológicos.

La Figura 3 presenta los valores de pH de los diferentes quesos a lo largo de la maduración. En general, se encontraron escasas diferencias debidas al tratamiento pudiendo atribuirse a la propia variabilidad del producto y lote utilizado. Así, los quesos del grupo control y los tratados con piramicina (que se elaboraron en el mismo lote de fabricación) presentaron mayores valores de pH ($p < 0.05$) a tiempo inicial, que se mantuvo a lo largo de la maduración. Como se aprecia en la figura, hay un descenso significativo ($p < 0.05$) del pH con el tiempo para todas las formulaciones. Este descenso del pH se debe al avance del proceso de maduración.

Los valores de actividad de agua (a_w) no presentaron grandes cambios, estando comprendidos entre 0.986-0.989 y de 0.979-0.987 al inicio del almacenamiento para el interior y el exterior de los quesos, respectivamente. Tal y como cabe esperar la a_w fue siempre significativamente ($P < 0.05$) mayor en el interior (más húmedo y con menor contenido en sal) que en la superficie de los mismos. Estos valores disminuyeron significativamente con el tiempo, debido al secado y avance de la maduración de los mismos,

alcanzando valores de 0.974-0.981 y de 0.96-0.971 para el interior y exterior de los quesos respectivamente. La magnitud de este cambio dependerá de las condiciones de temperatura y humedad en la cámara de maduración, que evidentemente, tanto en la superficie como en el interior, favorecen su descenso, aunque se observa que estos valores están todavía muy lejos del equilibrio (a_w equilibrio= 0.85). En general no se observaron diferencias significativas entre los valores de a_w debido a los diferentes tratamientos aplicados.

En los resultados del análisis sensorial que se muestran en la Figura 4, se puede observar que en cuanto a la apariencia, los datos muestran que no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las formulaciones (datos de medias y desviaciones no mostrados). Respecto al aroma, las puntuaciones más altas y más similares al control, fueron las de los quesos recubiertos 2 veces con los aceites. En cambio, los tratados con P y recubiertos 3 veces, fueron los menos valorados. Los valores de la textura de los quesos resultan bastante parecidos entre ellos, a excepción de aquellos correspondientes a los tratados con P y los recubiertos 2 veces con CH-O, que destacan por tener puntuaciones significativamente ($p < 0.05$) más bajas que los demás. En cuanto al sabor, no existieron diferencias significativas entre las formulaciones, a excepción de los quesos recubiertos 2 veces con CH-O cuya puntuación fue significativamente ($p < 0.05$) más alta en comparación con el resto de formulaciones. En cuanto al agrado general, los quesos recubiertos 3 veces con CH-R obtuvieron la mejor puntuación y para el resto, los valores fueron bastante similares.

En términos generales, la formulación CH-O que se aplicó dos veces obtuvo las puntuaciones altas en todos los atributos, especialmente en el atributo de sabor y fue el tratamiento más parecido al control.

CONCLUSIONES

El conjunto de resultados obtenidos muestran que la aplicación de 2 recubrimientos de CH-O confiere no solo óptimas propiedades antifúngicas, sino también unas adecuadas características fisicoquímicas y sensoriales. Además, en estos quesos la pérdida de peso del queso durante el periodo de maduración fue menor, permitiendo al mismo tiempo adquirir las características organolépticas propias de un queso tierno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la financiación del proyecto por el Programa de Apoyo a la Investigación y Desarrollo (PAID-05-12) de la Universitat Politècnica de València.

REFERENCIAS

- Cerqueira, A., Sousa-Gallagher, M.S., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *Journal of Food Engineering* 97, 87-94.
- Del Nobile, M.; Gammariello, D.; Conte, A.; Attanasio, M. (2009). A combination of chitosan coating and modified atmosphere packaging for prolonging “Fior di latte” cheese shelf life. *Carbohydr. Polym.* 78, 151-156.
- Del Prato, O. (1998). *Trattato di tecnologia casearia*. Bologna, Italy: Edagricole.
- Di Pierro, P.; Sorrentino, A.; Mariniello, L.; Giosafatto, C.; Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT-Food Sci. Technol.* 44, 2324-2327.
- Directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 1994, relativa a los envases y residuos de envases.
- Fajardo, P.; Martins, J.; Fuciños, C.; Pastrana, L.; Teixeira, J.; Vicente, A. (2010). Evaluation of chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *J. Food Eng.* 101, 349-356.
- Pastor, C.; González-Martínez, M.C. (2005). Recubrimientos comestibles. Aplicación a frutas y hortalizas. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 197, 130-135.
- Sánchez-González L.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *J. Food Eng.* 98, 443-452.
- Sánchez-González, L.; Vargas, M.; González-Martínez, C.; Cháfer, M.; Chiralt, A.; (2008). Incorporación de productos naturales en recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos. VIII Congreso SEAE Bullas 2008.
- Vargas, M.; Sánchez-González, L.; Cháfer, M.; Chiralt, A.; González-Martínez, C.; (2012). Edible chitosan coatings for fresh and minimally processed foods. *Emerging food packaging tech.* 5, 66-95.
- Wendorff, W.L.; Wee, C. (1997). Effect of smoke and spice oils on growth of moulds on oil-coated cheeses. *J. of Food Protection*, 60, 153-156.

FIGURAS

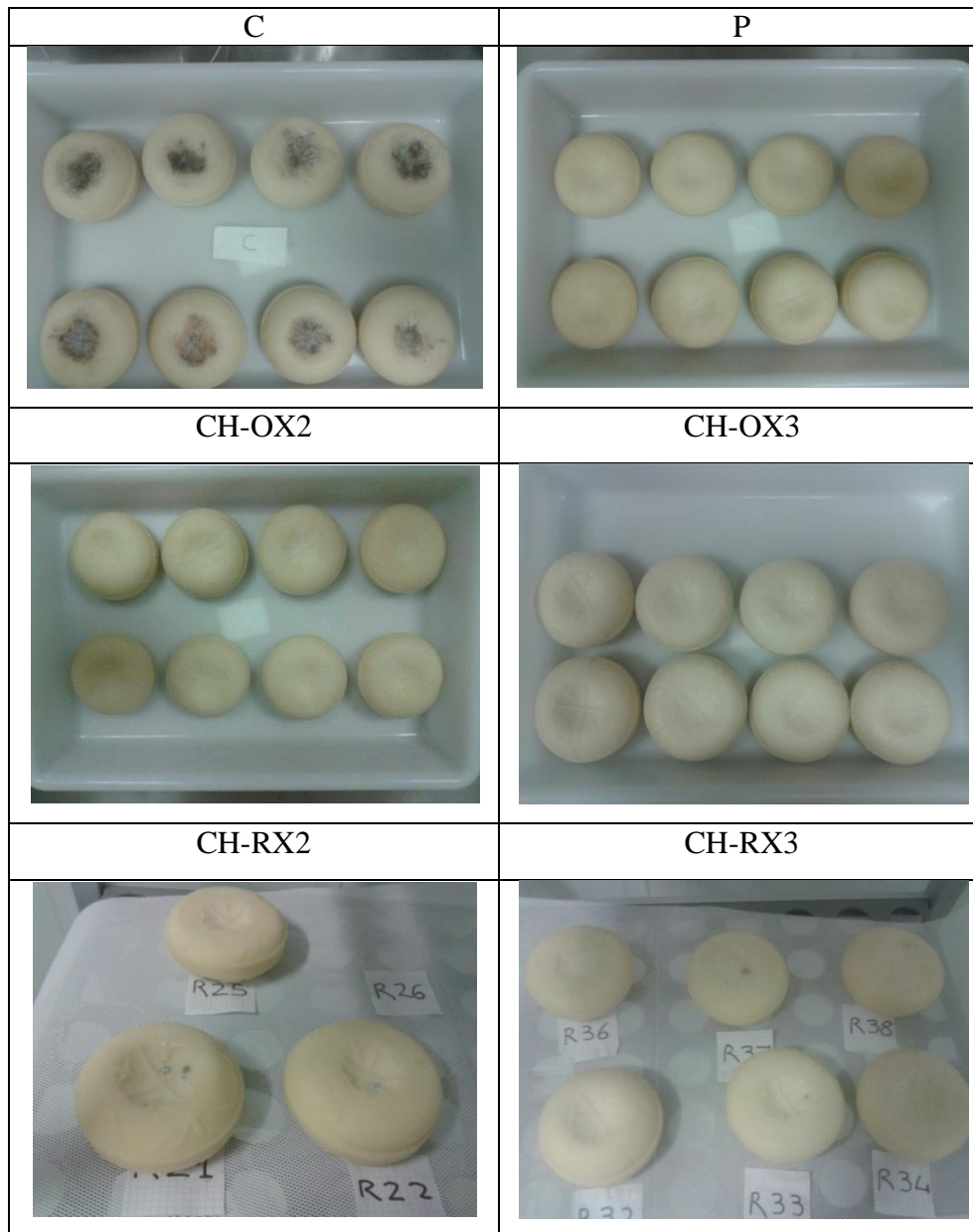


Figura 1. Fotografías durante el período de inspección visual.

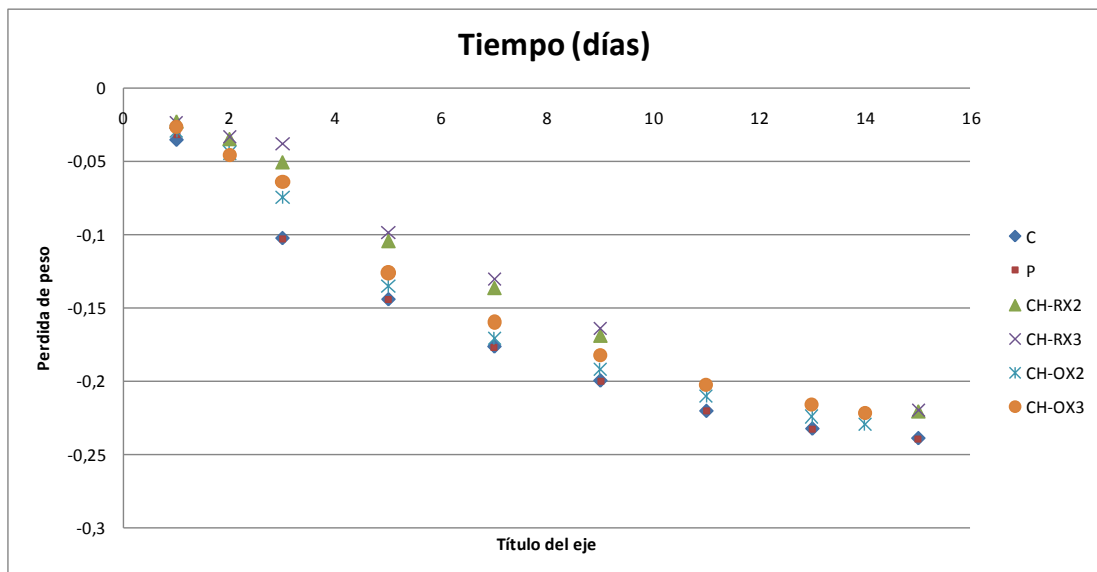


Figura 2. Pérdidas de peso de los quesos (C, P, CH-OX2, CH-OX3, CH-RX2 y CH-RX3) durante el periodo en la cámara de maduración a 85%HR y 10°C.

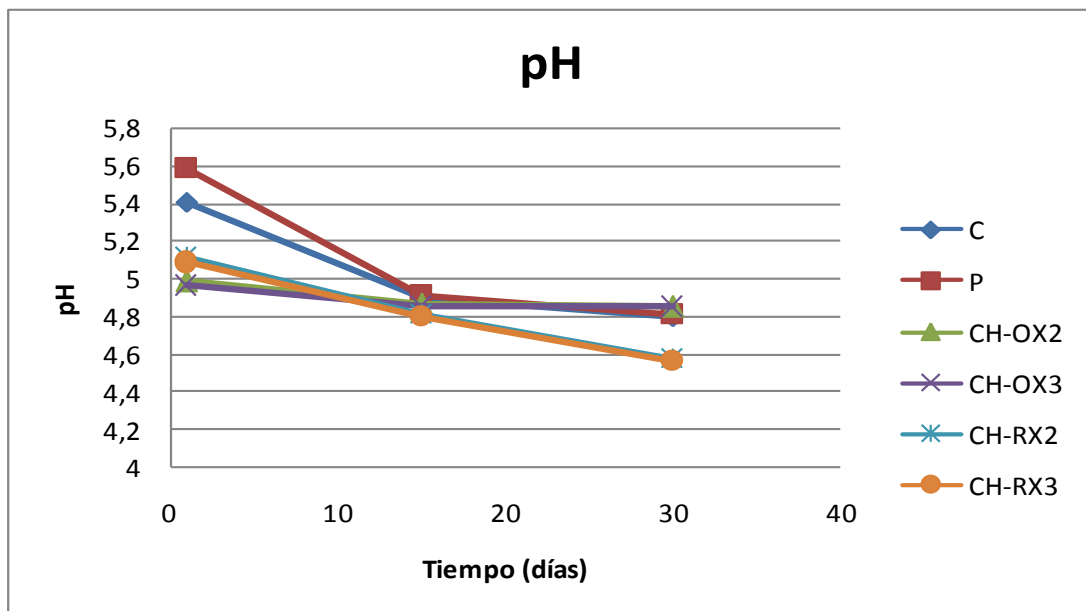


Figura 3. Evolución del pH de los quesos (C, P, CH-OX2, CH-OX3, CH-RX2 y CH-RX3) a tiempo inicial (T_0), tiempo inicial (T_{f1}) en la acámara de maduración a 85%HR y 10°C y después del periodo en nevera a 4°C (T_{f2}).

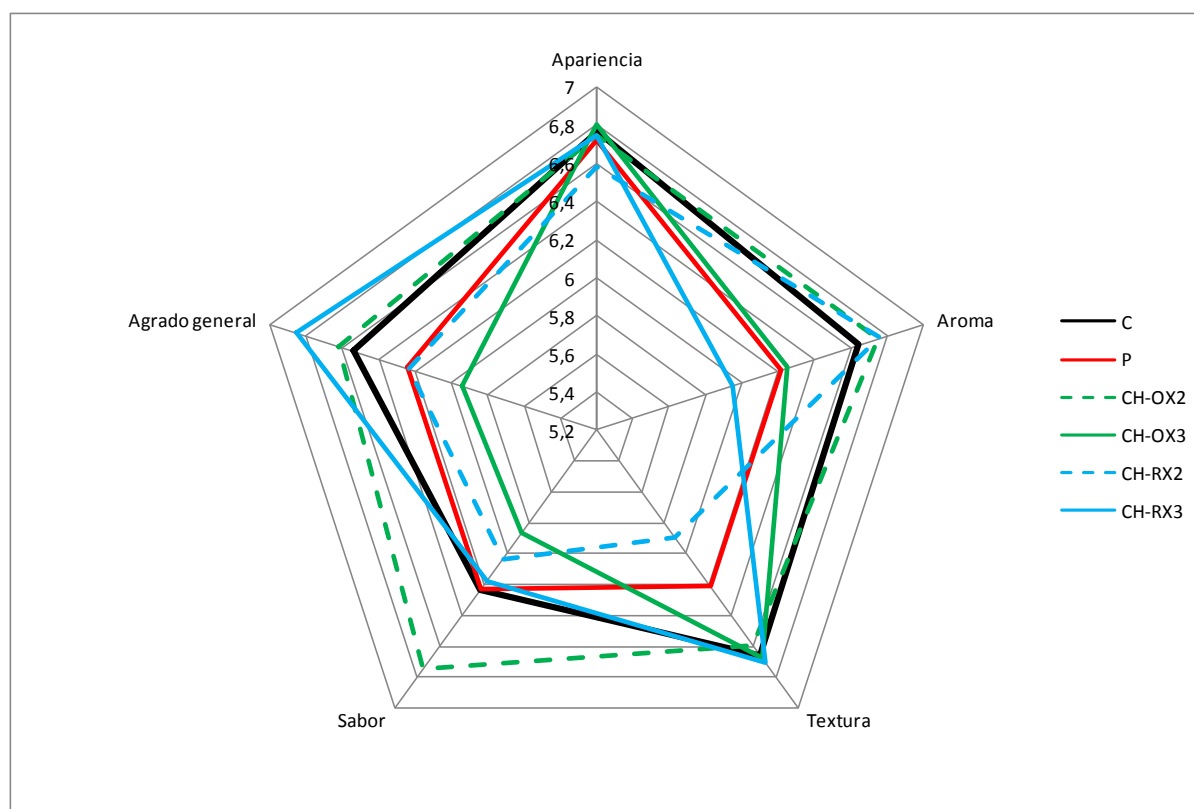


Figura 4. Perfil sensorial de los atributos de los quesos (C, P, CH-OX2, CH-OX3, CH-RX2 y CH-RX3).

TABLAS

Tabla 1. Consumo de [O₂] producción de [CO₂] y coeficiente de respiración (CR) de los quesos (C, P, CH-OX2, CH-OX3, CH-RX2 y CH-RX3) a tiempo inicial (T₀) y tiempo final (T_{fi}) en la acamara de maduración. Media y desviación estándar.

	TR (mL[O ₂] kg ⁻¹ h ⁻¹)		TR (mL[CO ₂] kg ⁻¹ h ⁻¹ 10 ⁻⁴)		CR (·10 ⁻⁴)	
	T ₀	T _{fi}	T ₀	T _{fi}	T ₀	T _{fi}
C	8,35 (2,22) al	5,36 (0,483) a ¹	43,3 (1,01) a ¹	25,9 (24,1) a ¹	5,20 (0,178) al	4,88 (5,35) a ¹
P	2,43 (1,52) b ¹	1,79 (0,293) b ¹	13,3 (0,593) b ¹	0,56 (3,62) b ²	5,88 (0,543) b ¹	0,31 (0,164) b ²
CH-OX2	0,611 (0,280) c ¹	0,372 (0,00944) c ¹	2,48 (0,41) c ¹	0,36 (1,97) b ¹	3,9 (0,543) c ¹	1,06 (0,8) b ²
CH-OX3	1,06 (0,005) bc ¹	0,106 (0,00141) c ²	3,47 (0,00374) c ¹	0,16 (2,12) b ²	3,28 (0,325) c ¹	1,19 (0,418) b ²
CH-RX2	1,33 (0,372) bc ¹	0,523 (0,126) c ²	4,02 (0,116) c ¹	0,54 (0,467) b ²	3 (0,109) c ¹	1,07 (0,206) b ²
CH-RX3	0,962 (0,263) bc ¹	0,141 (0,244) c ²	2,86 (0,0915) c ¹	0,54 (0) b ²	2,97 (0,4) c ¹	1,27 (0) b ²

a,b,c dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones (p<0.05)

1,2,3 en la misma fila indican diferencias significativas entre los tiempos (p<0.05)

AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE RECHEIOS PREPARADOS COM POLPA DE MURICI (*Byrsonima verbascifolia*, Rich)

Alline Aurea do Amaral, Suzana Caetano da Silva Lannes

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 16, CEP 05508000, Sao Paulo-SP/Brasil – allineamaral@usp.br, sclsan@usp.br

INTRODUÇÃO

Através da tixotropia podemos entender como se comporta a microestrutura de um material e sua influência na reologia. O termo microestrutura pode ser associado em sistemas tixotrópicos à distribuição espacial de bolhas e partículas. Um líquido tixotrópico é definido pelo seu potencial de ter uma estrutura de gel reversível sempre que a substância for mantida em repouso por um longo período de tempo (STEFFE, 1996; SCHRAMM, 2006).

Conforme Miquelim e Lannes (2009) a avaliação da estrutura de um material com a obtenção de dados de tixotropia pode ser conduzida de três maneiras: ensaio rotacional com a obtenção da curva de histerese, onde a amostra sofre reo-destruição; ensaio oscilatório, onde não existe destruição da estrutura, permitindo ter uma ideia de como o material se reconstitui; o ensaio combinado oscilatório-rotacional-oscilatório que é uma forma mais eficiente de verificação de reconstituição da estrutura.

A reologia é um parâmetro importante no controle de qualidade, processamento e desenvolvimento de recheios em geral, podendo controlar a textura percebida pelo consumidor, além de prever como o produto poderá ser moldado (BILL, 2009), auxiliando na elaboração do produto final assegurando sua qualidade e garantindo uma maior vida de prateleira (ROSSEAU, 2007).

O murici-do-Cerrado (*B. verbascifolia*) é um fruto de cor amarelada e de sabor agridoce, que pode ser encontrado em abundância nos períodos de dezembro a março, nas regiões serranas do Sudeste, nos Cerrados de Mato Grosso e Goiás e no litoral do Norte e Nordeste do Brasil (REZENDE; FRAGA, 2003). Segundo Silva et al. (2008), a polpa de murici *in natura*, apresenta valor energético total de 46,43 kcal/100g e sua composição química (g/100g) consiste em umidade (80,64g); proteínas (0,72g); lipídeos (2,19g); carboidratos (5,96g); fibra alimentar (9,72g), além de minerais como o Cálcio (78,0mg); Zinco (0,64mg) e Ferro (1,29mg). Os ácidos butírico e hexanóico são minoritários, mas são os mais correlacionados com o aroma dessa fruta.

O objetivo foi desenvolver formulações de recheio para chocolate com polpa de murici, comparando seu comportamento reológico com recheios elaborados com suco concentrado de laranja.

MATERIAL E MÉTODOS

Composição físico-química e de ácidos graxos da polpa de murici

A caracterização físico-química da polpa de murici *in natura* foi efetuada segundo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (1995). A composição de ácidos graxos seguiu o método oficial AOCS Ce 1-62 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997).

Desenvolvimento dos recheios

Foram elaboradas três formulações convencionais de recheio de laranja, respeitando as etapas de pesagem, aquecimento, emulsificação e acondicionamento com 17% de açúcar *fondant* (Fleischmann, Brasil), 13% de polpa de laranja concentrada (Lanjal, Brasil), 5% de álcool de cereais 40 °GL e base gordurosa contendo 54,7%; 57,2% e 59,7% de chocolate branco tipo cobertura (Nestlé, Brasil), 0,3% de lecitina de soja (Braswey, Brasil), 5%; 7,5% e 10% de gordura vegetal *low trans* (BUNGE-Pro Mult 44 LT, Brasil). A partir dessas amostras, foram desenvolvidas mais três formulações com polpa de murici (adquirido no estado do Pará/Brasil despolpada e congelada a ± -18 °C), substituindo o suco concentrado de laranja, sendo que a concentração da base gordurosa das formulações precisou ser reduzida de acordo com o teor de gordura encontrado nessa polpa. Assim, os recheios de murici foram desenvolvidos com a base gordurosa contendo 55%; 57,5% e 60% de chocolate branco tipo cobertura, 0,3% de lecitina de soja, 4,7%; 7,2% e 9,7% de gordura vegetal *low trans*.

Caracterização reológica das formulações desenvolvidas

O estudo reológico dos recheios foi realizado a partir de testes dinâmicos de oscilação e rotação efetuados em um Reômetro HAAKE MARS II (Thermo Electron Corporation, Alemanha), com banho termostatizado e sensor cone-placa (C35/1 Ti polido). A rotina de análise pelo ensaio combinado (oscilação e rotação) foi conduzida em triplicata: oscilação com tensão controlada (1,00 Hz, 0,01 Pa, t 60,00 s), rotacional com taxa de cisalhamento controlada (50,00 1/s, t 60,00 s) e oscilatório com tensão controlada (1,00 Hz, 5,00 Pa, t 180,00 s), à 28 °C. As deformações micro estruturais foram capturadas pelo Módulo RHEOSCOPE (microscópio óptico-aumento 20x, câmera de vídeo digital e uma unidade de controle de temperatura). Os resultados foram extraídos do programa HAAKE Rheowin

(versão 3.61), onde foi efetuada a média das triplicatas para plotagem dos gráficos. Os valores de recuperação da estrutura foram calculados pelo software do equipamento com base no último valor de G' , obtido no passo 1 do ensaio, e no valor de G' do 3 passo, obtido após 60 s da análise, segundo as instruções do manual do equipamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química da polpa de murici

Tabela 1 - Composição físico-química da polpa de murici *in natura*.

Polpa de murici	M±DP (%)
Umidade	80,72±0,16
Proteínas	0,72±0,10
Lipídios	2,34±0,01
Cinzas	0,99±0,02
*Carboidratos totais	15,23±0,04

n: 3, Média (M), Desvio padrão (DP) , *Carboidratos totais calculados por diferença

O teor de lipídios encontrado no óleo extraído da polpa do murici *in natura* (2,34 g/100 g) foi relativamente baixo, porém esse valor se torna alto quando comparado com outros frutos do Cerrado brasileiro, que apresentam teor de lipídios inferior a 1 g/100 g como o araçá, a pitomba e a gabioba (SILVA et al., 2008). Tuberoso et al. (2006) observou que a fração lipofílica do óleo de murici apresentava um alto potencial antioxidante, isso não ocorreu no trabalho de Castro et al. (2007), que avaliou o óleo extraído da polpa, possivelmente porque a polpa do murici possui mais constituintes antioxidantes na fase hidrofílica do que a fase lipofílica do extrato hexânico. O óleo total da polpa do murici apresentou 0,717 mg/kg de betacaroteno, esse alto valor é equivalente aos óleos de sementes de linho e de milho e superior aos óleos de girassol e de sementes de uva (TUBEROSO et al., 2006). O óleo extraído dos frutos do murici pode ser útil para o enriquecimento de azeites, pois contém aproximadamente 60% de ácidos graxos insaturados, um acentuado teor de betacaroteno e de outras substâncias antioxidantes (CASTRO et al., 2007).

Composição em ácidos graxos do óleo extraído da polpa de murici

Os ácidos graxos constituem as unidades básicas dos lipídios e sua determinação é fundamental para o conhecimento da qualidade dos óleos, para a verificação do efeito de processamentos, adequação nutricional do lipídio ou do alimento que o contém. A composição em ácidos graxos, em esteróis e em triacilgliceróis são as principais análises utilizadas na determinação da identidade dos óleos, além de ser uma das análises mais

importantes, sendo usada frequentemente por pesquisadores que estudam os aspectos fisiológicos da produção e modificação dos óleos e gorduras (SWERN; FORMO; BAILEY, 1979).

Tabela 2 - Composição dos principais ácidos graxos presentes no óleo extraído da polpa de murici *in natura*.

Ácido Graxo	M±DP (%)
C4:0 Acido Butírico	0,3±0,0
C6:0 Acido Capróico	2,7±0,2
C8:0 Acido Caprílico	1,3±0,1
C10:0 Acido Cáprico	0,1±0,0
C12:0 Acido Láurico	0,2±0,0
C14:0 Acido Mirístico	0,7±0,2
C16:0 Acido Palmítico	30,4±0,4
C16:1 Acido Palmitoléico	1,7±0,1
C18:0 Acido Estéarico	3,0±0,3
C18:1n7c Acido Oléico	44,5±0,6
C18:2n6c Acido Linoleico	14,7±0,0
C18:3n3 Acido alfa-Linolênico	0,4±0,0
SFA	38,8±0,7
UFA	61,2±0,6
MUFA	46,2 ± 0,5
PUFA	15,1±0,1

n: 3, Média (M), Desvio padrão (DP), SFA = ácidos graxos saturados, UFA = ácidos graxos insaturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados

Os ácidos graxos majoritários presentes nas amostras foram o ácido palmítico (30,4%), ácido oléico (44,5%) e ácido linoleico (14,7%). Altos valores foram observados para os ácidos graxos insaturados. A composição em ácidos graxos do óleo de palma - ácido palmítico (40,7%), ácido oléico (42%) e ácido linoleico (10,2%) – apresenta prevalência destes mesmos ácidos graxos. Teores elevados de ácidos graxos insaturados, 68 a 71%, foram observados no óleo de açaí, o que coloca esse fruto em uma condição atraente para o mercado de alimentos funcionais. O uso de matérias-primas ricas em ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados é de grande interesse para as indústrias de alimentos e bebidas que buscam alternativas para elaboração de produtos mais saudáveis, a polpa de murici demonstrou ser uma nova opção.

Caracterização reológica das formulações desenvolvidas

Os resultados dos ensaios apresentados na Figura 1 demonstram o comportamento em função do tempo para os recheios preparados com suco concentrado de laranja (F1, F2 e F3) e polpa de murici *in natura* (F4, F5 e F6) na concentração de 13%.

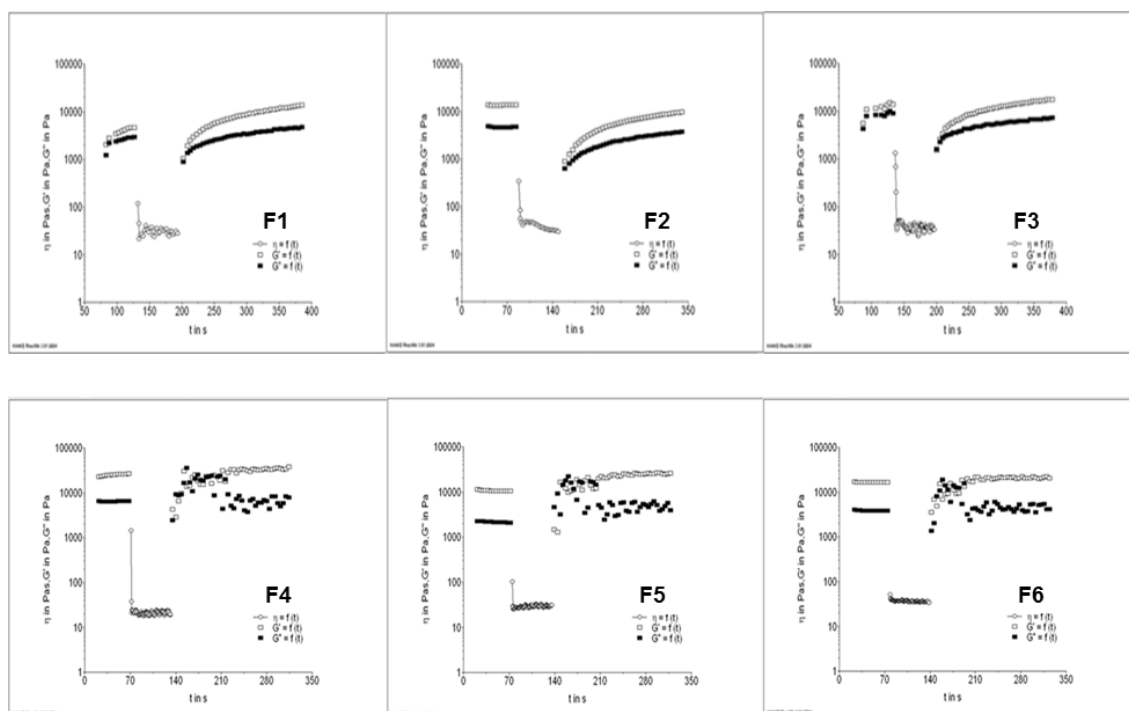


Figura 1 - Curvas dos módulos viscoso (G''), elástico (G') e viscosidade aparente (η), em função do tempo, para as amostras formuladas com suco concentrado de laranja (F1, F2 e F3) e polpa de murici (F4, F5 e F6), $T= 28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todos os recheios apresentaram comportamento de gel forte, sendo que a substituição do suco concentrado de laranja pela polpa de murici não influenciou esse resultado. Quando o módulo elástico (G') é superior ao módulo viscoso (G''), e ambos são independentes da frequência, o material tem caráter de sólido ou de gel forte. Um gel fraco apresenta valores de G'' maiores do que G' em baixas frequências e, em altas frequências, ocorre uma inversão dos módulos, com G' maior do que G'' . Em soluções diluídas, o espectro dinâmico apresenta valores de G'' significativamente maiores do que G' em toda a faixa de frequência, especialmente em baixas frequências. Após a fase rotacional, na terceira etapa da análise, é possível observar a quebra da estrutura, nas amostras contendo polpa de murici (Figura 1), pela inversão dos módulos G' e G'' , seguida pela rápida recuperação do sistema no final do teste. Em todas as formulações notou-se o decréscimo da viscosidade com o tempo, confirmando o comportamento Tixotrópico dos recheios, sendo que as amostras com maior quantidade de gordura (F1 e F4) apresentaram valores acentuados. A presença da gordura na formulação, mesmo que em pouca quantidade, pode alterar as características viscosas do produto em função do tempo (FOEGEDING; STEINER, 2002).

A viscosidade depende do tamanho, forma e orientação das moléculas, sendo que alterações instantâneas na taxa de cisalhamento causam alterações na forma e orientação das partículas. Em geral, notou-se que a viscosidade aparente não sofreu variações em todas as

amostras analisadas, independente do tipo de gordura utilizada. Valores superiores de recuperação estrutural foram observados nas formulações elaboradas com polpa de murici, resultado que pode ser associado à maior elasticidade e tixotropia da amostra. O comportamento elástico pode ser explicado em termos de mecanismos de ligação intermolecular. Uma força aplicada externa irá causar deslocamentos espaciais, ou compressões e tensões, dos elementos estruturais no interior do sólido (MARANGONI; NARINE, 2013).

Durante os ensaios reológicos foram obtidas imagens de microscopia sob luz polarizada, pelo módulo Rheoscope, para todas as formulações. Com este módulo, a ligação entre as estruturas microscópicas e as propriedades reológicas das amostras pode ser monitorada simultaneamente. Na Figura 2 observam-se as imagens capturadas pelo módulo Rheoscope durante a primeira (oscilatório inicial) e a última fase (oscilatório final) dos testes. Com este módulo a ligação entre as estruturas microscópicas e as propriedades reológicas das amostras podem ser monitoradas simultaneamente (THERMO ELECTRON CORPORATION, 2006).

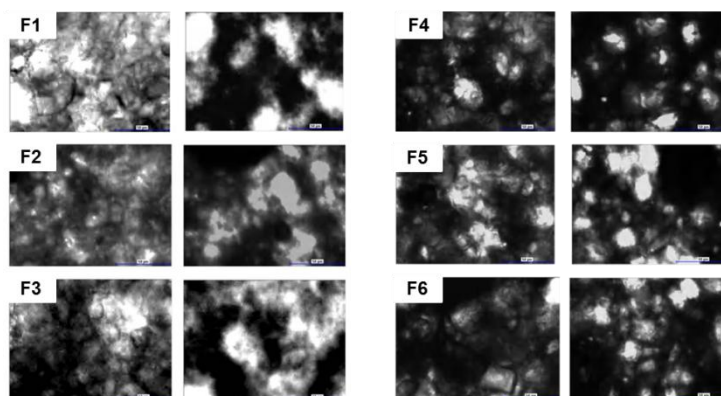


Figura 2 - Microscopia óptica sob luz polarizada, obtida pelo módulo Rheoscope (aumento = 20x), na fase inicial (coluna esquerda) e na fase final da análise reológica (coluna direita), para as amostras com gordura *low trans* + polpa de murici (MU19, MU20 e MU21), T= 28 °C.

As imagens obtidas no início e no final das análises confirmam a recuperação da estrutura; também se observa o menor tamanho dos glóbulos de gordura para as amostras elaboradas com a polpa de murici e melhor definição dos cristais com menor formação de aglomerados. Testes em pequena amplitude de oscilação têm mostrado que a maior parte das partículas de açúcar afetam fortemente as propriedades reológicas do produto final, reduzindo assim a relevância morfológica dos cristais de gordura. A distribuição do tamanho da partícula é um importante fator capaz de afetar tanto a força da rede como a extensão das

partículas finas dando maior elasticidade. No recheio é um atributo importante, já que afeta a percepção do produto final. A Tabela 3 mostra a porcentagem de recuperação das amostras de recheios produzidos com suco concentrado de laranja e polpa de murici, calculada pelo software Haake Rheowin, e avaliada em relação ao módulo G' , obtido no terceiro passo da análise reológica, após 60 s de análise.

Tabela 3 - Porcentagem de recuperação estrutural das amostras de recheios elaboradas com 13% de suco concentrado de laranja (F1, F2 e F3) e 13% de polpa de murici (F4, F5 e F6).

Amostra	Recuperação Relativa (%)
F1	168,71
F2	77,10
F3	31,46
F4	69,69
F5	100,51
F6	109,96

n: 6, Valores médios calculados pelo programa HAAKE RheoWin (versão 3.61), Todas as amostras contêm açúcar *fondant* + chocolate branco + gordura vegetal *low trans* + lecitina de soja + álcool 40 °GL, com as variações em suco concentrado de laranja (F1, F2 e F3) e polpa de murici (F4, F5 e F6).

Conforme Miquelim e Lannes (2009) a avaliação da estrutura de um material com a obtenção de dados de tixotropia pode ser conduzida pelo ensaio combinado oscilatório-rotacional-oscilatório muito eficiente para verificar a reconstituição da estrutura. Em medidas reológicas a tixotropia não é um valor absoluto, mas sim uma forma de mensurar o quanto o produto apresenta essa propriedade em função das condições do ensaio (MAO; CHEN, 2006).

Na Tabela 3 é possível observar que a maioria das amostras apresentou recuperação superior ou igual a 100%, sendo que a maior recuperação foi observada na amostra F1 e a menor para a F3. A recuperação do produto não deve ser relacionada somente ao quanto ele retorna as suas características de viscosidade iniciais, mas também ao quanto ele recupera da sua estrutura anterior. Os recheios produzidos com polpa de murici não apresentaram valores elevados de recuperação, devido à incompatibilidade observada entre as gorduras que compõe a fase gordurosa. Talvez se a formulação escolhida para adição da polpa de murici fosse com manteiga de cacau (ao invés de gordura *low trans*) poderia se observar resultados superiores, já que a composição do óleo de murici é compatível com a manteiga de cacau.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram valores superiores na recuperação estrutural das formulações elaboradas com o suco concentrado de laranja, enquanto que para as amostras contendo polpa

de murici observou-se a inversão dos módulos G' (módulo elástico) e G'' (módulo viscoso), após a primeira etapa da análise, antes de recuperar sua estrutura. Em todas as formulações notou-se o decréscimo da viscosidade com o tempo, confirmando o comportamento tixotrópico dos recheios.

BIBLIOGRAFÍA

Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. p.763-776.

Bill, E. Caramels, fondants and jellies as centres and fillings. In: TALBOT, G., ed. Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products. Boca Raton: CRC Press; Oxford: Woodhead, 2009. cap.7, p.123-151. (Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition).

Castro, R.A.O.; Leite, J.J.G.; Corrêa, C.G.; Bezerra, D.P.; Alves, C.R.; Morais, S.M. Propriedade antioxidante e caracterização dos ácidos graxos do extrato hexânico do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47, Natal, 2007. Anais eletrônicos. NATAL: ABQ-RN, 2007. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/13/13-38-137.htm>. Acesso em: 10 jul. 2013.

Foegeding, E.A.; Steiner, A.E. Factors regulating caramel stickiness and texture. *Manufacturing Confectioner*, v.82, n.5, p.81-88, 2002.

Mao, C.; Chen, J. Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, v.20, p.730-739, 2006.

Marangoni, A.G.; Narine, S.S. Rheology of fats. In: Marangoni, A.G.; Wesdorp, L.H., eds. Structure and properties of fat crystal networks. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. cap.4, 125-146.

Miquelim, J.N.; Lannes, S.C.S. Egg albumin and guar gum influence on foam thixotropy. *Journal of Texture Studies*, v.40, n.5, p.623-636, 2009.

Rezende, C.M.; Fraga, S.R. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonimacrassifolia*L.). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.14, n.3, p.425-428, 2003.

Rousseau, D. The microstructure of chocolate. In: McClements, D.J., ed. Understanding and controlling the microstructure of complex foods. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2007. cap.24, p.649-690. (Woodhead Publishing in food science, technology and nutrition).

Schramm, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. 2.ed. São Paulo: Artliber, 2006. 232p.

Steffe, J.F. Rheological methods in food process engineering. 2.ed. East Lansing: Freeman Press, 1996. 428p

Silva, M.R.; Lacerda, D.B.C.L.; Santos, G.G.; Martins, D.M.O. Caracterização química de frutos nativos do Cerrado. *Ciência Rural*, v.38, n.6, p.1790-1793, 2008.

Swern, D.; Formo, M.V.; Bailey, A.E., eds. Bailey's industrial oil and fat products. 4.ed. New York: Wiley, 1979. 839p.

Thermo Electron Corporation. Haake Mars – Modular Advanced System. Disponível em: <http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/products/catalog?categoryId=80471&&storeId=111522006>. Acesso em: 10 dez. 2012.

Tuberoso, C.I.G.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E.; Cabras, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. Italy. Food Chemistry, v.103, p.1494-1501, 2006.

EFFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS POST-COSECHA (ESCALDADO Y SONICACIÓN) SOBRE LOS PARÁMETROS DE COLOR Y COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN FRUTOS DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICON L.*).

Jurado- Soto G¹, Ochoa-Velasco C², Luna-Guevara, J.J¹, Ruiz-López I¹, Hernández-Carranza P¹, Luna-Guevara, M. L^{1*}

¹ Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio y 18 Sur, Ciudad Universitaria, CP.72570, Puebla, Puebla, México.

² Campus Regional Acatzingo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Carretera Federal Acatzingo - Nopalucan km 9, Acatzingo, Puebla, Puebla, México.

* Autor de correspondencia. Email: lunaguevara@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

México es considerado a nivel mundial como uno de los principales productores y comercializadores de tomate, durante el 2009 la producción alcanzó 4,002,337 ton/año, ingresando más de mil millones de dólares en promedio anual por ventas al extranjero (SAGARPA., 2010). Sin embargo, como consecuencia de esta producción se requieren tratamientos de conservación y condiciones óptimas de almacenamiento, mismas que pueden darle un valor agregado al fruto para ser comercializado en forma fresca. Entre los tratamientos que pueden ser aplicados a los productos vegetales se encuentran los diferentes tipos de escaldado, cuyas funciones primordiales son inactivar enzimas responsables del deterioro durante la conservación (Andersson y Styring, 1991).

Actualmente existe el creciente interés por aquellos métodos alternativos que reduzcan la severidad de los tratamientos térmicos tradicionales, entre las principales propuestas se encuentra la sonicación (Cruz *et al.*, 2009). Se ha comprobado que el ultrasonido puede provocar lisis celular e incrementar la actividad enzimática; por ello, se considera que la aplicación de esta tecnología puede tener un efecto positivo en la composición de los frutos (Knorr *et al.*, 2004 y Vercet *et al.*, 2001).

Existen reportes acerca de que las condiciones de almacenamiento post-cosecha pueden influir sobre algunas propiedades físicas del tomate como son: el color, firmeza, contenido de sólidos totales y pH (Dumas *et al.*, 2003). Asimismo, otros estudios mencionan que los tratamientos térmicos post-cosecha pueden ocasionar pérdidas de algunos minerales y vitaminas como la tiamina y ácido ascórbico (Vázquez y López, 2005). Específicamente Anese *et al.* (2013) consideran que el incremento en la temperatura favorece la liberación en los cromoplastos de algunos carotenoides incluyendo el licopeno, favoreciendo la biodisponibilidad de estos compuestos en el tomate. Cobran importancia los reportes

mencionados debido a que los carotenoides además de conferirle la coloración rojiza al fruto también se asocian con propiedades antioxidantes (AA). De ahí que la ingesta de tomate en la dieta se considera de gran interés, ya que los AA actúan protegiendo a las células del estrés oxidativo producido por la acción de los radicales libres reduciendo así el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y crónico degenerativas (Mordente *et al.*, 2011). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos post-cosecha, sobre los parámetros e índices de color (a , b , L , a/b , Hue y ΔE) y compuestos antioxidantes (licopeno y carotenoides totales) en frutos almacenados durante 5 días en condiciones de refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material vegetal

Los frutos (*Solanum lycopersicum* L cv Reserva) provinieron de un invernadero, localizado en la región de Tétela de Ocampo del Estado de Puebla. Para garantizar el grado de madurez los frutos se colectaron en plantas entre el segundo y tercer racimo.

Condiciones de almacenamiento

Tratamientos post-cosecha

Los frutos fueron divididos en 4 grupos incluyendo los controles considerando 27 frutos por cada grupo. Los tratamientos utilizados fueron escaldado convencional (EC) (T: 90°C, 45s), escaldado con bajas temperaturas (EBT) (T: 55°C, 22 min, CaCl₂=0.5%) y sonicación (S) (T: 45°C, 10 min/37KHz).

Los frutos sometidos a los diferentes tratamientos post-cosecha se almacenaron a temperatura de refrigeración (4°C) y retirados a los 0, 3 y 5 días.

Parámetros e índices de color

Las determinaciones de color se realizaron en tres puntos de la región ecuatorial del fruto utilizando la escala HunterLab comprendiendo las cromátidas L^* , a^* y b^* (Francis, 1980). A partir de los valores obtenidos fueron calculados los índices: I , Hue y ΔE de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$I = \frac{a}{b} \quad \text{Ec (1)}$$

$$HUE = \tan^{-1} [b/a] \quad \text{Ec (2)}$$

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad \text{Ec (3)}$$

Dónde: L_0 , a_0 , y b_0 fueron los parámetros iniciales y L , a , y b corresponden a los parámetros de cada periodo de almacenamiento.

Contenido de licopeno

La concentración de licopeno fue evaluada de acuerdo con los métodos reportado por Sadler et al. (1990) y Fish et al. (2002). Brevemente, un gramo de fruto fue homogenizado en un mL de agua destilada y almacenado en condiciones de obscuridad, fue tomada una alícuota de 0.4-0.6g y mezclada con una solución de hexano/acetona/etanol (2:1:1) y una solución de BHT (hidroxitolueno butilado) al 0.05% (p/v). Las muestras fueron agitadas a 180 rpm durante 30 min y 10 mL de agua destilada, dejándose reposar durante 15min para lograr la separación total de las fases. Se retiró la fase no polar para ser evaluada a 472 nm usando como blanco hexano.

Carotenoides

Los contenidos de carotenoides fueron evaluados de acuerdo con los métodos descritos por Lichtenthaler y Wellbum (1985). Primeramente se maceró un gramo de fruto con 5 mL de una solución de acetona (80% v/v), carbonato de calcio y 2g de arena de mar, la mezcla fue centrifugada a 3500 rpm durante 10 min. Las concentraciones de los carotenoides totales, clorofila a y b fueron determinadas a partir de las absorbancias obtenidas a 470, 645 y 662 nm, se utilizó acetona como blanco.

Análisis estadístico

Se evaluaron los efectos de los tratamientos de escaldado convencional, escaldado a bajas temperaturas y sonicación sobre los parámetros e índices de color y contenidos de compuestos carotenoides y licopeno. Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y se realizaron análisis de comparación de medias de Tukey, utilizando el software Statistix versión 8.1. También fueron determinados coeficientes de correlación de Pearson (r) relacionando los contenidos de licopeno con los índices de color de frutos sometidos a diferentes tratamientos post-cosecha.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El color es un atributo de calidad importante en el tomate debido a que determina el grado de madurez, vida post-cosecha y es un factor decisivo en el momento de la compra (Olives-Barba *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2007). Los resultados demostraron un incremento significativo ($P\leq 0.05$) del parámetro a/b en frutos sonicados ($a=25$), en comparación con los expuestos a EC y EBT con una tendencia inversa se presentaron los valores de los índices

Hue y ΔE (Tabla 1). Particularmente se puede observar que valores más altos de a/b en frutos sometidos a tratamientos de sonicación mantuvieron coloraciones más rojizas mismas que pueden relacionarse con una mayor aceptación por parte del consumidor (López-Camelo y Gómez, 2003).

Con los contenidos de carotenoides y sin considerar el tiempo de almacenamiento de los frutos, podemos observar que estadísticamente no se presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$), sin embargo los tratamientos EC y EBT afectaron directamente los contenidos de carotenoides al presentar los valores más bajos (Fig. 1A). Particularmente los frutos que mostraron una reducción en el contenido de licopeno (Fig. 1B), fueron aquellos sometidos al tratamiento de escaldado convencional ($T = 92 \text{ }^\circ\text{C}/45\text{s}$). Mientras que los frutos sometidos a los tratamientos de sonicación y escaldado a bajas temperaturas no presentaron diferencia significativa entre sí, con contenidos de $65.2 \text{ mg}/100\text{g}$ y $58.5 \text{ mg}/100\text{g}$ respectivamente. Los contenidos mencionados pueden relacionarse como una ventaja funcional de estos frutos en comparación con los sometidos al tratamiento de escaldado convencional. Lo anterior se relaciona con la importancia que presenta el licopeno como compuesto antioxidante (Juroszek *et al.*, 2009).

De acuerdo con los coeficientes de correlación de Pearson (r) obtuvieron valores significativos ($r > 0.5$) al relacionarse los contenidos de licopeno con los índices de color y compuestos carotenoides. Específicamente los contenidos de licopeno de frutos sometidos al escaldado convencional presentaron valores de $r = 1.000$, 0.996 y 0.995 con los parámetros a^* , a/b y $(a/b)^2$, respectivamente. Mientras que el índice de Hue, se correlacionó positivamente con respecto a la cantidad de licopeno presente en frutos tratados con sonicación y escaldado a bajas temperaturas, con valores de $r = 0.6315$ y $r = 0.8568$, respectivamente. La tendencia anterior coincide con lo reportado por Wold, *et al.*, (2004) y Brandt, *et al.*, (2006), quienes mencionan que *Hue* se relaciona con el contenido de pigmentos y específicamente en tomates puede referirse al contenido de licopeno en frutos maduros. Mientras que los carotenoides presentaron una correlación negativa significativa ($r = -0.99$) con respecto al contenido de licopeno en frutos expuestos a tratamientos de escaldado convencional; en comparación con los tomates procesados con escaldado a bajas temperaturas y sonicación ($r = 0.5$).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en los índices de color y contenidos de compuestos antioxidantes se demostró que el tratamiento de sonicación fue una alternativa post-cosecha viable, cuando es comparada con los tratamientos térmicos convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, B., Styring, S. 1991. Photosystem II: molecular organisation, function, and acclimation. *Curr. Top Bioenerg*, 16, 1–81. *Plant Physiol. Biochem.*, 31, 683–691.
- Anese, M., Mirolo G., Beraldo G. 2013. Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility. *Food Chem.*136(2):458-463.
- Arias R., Lee T. C., Logendra L., Janes H. 2000. Correlation of lycopene measured by HPLC with the *L**, *a**, *b** color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content, *J Agricultural and Food Chemistry*. 48:1697–1702.
- Brandt, S., Z. Pe'k, E'. Barna, A. Lugasi, Helyes, L. 2006. Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J. Sci. Food Agr.* 86:568–572.
- Cruz, R.M., Vieira, M.C., Fonseca, S.C., Silva, C. 2011. “Impact of thermal blanching and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) quality: thermosonication process optimization and microstructure evaluation”. *Food and Bioprocess Technology*. 4(7):1197-1204.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P. 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agr.* 83: 369–382.
- Francis, F. 1980. Color quality evaluation of horticultural crops. *Journal of Horticultural Science*.15(1):14-16.
- Fish W., Perkins-Veazie P., Collins J. 2002. A Quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents, *Journal of Food Composition and Analysis*. 15:309-317.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 261–266.
- Juroszek P., Lumpkin H. M., Yang R. Y., Ledesma D. R., Ma C.H., 2009, Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison of organic and conventional management systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1188-1194.
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R., 1985, Determinations of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf extracts in different solvents, *Biochemical Society Transactions*. 603: 591-592.
- López-Camelo A. F. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. (FAO, Argentina).
- Mordente, A., Guantario, B., Meucci, E., Silvestrini, A., Lombardi, E., Martorana, G.E., Giardina, B., Bohm, V. 2011. Lycopene and cardiovascular diseases: an update. *Current Medical Chemistry*.

Olives-Barba, A. I., Camara Hurtado, M., Sanchez Mata, M. C., Fernandez Ruiz, B., Lopez Saenz, M. 2006. "Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene in vegetables". Food chemistry. 95(2): 328-336.

Sadler, G., Davies, J., Dezman. D. 1990. Rapid extraction of lycopene and β -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. J. Food Sci. 55:1460–1461.

SAGARPA, 2010. Resumen Nacional de Producción Agrícola, http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=258, consultada octubre 2013.

Vázquez, A.I., López, N. 2005. Alimentación y Nutrición. Madrid: Ed. Díaz de Santos.

Vercet, A., Burgos, J., Crelier, S., Lopez-Buesa, P. 2001. Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2:139-150.

Wold, A.B., Rosenfeld, H.J., Holte, K., Baugerød, H. Blomhoff, R., Haffner. K. 2004. Color of post-harvest ripened and vine ripened tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as related to total antioxidant capacity and chemical composition. Int. J. Food Sci. Technol. 39:295–302.

Tabla 1. Índices de color evaluados en frutos de tomate sometidos a diferentes tratamientos post cosecha.

<i>Tratamientos Post-cosecha</i>	I: a/b		
	Tiempos de Almacenamiento (días)		
	0	3	5
Escaldado	1.03±0.04 ^{AB}	0.78±0.07 ^C	0.83±0.03 ^C
Escaldado a bajas T	1.04±0.03 ^{AB}	0.90±0.06 ^{BC}	0.89±0.02 ^{BC}
Sonicación	1.15±0.05 ^A	0.93±0.06 ^{BC}	1.12±0.09 ^A
	Hue		
Escaldado	44.05±1.28 ^{BC}	51.84±2.52 ^A	50.26±1.29 ^A
Escaldado a bajas T	43.70±1.06 ^{BC}	47.97±2.12 ^{AB}	48.05±0.82 ^{AB}
Sonicación	40.93±1.38 ^C	47.01±2.13 ^{AB}	41.63±2.37 ^C
	ΔE		
Escaldado	3.84 ± 1.51 ^{ABC}	6.47 ± 1.37 ^{AB}	7.02 ± 1.77 ^A
Escaldado a bajas T	3.16 ± 1.24 ^{ABC}	4.84 ± 1.38 ^{ABC}	5.52 ± 1.47 ^{AB}
Sonicación	1.18 ± 0.59 ^C	2.48 ± 1.53 ^{BC}	3.89 ± 1.93 ^{ABC}

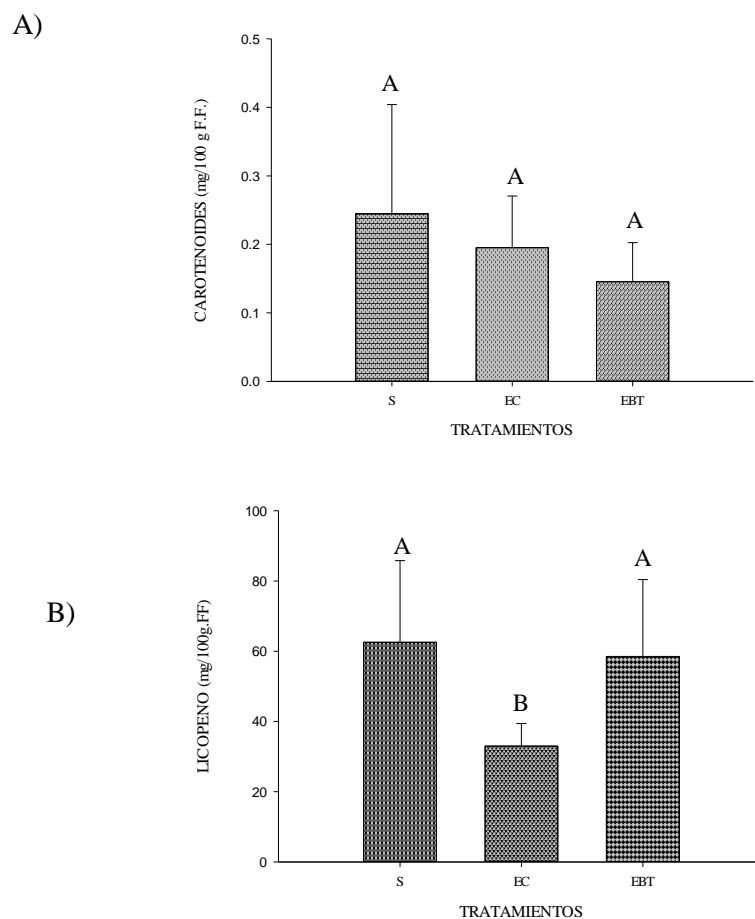


Figura 1. A) Contenido de carotenoides y B) Contenido de licopeno en tomates sometidos a diferentes tratamientos post-cosecha: Sonicación (S), Escaldado Convencional (EC) y Escaldado Bajas Temperaturas (EBT). *Los valores representan los promedios \pm la desviación estándar de 3 repeticiones en 3 experimentos. Letras idénticas arriba de la barras indican que no existe diferencia significativa.

EFEITO DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM DE POTÊNCIA NA SALGA ÚMIDA DE CARNE BOVINA

Gisandro Reis de Carvalho^{1*}, Javier Telis-Romero²

¹Mestrando em Engenharia de Alimentos; ²Prof. Dr. em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista. Rua Cristóvão Colombo, 2265. Jd. Nazareth. São José do Rio Preto – SP. CEP: +55 (17) 3221-2200. *gisandro_carvalho@hotmail.com.

RESUMO

A salga úmida pode ser utilizada como uma das etapas do processamento da carne para obtenção da carne seca e do *jerked beef*. A salga úmida ocorre baseada na desidratação osmótica, ou seja, a carne, quando inserida em uma solução hipertônica de sal, geralmente NaCl, irá perder água para a solução ao mesmo tempo em que o sal se difunde na carne. Como a difusão tanto da água quanto da carne é lenta e dificultada pelas barreiras estruturais da carne, muitas técnicas têm sido empregados com o objetivo de acelerar esta difusão. Métodos tais como agitação, aplicação de pulsos elétricos, pressão e, mais recentemente, aplicação de ultrassom de potência têm sido estudados a fim de compreender como eles aceleram e interferem na difusão e conseqüentemente na desidratação osmótica. O ultrassom de potência vem sendo objeto massivo de pesquisa, devido sua grande aplicabilidade, e facilidade de manuseio. Operações como secagem, extração, salga, entre outros processos, apresentaram maior rendimento com a aplicação de ultrassom de potência. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência do ultrassom de potência na salga úmida de carne bovina. Por meio de um planejamento experimental rotacional de composição central, foram obtidas curvas de desidratação osmótica para diversos níveis de potência ultrassônica e concentração da solução salina. Para obtenção das curvas de desidratação osmótica, a umidade da carne foi determinada durante vários tempos de processo (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos). Após a obtenção das curvas de desidratação osmótica, o modelo empírico de Peleg ($X^W = X_0^W - t / (k_{1W} + k_{2W}t)$) foi ajustado as mesmas. Após 120 minutos de desidratação osmótica, foi possível observar que a concentração da solução de sal influencia diretamente na perda de água. O ultrassom apresentou maior influência na perda de água em potências médias e em concentrações menores de NaCl.

INTRODUÇÃO

A carne bovina é uma das matérias-primas alimentícias de maior importância, seja nutricional ou economicamente. A cadeia de produção e consumo da carne e de seus subprodutos e derivados tem uma participação expressiva na economia de muitos países, assim como na do Brasil, que é um dos principais produtores e exportadores de carne e derivados do mundo. Somente no primeiro semestre de 2013, as exportações de carne e derivados do Brasil ultrapassaram três bilhões de dólares (Abiec, 2013).

Devido à grande disponibilidade de nutrientes, a carne é muito susceptível à degradação, tanto microbiana como de fatores endógenos. Atualmente, a preocupação dos engenheiros de alimentos é desenvolver processos que preservem as características desejáveis ao mesmo tempo em que estabilidade do produto seja aumentada (Tornberg, 2013).

A desidratação osmótica é uma técnica empregada com o objetivo de reduzir a atividade de água, conferindo assim maior estabilidade aos produtos. Pode ser utilizada como pré-tratamento para outras operações como secagem. Durante a desidratação osmótica, o produto é imerso em uma solução hipertônica. Devido à diferença de concentração, a água é retirada por difusão, ao passo que, a partir do mesmo mecanismo, o soluto entra no produto. A difusão da água e, principalmente, do soluto é lenta e bastante influenciada pelas variáveis de processo como temperatura, pressão, natureza do produto e do soluto (Rastogi, Raghavarao *et al.*, 2002; Falade e Igbeka, 2007).

Algumas tecnologias têm sido combinadas à desidratação osmótica com o intuito de acelerar a difusão da água e do soluto e melhorar a qualidade do produto final. Entre estas tecnologias está o ultrassom (Cárcel, Benedito, Rosselló *et al.*, 2007; Siró, Vén *et al.*, 2009; Cárcel, García-Pérez *et al.*, 2012). De modo geral, a produção de ultrassom consiste na conversão de qualquer tipo de energia em energia sonora. Com frequências acima da faixa audível pelo ser humano, a forma de geração depende das necessidades do processo, principalmente da intensidade de saída (Carlin, 1972).

A aplicação de ultrassom de potência em operações que envolvem alimentos vem crescendo e se mostrando vantajosa em alguns casos. Portanto o objetivo deste trabalho é avaliar a influência da aplicação de ultrassom de potência na salga úmida de carne bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Medidas Físicas do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Unesp, campus de São José do Rio Preto. Para determinação da influência da potência ultrassônica durante a salga úmida de

carne bovina, um planejamento experimental foi elaborado com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). O planejamento utilizado foi do tipo composto central rotacional, mostrado na Tabela 1.

Tabela 1

A carne utilizada neste trabalho foi o miolo da paleta, adquirido em um açougue local. Durante o preparo das amostras, o excesso de gordura e membranas presente na carne foi removido com o auxílio de uma faca e, então, a peça foi cortada em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta. Após serem cortadas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos herméticos e congeladas sob a temperatura de $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a realização dos experimentos, a carne era previamente descongelada à $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas (Cárcel, Benedito, Bon *et al.*, 2007).

Para preparar as soluções osmóticas, foi utilizado sal (NaCl) comercial comum com pureza de 99 %. O sal foi previamente seco, em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante e resfriado em dessecador. As soluções foram preparadas adicionando água destilada às quantidades previamente pesadas de sal, agitando até completa dissolução deste.

O equipamento de ultrassom utilizado foi o UP 400S (Hielscher Inc., Teltow, Alemanha), equipado com uma sonda cilíndrica de titânio modelo H22L2D, ponta com diâmetro de 22, comprimento aproximado de 200 mm, rosca macho M10×1, com selo para sistemas fechados. O mesmo opera em uma frequência de 20 kHz e potência nominal máxima de 400 W e conta com um regulador de potência transmitida, podendo variar desde 0 % até 100 %. Este também, pode operar intermitentemente, com tempo máximo de um segundo com aplicação de ultrassom e um segundo sem aplicação.

Durante a desidratação osmótica, três amostras de carne eram imersas em 1000 g de solução, que era mantida a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ com o auxílio de um banho termostatizado. Para cada condição de desidratação pré-estabelecida, eram realizados experimentos nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, para se obter as curvas de desidratação osmótica.

Após cada experimento, as amostras eram imersas em água destilada, por 30 segundos, para a retirada do excesso de sal aderido na superfície (Cárcel, Benedito, Rosselló *et al.*, 2007). A umidade das amostras era então determinada de acordo com o método 950.46 da AOAC (Aoac, 2000).

Para modelar as curvas de desidratação osmótica foi utilizado o modelo de Peleg (Equação 1) (Peleg, 1988).

$$X^w = X_0^w - \frac{t}{k_{1w} + k_{2w}t} \quad \text{Equação 1}$$

O modelo proposto por Peleg apresenta dois parâmetros. k_{1w} , que é a taxa constante de Peleg, representa a taxa de saída de água bem no começo do processo, quando o tempo tende a 0. A constante de capacidade, k_{2w} está relacionada a umidade mínima alcançada. Com o tempo tendendo a infinito, a Equação 1 dá a relação entre a umidade de equilíbrio, a umidade inicial e a constante de capacidade.

$$X_e^w \equiv X_0^w - \frac{1}{k_{2w}} \quad \text{Equação 2}$$

O modelamento foi feito através dos softwares OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA), por meio da ferramenta de análise matemática “*Nonlinear Surface Fit*”, e Excel 2013 (Microsoft Corporation, Santa Rosa, USA), por meio da ferramenta “*Solver*”.

A qualidade do ajuste foi verificada através do coeficiente de correlação (R^2), Equações 3. Onde S_y é o desvio padrão da amostra ($J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$), S_{xy} é o desvio padrão do modelo estimado ($J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$).

$$R^2 = 1 - \frac{S_{xy}^2}{S_y^2} \quad \text{Equação 3}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de desidratação osmótica obtidas nas diferentes condições experimentais são mostradas na figura a seguir

Figura 1

Como mostra a Figura 1, a concentração de sal e a potência ultrassônica afetaram o processo de desidratação osmótica. Os parâmetros do ajuste são mostrados na Tabela 2. O ajuste do modelo de Peleg apresentou coeficientes de correlação entre 0,74 e 0,98. Nas condições de menor concentração, os ajustes apresentaram menores coeficientes de correlação, pois, nessas condições, o comportamento das curvas de desidratação osmótica não característico. A ação do ultrassom combinado com baixas concentrações de sal promoveu maiores perdas de água no início do processo, mas a umidade não aproximou-se de um valor constante (umidade de equilíbrio), apresentando grande variação com o decorrer do processo.

Tabela 2

A umidade de equilíbrio (em base seca) atingida durante o processo de desidratação osmótica variou entre 1,32 e 2,94, sendo que menores umidades foram obtidas para maiores concentrações de sal.

Não há muitos relatos na literatura de aplicação da equação de Peleg para a descrição de desidratação osmótica de produtos alimentícios. Chabbouh, Ben Hadj Ahmed et al. (2012) reportaram, durante a salga de kaddid, uma carne curada típica da Tunísia, valores de k_{1w} próximos de 0,1, e de k_{w2} variando de 0,4 a 0,9, utilizando uma solução com concentração de 15 %. Corzo (2006) encontrou valores de k_{2w} entre 1 e 2, durante a desidratação osmótica de fatias de sardinha.

Figura 2

Analisando a Figura 2, pode se perceber a influência do ultrassom na umidade final, no caso, na perda de água (%). A perda de água foi maior para condições de maior concentração de sal, devido a maior diferença de pressão osmótica, mas o ultrassom apresentou maior influência na perda de água em menores concentração de sal. Ao analisar apenas a influência do ultrassom, houve maiores perdas de água em potências médias, em torno de 50 a 60 % da potência nominal total. A ação do ultrassom em baixas potências pode não ter sido suficiente pra alterar a estrutura da carne, assim como altas potências podem ter provocado alterações estruturais suficientes para provocar a entrada de água e resultar em umidades finais maiores que as umidades finais obtidas para potências médias.

CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode se avaliar de forma inicial a influência da potência ultrassônica e da concentração de sal durante a desidratação osmótica de carne bovina. Apesar de ser resultados parciais, o estudo pode mostrar que, como era de se esperar, a concentração de sal promove uma maior redução de umidade e, além disso, que a aplicação de ultrassom também influencia na saída de água do produto. A utilização de potências médias resultou em maiores reduções na umidade do produto. O modelo de Peleg foi ajustado com sucesso, salvo de baixas concentrações, onde as curvas de desidratação osmótica não se apresentaram tão características. Os resultados apresentados são parciais, em ensaios futuros, pretende-se analisar a difusividade da água e do sal, aplicando o modelo de Fick, além de análises estruturais, para correlacionar os resultados com os parâmetros estudados (Concentração de sal na solução e potência ultrassônica).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Processo nº: 2012/13487-2) pelo apoio financeiro.

Tabela 2 - Planejamento composto central.

Condição	Amplitude do ultrassom (%)	Potência ultrassônica nominal (W)	Concentração da solução ($\text{g}_{\text{NaCl}} \cdot \text{g}_{\text{sol}}^{-1}$)
1	50	200	0,075
2	50	200	0,225
3	75	300	0,075
4	75	300	0,225
5	45	180	0,150
6	80	320	0,150
7	62,5	250	0,044
8	62,5	250	0,256
9 (C)	62,5	250	0,150
10 (C)	62,5	250	0,150

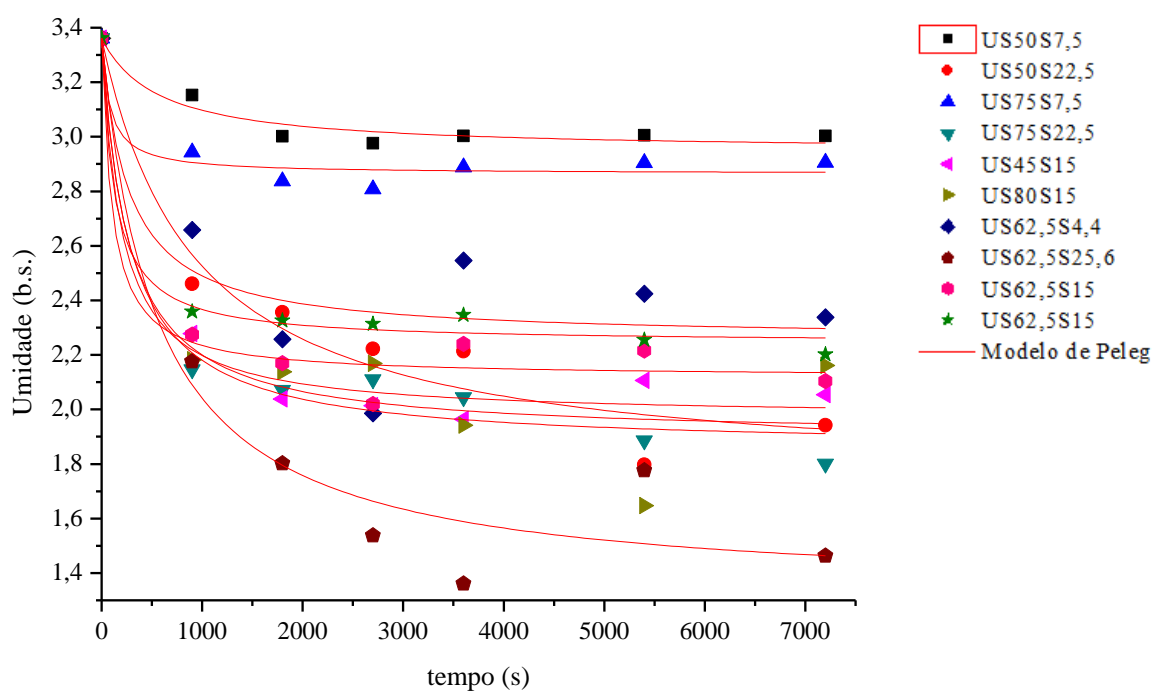


Figura 4 – Ajuste do modelo de Peleg às curvas de desidratação osmótica.

Tabela 3 – Parâmetros do ajuste do modelo de Peleg às curvas de desidratação osmótica

Condição de processo	Parâmetros estimados			R^2
	k_{1w}	k_{2w}	X_e (b.s.)	
US50S7,5	1378,3	2,416	2,947	0,9306
US50S22,5	579,7	0,617	1,741	0,9440
US75S7,5	165,9	2,014	2,864	0,9352
US75S22,5	182,4	0,665	1,856	0,9727
US45S15	141,4	0,719	1,969	0,9783
US80S15	178,4	0,683	1,897	0,8783
US62,5S4,4	241,6	0,907	2,258	0,7434
US62,5S25,6	267,8	0,490	1,320	0,9378
US62,5S15	83,6	0,805	2,118	0,9657
US62,5S15	111,4	0,895	2,243	0,9887

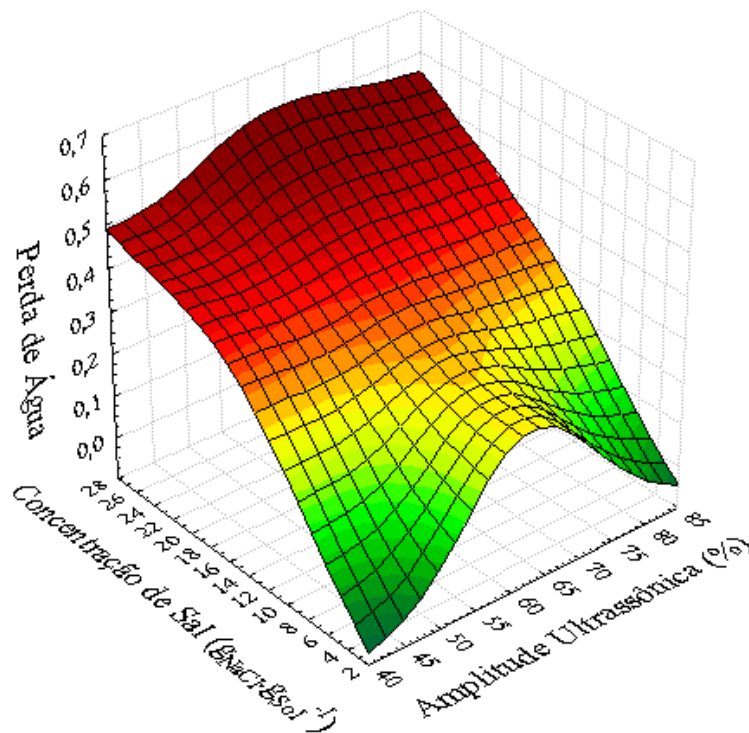


Figura 5 – Perda de água em função da concentração da solução osmótica e da amplitude de potência ultrassônica

BIBLIOGRAFIA

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 2013. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/> >. Acesso em: 25 de Maio.

AOAC. Official Methods of Analysis. Method 950.46. Gaithersburg, MD: AOAC International 2000.

Cárcel, J. A. et al. High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Science*, v. 76, n. 4, p. 611-619, 2007.

Cárcel, J. A. et al. Influence of ultrasound intensity on mass transfer in apple immersed in a sucrose solution. *Journal of Food Engineering*, v. 78, n. 2, p. 472-479, 2007.

Cárcel, J. A. et al. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, v. 110, n. 2, p. 200-207, 2012. ISSN 0260-8774.

Carlin, B. A. *Ultrasonica*. Urmo, 1972.

Chabbouh, M. et al. Studies on the Salting Step of Tunisian Kaddid Meat: Experimental Kinetics, Modeling and Quality. *Food and Bioprocess Technology*, v. 5, n. 5, p. 1882-1895, 2012/07/01 2012. ISSN 1935-5130.

Corzo, O.; Bracho, N. Application of Peleg model to study mass transfer during osmotic dehydration of sardine sheets. *Journal of Food Engineering*, v. 75, n. 4, p. 535-541, 2006. ISSN 0260-8774.

Falade, K. O.; Igbeka, J. C. Osmotic Dehydration of Tropical Fruits and Vegetables. *Food Reviews International*, v. 23, n. 4, p. 373-405, 2007/09/28 2007. ISSN 8755-9129.

Peleg, M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, v. 53, p. 1216–1219, 1988.

Rastogi, N. K. et al. Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends in Food Science & Technology*, v. 13, n. 2, p. 48-59, 2002. ISSN 0924-2244.

Siró, I. et al. Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. *Journal of Food Engineering*, v. 91, n. 2, p. 353-362, 2009. ISSN 0260-8774.

Tornberg, E. Engineering processes in meat products and how they influence their biophysical properties. *Meat Science*, v. 95, n. 4, p. 871-878, 2013.

PREPARACIÓN DE PRODUCTOS ENRIQUECIDOS EN GLUCOSIL-DIANHIDRIDOS DE FRUCTOSA (GLUCOSIL-DAFS) POR CAMELIZACIÓN DE PALATINOSA®

Loyda Atencio-Genes^a, Elena Suárez-Pereira^b, Carmen Ortiz Mellet^{b,*}, José M. García Fernández^{a,*}

^aInstituto de Investigaciones Químicas (IIQ), CSIC – Universidad de Sevilla, Avda. Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla

^bDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, c/ Profesor García González 1, 41012 Sevilla

INTRODUCCIÓN

La caramelización tiene lugar cuando los azúcares o los alimentos con una elevada proporción de azúcares se someten a un proceso de calentamiento, solos o en disolución concentrada, en presencia o no de ciertos aditivos. Junto con la reacción de Maillard, que implica conjuntamente azúcares y aminoácidos, la caramelización pertenece al grupo de las llamadas *reacciones de pardeamiento no enzimático de los alimentos*, responsables del aroma, del aspecto y del sabor de los alimentos cocinados. En el ámbito de la gastronomía tradicional, se entiende por caramelo únicamente el producto resultante de calentar la sacarosa a temperaturas próximas a su punto de fusión, preferentemente en presencia de un producto culinario ácido como zumo de limón o vinagre. Sin embargo, en la industria la caramelización es hoy en día un proceso utilizado para la preparación de una variedad de aditivos o ingredientes alimentarios de gran importancia económica. Como materia prima puede utilizarse glucosa, fructosa o maltodextrinas en presencia de catalizadores tales como ácidos carboxílicos alimentarios (caramelos aromáticos), amoníaco, hidróxidos alcalinos o sulfitos (caramelos colorantes) (Defaye 1995).

Durante el proceso de caramelización se producen reacciones de deshidratación y autocondensación de los azúcares que originan una fracción volátil minoritaria, constituida fundamentalmente por 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF), responsable del aroma característico del caramelo. Además, se forman pigmentos coloreados (melanoidinas) y, junto a éstos, una fracción mayoritaria no volátil (90-95%) de naturaleza sacarídica cuya composición ha permanecido desconocida hasta finales del siglo XX. En 1994, el trabajo realizado por los doctores Jacques Defaye y José Manuel García Fernández en Grenoble (Francia) permitió identificar los dianhidridos de difructosa (DAFs) y sus derivados glicosilados con diferente grado de polimerización (glicosil-DAFs) como los constituyentes fundamentales de esta fracción (Defaye 1994). Aunque algunos miembros de esta familia de

fructooligosacáridos cíclicos eran conocidos desde bastante tiempo atrás, se ignoraba por completo su presencia en la dieta humana.

La formación de DAFs partir de fructosa, o de otros azúcares que contienen fructosa en su composición, como la sacarosa, está particularmente favorecida para concentraciones elevadas de azúcares, como ocurre en el caso de la preparación de caramelo. Hasta 13 isómeros diferentes con esta estructura general, resultantes de la dimerización de la D-fructosa con formación de dos enlaces glicosídicos recíprocos, han sido identificados en los caramelos empleados en pastelería, en proporciones que pueden ser próximas al 30%. La toma de conciencia de la presencia de los DAFs en nuestra dieta ha estimulado una intensa investigación dirigida a elucidar el papel nutricional que desempeñan estos compuestos. Si bien los datos sobre las propiedades nutricionales de los DAFs son mucho menos exhaustivos que para los fructooligosacáridos lineales (FOS), algunos miembros de esta familia de fructooligosacáridos cíclicos, accesibles por vía biotecnológica, han mostrado igualmente propiedades bifidogénicas, además de ser acariogénicos y débilmente calóricos (Ortiz Mellet 2010). Cabe esperar, por tanto, que caramelos enriquecidos en este tipo de fructooligosacáridos se comporten como alimentos funcionales.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una tecnología para la producción de caramelos con un contenido superior al 70% en DAFs y glicosil-DAFs (Suárez-Pereira 2010). El procedimiento implica el calentamiento de fructosa o azúcares alimentarios que contengan fructosa en presencia de catalizadores ácidos sólidos, especialmente la resina ácida Lewatit® S2328, aprobada para su uso en la industria agroalimentaria. La transformación se efectúa a concentración elevada del azúcar de partida en agua a temperaturas que oscilan entre 70-110 °C, y tiempos de caramelización que pueden ir de 1 a 4 h. El producto resultante puede separarse fácilmente del catalizador por filtración y contiene una elevada proporción de dianhidridos de fructosa y de dianhidridos de fructosa glicosilados que puede modularse ajustando las condiciones. Posteriormente, se han publicado algunas modificaciones de este método que implican, por ejemplo, el uso de radiación microondas (Idrid 2012).

El equipo investigador ha abordado una evaluación de las propiedades prebióticas de los caramelos preparados mediante esta tecnología, caramelos por tanto enriquecidos en fructooligosacáridos de tipo DAFs, en modelos animales, incluyendo ratas de laboratorio (Arribas 2010) y pollos (Peinado 2013). Los resultados indicaron, de manera general, un aumento en las poblaciones de bacterias beneficiosas como lactobacillus y bifidobacterias así como la producción de ácidos grasos de cadena corta, confirmándose la ausencia de cualquier

efecto tóxico. Además, se obtuvieron resultados que indican un efecto preventivo y reparador en un modelo animal de la enfermedad de Crohn, lo que permite considerar los caramelos enriquecidos en DAFs como nutracéuticos, con un potencial prometedor para el tratamiento de patologías de inflamación intestinal en humanos.

Los antecedentes comentados no permiten, sin embargo, estimar cuales son los componentes más activos del caramelo enriquecido en DAFs. En un nuevo proyecto, nos hemos planteado la preparación de un nuevo caramelo enriquecido en componentes de mayor grado de oligomerización, esto es, en glicosil-DAFs. Para ello, hemos aplicado la técnica de caramelización catalizada por resina ácida a una glucosilfructosa en lugar de a la fructosa, en concreto a la Palatinosa®. La Palatinosa® (isomaltulosa, 6-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranosa) es un disacárido comercial obtenido por transposición enzimática de la sacarosa que se viene utilizando como edulcorante en Japón desde 1985. Se trata de un producto no cariogénico e indicado para su consumo por diabéticos y prediabéticos (Lina 2002). La pirólisis de la Palatinosa® en presencia de ácido cítrico origina el condensado de palatinosa, para el que se han descrito propiedades prebióticas probablemente relacionadas con la formación de derivados glucosilados de dianhidridos de fructosa (glucosil-DAFs) (Tanaka 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de caramelos enriquecidos en glucosil-DAFs a partir de Palatinosa®.

Las reacciones de caramelización se han llevado a cabo en un matraz de fondo redondo de 50 mL colocado en un sistema a reflujo e inmerso en un baño de aceite de silicona (polimetilfenilsiloxano) o en vial cerrado inmerso en un baño de arena. Para el calentamiento y la agitación magnética se utilizó una placa IKARTC Basic provista con un termopar para el control de temperatura. La palatinosa (5-10 g) se disolvió primero en agua a la concentración deseada y, posteriormente se añadió la resina ácida de intercambio iónico Lewatit® S2328 (H⁺). La mezcla se calentó con una buena agitación durante 2-4 h. Para detener la reacción de caramelización se añadió una mezcla de agua-hielo (50 mL). El catalizador se separó por filtración y se lavó varias veces con agua caliente para recuperar los restos de caramelo adherido al mismo. Para el seguimiento de la cinética de caramelización, se tomaron muestras (50-100 mg) a diferentes intervalos de tiempo. Estas muestras se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis.

Análisis de caramelos de Palatinosa® mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Para el análisis por CG-FID, se aplicó un protocolo de derivatización consistente en la oximación-trimetilsililación de las mismas dependiendo de las muestras. Las alícuotas tomadas en el curso de la reacción (100 ó 150 mg) se diluyen en 1 mL de agua destilada se centrifugan en una microcentrifuga de sobremesa, se decantan y se liofilizan. Se prepara una disolución del liofilizado en agua ($16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), de la que se toma una alícuota de 100 μL a la que se añade una disolución de fenil β -D-glucopiranosido (patrón interno) en acetona-agua (1:9 v/v, $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 100 μL). La disolución resultante se evapora a sequedad bajo presión reducida (0.1 mm Hg). Para la derivatización, 15-20 mg de la muestra liofilizada se disuelven en 1 mL de una disolución de hidroxilamina en piridina ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y se calienta en baño de agua durante 50 minutos a 60 °C. Se añaden entonces 200 μL de hexametildisilazana y 100 μL de trimetilclorosilano y la mezcla de reacción se mantiene en baño de agua durante 40 minutos a 60 °C. Se observa la aparición de un precipitado de color blanco que será separado por centrifugación antes de hacer la inyección en el cromatógrafo de gases.

Ensayos de fermentabilidad. Los experimentos de fermentación se llevaron a cabo utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae*, agua desionizada y material esterilizado. Para la preparación de los cultivos, se utiliza extracto de levadura (1%), peptona (2%) y glucosa o caramelo palatinosa (2%). Se preparan 90 mL de extracto de levadura y peptona, se adicionan 10 mL de glucosa (control) o caramelo de Palatinosa®. Una vez disuelto el medio, se esteriliza la disolución para evitar el crecimiento de contaminantes por calentamiento en autoclave a 121 °C por 20 min.

Una vez disueltos los componentes, el medio, se reparte en tubos a razón de unos 2-4 ml por tubo, se tapan estos con tapón y se esterilizan en autoclave. Se introduce el asa de siembra en el cultivo crecido, tomando una colonia y agitándola en cada tubo. Se incuba a 30 °C hasta que haya crecimiento. Como indicador de las características de crecimiento están el color, olor y la turbidez del medio. Se realiza además un control con microscopio. Se inoculan entonces los medios previamente preparados para el estudio cinético de la fermentabilidad del caramelo de palatinosa®. El experimento se ha mantenido durante 10 días. Se extrajeron alícuotas a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis por cromatografía de gases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caramelización de Palatinosa® promovida por la resina ácida de intercambio iónico Lewatit® S2328 conduce a conversiones de hasta el 60%, con formación de una proporción significativa de productos tetrasacarídicos con estructura de diglucosil-DAFs (G_2 -DAFs). El análisis por cromatografía de gases permite identificar cinco compuestos en la región de los G_2 -DAFs (Figura 1), cuatro de los cuales pudieron identificarse de manera inequívoca por comparación con patrones puros. Se observa igualmente la presencia de compuestos con estructura de monoglucosil-DAFs (G-DAFs). Un estudio mediante espectrometría de masas permitió detectar compuestos de mayor grado de oligomerización así como la presencia de una serie de compuestos derivados del HMF (glucosil-HMFs). El primer miembro de esta serie (G-HMF) se sintetizó y su presencia en el caramelo se confirmó inequívocamente.

Establecidas las condiciones de obtención de un caramelo enriquecido en glucosil-DAFs a partir de Palatinosa® así como su caracterización físicoquímica, nos hemos interesado en la posibilidad de modificar el producto mediante procedimientos fermentativos. Para ello, hemos utilizado la levadura *Saccharomices cerevisiae* y hemos realizado un estudio comparativo de la capacidad de este organismo para metabolizar los DAFs, el caramelo enriquecido en DAFs, los diglucosil-DAFs (obtenidos de manera exclusiva mediante métodos químicos) y el caramelo de Palatinosa®. Los resultados indican que tanto los DAFs como los glucosil-DAFs son resistentes a la fermentación, en tanto que los excesos de mono y disacáridos presentes en los caramelos son rápidamente metabolizados por la levadura.

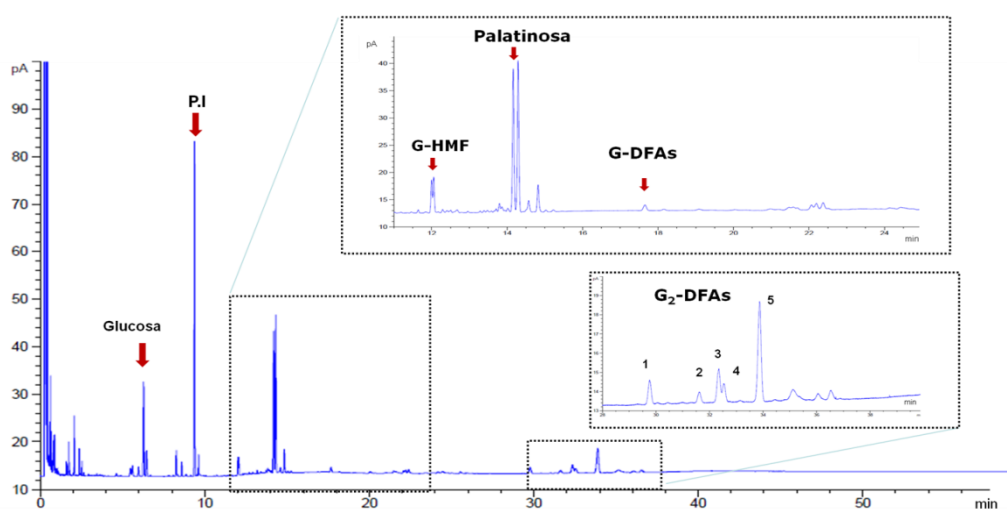


Figura 1. Perfil cromatográfico del caramelo obtenido por tratamiento de Palatinosa® con resina ácida

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que es posible preparar un caramelo enriquecido en glicosil-DAFs partiendo de Palatinosa® mediante la tecnología basada en el uso de la resina ácida de intercambio iónico Lewatit® S2328 como catalizador. Tanto el caramelo enriquecido en DFAs preparado a partir de fructosa, descrito con anterioridad, como el nuevo caramelo enriquecido en glicosil-DAFs pueden transformarse mediante fermentación con levadura. Este proceso elimina los restos de monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos reductores en general, dejando intactos los DAFs y glicosil-DAFs que son los componentes responsables de la actividad prebiótica y nutracéutica observada. Dado que los DAFs y, probablemente, los glicosil-DAFs no se digieren, se obtienen de esta manera caramelos prebióticos acalóricos. Los estudios de las propiedades nutricionales de estos nuevos productos están actualmente en curso y deben permitir determinar si existen diferencias entre unos y otros en lo referente al efecto sobre la microbiota y la prevención y recuperación de agresiones del tracto intestinal.

REFERENCIAS

- Arribas B, Suárez-Pereira E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Buttersack C, Rodríguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, Bailon E, Guerra-Hernández E, Zarzuelo A and Gálvez J 2010. Di-D-fructose-enriched caramels: effect on colon microbiota, inflammation, and tissue damage in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6476-6484.
- Defaye J and García Fernández JM 1994. Protonic and thermal activation of sucrose and the oligosaccharide composition of caramel. *Carbohydrate Research* 256, C1-C4.
- Defaye J and García Fernández JM 1995. The oligosaccharide components of caramel. *Zuckerindustrie* 120, 700-704.
- Idri I, Havet J.-L., García Fernández JM, Ferroud C and Porte C 2012. Microwave-assisted synthesis of prebiotic di-D-fructose dianhydride-enriched caramels. *Food Chemistry* 234, 1527-1532.
- Lina BAR, Jonker D and Kozianowski G 2002. Isomaltulose (Palatinose ®): a review of biological and toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1375-1371.
- Ortiz Mellet C and García Fernández JM 2010. Difuctose dianhydrides (DFAs) and DFA enriched products as functional foods. *Topics in Current Chemistry* 294, 49-77.
- Peinado MJ, Echávarri A, Ruiz R, Suárez-Pereira E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM and Rubio LA 2013. Effects of inulin and di-D-fructose dianhydride-enriched caramels on intestinal microbiota composition and performance of broiler chickens. *Animal*, 7, 1779-1788.

Suárez-Pereira E, Rubio EM, Pilard S, Ortiz Mellet C and García-Fernández JM 2010. Di-D-fructose dianhydride (DFA)-enriched caramels by acid ion-exchange resin-promoted caramelization of D-fructose: chemical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1777-1787.

Tanaka M, Nakajima Y, Nishio K and Hashimoto H 1993. Structure of oligosaccharides prepared by acidic condensation of Palatinose. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 12, 49-61.

HIDROLISADOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE COM ALCALASE LIVRE E IMOBILIZADA: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Pessato, T. B.¹; Tavano, O. L.²; Netto, F. M.¹

1. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato 80, 13083-862 Campinas, São Paulo, Brasil. e-mail: flavia@fea.unicamp.br

2. Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Rua Getúlio Guaritá n° 159, sala 321, 38025440 Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os hidrolisados do isolado protéico do soro do leite (IPS) têm sido produzidos e estudados visando alteração de propriedades funcionais, suplementação de dietas para grupos específicos e obtenção de peptídeos bioativos. A hidrólise enzimática pode ser realizada com a enzima livre ou imobilizada, que corresponde àquela enzima ligada a um suporte sólido que apresenta retenção de sua atividade catalítica e pode ser reutilizada (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). Uma das mais destacáveis diferenças entre a utilização da enzima livre ou imobilizada está na forma de interrupção da reação. Quando a enzima livre é utilizada, muitas vezes é necessário inativá-la por aquecimento para interromper a hidrólise. Quando a enzima imobilizada é utilizada, a hidrólise pode ser interrompida pela retirada da enzima do meio reacional por filtração. Os diferentes tratamentos para interrupção da reação de hidrólise podem acarretar em características diferentes dos hidrolisados produzidos, em especial, naqueles obtidos com a enzima livre, pois o tratamento térmico pode causar modificações tais como agregação dos peptídeos formados (CHEISON, WANG e XU, 2007; POULIOT, GUY, TREMBLAY, *et al.*, 2009). O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar hidrolisados de IPS produzidos com Alcalase livre (AL) e imobilizada em glioxil-agarose (AIm).

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se IPS PROVON® (Glanbia Nutritionals, Kilkenny, Irlanda). A Alcalase (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA) foi utilizada nas formas livre e imobilizada. Para imobilização foi utilizada agarose comercial 4BCL (GE HealthCare).

Imobilização da Alcalase

Para preparo do suporte glioxil, a agarose foi ativada com glicidol (2,3-epoxi-propanol), como descrito por Guisán (1988). Em banho de gelo, para cada grama de agarose, foram adicionados 286 µL de água, 476 µL de 1,7 N NaOH contendo 28,5 mg de borohidreto de sódio/ mL de solução e 343 µL de glicidol. Após 18 h de ativação, o suporte foi lavado

com água destilada e seco a vácuo. Uma solução de Alcalase em solução tampão carbonato de sódio 10 mM pH 10,2 (480 µL de enzima/100 ml) foi adicionada ao suporte (10 mL de solução de enzima/g de suporte) e a suspensão foi mantida a 4°C, sob agitação constante. Após 24 h de imobilização, foi acrescentado 1 mg de boroidreto de sódio por mL de mistura. Após 30 min, o gel foi lavado sob vácuo com água milli Q e depois com tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹), pH 8.

Obtenção dos hidrolisados do isolado proteico do soro (IPS)

Tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² para avaliar a influência das variáveis independentes temperatura e pH no grau de hidrólise (GH), variável dependente. Para todos os ensaios, o IPS foi preparado em solução aquosa na concentração de 3 % (m/v) e a relação enzima:substrato foi fixada em 120 U/g de substrato. Após 180 min, a reação foi interrompida por aquecimento a 90°C/10 min ou pela retirada da enzima do meio reacional por filtração a vácuo quando a enzima livre ou imobilizada foi utilizada, respectivamente. A reação de hidrólise foi monitorada utilizando-se pH-stat, com uso de titulador automático modelo Metler DL 21 (Schwerzenbach, Suíça) com sistema de agitação. O GH foi definido pela equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986):

$$\text{GH (\%)} = \frac{B \cdot N_b(1/\alpha)(1/MP)(1/htot)}{100} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde: B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; 1/α = média de grau de dissociação do grupo α-NH₂; MP = massa da proteína em g; htot = número total de ligações peptídicas no substrato proteico, cujo valor é de 8,8 mMol/g de proteína para o isolado proteico do soro de leite (STĂNCIUC, VAN PLANCKEN, ROTARU, *et al.*, 2008).

Os hidrolisados obtidos com a enzima livre foram denominados como HAL e os obtidos com a enzima imobilizada HAIm, seguidos pelo número referente ao ensaio de hidrólise do DCCR.

Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

Foram realizadas cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e de exclusão molecular (CLAE-EM) utilizando Sistema de HPLC Agilent, Sistema de bombas quaternário, Semi Preparativo e Analítico com Detector por Arranjo de Diodos (DAD).

A CLAE-FR foi realizada para todos os hidrolisados de acordo com Sabadin, Vllias-Boas *et al.* (2012) com algumas modificações utilizando coluna C18 Luna (250 mm x 4,6 mm DI, 5 µm) – Phenomenex - Woburn, MA, EUA. As proteínas α-Lactalbumina (α-La) e β-lactoglobulina (β-Lg) foram utilizadas como padrões. A composição dos solventes foi:

solvente A: 0,04% de ácido trifluoracético (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) em água Milli-Q, solvente B: 0,03% TFA em acetronitrila (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) de grau HPLC (High Performance Liquid Chromatography). A coluna foi mantida em temperatura ambiente, com fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detector fixado em 214 nm, volume de injeção de 25 μL . A eluição das amostras foi realizada em gradiente linear até 70% do solvente B em 40 min, mantida de forma isocrática por 5 min e reequilibrada às condições iniciais durante 15 min. Os cromatogramas dos hidrolisados foram divididos em 3 zonas: (I) alta hidrofiliçidade, até 16 min, com solução B na concentração entre 10% e 30%; (II) média hidrofiliçidade, entre 16 e 22 min, com solução B entre 30% e 40% e (III) baixa hidrofiliçidade, a partir de 22 min, com concentração de solução B acima de 40%.

A CLAE-EM foi realizada apenas com os hidrolisados HAL e HAI_m nos ensaios 2, 5 e 8 dos DCCR para verificar a distribuição de massa molecular (MM) aparente, utilizando coluna Protein-PakTM 60 Å – 7,8 mm x 300 mm (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) (faixa de separação de 1-20 kDa). A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,8 e utilizou-se α -La como padrão. O fluxo foi de 0,5 mL/min e o monitoramento a 214 nm. O volume de injeção de amostra foi de 20 μL e o tempo de corrida igual 40 minutos.

As fases móveis de ambas as análises foram filtradas em membrana 0,45 μm (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). As amostras (3mg de proteína/ml) foram solubilizadas nas respectivas fases móveis e filtradas em membranas de acetato de celulose 22 μm (Schleicher & Schüll, Dassel, Dassel, Alemanha). As análises foram realizadas em duplicata.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras HAL e HAI_m 2, 5 e 8 foram avaliadas por eletroforese em dois diferentes sistemas, SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina, utilizando equipamento Mini Protein II (BioRad, Hercules, CA, EUA). SDS-PAGE foi realizado como descrito por Laemmli (1970) utilizando géis de separação e empilhamento 12% e 4% de acrilamida, respectivamente. Utilizou-se kits de marcadores padrão de MM de 14,4 a 97,0 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). No sistema SDS-PAGE-Tricina foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: gel de separação (16,5%T e 3%C) com 6 mol/L ureia, gel espaçador (10%T e 3%C) e gel de empilhamento (4% T e 3%C). Utilizou-se padrão de 3,5 a 26 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

O IPS e os hidrolisados (2% proteína) foram diluídos em tampão redutor e aquecidos a 95 °C/4 min. Foram aplicadas alíquotas de 10 μl de amostra. Após a corrida, os géis foram

corados com Comassie Blue R-250 na concentração de 0,1% em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5) e descorados em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz com os ensaios experimentais e os resultados de GH para cada enzima estão apresentados na Tabela 1. O GH variou de 18,1 a 22,5% para a AL e de 9,5 a 22,2% para a AIm. Quando suportes porosos, como glioxil-agarose, são utilizados para imobilização, parte da enzima é imobilizada na superfície do suporte e parte no interior de sua malha, o que pode gerar dificuldades de acesso do substrato a estas enzimas, restringindo a velocidade de ação da enzima imobilizada. Isso pode explicar a obtenção de hidrolisados com menor GH com AIm. O ensaio 8 não somente foi o que resultou em maior GH com AIm, bem como foi o único ensaio em que o GH com esta enzima ultrapassou o GH obtido com AL. Embora a imobilização possa aumentar a estabilidade da enzima por rigidificação da cadeia protéica, isto dificulta a movimentação da cadeia durante a interação com o substrato. Altas temperaturas poderiam colaborar com maior energia ao sistema permitindo que a enzima superasse tal dificuldade.

Na CLAE-FR as proteínas α -La e β -Lg apresentaram tempos de retenção (TR) 27,2 e 28,6 min, respectivamente. O perfil cromatográfico do IPS (CLAE-FR) mostrou picos referentes às proteínas α -La e β -Lg, identificadas pelos tempos de retenção que foram semelhantes aos padrões. Os perfis cromatográficos (CLAE-FR) dos hidrolisados obtidos nos DCCR estão apresentados na Figura 1. Observa-se ausência de picos referentes à α -La e β -Lg nos hidrolisados obtidos com AL (Figura 1A), o que indica a hidrólise destas proteínas. Os cromatogramas dos HAL obtidos sob as diferentes condições de hidrólise são similares, sendo que a maioria dos peptídeos foi eluída nas regiões de alta (I) e média (II) hidrofiliabilidade. Os perfis cromatográficos (CLAE-FR) dos hidrolisados obtidos com AIm (Figura 1B) apresentaram mais picos na região de baixa hidrofiliabilidade (III) que os HAL. Na maioria dos cromatogramas apareceram picos referentes às proteínas íntegras, o que sugere que a hidrólise foi menos eficiente utilizando a AIm. Isso pode ser devido ao substrato encontrar dificuldades para acessar os sítios ativos da enzima através da malha do suporte utilizado na imobilização da enzima.

A Figura 2 mostra os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina) do IPS e dos HAL e HAIm. Nos dois sistemas é possível observar a separação das duas principais proteínas dos IPS, β -Lg e α -La, e no sistema SDS-PAGE é possível observar a soroalbumina bovina (BSA) de 66 kDa. Os perfis dos hidrolisados, de forma geral, apresentaram banda

referente a essa proteína, porém, nos HAI_m essas bandas foram mais intensas. Isso sugere que a AI_m teve mais dificuldade para hidrolisar essa proteína. Os perfis dos HAL₂ e HAL₅ mostraram desaparecimento quase que total de β -Lg e α -La. Enquanto que o perfil do HAL₈ não apresentou nenhuma banda em nenhum dos dois sistemas, sugerindo que sob as condições de hidrólise deste ensaio, foram produzidos peptídeos de MM menor que 3,5 kDa. Nos perfis eletroforéticos (SDS-PAGE e SDS-PAGE/Tricina) dos hidrolisados HAI_{m2} e HAI_{m5} observa-se bandas, de fraca intensidade, referentes às proteínas β -Lg e α -La. É possível observar também bandas na região de MM um pouco abaixo de 66,2, de 31, 26,6 e 17 kDa, o que pode indicar a presença de peptídeos originários da quebra de proteínas maiores. Já o hidrolisado HAI_{m8} apresentou perfis eletroforéticos semelhantes aos hidrolisados obtidos com a AL, o que condiz com o maior GH obtido neste ensaio (22,2%).

A α -La (14,4 kDa) e a BSA (66 kDa) foram utilizadas como padrões para avaliar a distribuição de MM das amostras por CLAE-EM. A MM da BSA (66 kDa) é superior à faixa de separação da coluna e, assim, o TR dessa proteína, 11,4 min, representa o volume morto. O TR da α -La (14,4 kDa) foi 13,4 min. Os cromatogramas (CLAE-EM) dos hidrolisados com AL e AI_m encontram-se na Figura 3. De forma geral, os HAL e HAI_m apresentaram, majoritariamente, MM aparente menor que 14,4 kDa, o que está em conformidade com os resultados das eletroforeses. Porém, os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE/Tricina) dos HAL indicam que estes são constituídos, principalmente, por peptídeos de MM menor que 3,5 kDa, sugerindo que picos eluídos próximo ao TR da α -La podem ser referentes a agregados de peptídeos. Nos cromatogramas (CLAE-EM) dos HAI_m observa-se um pico eluído no volume morto da coluna. Esse pico pode ser referente aos peptídeos de MM aparente maiores que a capacidade de separação da coluna, eluídos juntamente com resíduos de BSA, uma vez que, de acordo com o perfil eletroforético, essa proteína não foi totalmente hidrolisada pela enzima imobilizada.

CONCLUSÕES

A enzima imobilizada produziu hidrolisados de menor GH e, conseqüentemente, maiores MM. Esses resultados podem ser atribuídos ao processo de imobilização que restringe o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima, causando menor eficiência da hidrólise por essa enzima.

BIBLIOGRAFÍA

adler-Nissen, H. S. O. J. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. London. 1986 (Elsevier Applied Science Publishers)

Cheison, S. C., Wang, Z. E Xu, S.-Y. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, v.80, n.4, p.1134-1145. 2007.

Guisán, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, n.6, p.375-382. 1988.

Katchalski-Katzir, E. Immobilized enzymes — learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*, v.11, n.11, p.471-478. 1993.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Pouliot, Y., Guy, M. M., Tremblay, M., *et al.* Isolation and characterization of an aggregating peptide from a tryptic hydrolysate of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.9, p.3760-3764. 2009.

Sabadin, I., Villas-Boas, M., De Lima Zollner, R., *et al.* Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. *European Food Research and Technology*, v.235, n.5, p.801-809. 2012.

Stănciuc, N., Van Plancken, I. D., Rotaru, G., *et al.* Denaturation impact in susceptibility of beta-lactoglobulin to enzymatic hydrolysis: A kinetic study. *Revue Roumaine de Chimie*, v.53, n.10, p.921-929. 2008.

Tabela 1: Matriz do DCCR utilizado para Alcalase livre e imobilizada e seus respectivos resultados.

Ensaio	Variáveis Independentes		Variável Dependente – GH (%)	
	pH	Temperatura (°C)	Alcalase Livre	Alcalase Imobilizada
1	7,3	48	18,1	14,3
2	8,7	48	18,1	11,4
3	7,3	62	21,0	18,3
4	8,7	62	23,9	17,7
5	7,0	55	22,5	17,4
6	9,0	55	20,1	17,3
7	8	45	22,2	9,5
8	8	65	18,8	22,2
9	8	55	21,5	19,4
10	8	55	20,3	17,1
11	8	55	22,4	20,0

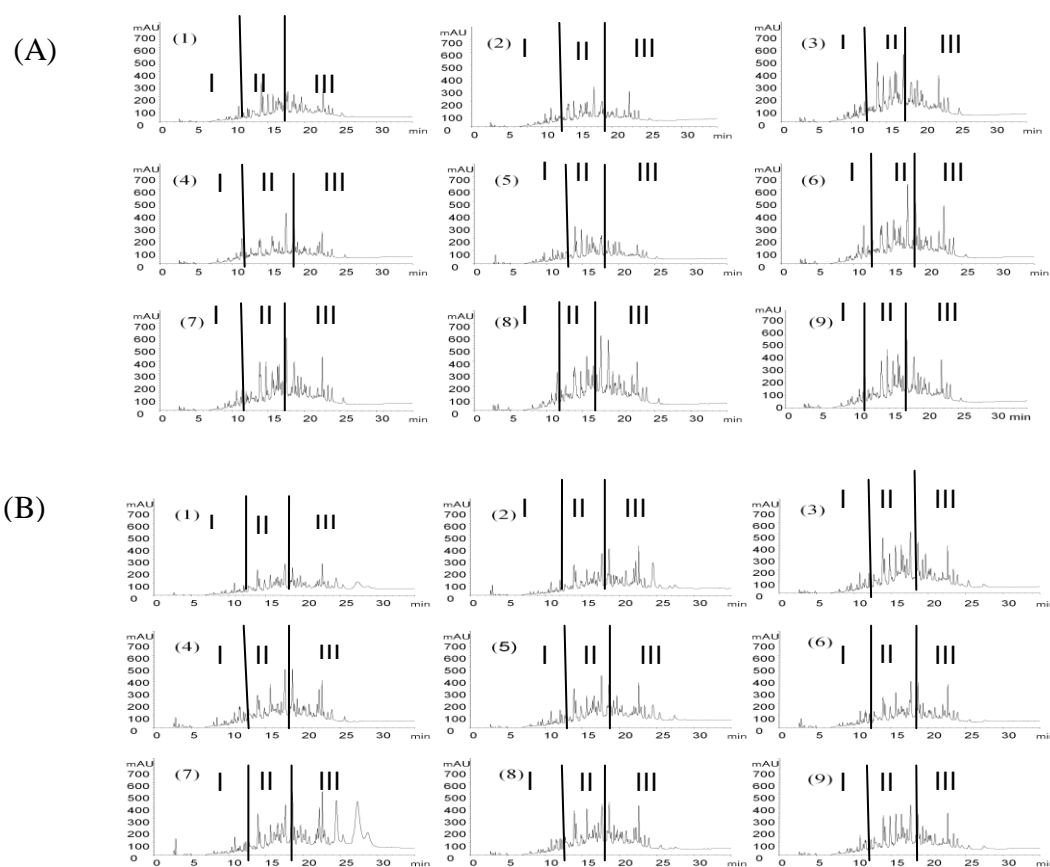


Figura 1: Perfil cromatográfico (CLAE-FR) de hidrolisados obtidos com Alcalase livre (A) e imobilizada (B) nos DCCR. Números referentes a cada ensaio do DCCR. Coluna C18 Luna (250 mm x 4,6 mm DI, 5 µm); fluxo 1ml/min.

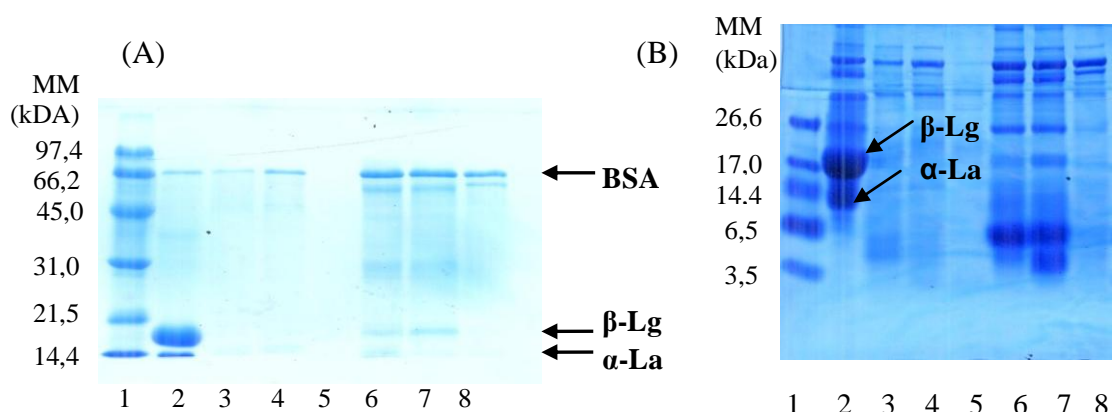


Figura 2: Perfis eletroforéticos de IPS íntegro e HAL e HAIm obtidos nos ensaios 2, 5 e 8 dos DCCR. (A) SDS-PAGE (gel de poliacrilamida – 12%); (B) SDS-PAGE/Tricina: (1) Padrão de massa molecular; (2) IPS não hidrolisado; (3) HAL2; (4) HAL5; (5) HAL8; (6) HAIm2; (7) HAIm5; (8) HAIm8.

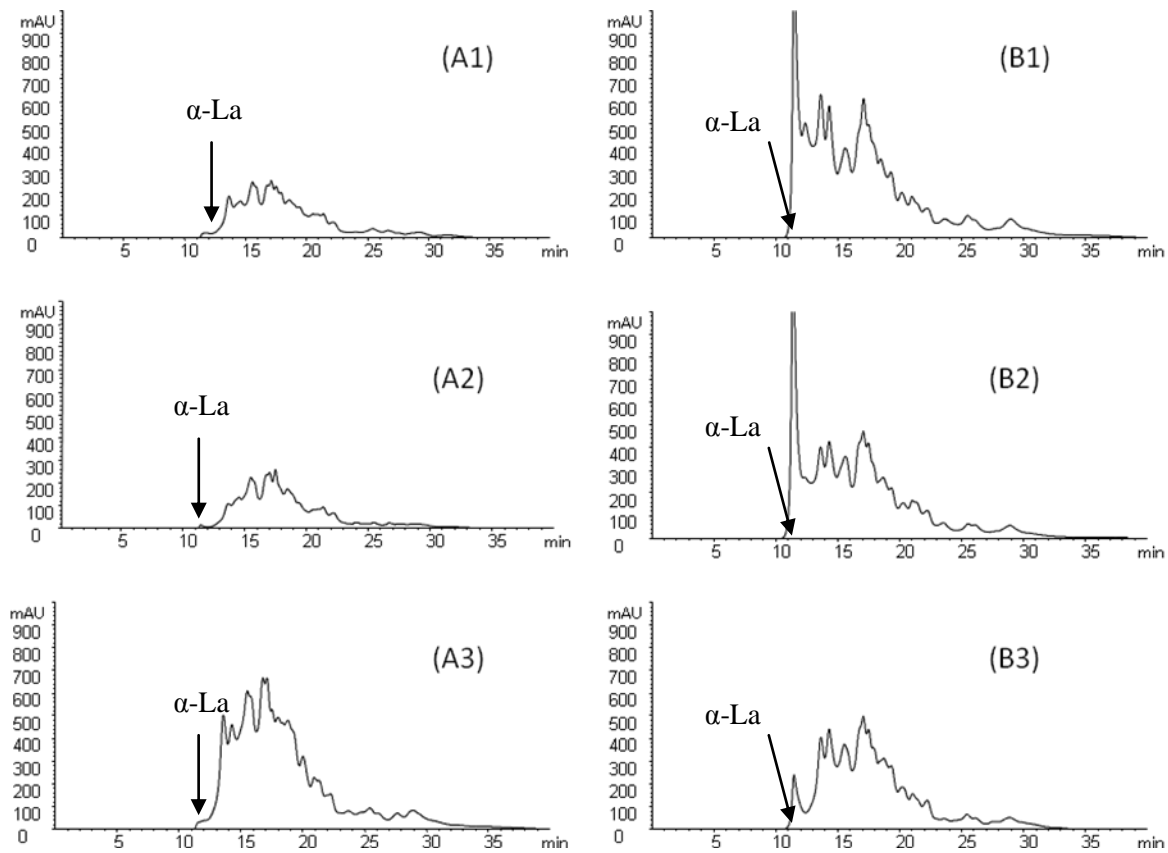


Figura 3: Perfil cromatográfico (CLAE-EM) dos hidrolisados com Alcalase livre (A) e imobilizada (B) obtidos nos DCCR. (1) Ensaio 2. (2) Ensaio 5. (3) Ensaio 8. Condições de análise: coluna Protein-Pak TM 60Å (7,8 mm x 300 mm), fluxo de 0,5 mL/min, FM: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,8.

DEGRADACIÓN FOTOQUÍMICA DE PECTINMETILESTERASA

A. Ibarz, V. Falguera y A. Garvín

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

INTRODUCCIÓN

La pectinmetilesterasa (PME) (EC 3.1.1.11) es una enzima que actúa eliminando los grupos metoxilo del ácido galacturónico de la pectina, produciendo metanol y pectinas de bajo grado de metoxilación. Los grupos carboxilo forman enlaces entrecruzados en presencia de iones divalentes, como el Ca^{2+} , causando la formación de flóculos de pectina que acaban precipitando, disminuyendo la turbidez del zumo y dando lugar a un suero o zumo clarificado. En el caso que se desee que la pectina esté en suspensión en los denominados zumos turbios, esta enzima debe ser desactivada, ya que se encuentra de forma natural en la fruta. La inactivación habitual de la enzima tiene lugar mediante tratamiento térmico, pero como este tratamiento tiene importantes efectos secundarios sobre el zumo, se ha estudiado su inactivación mediante radiación UV.

Esta técnica consiste en la emisión de una radiación en la región de alta absorbancia de la molécula, que causa una rotura de los enlaces y por lo tanto, la destrucción de los mismos.

Por otro lado, es interesante tener en cuenta que durante el almacenamiento del zumo puede darse la reacción de Maillard entre azúcares reductores y aminoácidos presentes en el zumo. El producto de esta reacción es una mezcla de polímeros coloreados denominados melanoidinas que absorben parte de la radiación. Por lo tanto, es interesante conocer el efecto protector sobre la inactivación de la enzima PME en presencia de melanoidinas.

El objetivo del presente trabajo es realizar un estudio de degradación fotoquímica de la enzima PME en solución acuosa pH 7, evaluando el efecto de la temperatura sobre esta degradación y el efecto de la presencia de melanoidinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras a irradiar. Se prepararon soluciones acuosas de 0.2 U/mL de PME a pH 7 a partir de una disolución inicial de 10 U/mL.

Preparación de la disolución de melanoidinas. La disolución de melanoidinas se sintetizó (Falguera, *et al.*, 2013a) sometiendo una disolución de 300 g de fructosa y 2 g de ácido glutámico en 1 L de agua destilada a 95°C durante 13 días. Se extrajeron las

melanoidinas sintetizadas en 10 g de carbón activo, utilizando una columna de 5 cm. de diámetro con una placa de fibra de vidrio en la parte inferior. El carbón activo fue lavado con agua para eliminar el contenido de fructosa y ácido glutámico, analizando azúcares reductores en el agua de lavado hasta que no se observó contenido en azúcares reductores mediante el método del reactivo de Fehling. Posteriormente, se recuperaron las melanoidinas mediante una desorción del carbón activo con una disolución acuosa de piridina al 25%. La disolución resultante se filtró para eliminar el carbón activo, se concentró por evaporación del disolvente en un rotavapor y fue liofilizada. De este modo se obtuvieron 6.245 g de melanoidinas que fueron disueltas en 500 mL de agua, dando una disolución madre de 12.45 mg/mL.

A partir de esta disolución, se añadió la cantidad necesaria de la misma a 3 disoluciones sintéticas de 0.2 U/mL de PME para obtener las concentraciones de 0.05, 0.10 y 0.2 mg/mL de melanoidinas.

Tratamiento con radiación UV. El tratamiento fotoquímico con radiación UV es similar al descrito por Falguera *et al.* (2011), que esencialmente consiste en una cámara oscura que contiene el tanque de reacción y la lámpara UV. Las muestras a irradiar se colocan en un tanque de metacrilato de 22x15x10 cm, donde alcanza una altura de 2,4 cm. Con el fin de controlar la temperatura de las muestras se dispone de un sistema de refrigeración consistente en un serpentín metálico alimentado con agua fría, lo que permite mantener la temperatura de la muestra a con una diferencia máxima de ± 1 °C. Se trabajó a cuatro temperaturas 20, 30, 40 y 50°C. Para asegurar que el tanque está perfectamente agitado se utilizó un agitador magnético. La fuente de irradiación es una lámpara de mercurio de media presión Philips HPM-12 (Philips, Eindhoven, The Netherlands) de 400 W de potencia nominal que emite en el intervalo de 250 a 740 nm, con una potencia real de $3,88 \cdot 10^{-7}$ E·min⁻¹. En la Figura 1 se muestra el espectro de emisión de esta lámpara, en la que P_λ es la potencia de la misma para las diferentes longitudes de onda de emisión. La distancia entre la lámpara y la superficie de la disolución fue de 22,5 cm. Una vez encendida la lámpara, se esperan 10 minutos antes de introducir la muestra a irradiar en el interior de la cámara. Se tomaron muestras de las disoluciones irradiadas cada 10 minutos hasta un máximo de 120 minutos, colocando dichas muestras bajo refrigeración hasta su análisis. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis de la actividad enzimática. La actividad enzimática se definió como la medición de la formación de los grupos carboxilo durante la hidrólisis de la pectina a pH 7.7

y a 50°C (Falguera *et al.*, 2013b). Para ello, se midió el tiempo necesario en recuperar el pH tras la adición de una cantidad fija de NaOH.

El método consistió en mezclar 40 mL de disolución de pectina (Pectina B rapid set) al 1% (m/v) y NaCl 0.15 M con el volumen necesario de NaOH 0.05 M para alcanzar un pH de 7.7 y con 10 mL de la disolución que contiene la enzima, volviendo a ajustar el pH a 7.7. Posteriormente, se añadieron 100 µL de NaOH 0.05 M y se cronometra el tiempo que tarda la disolución en recuperar el valor de pH de 7.7.

Una unidad de PME se define como el número de µmoles de grupos carboxilo formados a 50°C por minuto. La actividad PME se definirá como el número de unidades PME por unidad de volumen.

$$Actividad\ PME\ (U/mL) = \frac{100\mu\text{mol} \cdot N \cdot \frac{1\text{L}}{10^6\mu\text{L}} \cdot \frac{0.05\text{moles}}{\text{L}} \cdot \frac{10^6\mu\text{mol}}{\text{mol}}}{10\text{mL} \cdot t(\text{min})} = \frac{0.5\ \mu\text{mol}}{t\ \text{mL} \cdot \text{min}}$$

$$Actividad\ relativa\ (\%) = \frac{Actividad\ tiempo\ t}{Actividad\ inicial} \cdot 100\%$$

Espectro de absorción. Para la obtención del espectro de absorción de las muestras de la disolución sintética de PME 0.2 U/mL y una concentración de melanoidinas de 0.05 mg/mL, se realizó un barrido de longitudes de onda entre 200 y 750 nm con un espectrofotómetro Helios Gamma (Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso.

pH. El pH de las muestras se midió con un pH-metro Crisol micropH (Crisol Instruments, S.A., Alella, España).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se muestra la evolución de la actividad enzimática relativa con el tiempo de irradiación a las diferentes temperaturas estudiadas. Los resultados experimentales se han ajustado a una cinética de primer orden, dándose en la Tabla 1 los valores de los parámetros del ajuste. Tanto el ajuste como los estimados de los parámetros han resultado significativos para un nivel de confianza del 95%.

Se puede observar que los valores de las constantes cinética aumentan con la temperatura. Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura sobre estas constantes, se supone que dicha variación se puede describir adecuadamente según una ecuación tipo Arrhenius, obteniéndose una energía de activación de 19,9 kJ/mol, con un coeficiente de determinación de 0.8875.

En la Tabla 2 se muestra la influencia de la presencia de melanoidinas en la constante cinética. Puede observarse el elevado efecto fotoprotector de la presencia de las melanoidinas, ya que una concentración de 0.05 mg/mL de melanoidinas provoca un descenso de aproximadamente un 80% en el valor de la constante cinética y que una mayor concentración de melanoidinas no provoca un descenso mayor.

En la Figura 3 se muestra la evolución del espectro de absorbancia de la disolución de PME con una concentración de 0.05 mg/mL de melanoidinas a 20°C. Se observa que la absorbancia se reduce con el tiempo de irradiación, especialmente entre 250 y 320 nm, lo que indica la capacidad de las melanoidinas para absorber la irradiación y descomponerse hacia otros fotoproductos.

CONCLUSIONES

El tratamiento fotoquímico con radiación UV puede inactivar parcialmente la PME en solución acuosa según una cinética de primer orden, aumentando este efecto con la temperatura según una ecuación de tipo Arrhenius.

También se ha observado que la presencia de melanoidinas ejerce un elevado efecto fotoprotector de esta inactivación.

BIBLIOGRAFÍA

Falguera, V.; Pagán, J. and Ibarz, A. (2011). Effect of UV radiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 115-119.

Falguera, V.; Moulin, A; Thevenet, L. and Ibarz, A. (2013a). Inactivation of peroxidasa by ultraviolet-visible irradiation: effect of pH and melonoidin content. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12): 3627-3633.

Falguera, V.; Garza, S.; Pagán, J.; Garvín, A. and Ibarz, A. (2013b) Effect of UV-Vis irradiation on enzymatic activities and physicochemical properties of four grape musts from different varieties. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (8): 2223-2229.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España por la ayuda recibida en el proyecto CTQ2011-26569.

Tabla 1.- Constantes cinéticas de primer orden para la evolución de la actividad enzimática a distintas temperaturas para una concentración inicial de PME de 0.2 U/mL.

t (°C)	$k \times 10^3$ (min^{-1})	R^2
20	$5,2 \pm 0,2$	0,9195
30	$8,6 \pm 0,3$	0,9126
40	$10,8 \pm 0,5$	0,8586
50	$11,3 \pm 0,6$	0,9625

Tabla 2.- Constantes cinéticas de primer orden en función de la concentración de melanoidinas a 20°C y una concentración inicial de PME de 0.2 U/mL.

C_{mel} (mg/mL)	$k \times 10^3$ (min^{-1})	R^2
0	$5,2 \pm 0,2$	0,9195
0.05	$1,3 \pm 0,2$	0,8356
0.1	$1,3 \pm 0,2$	0,8112
0.2	$1,2 \pm 0,2$	0,7785

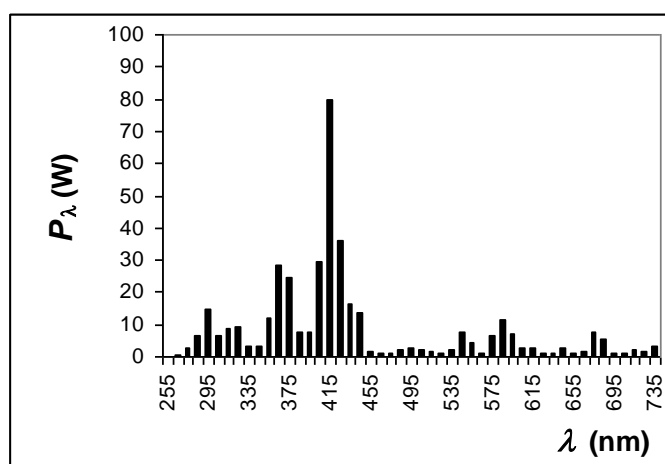


Figura 1. Espectro de emisión de la lámpara Philips HPM-12

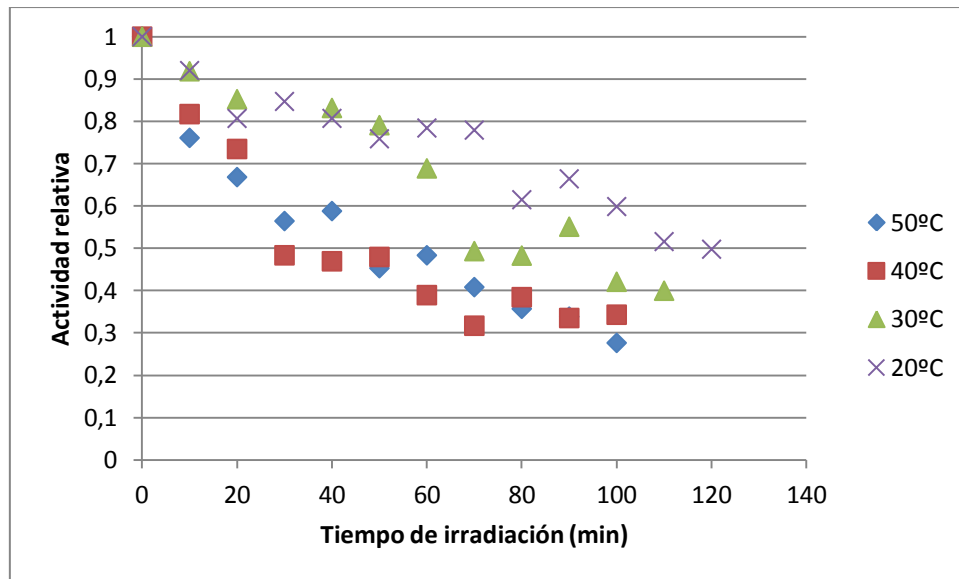


Figura 2. Evolución de la actividad enzimática relativa con el tiempo a distintas temperaturas para una disolución inicial de PME de 0.2 U/mL.

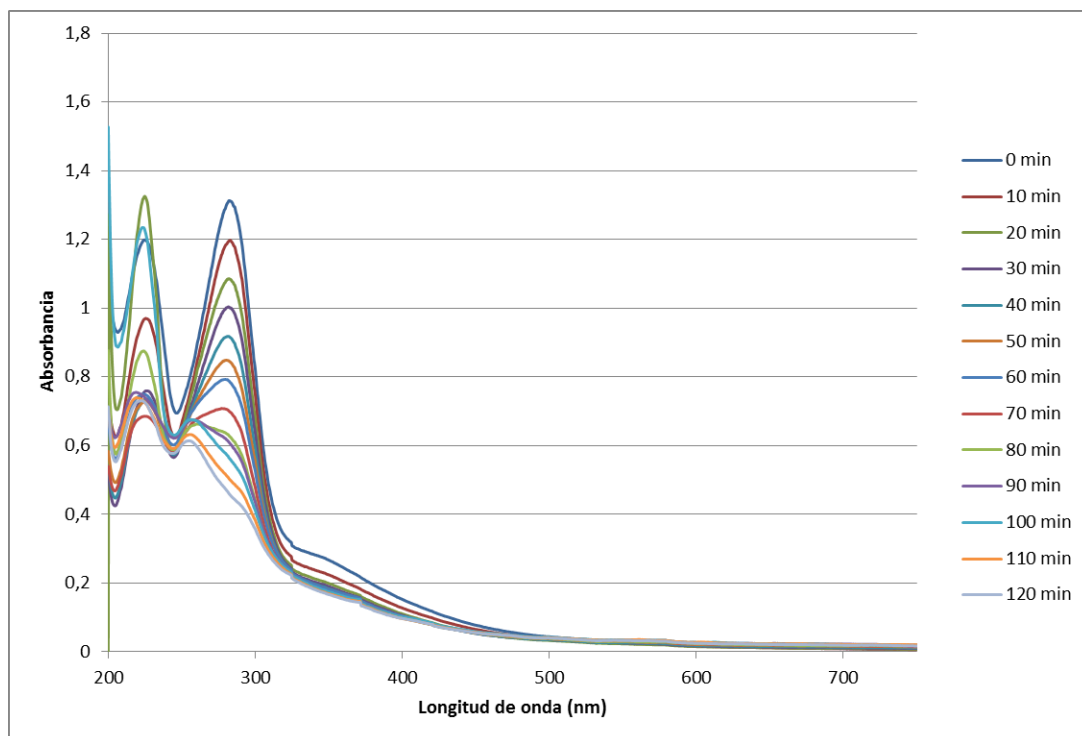


Figura 3. Evolución con el tiempo de irradiación del espectro de absorción de una disolución de 0.2 U/mL PME a 20°C y con una presencia inicial de melanoidinas de 0.05 mg/mL.

EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIOXIDANTE POR EL USO COMBINADO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y STEVIA REBAUDIANA

Criado, M.N.¹, Belda-Galbis, C.M.¹, Martínez, A.¹, Rodrigo, D¹

1) Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Avda. Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7. 46980. València. Spain. lolesra@iata.csic.es

INTRODUCCIÓN

La relación que existe entre la alimentación, la salud y el bienestar está marcando, en parte, la evolución de la industria alimentaria. Cada vez más, se da más importancia a la influencia de la composición de los alimentos en la nutrición humana y a las funciones que pueden desempeñar en la prevención de algunas enfermedades. Este hecho ha impulsado al sector agroalimentario a investigar la aplicación de tecnologías de procesado alternativas a la térmica tradicional que permitan conseguir alimentos estables, con características similares a las del alimento fresco, que sean seguros y saludables. El procesado por altas presiones hidrostáticas (HPP) prolonga la vida útil de los alimentos dado su potencial para inactivar microorganismos (Pina-Pérez et al., 2012) y enzimas (Terefe et al., 2013) minimizando las pérdidas de calidad, en términos de aroma, color y valor nutritivo producidas como consecuencia del procesado con técnicas térmicas convencionales (Rastogi et al., 2007). Sin embargo, esta tecnología por sí misma, es menos efectiva en cuanto a la inactivación microbiana y enzimática que las térmicas convencionales. Por ello, y dado que su eficacia puede mejorarse en presencia de ingredientes naturales (Sánchez-Moreno et al., 2004), el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las HPP en combinación con la adición de un ingrediente natural, *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Stevia*) con capacidad antioxidante (Criado et al, *In press*) y antimicrobiana (Belda et al., 2014), sobre la actividad peroxidasa (POD) y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* de un extracto enzimático de mango, naranja y papaya.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia prima. Papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*) y naranja (*Citrus sinensis*, cultivar Salustiana) fueron adquiridas con un grado óptimo de madurez en un supermercado local. Las hojas secas de *Stevia* fueron suministradas por la empresa ANAGALIDE S. A. (Barbastro, Huesca).

Infusión de Stevia. 100 mL de agua mineral hirviendo se vertieron sobre 8,33 g de hoja de *Stevia*. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min. Así se obtuvo una solución madre al $8,33 \pm 0,01\%$ (p/v) que se filtró a vacío empleando papel de filtro Whatman[®] N° 1, para garantizar la eliminación de impurezas.

Extracto enzimático. Se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Rodrigo et al., (1996), con algunas modificaciones. 100 g de pulpa de papaya, mango y naranja, en proporción 65:20:15% (p/p/p, respectivamente) se trituraron durante 5 min, tras añadirle a la mezcla 100 mL de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7) con NaCl (1 M) y polivinilpolipirrolidona (PVPP; 5% (p/v)). El homogeneizado se filtró a vacío y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min, a 4 °C, en una centrifuga Avanti J-25, Beckman Instruments Inc. (Fullerton, California, USA). El sobrenadante constituyó el extracto enzimático.

Preparación de las muestras. Diferentes volúmenes de la solución madre de *Stevia* (3 y 6 mL) se añadieron a 14 mL del extracto enzimático para obtener unas concentraciones finales de *Stevia* de 1,25 y 2,5% (p/v), respectivamente. La muestra sin *Stevia* contenía 14 mL de extracto enzimático y se completó con agua hasta un volumen final de 20 mL.

Medida de actividad POD. La actividad POD se determinó por espectrofotometría. Para ello 200 µL de extracto enzimático se añadieron a un tubo con 3,8 mL de tampón fosfato sódico (0,05 M, pH 7,0, con NaCl 1 M), que se agitó durante 5 min y se mantuvo a 25 °C durante 7 min. La reacción enzimática se inició cuando 2,39 mL de esta solución se colocaron en una cubeta de poliestireno de 4,5 mL y se mezclaron con 0,61 mL de una mezcla de reacción que consiste en guayacol (Sigma-Aldrich Co. LLC, EEUU), H₂O₂ (Sigma - Aldrich Co. LLC, EEUU) y agua bidestilada. La concentración en la cubeta fue 45 mM de H₂O₂ y 36 mM de guayacol. Los cambios en la absorbancia a 470 nm se registraron cada 1 s durante 2,5 min, utilizando el espectrofotómetro Lan Optics Modelo PG1800 (Labolan, España). Una unidad de actividad de POD se expresó como un incremento de absorbancia por min y mL de extracto enzimático. Se determinó la actividad inicial de la muestra sin tratar (A_0) e inmediatamente después de aplicar el tratamiento de HPP (A) y se calculó el porcentaje de actividad relativa (% RA) según la ecuación 1:

$$\% RA = 100 \cdot (A/A_0) \quad (1)$$

Microorganismo. A partir de un liófilo proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (*L. monocytogenes* CECT 4032) se obtuvo un stock de viales siguiendo el

método descrito por Saucedo-Reyes et al. (2009), siendo su concentración celular media de unas $7,6 \times 10^9$ ufc/mL.

Inactivación microbiana. La densidad celular de muestras tratadas, con y sin *Stevia*, en términos de \log_{10} (ufc/mL), antes y después de cada tratamientos se determinó por recuento de viables en placas con agar tripticasa de soja (TSA; Scharlau Chemie S. A., España), tras 48 h de incubación a 37 °C. La inactivación lograda con cada uno de los tratamientos a estudio se estableció en base a la diferencia existente entre los recuentos obtenidos de pre- y post-tratamiento. De cada muestra se tomaron dos alícuotas, se diluyeron con agua de peptona tamponada (Scharlau S.A., España) y se sembraron dos placas por alícuota.

Tratamiento por HPP. Para evaluar el efecto conjunto de la aplicación de las HPP en presencia de *Stevia* sobre la actividad POD y la inactivación microbiana los tratamientos por HPP se llevaron a cabo a temperatura ambiente (18-22 °C), a tres niveles de presión (300, 400 y 500 MPa), durante 5, 10 y 15 min y en presencia de diferentes concentraciones de *Stevia* (0, 1,25 y 2,50% (p/v)). Para ello se empleó un equipo piloto de 2,3 L de capacidad (EPSI NV, Temse, Bélgica), capaz de trabajar entre -15 y 90 °C, alcanzando una presión máxima de 689 MPa, siendo el fluido presurizante una mezcla de agua y etilenglicol (70:30% (v/v)).

Análisis estadístico. Las diferencias significativas entre los resultados obtenidos por aplicación de distintos tratamientos, en presencia de diferentes concentraciones de *Stevia* se establecieron mediante análisis de la varianza (ANOVA), considerándose significativas cuando $p < 0,05$. Para ello se empleó el software estadístico Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., VA, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en relación al efecto del tratamiento por HPP en presencia y ausencia de *Stevia* sobre la actividad POD y la inactivación microbiana en un extracto enzimático procedente de papaya, mango y naranja se muestran en la Tabla 1.

Con respecto a la POD, la actividad del extracto sin tratar en ausencia de *Stevia* fue de $2,07 \pm 0,69$ Δ Absorbancia/min mL de extracto. Este valor concuerda con los obtenidos por otros autores (Castro et al., 2006), aunque cabe destacar que el contenido de POD en frutas y verduras se ve afectado por la especie, la variedad y el grado de maduración.

En términos generales, la eficacia de un tratamiento por HPP depende del tipo de enzima, el pH, la composición del medio, la temperatura, el tiempo de tratamiento y el nivel de presión aplicado (Hendrick et al., 1998). Nuestros resultados demuestran que en ausencia

de *Stevia* la actividad POD residual se redujo a 27,5%, 22,3%, 20,0%, 16,1% y 15,7%, después del tratamiento a 300 MPa durante 5 y 15 min, 400 MPa durante 10 min y 500 MPa durante 5 y 15 min, respectivamente, con respecto al valor de la muestra sin tratar. De acuerdo con ello, para un mismo tiempo de tratamiento, a medida que aumenta la presión aplicada, el efecto inhibitorio de la tecnología sobre la enzima aumenta. Varios trabajos que se han centrado en el efecto de las HPP sobre la actividad POD en diversas frutas y verduras, muestran que esta enzima exhibe una amplia gama de estabilidad a la presión, siendo en algunos casos muy resistente a la misma. Estudios llevados a cabo por Quaglia et al. (1996) indican que es necesario un tratamiento de 900 MPa durante 10 min a temperatura ambiente para causar una reducción del 88% de la actividad de POD en guisantes.

Es por ello, que para aumentar la eficacia de las HPP en relación a su capacidad de inactivación enzimática, varias investigaciones han propuesto su uso combinado con la adición de inhibidores enzimáticos naturales. El análisis estadístico de los datos indica que las variables presión y concentración de *Stevia* tienen una influencia significativa sobre la actividad de POD ($p < 0,05$). Además, independientemente de la presión y el tiempo de tratamiento aplicado la adición de un 2,5% (p/v) de *Stevia* produce la inactivación completa de la enzima. Esto puede ser debido a que la adición del agente inhibidor (*Stevia*) puede alterar la estabilidad de la POD frente a la presión, por lo tanto, su combinación con las HPP permitiría la inactivación mediante tratamientos menos intensos. En vista de los resultados obtenidos, la adición de *Stevia* pone de manifiesto su carácter antioxidante atribuido a la misma por otros autores en base a su composición (Muanda et al., 2011).

Por otro lado, en vista de los resultados obtenidos (Tabla 1), en ausencia de *Stevia* y para presiones de 300 MPa, la inactivación microbiana fue mayor cuando aumentó el tiempo de tratamiento. Para presiones superiores a 300 MPa, sea cuál sea el tiempo de tratamiento, se consiguieron inactivaciones mayores a 5 ciclos logarítmicos, que es el estándar propuesto para cualquier estrategia de procesamiento destinada a garantizar la seguridad de zumos de frutas y productos similares (CFR, 2012). Además, la adición de un 2,5% (p/v) de *Stevia* aumentó la inactivación alcanzada con la combinación 300 MPa - 5 min, en casi 4 ciclos logarítmicos. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por otros autores (Tadhani y Subhash, 2006).

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que combinar HPP con la adición de *Stevia* permitiría la obtención de zumos estables, microbiológicamente seguros y nutricionalmente mejorados.

BIBLIOGRAFÍA

- Belda-Galbis, C. M., Pina-Pérez, M. C., Espinosa, J., Marco-Celdrán, A., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2014). Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. *Food Microbiology*, *38*(0), 56-61.
- Castro, J.A., Baquero, L.E., & Narváez, C.E. (2006). Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase from pitahaya amarilla fruits (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*, *35*(1), 91-101.
- CFR (2012). *Title 21: Food and drugs*. USA: FDA Retrieved from <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=120.24>.
- Criado, M. N., Barba, F. J., Frígola, A., & Rodrigo, D. (*In press*). Effect of *Stevia rebaudiana* on oxidative enzyme activity and its correlation with antioxidant capacity and bioactive compounds. *Food and Bioprocess Technology*. DOI: 10.1007/s11947-013-1208-3.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, *9*(5), 197-203.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(9), 1865-1872.
- Pina-Pérez, M. C., Silva-Angulo, A. B., Rodrigo, D., & López, A. M. (2012). A preliminary exposure assessment model for *Bacillus cereus* cells in a milk based beverage: Evaluating high pressure processing and antimicrobial interventions. *Food Control*, *26*(2), 610-613.
- Quaglia, G. B., Gravina, R., Paperi, R., & Paoletti, F. (1996). Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas. *LWT - Food Science and Technology*, *29*(5/6), 552-555.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(1), 69–112.
- Rodrigo, C., Rodrigo, M., Alvarruiz, A., & Frígola, A. (1996). Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *Journal of Food Protection*, *59*(10), 1065-1071.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2004). Effect of combined treatments of high-pressure and natural additives on carotenoid extractability and antioxidant activity of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *European Food Research and Technology*, *219*(2), 151-160.
- Saucedo-Reyes, D., Marco-Celdrán, A., Pina-Pérez, M. C., Rodrigo, D., & Martínez-López, A. (2009). Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *10*(2), 135-141.
- Tadhani, M. B., & Subhash, R. (2006). *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *5*(1), 557-560.
- Terefe, N. S., Kleintschek, T., Gamage, T., Fanning, K. J., Netzel, G., Versteeg, C., & Netzel, M. (2013). Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *19*, 57-65.

Tabla 1. Efecto combinado de la aplicación de AHP y el uso de *Stevia* sobre la actividad POD y la inactivación microbiana de un extracto enzimático procedente de papaya, mango y naranja.

Presión (MPa)	Tiempo (min)	<i>Stevia</i> (%, p/v)	POD (% RA)	$\log_{10} (N_f/N_0)$ $\log_{10}(\text{cfu/mL})$
300	5	0	27,46 ± 2,69	0,17 ± 0,01
		2,5	ND	3,96 ± 0,03
	10	1,25	23,05 ± 1,24	-
	15	0	22,29 ± 0,04	5,72 ± 0,02
		2,5	ND	>7 ⁺
	400	5	1,25	20,55 ± 1,30
0			19,95 ± 0,73	6,30 ± 0,08
10		1,25	18,52 ± 0,27	-
		2,5	ND	>7 ⁺
15		1,25	17,50 ± 0,01	-
		5	0	16,13 ± 0,59
500	5		2,5	ND
		10	1,25	12,10 ± 0,01
	15	0	15,66 ± 0,71	>7 ⁺
		2,5	ND	>7 ⁺

POD: Peroxidasa. %RA: % actividad relativa. ND: no detectado. N_f: Concentración celular final. N₀: Concentración celular inicial. -: No ensayado. ⁺N₀ = 7.84 ± 0.17 log₁₀(cfu/mL).

EVALUACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD Y EL COSTE DE LOS ALIMENTOS SIN GLUTEN

Salvo, C., Carbonell-Capella, J. M., Esteve M. J., Frígola, A.*

Área de Nutrición y Bromatología, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot. Spain
*ana.frigola@uv.es. Phone: +34 963544955, Fax: +34 963544954

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Celiaca (EC) es un proceso autoinmune debido a una intolerancia permanente al gluten, una proteína presente en cereales como el trigo, el centeno, la cebada y discutiblemente la avena. Es una enfermedad inflamatoria intestinal, secundaria a la ingestión de gluten, que ocurre en pacientes genéticamente predispuestos (HLA DQ2/DQ8).

El gluten es una proteína que se encuentra en la semilla de muchos cereales combinada con almidón. Representa el 80% de las proteínas del trigo y es el responsable de la elasticidad de la masa de harina, confiere la consistencia esponjosa de los panes y las masas horneadas y se usa en alimentación por su poder espesante (Chaves Araujo y col, 2010).

Fernández y col, (2010) estiman que la prevalencia de la enfermedad en la población española es del 1-3%; otros autores señalan una prevalencia de 1/100 a 1/200 en Europa y EE.UU (Malaut y Cellier, 2010).

El único tratamiento para la EC es la modificación de la dieta, eliminando el trigo, el centeno, la cebada y la avena, así como cualquier derivado de estos, como harinas, féculas, almidones, malta, espesantes, proteínas, sémola, etc... Para asegurar una dieta libre de gluten, el celíaco debe saber siempre los ingredientes de los alimentos que consume, y conocer la forma en la que se han preparado o cocinado. Catassi y col (2007) realizaron un estudio en el que concluyeron que mantener una dieta con contenido de gluten “cero” es casi imposible y que ingestión de pequeñas cantidades de gluten prolongado (50 mg/día) produjo daños importantes en el intestino delgado de un las personas con EC y con una dieta estricta.

El alto coste y la baja disponibilidad de los alimentos sin gluten (SG), ha sido citado en diferentes estudios como la causa del incumplimiento de la dieta en las persona celiacas (Hall y col, 2009), además el seguimiento de la misma durante toda la vida se hace monótona y ocasiona un problema sicosociológico (Trocone y col, 2008). El objetivo del presente estudio es evaluar los factores que dificultan a las personas celíacas el seguimiento de una dieta sin gluten como son la disponibilidad y el coste.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida de datos, se realizó en visitas a supermercados de compra de la ciudad de Valencia durante los meses de Marzo y Abril de 2012. Para ello, se registró la disponibilidad y el coste de los alimentos SG en la ciudad de Valencia, a través de diferentes comercios de alimentación; la información nutricional que figura en el etiquetado en relación al contenido de grasa y de azúcares y la información que figura en el etiquetado sobre el contenido de gluten, de gran interés para los celíacos, en los productos SG. (Reglamento (CE) 41/2009, sobre contenido en gluten y de obligado cumplimiento a partir del 1 de enero de 2012).

Se han seleccionado cinco establecimientos de diferente categoría:

- A: Supermercados de compra habitual y diaria en la ciudad y bajo precio
- B: Hipermercados de centro comercial próximo a la ciudad. Precio competitivo
- C: Hipermercados de centro comercial próximo a la ciudad. Precio competitivo
- D: Hipermercados en la ciudad. Precio alto
- E: Tienda de dietética en la ciudad

La selección de alimentos se realizó en base a los que la Dieta Mediterránea recomienda de consumo diario y varias raciones diarias a base de cereales. Tomando como referencia los alimentos que figuran en La Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE): “Resultados sobre datos de consumo de alimentos 2009-2010, a base de cereales”, y publicada en 2011 (www.aesan.msps.es). Se seleccionaron siete grupos de alimentos cuyo componente esencial es especialmente trigo: pan, cereales de desayuno, bollería, pasta, pasta precocinada, pizzas y harinas (Cuadro 1). Estos grupos se subdividieron en una serie de veinte alimentos, siguiendo la nomenclatura de los alimentos que figuran en dicha encuesta, pan blanco, pan de molde blanco, pan tostado, cereales, cereales chocolate, galleta tipo maría, galleta con chocolate, magdalenas, bizcocho, croissant, espagueti, fideos, macarrones, canelones, lasaña, pizza jamón queso, pizza quesos, base de pizza, harina panificable, harina de maíz.

Se visitaron los cinco establecimientos seleccionados y de cada producto se registró la disponibilidad, y el número de marcas que ofrece cada establecimiento, tanto normales como SG.

Se anotaron los datos sobre el precio de cada uno de los productos. De cada producto se registró el peso del envase en gramos, su precio en euros y se transforma en euros por Kg, la información nutricional que figura en el etiquetado y el contenido en gluten. El tamaño de la muestra fue de 20 alimentos. De cada uno de ellos se registró una marca sin gluten y dos marcas normales, la más barata y la más cara en cada establecimiento para realizar la

media, es decir se tomaron datos de 60 alimentos de distintos fabricantes en cinco establecimientos, aunque en alguno de ellos, no todos los productos SG están disponibles. Se comprobó que todos los alimentos SG incluidos en el estudio figuran en el “Lista Oficial FACE 2012” (Alimentos aptos para Celíacos según la Federación de Asociaciones de Celíacos de España), para confirmar que se tratan de productos sin gluten.

RESULTADOS

En ninguno de los establecimientos se encontró los 20 SG alimentos seleccionados, siendo la disponibilidad media en los cinco establecimientos de 76 %, (15,2/20) alimentos SG por comercio. En el A, encontramos menor disponibilidad el 65% (13/20) y en D el 95% (19/20). En todos los puntos de venta la variedad de marcas es superior para productos normales que los SG (Fig. 1). Destaca la baja disponibilidad en el establecimiento C, el 7,34 % de productos SG, respecto a los normales (Fig. 2).

Todos los alimentos SG son más caros que sus homólogos normales, siendo la mayor diferencia de precio el pan de barra ,210% más caro, seguido de croissant, 195,43% y del pan tostado, 186,25% (Fig. 3). El coste de los alimentos SG es de $10,92 \pm 4,65$ €/Kg (2,095 €, por persona y día) y la media de los normales $5,98 \pm 2,64$ €/Kg (0,907 €, por persona y día). Esto supone un incremento de 415,62 € al año de coste de los alimentos para las personas celíacas.

Si analizamos la diferencia en porcentaje (Fig.4)., vemos que los productos SG son un 82,60 % más caros, siendo el alimento más caro el pan SG, un 163%, seguidos de la bollería, pasta y pasta precocida con el 100%. La pizza y las harinas son los más económicos (35 % y 16%).

En general, todos los precios de los alimentos normales de nuestro estudio, eran más caros en el establecimiento E. Se realizó la evaluación eliminando los datos del establecimiento E, tanto de los productos SG como los normales, y se observó como el precio de los alimentos SG varia en unos céntimos al día, de 2,095 €/día a 2,038 €/día, pero los datos del precio de los alimentos normales han variado de 0,907 €/día a 0,620 €/día, lo que aumenta la diferencia de coste en 517,57 €/ año de los alimentos para las personas celíacas.

Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios. En EE.UU, Lee y col, (2007) estudiaron la disponibilidad y el coste de una cesta de compra compuesta por 11 alimentos SG, encontrando que el precio de los alimentos SG era un 240% más caro que los normales y varían con el lugar de compra, un 123% más caros en tiendas de dietética que en

el resto de comercios. Un estudio realizado en Canadá encontró que los alimentos SG eran un 180% más caros que sus homólogos (Stevens y Rashid, 2008). En Reino Unido se llevó a cabo un trabajo en el que se estudiaba el precio y la disponibilidad de 20 alimentos (Singh y Whelan, 2011) y solo el 41% de los productos SG se encontraban en todas las tiendas y en los supermercados más económicos solo se encontraron un 9% de los alimentos SG. El precio de todos los alimentos SG fue más caro, el pan en un 360% y otros alimentos entre el 76% para tartas y el 518% para galletas.

El etiquetado de los alimentos sin gluten no ha evidenciado que tengan más contenido en grasas y azúcares y la información sobre el contenido en gluten es inexistente. El contenido en gluten en los alimentos SG no figuraba en el etiquetado de ninguno de los productos estudiados.

CONCLUSIONES

El trabajo realizado muestra que la disponibilidad de los alimentos SG es limitada en los establecimientos más baratos y de compra diaria, mientras que aumenta en los establecimientos más caros donde tienen una sección dedicada a productos de dietética y en las tiendas especializadas en dietética. Por otra parte, para seguir una dieta adecuada, con consumo de cereales varias veces todos los días, las personas celíacas deben incrementar su presupuesto entre 415,62 y 517,57 € al año.

AGRADECIMIENTOS

Carbonell-Capella J.M. disfruta de una beca FPU del Ministerio de Educación (AP2010-2546).

BIBLIOGRAFÍA

AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Evaluación de riesgos. ENIDE: Encuesta Nacional de Ingesta Dietética. http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/evaluacion_riesgos/subseccion/enide.shtml. (03-03-2012). . Reglamento 41/2009 sobre composición y etiquetado de productos para personas con intolerancia al gluten http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/reglamento_41_2009.shtml. (10-12-2011).

Chaves Araujo, H. M., Coelho Araujo, W. M., Assuncao Botelho, R. B., & Zandonadi, R. P. (2010). Celiac disease, eating habits and practices and life quality of life. *Revista De Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition*, 23(3), 467-474.

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., et al. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for

patients with celiac disease RID G-2812-2011. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160-166.

FACE. Federación de Asociaciones de celíacos de España. Disponible en: <http://www.celiacos.org/>.12-12-2011

Fernández A, González L, de la Fuente J,(2010). *Enfermedad Celiaca: formas de presentación en el adulto. Revista española de Enfermedades Digestivas* 100 (8), 466-471

Hall, N. J., Rubin, G., & Charnock, A. (2009). Systematic review: Adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30(4), 315-330.

Lee, A. R., Ng, D. L., Zivin, J., & Green, P. H. R. (2007). Economic burden of a gluten-free diet. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 20(5), 423-430.

Malamut, G., & Cellier, C. (2010). Celiac disease. *Revue De Medecine Interne*, 31(6), 428-433

Singh, J., & Whelan, K. (2011). Limited availability and higher cost of gluten-free foods. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 24(5), 479-486.

Stevens, L., & Rashid, M. (2008). Gluten-free and regular foods: A cost comparison. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 69(3), 151-154.

Troncone, R., Ivarsson, A., Szajewska, H., Mearin, M. L., & Memb Europ Multi Platform CD CDEUS. (2008). Future research on coeliac disease - a position report from the european multistakeholder platform on coeliac disease (CDEUSSA). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(11), 1030-1043.

Cuadro 1. Consumo Alimentos en España 2011 (g/persona/día) (www.aesan.msps.es)

GRUPO DE ALIMENTOS	MEDIA	SD
PAN	100,81	69,01
CEREALES DESAYUNO	5,53	13,73
BOLLERIA	33,08	40,16
PASTA	18,76	29,36
PASTA PRECOCINADA	1,08	8,68
PIZZA	3,41	20,99
HARINAS	6,91	17,81

SD: desviación estándar

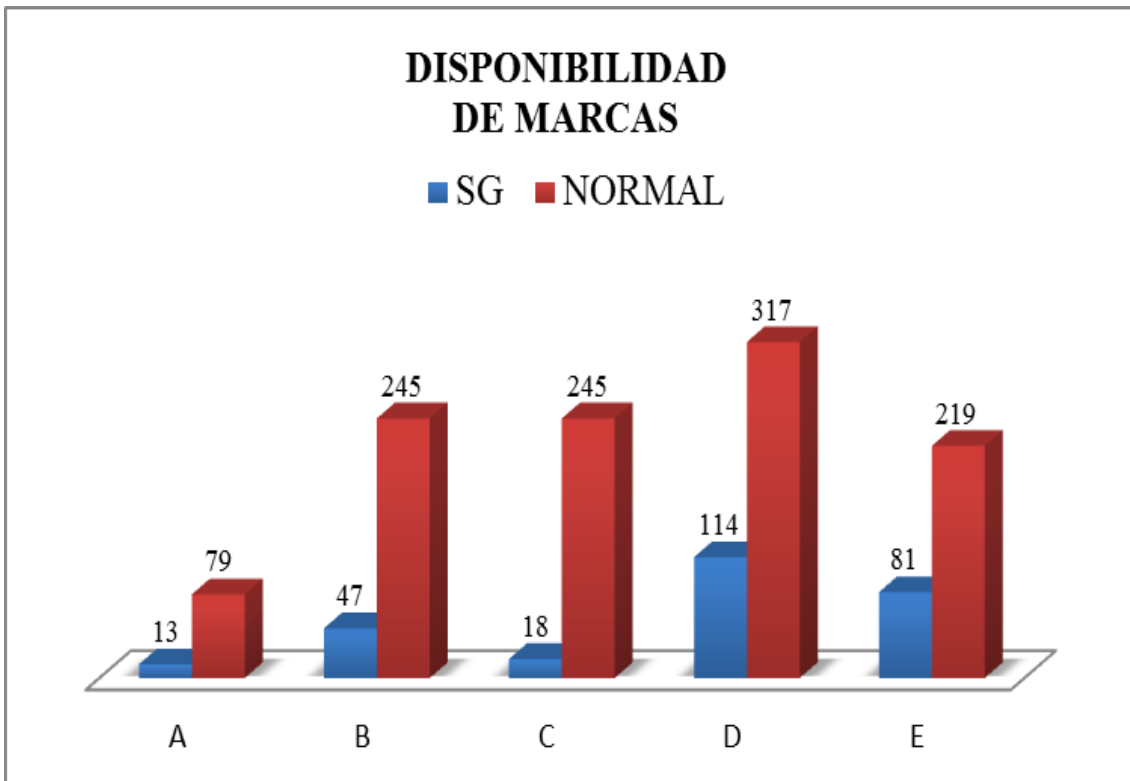


Figura 1. Disponibilidad de alimentos SG y normales por establecimiento

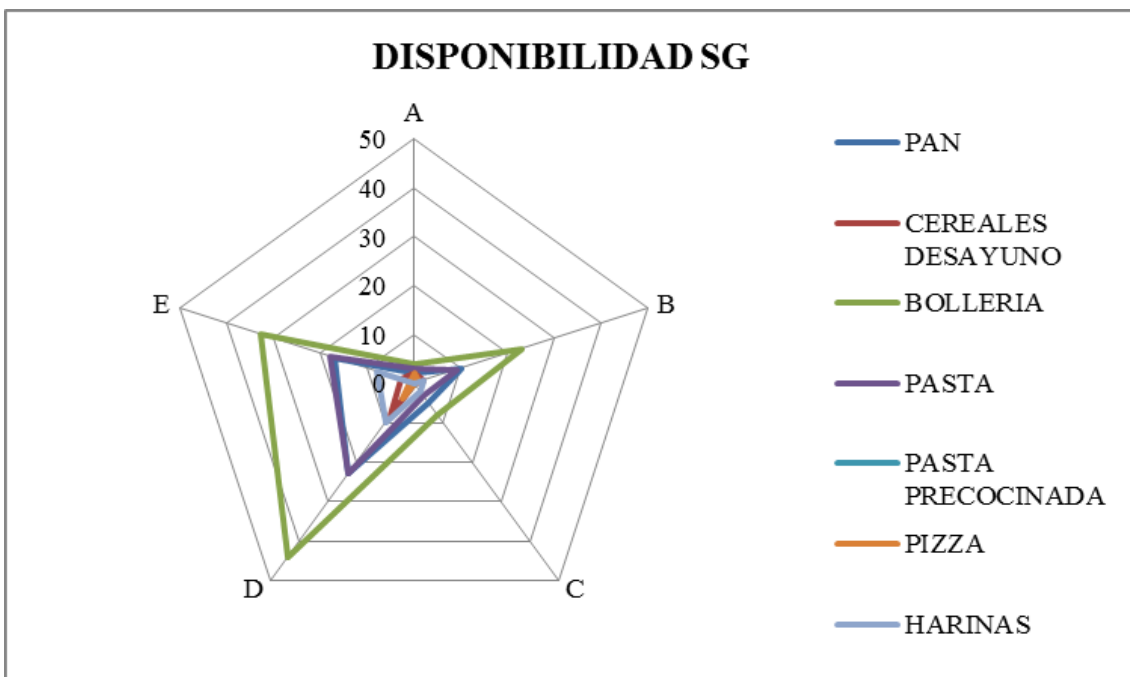


Figura 2. Disponibilidad SG por grupos de alimentos y establecimiento

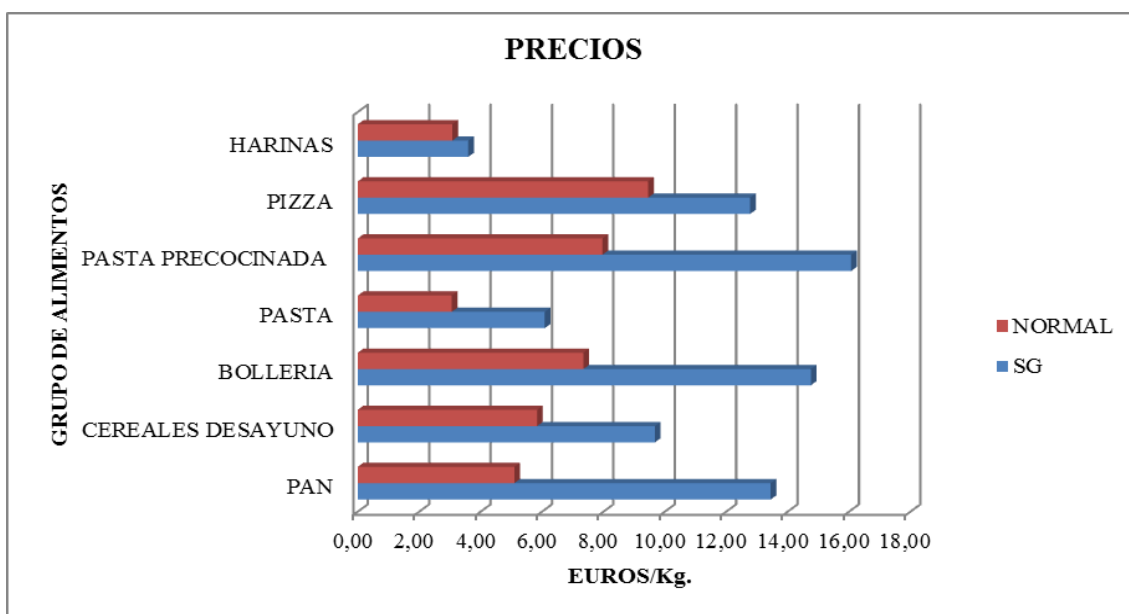


Figura3. Precio SG y normales en euro/Kg.



Figura 4. Diferencia precio entre SG y Normal en %

COMPUESTOS FENÓLICOS EN DIFERENTES PRODUCTOS DERIVADOS DE *STEVIA REBAUDIANA*

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Esteve M. J., Frígola, A*

Área de Nutrición y Bromatología, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot. Spain

*ana.frigola@uv.es. Phone: +34 963544955, Fax: +34 963544954

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un interés creciente acerca del uso de un edulcorante acalórico natural que se obtiene de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. La comercialización de este edulcorante fue aprobada por la FDA en el año 2008 y en noviembre del 2011, la Comisión Europea (UE) aprobó su uso como nuevo aditivo alimentario (E 960) (EFSA, 2010). Desde entonces, la industria alimentaria está desarrollando una serie de nuevos productos a base de extractos de plantas de stevia con el objetivo de satisfacer la demanda de los consumidores, cada vez más preocupados por una alimentación saludable. Los productos incluyen desde extractos crudos de stevia a rebaudiósido A, que es un ingrediente altamente purificado que contiene el componente con mejor sabor de la hoja de stevia. Recientemente se ha demostrado que los extractos de las hojas de stevia, utilizados como aditivos edulcorantes en bebidas a base de vegetales y otros alimentos presentan una alta capacidad antioxidante. Sin embargo, los estudios sobre los compuestos bioactivos presentes en los productos derivados de stevia son todavía escasos. En el presente trabajo se estudian los fenoles solubles totales así como el perfil fenólico de distintas muestras de stevia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

La investigación se llevó a cabo en siete productos derivados de *Stevia rebaudiana*: extracto acuoso de stevia 1 (EAS1), a partir de hojas suministradas por la empresa ANAGALIDE, SA (Huesca, España) y preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante; extracto acuoso de stevia 2 (EAS2), preparado a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* compradas en un supermercado local (Navarro, Valencia), siguiendo las instrucciones del fabricante; extracto crudo de stevia (Glycostevia-EP[®]), resultado de la extracción acuosa de hojas de stevia, al 1% p/v; extracto de stevia purificado (Glycostevia-R60[®]), extracto purificado con 95% de rebaudiósido A en 1% p/v y distintas muestras comercializadas en diferentes países, que incluyen Truvia (Azucarera, Madrid, España),

PureVia (Whole Sweetener Company Earth, París, Francia) y Stevia Raw (Cumberland Packing corp., Brooklyn, EE.UU.) Cada muestra (1 g) se mezcló con 100 ml de agua destilada.

Métodos

Los fenoles solubles totales se determinaron siguiendo el método descrito por George y col. (2005) y posteriormente empleando el método de Folin-Ciocalteu (Barba y col., 2013). La lectura de las muestras se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/Vis a 750 nm. Los resultados se expresan como g equivalentes de ácido gálico (g EAG)/100 g.

El perfil fenólico se determinó utilizando cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de acuerdo con el método propuesto por Kelebek y col. (2009). Se empleó una precolumna PFP(2) Luna y una columna Luna 100 PFP(2) (5 μ m, 150 x 4,6 mm) (Phenomenex, España), utilizando el operador Varian STAR Chromatography Workstation Ver. 6.0 (Varian Inc, California, USA). Previamente las muestras se filtraron en cartuchos Sep-pak[®] (cartuchos C18 de fase reversa; Millipore MA, USA) que retienen los compuestos fenólicos. La identificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo usando patrones y comparando los tiempos de retención, mientras que la cuantificación se realizó mediante calibración externa con patrones. Se añadió una cantidad conocida de cada patrón fenólico a cada una de las muestras para confirmar la identificación de los compuestos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos son componentes beneficiosos que se encuentran principalmente en productos alimenticios de plantas. La Figura 1 presenta el contenido total de compuestos fenólicos en las distintas muestras de stevia. Un método común para cuantificar el contenido fenólico se basa en la reacción de los fenoles con el reactivo colorimétrico Folin-Ciocalteu. Sin embargo, varios autores han informado acerca de la existencia de interferencias por la presencia de otras sustancias reductoras (ácido ascórbico, glucosa, fructosa, sulfitos...), que pueden estar natural o artificialmente presentes en zumos, frutas y verduras. Con el fin de eliminar dichas interferencias, se empleó el método de George y col. (2005) con ciertas modificaciones. La muestra de Glycostevia-EP[®] presentó el valor más alto de compuestos fenólicos totales (20,8 g EAG/100g), mientras que no se detectaron compuestos fenólicos en los extractos purificados de stevia (Glycostevia-R60[®], PureVia, Truvia y Stevia Raw), que únicamente contienen glucósidos de esteviol (>95%). Los diferentes extractos acuosos de stevia presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en

el contenido de compuestos fenólicos totales, dada la diferente variedad de las hojas de stevia (12,6 y 10,5 g EAG/100g para EAS1 y EAS2, respectivamente). Estos valores se encuentran dentro del rango de los encontrados por otros autores (Muanda y col., 2011; Tadhani y col., 2007; Kaushik y col., 2010) en diferentes productos derivados de stevia (2-24 g ácido gálico/100 g).

Con el fin de realizar un estudio más profundo de los compuestos fenólicos, se realizó un análisis CLAR de los compuestos fenólicos. En la Figura 2 se muestra el cromatograma del extracto acuoso de stevia 1. Se identificaron y cuantificaron un total de 11 compuestos fenólicos en los productos derivados de stevia, incluyendo ácidos hidroxibenzoico (2), ácidos hidroxicinámicos (5), flavonas (1), flavonoles (2) y compuestos de flavanoles (1). El perfil fenólico se obtuvo exclusivamente de los extractos acuosos de stevia y de Glycostevia-EP[®]. Los glucósidos de esteviol purificados no contenían ningún compuesto fenólico. Los resultados muestran un perfil fenólico similar al encontrado por diferentes autores en productos derivados de stevia (Kim y col., 2011; Muanda y col., 2011). Cada muestra presentó un perfil fenólico diferente. Como se muestra en la Tabla 1, la quercetina y la rutina fueron los compuestos fenólicos predominantes en los productos derivados de stevia, seguidos por la apigenina, catequina y el ácido clorogénico. Además, el principal ácido hidroxibenzoico fue el ácido gálico (3,4-ácido-5-trihidroxibenzoico). El ácido gálico es un compuesto fenólico natural abundante presente en alimentos de origen vegetal que ha desencadenado un considerable interés debido a sus propiedades antioxidantes (Muanda y col., 2011).

A excepción del ácido protocatecuico y el ácido transcinámico, se encontró una correlación significativa entre cada compuesto fenólico y el contenido total de fenoles medidos usando el método de Folin-Ciocalteu. El Sumatorio de fenoles más alto se halló en la muestra de Glycostevia-EP[®], en comparación con los extractos acuosos de stevia. Además, se encontró una correlación significativa entre la suma de los once compuestos fenólicos identificados y los compuestos fenólicos totales medidos con el método de Folin-Ciocalteu ($r^2 = 0,998$).

En base de los resultados de estos ensayos se puede observar que el extracto acuoso de stevia 1 presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos totales que el extracto acuoso de stevia 2. De hecho, la suma de todos los compuestos fenólicos detectados por CLAR en el extracto acuoso de stevia 1 es casi dos veces superior a la suma analizada en el extracto acuoso de stevia 2.

CONCLUSIONES

Junto con los diterpenos de sabor dulce, los extractos acuosos de stevia pueden considerarse una buena fuente de compuestos fenólicos. Dichas sustancias desempeñan importantes funciones en la prevención del desarrollo de enfermedades oxidativas y crónicas. Es por ello que los extractos acuosos de stevia se pueden utilizar como ingredientes nutraceuticos en productos alimenticios con el fin de proporcionar nuevos alimentos funcionales de elevada calidad nutricional. Sin embargo, no todas las categorías de productos de stevia poseen en su composición compuestos fenólicos. Debido a esta variación y a la inconsistencia en su composición, los estudios de extractos de stevia son difíciles de interpretar en cuanto a su repercusión en la salud, por lo que son necesarios estudios definidos que determinen su uso óptimo en matrices alimentarias.

BIBLIOGRAFÍA

- Barba, F.J., Esteve, M.J., Tedeschi, P., Brandolini, V., Frigola, A. (2013). A comparative study of the analysis of antioxidant activities of liquid foods employing spectrophotometric, fluorometric, and chemiluminescent methods. *Food Analytical Methods*, 6, 317-327.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*, 8(4), 1537.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1370-1373.
- Kaushik, R., Pradeep, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010). Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 27-33.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91, 187-192.
- Kim, I.S., Yang, M., Lee, O.H., Kang, S.N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1328-1332.
- Muanda, N.F., Soulimani, R., Diop, B., Dicko. (2011). A Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1865-1872.
- Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 323-329.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (con fondos FEDER) (AGL2010-22206-C02-01). Carbonell Cappela J.M. disfruta de una beca FPU del Ministerio de Educación (AP2010-2546). Buniowska, M. tiene una beca del proyecto RSI para la región de Podkarpacie, Polonia (8.2.2/IV.26/217/11/U/155/12).

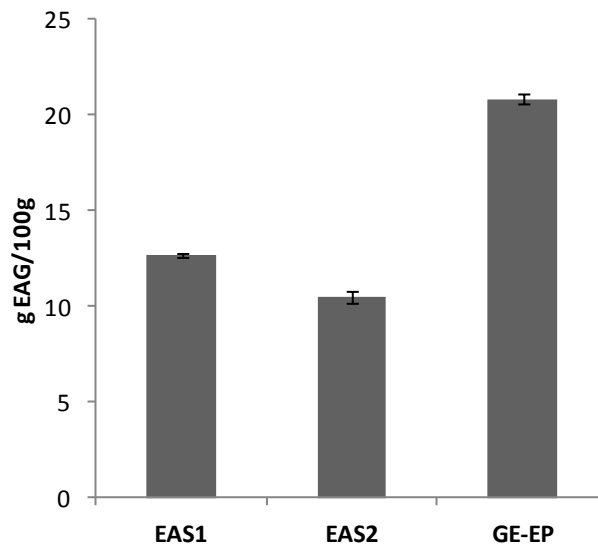
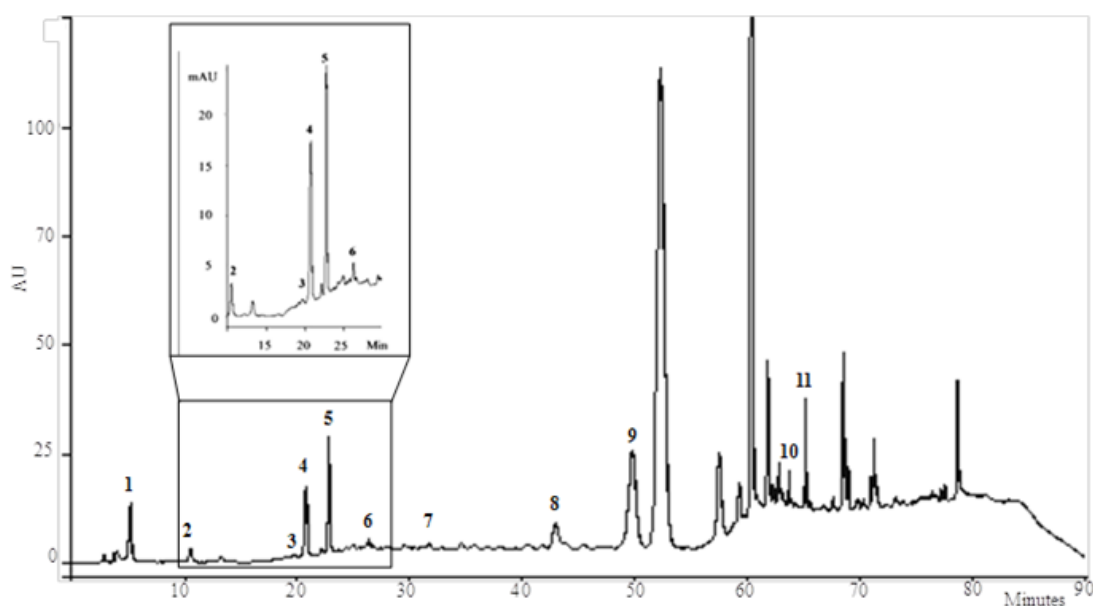


Figura 1. Compuestos fenólicos totales (g AGE/100 g) en los extractos acuosos de stevia y en la muestra de Glycostevia-EP®.

Tabla 1. Concentración de los compuestos fenólicos (mg/100 g) en las muestras de stevia.

Compuesto	T _r (min)	EAS1	EAS2	GE-EP
Ácido gálico	5.3	1.8±0.1	15.7±1.1	49.5±7.1
Ácido protocatecuico	7.9	8.6±0.3	3.7±0.2	-
Catequina	19.3	494.2±23.3	905.0±45.2	13.4±0.3
Ácido cafeico	21.2	76.9±1.0	118.5±3.3	250.2±6.2
Ácido clorogénico	23.2	343.4±32.0	293.1±6.3	668.4±65.3
Ácido cumárico	26.3	50.8±4.4	37.0±0.6	212.1±9.6
Ácido ferúlico	34.1	141.6±1.3	10.4±0.2	270.4±34.2
Ácido transcinámico	44.5	14.4±0.1	403.6±5.4	101.1±17.3
Rutina	50.2	2797.1±28.9	401.0±4.4	10972.4±504.8
Quercetina	64.0	3619.4±80.0	3342.5±9.4	3077.7±25.2
Apigenina	67.2	1186.6±43.1	933.9±31.0	1383.3±28.1
Sumatorio polifenoles		8734.8±121.0	6464.3±32.1	16998.4±637.0


Figura 1. Cromatograma del análisis CLAR del extracto acuoso de stevia 1 mostrando los compuestos fenólicos 1: Ácido gálico, 2: Ácido protocatecuico, 3: Catequina, 4: Ácido cafeico, 5: Ácido clorogénico, 6: Ácido cumárico, 7: Ácido ferúlico, 8: Ácido transcinámico, 9: Rutina, 10: Quercetina, 11: Apigenina.

RESGATE DA DIETA MEDITERÂNEA EM RESTAURANTES

Lessa, K., Carbonell-Capella, J. M., Esteve M. J., Frígola, A.*

Área de Nutrición y Bromatología, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot. Spain

*ana.frigola@uv.es. Phone: +34 963544955, Fax: +34 963544954

1.INTRODUÇÃO

Tanto a cozinha espanhola quanto a tradicional dieta do mediterrâneo recebe muita atenção por oferecer uma dieta saudável, juntamente com o fornecimento de proteção ao corpo contra doenças e enfermidades. Existe uma série de estudos de intervenção pela dieta do mediterrâneo demonstrando melhorias na função endotelial celular, inflamação e resistência à insulina (Esposito et al, 2004) enfermidades cardiovasculares (Berdard et al, 2010), e artrite reumatóide (Sköldstam et al, 2003). Uma recente análise demonstrou que a adesão estrita à dieta mediterrânea reduz o risco de morte por câncer e doenças cardiovasculares, bem como o risco de desenvolver o mal de Parkinson e doença de Alzheimer (Sofi et al, 2008). No entanto, como cozinha espanhola e a tradicional dieta mediterrânea estão integradas na sociedade ocidental e influenciadas por outras culturas e hábitos alimentares, assim iniciando um processo de "ocidentalização" onde cada vez mais os padrões dietéticos se assemelham especialmente aos não mediterrâneos grupos de alimentos (Karamanos et al, 2002). Este processo também se estende a novos estilos de vida, tais como o aumento da participação da mulher no mercado de trabalho, aumento da jornada de trabalho, e escassez subsequente de tempo, pode dissuadir as pessoas de cozinhar e pode ter contribuído para o aumento do consumo de alimentos fora de casa (Mancino et al, 2007) a mudança de certos hábitos alimentares e padrões dietéticos começou no século XIX com a industrialização, quando a ingestão alimentar era 2096 kcal e hoje chega a 3.421 kcal (Segura e Segura, 2007).

Comer fora ganhou importância na dieta dos europeus (Orfanos et al, 2009). Um estudo espanhol concluiu que a alta frequência de comer fora de casa tem sido associada com um aumento de peso corporal subsequente, e com um aumento no risco de excesso de peso/obesidade (Bes-Rastrollo et al, 2009). Ao longo dos últimos 30 anos, os alimentos preparados fora de casa tornaram uma parte regular da maioria das dietas de americanos, e aqueles que acompanham as tendências de alimentos espera que isso continue (Balzer, 2012). Os alimentos preparados fora de casa foram responsáveis por 41% dos gastos com alimentos em 2008 (USDA/ERS, 2012), e contribuiu com 32% da ingestão calórica (Biing-hwan e

Gurthrie, 2012). Infelizmente, em comparação com os alimentos consumidos em casa com os alimentos consumidos fora de casa estes normalmente apresentam alta quantidade de energia e são ricas em gordura total e saturada (Smith et al, 2009), proteínas e açúcar, e mais baixos em vitaminas, carboidratos e teor de fibra, e estão positivamente associado com ganho de peso (Bes – Rastrollo et al, 2009) em adultos e crianças (Todd et al, 2010; Mancino et al, 2010).

O local físico onde as pessoas compram/ou comer sua comida parece um bom lugar para tentar mudar as escolhas alimentares (Glanz e Yaroch, 2004). A melhorada qualidade nutricional de alimentos fora de casa, não é só ter opções de alimentos saudáveis disponíveis, mas os consumidores devem responder a essas opções.

Desde que a UNESCO incluiu as "artes culinárias" em sua definição de patrimônio imaterial, em 1989, comida caracterizada como "produtos e pratos tradicionais" são patrimônio ativo (Álvarez e Sanmartino, 2009). Dentro deste a experiência cultural é um fator primordial em curso. No entanto, a comida é mais do que comer. Alimentos relacionam-se com questões de identidade, cultura, produção, consumo sustentabilidade.

Como gastronomia e nutricionistas estão intensamente relacionados às interações sociais, é extremamente interessante analisar as suas implicações em uma das maiores preocupações atuais da sociedade: o excesso de peso/obesidade. Tendo em mente que os resultados aqui apresentados são discutidos em termos do regaste da tradicional Dieta Mediterrânea em dois diferentes menus de um restaurante da cidade de Valencia-ESP.

2.METODOLOGIA

2.1 Menu designe

A equipe de cozinha do restaurante selecionado foi responsável pela elaboração dos pratos, e a nutricionista foi responsável pela análise da composição nutricional. Quando necessário foram alterados determinados ingredientes, métodos de preparação e tamanhos das porções. Essas modificações não alteram a essência da refeição, e são realizadas com o intuito que os consumidores percebam as mudanças.

A seleção das receitas finais e dos menus são baseadas nas exigências dos consumidores, preferências sensoriais e de acordo com os preceitos da tradicional dieta mediterrânea. A apresentação final de um prato é mostrada nas figuras abaixo, por exemplo: Salada de atum, Paella Valenciana e carpaccio de kiwi mostrados nas figuras 1, 2 e 3.

2.2 .Avaliações Dietética

A parti das receitas disponíveis pelo restaurante se procedeu a estilização por avaliação qualitativa, com vista a cumprir as atuais exigências nutricionais e que estejam de acordo com a decisão da UNESCO de 16 novembro de 2010, que aprovou o registro da Dieta Mediterrânica na lista do Patrimônio Cultural Imaterial da humanidade.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comparação com dieta mediterrânica

Em 6 meses de investigação, dois menus foram analisados para a composição nutricional: 9 entradas, 6 pratos principais e 4 sobremesas, em total de 19 pratos diferentes e 77 combinações de pratos. (tabela 1 e 2). 80 % dos ingredientes utilizados foram adquiridos de produtores locais ou no mercado local (limões, maçãs, uvas, abacaxis, laranjas, tangerinas, kiwi, morangos, peras, cenouras, abóboras, pimentões, cebolas, tomates, carne, peixe, frango, ovos, cominho, pimenta, alface, cebolinha). Produtos locais ou regionais são vistos como atrativos aos consumidores. Em estudo do Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 50,8% relatam que os espanhóis estão dispostos a pagar mais por alimentos naturais (sem aditivos) (MAPA 2012). Além disso, as recentes preocupações sobre a qualidade e a segurança dos alimentos têm estimulado a demanda de cultivo local e de produção orgânica. Isso é refletido pelo número de restaurantes que servem pratos gourmet base de tais produtos (Devauxet al, 2009). Isso permite a possibilidade de adicionar novas ideias e conceitos de dieta e ajudar a economia local.

No estudo dos menus 45,5% das entradas são saladas (salada de Ventresca, salada da Horta, salada mix , salada de salmão , salada tabule), 28% são de legumes ou vegetais frescos (escalibada de verduras emulsão de bacalhau , escalibada emulsão de anchovas , pimentões recheados de pato). Os pratos principais são uma variedade de arroz e fideua (arroz abanda, paella valenciana, arroz preto, fideua de pato, arroz meloso de coelho, paella de costela de porco). O método de preparação teve em conta a tradicional dieta mediterrânea, sendo os ingredientes misturados em conjunto no processo de cozimento, fundindo os ingredientes, o que facilita a mistura de sabores e texturas (terramed, 2012).

Como isso as guarnições não são só utilizadas como complementos gastronômicos, elas também são utilizadas para equilibrar o menu, como o primeiro prato é a base de hortaliças e verduras a guarnição adequada são alimentos ricos em carboidratos como os arrozes e o fideua. Por fim a garantia de uma variedade de frutas frescas (inteira, manipulada

ou com o natural) garante um adequado equilíbrio nutricional ao menu. Em uma das duas opções ofertadas no menu.

Os benefícios da dieta mediterrânea para a saúde têm sido destacados em vários estudos sobre os efeitos de seus vários componentes. O Aceite desempenha um papel importante como fonte primária de ingestão de gordura. A dieta mediterrânea é rica em ácidos graxos monoinsaturados (AGM), ácido oléico, especificamente, e pobre em ácidos graxos saturados. Estudos afirmam que a dieta cis-MUFA tem uma maior defesa antiaterosclerótica por afetar os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) sobre os fatores de risco cardiovascular (Huang e Sumpio, 2008). O restaurante, que participara neste estudo garante só utilizar azeite de oliva em seus pratos.

O sal tem uma das recomendações mais restritivas para cozinhar. É uma ingredientes fundamentais, devido à sua implicação em doenças cardiovasculares e renais, mas também devido às suas propriedades sensoriais. É fácil chegar ao Reference Intake 6g (RI) de sal publicado pela EFSA . O primeiro passo foi acordar com o chef a adição de 4g de sal para os pratos principais, porque também se deve levar em conta que o sal não é a única fonte de sódio nos pratos.

No entanto quantificar a quantidade de sal e de azeite adicionada nas preparações dos pratos é difícil. Chefs muitas vezes adicionam sal e azeite nos alimentos durante o processo de cozimento, e, em seguida, fazer ajustes para definir o sabor. O resultado disto é que as quantidades acordadas dificilmente são respeitadas. O conteúdo total de sódio e gordura adicionada por azeite de oliva e pelo sal nos menus são nutrientes importantes a considerar, e é necessário uma avaliação química para garantir a efetiva implementação das mudanças. Além disso, nem o sal nem o azeite são colocados em cima da mesa dos clientes. Isso torna mais fácil para evitar abusos de sal ou óleo.

Paella Valenciana disso proporcionou um alto teor de proteína. Não há nenhuma evidência científica para mostrar que dietas ricas em proteínas é um trunfo para a saúde das pessoas, pode ser vantajoso, uma vez inicialmente causar um aumento na massa corporal magra e função imunológica, porém, são consequências adversas. Estudos recentes destacam a toxicidade sobrecarga aminoácido, assumindo um estímulo estressante para os rins e afetar sua função excretora, além de consumo excessivo de proteína animal está associado com uma alta ingestão de gorduras saturadas, um importante fator de risco para a origem de doenças ateroscleróticas (Rivero, 1994).

O diminuir o tamanho da porção de carne do prato é mais difícil devido à elevada palatabilidade da carne e uma diminuição significativa é percebida pelo consumidor. A

estratégia acordada com o restaurante foi reduzir teor de carne em 25% e desfia-la para tentar fazer a redução imperceptível para os consumidores.

As seleções de receitas para a preparação dos menus foram feitas de acordo com a demanda dos clientes, preferências, e estão de acordo com a decisão da UNESCO de 16 novembro de 2010, que aprovou o registro da Dieta Mediterrânea na lista do Patrimônio Cultural Imaterial da humanidade, resumindo-o como segue: "a dieta mediterrânea é um conjunto de habilidades, conhecimentos, práticas e tradições associados com a alimentação humana , que vão direto da terra a mesa, cobrindo para cultivos, colheitas e pesca, assim como a preservação , transformação e preparação de alimentos e , em especial , o consumo destes. A dieta mediterrânea é caracterizada por um modelo nutricional que tem se mantido constante ao longo do tempo e do espaço, onde seus principais ingredientes são: o azeite de oliva, cereais, frutas e vegetais , frescos ou secos , uma proporção moderada de carne , peixe e laticínios, condimentos e especiarias em abundancia, acompanhado por vinho ou infusões e sempre respeitando as crenças de cada comunidade. " (UNESCO, 2010).

4.CONCLUSÃO

Os resultados da intervenção com chefs mostram diferentes mudanças no conhecimento, atitude e comportamento. Várias tendências se tornaram evidente na análise retrospectiva deste projeto. Os itens do cardápio produzidos pelos chefs indicam que nós realizamos nossa meta original de educar chefs para capacitar e motivá-los a pensar sobre alimentos de baixo teor de gordura como um esforço criativo de acordo com a tradicional Dieta do Mediterrâneo.

AGRADECIMENTOS: Lessa possui uma bolsa de estudos da CAPES- Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brasil) (nº 01010623.3). Carbonell-Capella possui uma bolsa de estudos do Ministerio de Educação (AP2010-2546).

BIBLIOGRAFIA

Álvarez, M., Sanmartino, G. (2009). Empanadas, tamales y carpaccio de llama. Patrimonio Alimentario y Turismo en la Quebrada de Humahuaca-Argentina. Estudios y Perspectivas en Turismo, 18, 161–175.

Balzer, H. (2012) Is Cooking a Lost Art? http://www.eatingwell.com/food_news_origins/food_news/is_cooking_a_lost_art_a_conversation_with_harry_balzer_c

Bedard, A., Riverin, M., Dodin, S., Corneau, L., Lemieux, S. (2010). Sex differences in response to a Mediterranean diet on cardiovascular risk profile. The FASEB Journal.

- Bes-Rastrollo, M., Basterra-Gortari, F.J., Sanchez-Villegas, A. (2010) A prospective study of eating away-from-home meals and weight gain in a Mediterranean population: the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) cohort. *Public Health Nutr* 13, 1356–1363.
- Biing- Hawan, L., Gurthrie, J. (2012). *Nutritional Quality of Food Prepared at Home and Away From Home, 1977-2008*. United States Department of Agriculture.
- Devaux, A., Horton, D., Velasco, C., Thiele, G., López, G., Bernet, T., Reinoso, I., Ordinola, M. (2009). Collective action for market chain innovation in the Andes. *Food Policy*, 34, 31-38.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G. (2004). Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome. A randomized trial. *The Journal of the American Medical Association*, 292, 1440–1446.
- Glanz, K., Yaroch, A. L. (2004). Strategies for increasing fruit and vegetable intake in grocery stores and communities: Policy, pricing, and environmental change. *Preventive Medicine*, 39, S75–S80.
- Huang, L. C., Sumpio, E. B. (2008). Olive oil, the Mediterranean Diet and Cardiovascular health. *The American College of Surgeons*.
- Karamanos B., Thanopoulou A., Angelico F., Assaad-Khalil S., Barbato A., Del Ben M. (2002) Nutritional habits in the Mediterranean Basin. The macronutrient composition of diet and its relation with the traditional Mediterranean diet. Multicentre study of the Mediterranean Group for the Study of Diabetes (MGSD). *Eur J Clin Nutr*, 56, 983–91.
- Mancino, L., Newman, C. (2007). *Who Has Time To Cook? How Family Resources Influence Food Preparation*, ERR-40, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service.
- Mancino, L., Todd, J., Guthrie, J., Biing-Hawan, L. (2010). *How Food Away From Home Affects Children’s Diet Quality*, ERR-104, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, <http://www.ers.usda.gov/publications/>.
- MAPA- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2012) <http://www.magrama.gob.es/es/>
- Orfanos, P., Naska, A., Trichopoulou, A. (2009). Eating out of home: energy, macro- and micronutrient intakes in 10 European countries. *The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Eur J Clin Nutr*, 63, S239–S262.
- Rivero, M. (1994). *Nutrición y cáncer*: Barcelona, 29-35.
- Segura, C. X., Segura, R. G. (2007). The nutritional transition in contemporary Spain: the evolution of the intake of bread, potatoes and pulses (1850-2000). *Universitat Autònoma de Barcelona. Investigaciones de Historia Económicas*, 7, 69 - 100
- Sköldstam, L., Hagfors, L., Johansson, G. (2003). An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 62, 208–214.
- Smith, K. J., McNaughton, S. A., Gall, S. L., Blizzard, L., Dwyer, T., Venn, A. J. (2009). Take away food consumption and its associations with diet quality and abdominal obesity. A cross-sectional study of young adults. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 6, (1), 29.

Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gensini, G. F., Casini, A. (2008). Adherence to Mediterranean diet and health status. Meta-analysis. *BMJ*, 337-344.

Terramed. Centro Internacional de Altos Estudios Agronomicos Mediterráneos. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. España. 2012.

Todd, J., Mancino, L., Biing-hawan, L. The Impact of Food Away From Home on Adult Diet Quality, ERR-90, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, 2010, <http://www.ers.usda.gov/publications/err90/>.

Unesco, La Liste représentative du patrimoine culture limmatériel de l'humanité, 2010. (<http://www.unesco.org/>).

U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Library (USDA/NAL). SNAP-Ed Connection Recipe Finder, 2012, <http://recipefinder.nal.usda.gov/>.

Tabela 1. Menus

	Menu1	Menu 2
Entrada	Vichysoisse	Escalibada de anchova
	Escalibada de bacalhau	Salada de ventrecas
	Pimentões recheados de pato	Pimentões recheados de pato
	Salada de Salmão	Salada da horta
	Salada tabule	Hamburguezinhas
Prato principal	Paella Valenciana	Paella Valenciana
	Arroz marinheiro	Arroz Negro
	Arroz negro	Fideua de pato
	Fideua de pato	Paella de vegetais
	Paella de costelas de porco	Arroz de coelho
Sobremesa	Laranja navel	Pudin
	Carpaccio de kiwi	Capricho de laranja

Tabela 2. Pratos e ingredientes utilizados

Nome dos pratos	Ingredientes
Entradas	
Vichysoisse	Vichysoisse com maçã e yogurt
Salada de Salmão	Salmão, queijo de cabra, tomate, kani, mostarda e vinagre.
Escalibada	Vegetais com azeite de oliva extra-virgem, bacalhau ou anchova, azeitonas negras.
Salada tabule	Frango, arroz maroquino, tomate, cebola, cebolinha.
Salada mix	Alface, yogurt, maçã e bonito.
Salada de Ventresca	Ventresca de atum, alface, pimentões
Salada da horta	Alface, cebola, tomate, ovos e pickles.
Hamburguezinhas	Pequenas hamburguesas, com cebola caramelizadas e bacon.
Pimentões recheados de pato	Pato, cogumelos e pimentão vermelho.
Pratos principais	
Paella Valenciana	Frango, coelho, arroz, alecrim
Arroz marinheiro	Camarão, mexelhões, sepias, polvo, arroz,
Arroz negro	Arroz, serpia, tinta de serpias,
Paella de costelas de porco	Costelas de porco, pimentões, arroz, couve-flor
Fideua de pato	Fideua, pato, e cogumelos de temporada
Paella de vegetais	Arroz, vegetais
Sobremesa	
Laranja navel	Laranja, amêndoas
Capricho de laranja	Laranja, iogurte e castanha
Pudin	Açúcar, leite condensado, bolachas
Carpaccio de kiwi	Kiwi, iogurte em pó



Figura 2. Salada de ventresca



Figura 3 Paella Valenciana



Figura 4 Carpaccio de Kiwi

SEPARATION AND QUANTIFICATION OF STEVIOL GLYCOSIDE IN DIFFERENT STEVIA SAMPLES USING HPLC

Buniowska, M., Carbonell-Capella, J., Znamirowska, A. ⁽¹⁾, Esteve, M.J., Frigola, A*

Department of Nutrition and Food Chemistry, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, Spain

⁽¹⁾Faculty of Biology and Agriculture, Department of Dairy Technology, University of Rzeszów

*ana.frigola@uv.es. Phone: +34 963544955, Fax: +3496354495

INTRODUCTION

Stevioside is a product obtained from the leaves of *stevia rebaudiana bertonii*. An abundant component of *stevia rebaudiana* leaf has become well-known for its intense sweetness (250-300 times sweeter than sucrose) and used as a non-caloric in several countries.

The plant is indigenous to the northern regions of South America and grows wild in the Highlands of Amambay and near the source of the river Monday (a border area between Brazil and Paraguay). It is being cultivated in continental China, Taiwan, Thailand, Korea, Brazil and Malaysia. Besides the above-mentioned stevia is also grown in Israel, the Ukraine, the UK, the Philippines, Canada, Hawaii, California and all South America⁽¹⁾ The consumption of purified extract ultimately depends on the production approach used by the manufacturer and the environment and genetic aspect of the original plant. The glycoside profiles of stevia are subjected to considerable variability according to geographic area, state of plant maturity environmental conditions, harvesting and processing⁽²⁾. Stevioside is present with an average of 4-20% in the dry matter of the plant leaves, which primarily depends on cultivar characteristics of plant and basic agricultural techniques⁽³⁾. However, more research in varying dosages needs to be published before we have a better understanding. The steviol glycoside present in plant tissue, stevioside and rebaudioside A are largely responsible for the sweet and flavour of stevia leaves.

The advantages of stevioside as a dietary supplement for human subjects, (sweetener with zero calories, without toxic effects on human health, heat-stable, well tolerate low pH volumes) confirms that can be use as a sweetener in consumption and everyday use. Give some benefits for diabetics, phenylketonuria patients, as well as for obese persons intending to consume fewer calories by avoiding sugar supplements in the diet. No allergic reactions to it seem to exist.

Nowadays a number of study with this topic suggest that, beside sweetness, stevioside along with related compounds, which include rebaudioside A (second most abundant component of *S. rebaudiana* leaf), steviol and isosteviol (metabolic components of stevioside) may also offer therapeutic benefits, as they have anti-hyperglycemic, anti-hypertensive, anti-inflammatory, anti-tumor, diuretic, and immune influencing properties. However, more human research in varying dosages needs to be published before we have a better understanding.

More than 100 compounds have been identified in *Stevia rebaudiana*, the best known of which are the steviol glycosides, particularly stevioside and rebaudioside A, the second most abundant and 400 times sweeter than sucrose.

The aim of this study was to use HPLC analytical method for the separation and quantification of the sweet diterpene glycosides from the leaves of *stevia rebaudiana*.

MATERIALS AND METHODS

Samples:

Method development was carried out on seven samples of *stevia rebaudiana* from Anagalide SA (Huesca, Spain). For analytical purposes, the samples were purchased from different places: **Truvia** (Azucarera, Madrid, España), **PureVia** (Whole Sweetener Company Earth, París, Francia), **Raw Extract** (Cumberland Packing corp., Brooklyn, EE.UU.). **Glycostevia-EP® GE-EP**, (crude extract obtained from dried leaves, al 1% w /v), **Glycostevia-R60® GE-R60**, (purified extract with 95% rebaudioside A ein 1% w / v), **Stewia water extract 1 (SWE1)** from Anagalide SA (Huesca, Spain), **stevia water extract 2 (SWE2)** was purchased from a local supermercat (Navarro, Valencia). To prepare infusion of *stevia rebaudiana* 100 ml destilated water were added to the dried leaves.

Chromatographic analysis

Stevioside was analyzed using HPLC (high-performance liquid chromatography). Analysis was applied using the method of JECFA. Samples were filtering through a Sep-Pak® cartridge (a reverse-phase C-18 cartridge; Millipore, MA, USA). The system is carried out using a Kromasil 100 C18 column (5 µm, 150 x 4.6 mm) (Scharlab, Barcelona, Spain). The method was applied to the determination of real samples. Peak areas of standards were compared for quantification. Concentrations were expressed as mg/100g dried leaf.

RESULTS AND DISCUSSION

In this paper four different steviol glycosides were detected and analysed (Table 1) using HPLC method (rebaudiana A, the most abundant stevioside 400 times sweeter than sucrose rebaudiana F, rebaudiana C and stevioside). Their concentrations vary widely depending on the genotype, cultivation conditions and preparation of the sample. As can be observed in Table 1, the HPLC analysis in stevia water extract 2 showed the highest yield of the four steviol glycosides analysed. Stevioside was found to be the major compound (411.9 mg/100 g) in stevia water extract 2, followed by rebaudioside F and rebaudioside A (26.6 and 26.1 mg/100 g respectively). Also, there was a strong relationship between concentrations of rebaudiose A and stevioside in stevia water extract 1, (22.5 and 22.0 mg/100 g respectively). Moreover, in purified steviol glycosides, only rebaudioside A and stevioside in the case of TruVia were detected. Rebaudioside A ranged from 0.7 mg/100 g in *Glycostevia-R60*[®] up to 411.9 mg/100 g in stevia raw extract 2.

This ratio should be as high as possible considering rebaudioside A has better sweetening properties than stevioside.

CONCLUSION

The HPLC method is validated as sensitive, safe with high throughput in the development for quantification of stevioside and rebaudioside A can be used for the quality control of *S. rebaudiana* as well as to check the content of stevia glycoside during different stages of crop for commercial production. Stevioside and rebaudioside A are the component glycosides of principal interest for their sweetening property. Associated glycoside include rebaudioside C, dulcoside A, rebaudioside, steviolbioside, and rebaudioside B generally present in preparations of steviol glycosides at levels lower than stevioside or rebaudioside A. In samples from different origin the composition of steviol glycoside varies significantly. Before concluding an any beneficial effects deeper studies are needed in which stevia samples composition is clearly defined.

REFERENCES.

- Sivaram , L., & Mukundam, U. (2003). In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39, 520-523.
- Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121, 41-54.

Brandle J.E., Rosa N. (1992). Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of stevia rebaudiana. Canadian Journal of Plant Science 72 (4) 1263-1266.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research project was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology and European Regional Development Funds (AGL2010-22206-C02-01). Carbonell-Capella, J.M. holds an award from the Spanish Ministry of Education (AP2010-2546). Buniowska, M. thanks to Podkarpace Marshal's Office for Ph.D. scholarship number 8.2.2/IV.26/217/11/U/155/12.

Table 1. Total stevioside content of the extract from *Stevia Rebaudiana*.

Sample	Glycol steviosides (mg/100 g)			
	Reb A	Ste	Reb F	Reb C
SWE1	58.9±09	255.0±1.8	5.79±0.08	23.74±0.045
SWE2	26.1±0.7	411.9±21.9	26.64± 0.55	8.82±0.27
GE-EP	24.3±0.2	22.8±0.9	1.17±0.11	5.00±0.05
GE-R60	0.7±0.1	0.5±0.1	0.03±0.01	0.10±0.01
PureVia	16.7±0.8	-	-	-
TruVia	11.2±0.6	12.0±0.9	-	-
Stevia raw extract	48.1± 0.3	-	-	-

SWE1 - stevia water extract 1, SWE2 - stevia water extract 2, GE- EP - GE-EP - Glycostevia-R60®, PureVia, TruVia TruVia Stevia extract raw stevia raw extract.

SEPARACIÓN DE BUTANOL A PARTIR DE MEZCLAS ABE MEDIANTE PERVAPORACIÓN CON GAS DE ARRASTRE UTILIZANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS IÓNICAS SOPORTADAS ESTABILIZADAS POR GELIFICACIÓN

Plaza, A¹., Merlet, G¹., Romero, J¹.

¹Laboratorio de Procesos de Separación por Membranas (LabProSeM), Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Chile (USACH), Santiago, Chile.

1. INTRODUCCIÓN

El bio-butanol ha sido considerado como un combustible alternativo prometedor, el cual puede ser producido a partir de fuentes renovables. El butanol tiene ciertas ventajas sobre los demás bio-alcoholes de bajo peso molecular; tales como: el baja volatilidad, alto poder calor calorífico y no presenta problemas de ignición, entre otras (Jin, 2011).

La fermentación ABE es un proceso utilizado para la producción de butanol, el cual utiliza una cepa de la familia *Clostridium* para fermentar sustratos de almidón, remolacha y glucosa entre otras fuentes de biomasa. Los principales productos de la fermentación ABE son la Acetona, Butanol y Etanol, los cuales se producen en una razón de 3:6:1, respectivamente.

La pervaporación tiene un gran potencial en la recuperación de butanol a partir de caldos de fermentación, debido a que es un proceso no destructivo para el cultivo fermentativo, además de ser un proceso de una sola etapa que puede ser fácilmente acoplado a la unidad de fermentación.

Por otro lado, los líquidos iónicos (LIs) son considerados como una nueva clase de solventes verdes, los cuales presentan numerosas ventajas sobre los solventes convencionales, entre las cuales se encuentran su casi nula presión de vapor y su capacidad de solvatar una gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas. Se ha estudiado el uso de LIs en las técnicas de membranas con resultados promisorios (Fortunato, 2004). Sin embargo, el uso de los LIs para la separación de butanol a partir de los solventes ABE utilizando el proceso de pervaporación no ha sido completamente estudiada. El acoplamiento de las técnicas de membrana y los LIs usualmente requiere la impregnación y estabilización de este LI en los poros de la membrana, con el objeto de mejorar sus propiedades mecánicas. Una técnica para solucionar el problema de la pérdida del LI de los poros de la membrana, es estabilizar este LI mediante gelificación utilizando diversos materiales poliméricos o gelificantes, los cuales tienen buena conductividad y resistencia mecánica, algunos incluso tienen a mejorar sus propiedades físico-químicas (Voss, 2009; Hanabusa, 2005).

Se estudió la estabilidad de las membranas de LI en función del comportamiento de la separación en función del tiempo. Además se investigaron los parámetros de operación en el proceso de pervaporación; y finalmente se desarrolló un modelo basado en la teoría de resistencias en serie, para la descripción de la transferencia de masa a través de las membranas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Para la síntesis de las membranas de pervaporación, se utilizó el líquido iónico (LI) 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato [bmim][PF₆] (grado síntesis), ácido 12-hidroxiestearico (pureza 99 % p/p), acetona, butan-1-ol y etanol (grado analítico), los cuales fueron suministrados por Merck, Sigma-Aldrich y Equilab, respectivamente.

2.2. Preparación de las membranas

2.2.1. Preparación del módulo mono fibra de PV

Para preparar la membrana de LI, se puso una fibra hueca de politetrafluoroetileno (PTFE) en una carcasa de acero inoxidable y sus extremos fueron pegados con resina epóxica. La La Figura 1, muestra la sección transversal de la membrana líquida iónica gelificada soportada en los poros de la membrana. Para introducir el gel de LI en los poros de la membrana porosa de PTFE, se mantuvo la carcasa a 80°C utilizando una cinta calefactora y de manera simultánea se hizo circular la mezcla de LI-gelificante por el interior de la fibra utilizando una bomba peristáltica, mientras por la carcasa se aplicaba vacío mediante una bomba de vacío, hasta observar un flujo de permeado constante; entonces se hizo circular una corriente de nitrógeno para limpiar el exceso de LI-gelificante. La temperatura del módulo fue disminuida de 80 a 20°C a razón de 10°C cada 30 minutos.

2.1.3. Experimentos de pervaporación y evaporación con membranas

El primer proceso estudiado fue la pervaporación con gas de arrastre (PV), utilizando una membrana líquida iónica gelificada soportada; el objetivo fue caracterizar la transferencia de masa en la separación de acetona, butanol y etanol a partir de soluciones acuosas utilizando el proceso de pervaporación. El comportamiento del proceso de pervaporación fue comparado con el proceso de evaporación con membranas, utilizando los mismos soportes porosos pero sin contener LI, para poder identificar la selectividad de la membrana de LI por sí sola. Todos los aspectos fluido-dinámicos se mantuvieron constantes en los dos procesos, para investigar el efecto de el LI en la separación de los compuestos ABE. La figura 2, muestra el aparato experimental utilizado tanto en la PV como en la ME.

En ambos procesos se trabajó a 30 °C, bajo condiciones transcientes; se alimentó por el interior de la fibra una solución acuosa conteniendo 500 ppm de cada soluto (acetona-butanol-etanol) con flujos entre 1,2 a 3,0 L min⁻¹. Por el lado de carcasa y en contracorriente se hizo circular nitrógeno con flujos entre 0,6 y 1,3 L min⁻¹, el cual recibía los compuestos capaces de permear a través de la membrana, esta corriente gaseosa fue burbujeada en un recipiente con agua. La disminución de la concentración de los compuestos ABE fue monitoreada utilizando un cromatógrafo gaseoso, inyectando muestras cada 15 minutos por un período de 2 horas.

Para cada uno de los procesos estudiados, se estimaron los porcentajes de extracción y los flujos transmembrana de los compuestos ABE, con estos parámetros se planteo un modelo basado en la teoría de resistencias en serie utilizando el software Matlab ®, capaz de describir la transferencia de masa de cada soluto a través de la membrana.

Para estudiar el efecto que tiene el LI gelificado en el interior de las fibras en la extracción se compararon los resultados obtenidos al operar con y sin LI en las fibras, utilizando idénticas condiciones operacionales pero con el proceso de PV y ME.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. ensayos de evaporación con membranas

El primer paso fue el estudio del sistema de referencia, esto es la evaporación con membranas, obteniéndose como resultado una mayor extracción de la acetona por sobre el etanol y butanol; en este caso las magnitudes de los flujos transmembrana siguen el mismo comportamiento que el de las constantes de Henry, las cuales pueden entregar información de la volatilidad de cada compuesto. A pesar del hecho de que la acetona muestra la mayor volatilidad relativa, su flujo transmembrana promedio no es proporcionalmente mayor, esto es debido a su capacidad de movilidad dentro de los poros de la membrana llenos de gas y a través de las capas limites en las proximidades de la membrana. En este sentido es el etanol la molécula más pequeña y muestra mayores coeficientes de difusión tanto en agua como en nitrógeno que las restantes moléculas.

El modelo de transferencia de masa basado en la teoría de resistencias en serie, muestra un buen ajuste con los datos experimentales bajo todas las condiciones operacionales estudiadas en el presente trabajo, permitiendo validar las dos principales ideas: (1= la transferencia de masa a través de las proximidades de la membrana puede ser descrita utilizando las ecuaciones clásicas de transporte, describiendo los fenómenos difusivos y convectivos, y (2) la resistencia a la transferencia de masa de la capa limite de la capa

gaseosa, puede ser despreciada bajo todas las condiciones operacionales estudiadas en el presente trabajo. En la Figura 3, se muestran los resultados experimentales y los resultados estimados mediante el modelo fenomenológico planteado.

3.2. Ensayos de pervaporación con gas de arrastre

En el caso de la pervaporación con gas de arrastre, los resultados de porcentajes de extracción obtenidos, fueron completamente diferentes a los obtenidos con la evaporación con membranas. En este caso la presencia del LI gelificado en los poros de la membrana, genera un transporte preferencial del butanol, reduciendo el flujo global de transferencia de masa, pero manteniendo el orden de magnitud de los flujos observados en la membrana de evaporación. A pesar de que las propiedades de transporte de la capa de LI gelificado son menores que las propiedades de transporte de la capa de gas formada en los poros durante el proceso de evaporación con membrana, las altas solubilidades de estos compuestos, n especial del butanol y acetona, explican estos valores de flujos, los cuales son altos si se comparan con los flujos típicos obtenidos con las membranas poliméricas. El flujo parcial promedio del butanol obtenido en el presente trabajo al utilizar las membranas líquidas iónicas gelificadas soportadas es de $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, cuando la concentración inicial de butanol fue de 500 ppm; Liu y colaboradores (Liu, 2005) obtuvo valores de flujos transmembrana de butanol de $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ a $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ para los compuestos de fermentación ABE, utilizando concentraciones de estos solutos entre 1030 y 1910 ppm, respectivamente; utilizando una configuración de pervaporación con una membrana polimérica basada en PEBA 2533.

Cabe destacar que no se observaron pérdidas de LI durante las experiencias de pervaporación. Sin embargo, la selectividad de la membrana disminuyó luego de 5 o 6 repeticiones de las corridas experimentales de pervaporación.

La selectividad de cada compuestos, puede ser cuantificada en términos de su flujo de permeación comparativos. En este trabajo se consideraron las razones butanol/acetona y Butanol/etanol, debido a que el mayor interés en este tipo de proceso es el desarrollo de nuevas técnicas para la separación de butanol a partir de caldos de fermentación. Las razones de flujos de transferencia fueron calculados con el objeto de mostrar la permeación preferencial del butanol a través de la membrana LI gelificada, los valores promedios obtenidos son presentados en la Tabla 2. Los valores obtenidos, se pueden considerar bajos en términos de selectividad bajo las condiciones operacionales seleccionadas en este estudio, donde las concentraciones iniciales fueron de 500 ppm para todos los solutos estudiados. Sin embargo, estas razones de flujo son mayores que las obtenidas con la evaporación con

membranas, en la cual para un proceso con una membrana no selectiva presenta valores de 0,48 para el butanol/acetona y de 1,02 para la razón butanol/etanol.

Por otro lado, el modelo fenomenológico planteado para el proceso de pervaporación utilizó datos de propiedades físicas y de transporte obtenidas de literatura para los compuestos en las fases fluidas (líquida y gas) (Perry, 1999), muestra un buen ajuste a los datos obtenidos de manera experimental, mostrando que el coeficiente global de transporte, esta influenciado principalmente por la solubilidad y entonces por la termodinámica en lugar de las cinéticas de transporte, ya que el butanol presenta el menor coeficiente de difusión de los tres compuestos estudiados. Los valores de coeficientes de difusión estimados en la capa de líquido iónico gelificado, se estimaron mediante el modelo fenomenológico para los tres compuestos (valores presentados en la Tabla 2).

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se implemento la pervaporación de mezclas acuosas ABE, utilizando membranas líquidas iónicas soportadas, basadas en [bmim][PF₆] con el objetivo de separar butanol desde soluciones acuosas. Los ensayos de pervaporación fueron comparados con las corridas experimentales de evaporación con membranas, realizadas en el mismo dispositivo experimental y soporte de membrana, pero sin LI gelificado.

El uso de una capa de LI gelificado formado con una baja concentración de gelificante genera membranas con un permeabilidad comparable con el sistema de evaporación con membranas, pero selectivo hacia la transferencia del butanol. La selectividad de la membrana está dada principalmente por el coeficiente de partición entre el LI gelificado y la solución acuosa, y la membrana misma representa el principal paso controlante a la transferencia de masa durante el proceso de pervaporación.

Se propuso un modelo de transferencia de masa basado en las ecuaciones clásicas de transporte para descripción de los sistemas de pervaporación y de evaporación con membranas. Este modelo permite la simulación de el sistema de evaporación con membranas, verificando la elección de las correlaciones de los coeficientes de transferencia de masa en la capa limite de la solución acuosa de alimentación ABE. La misma aproximación teórica fue aplicada a la pervaporación. Entonces, el modelo fue utilizado para correlacionar los coeficientes de difusión de la acetona, butanol y etanol en la capa de LI gelificado. El modelo es coherente con los datos experimentales y es capaz de correlacionar los coeficientes de transferencia de masa de cada compuesto en la capa de LI gel, los cuales tiene valores mayores que los reportados para LI polimerizados o mezclados con polímeros.

5. BIBLIOGRAFÍA

C. Jin, M. Yao, H. Liu, C.F. Lee, J. Ji, Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel, *Renewable Sustainable Energy Rev.* 15(2011) 4080-4106.

R. Fortunato, C.A.M. Afonso, M.A.M. Reis, J.G. Crespo, Supported liquid membranes using ionic liquids: study of stability and transport mechanisms, *J. Memb. Sci.* 242(2004) 197-209.

B.A. Voss, J.E. Bara, D.L. Gin, D.R. Noble, Physically gelled ionic liquids: solid membrane materials with liquid like CO₂ transport, *Chem. Mater.* 21(2009) 3027-3029.

K. Hanabusa, H. Fukui, M. Suzuki, H. Shirai, Specialist gelator for ionic liquids, *Langmuir* 21 (2005) 10383-10390.

F. Liu, L. Liu, X. Feng, Separation of acetone-butanol-ethanol (ABE) from dilute aqueous solutions by pervaporation, *Sep. Purif. Technol.* 42(2005) 273-282.

R.H. Perry, D.W. Green, *Perry's Chemical Engineer's Handbook*, 7 th Ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 1999.

Tabla 1. Valores promedios de las razones de flujos de transferencia obtenidas en el presente trabajo, para el butanol en acetona y etanol, respectivamente.

$N_{\text{butanol}/N_{\text{acetona}}}$	$N_{\text{butanol}/N_{\text{etanol}}}$
1.141 ± 0.073	1.706 ± 0.373

Tabla 2. Valores de coeficientes de difusión estimados para la acetona, butanol y etanol en la capa de LI gelificado. Valores estimados mediante la correlación de datos experimentales con el modelo de transferencia de masa implementado para el proceso de pervaporación.

Compuesto	$D_{s-LI\ gel} [m^2\ s^{-1}]$
Acetona	$4.8 \cdot 10^{-10}$
Butanol	$4.0 \cdot 10^{-10}$
Etanol	$5.4 \cdot 10^{-10}$

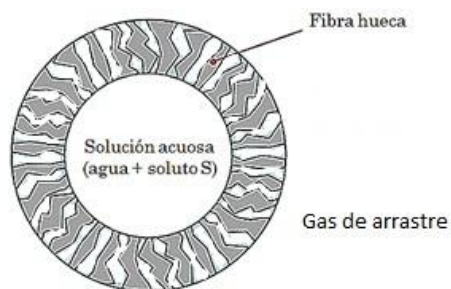


Figura 1. Sección transversal del soporte poroso que contiene el LI gelificado en el interior de los poros de la membrana.

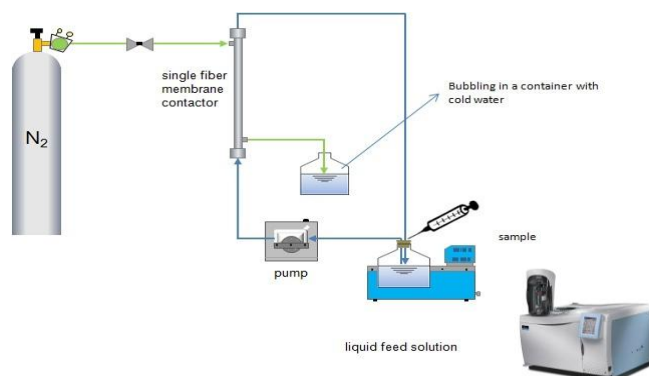


Figura 2. Dispositivo experimental utilizado en los ensayos de pervaporación y evaporación con membranas.

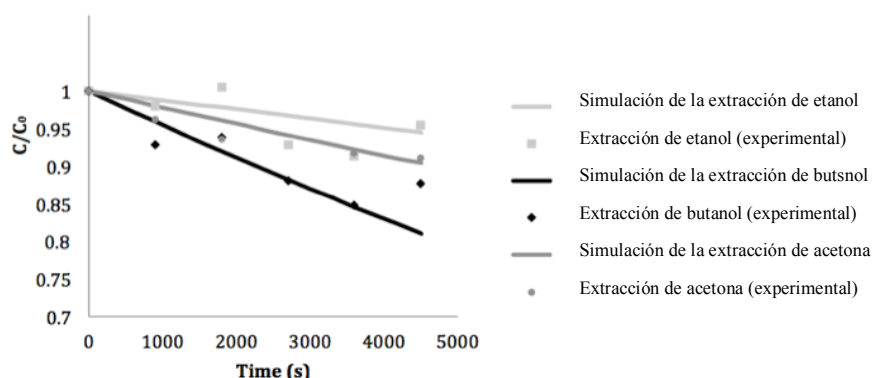


Figura 3. Cambio de Concentración experimental y simulado para la evaporación con membranas de la acetona, butanol y etanol, con un flujo de $1,17 \cdot 10^{-5} \text{ L s}^{-1}$ y $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ L s}^{-1}$ de alimentación acuosa y de la corriente gaseosa, respectivamente. La concentración inicial de cada compuesto (C_0) fue de 500 ppm.

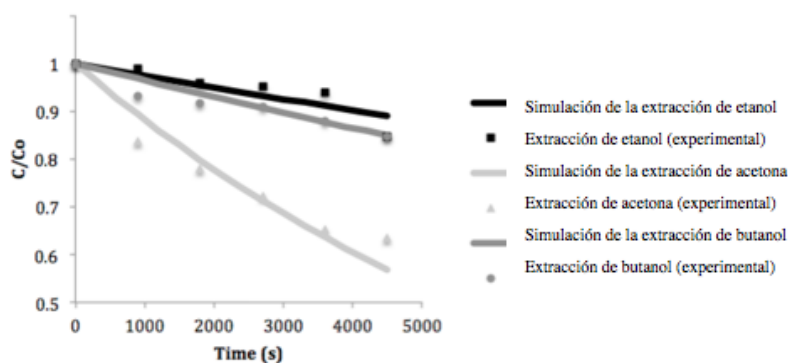


Figura 4. Razón de cambio de concentración, estimada de manera experimental y simulada para la pervaporación de acetona, butanol y etanol con flujos de $1,17 \cdot 10^{-5} \text{ L s}^{-1}$ y $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ L s}^{-1}$ de alimentación acuosa y de la corriente gaseosa, respectivamente. La concentración inicial de cada compuesto (C_0) fue de 500 ppm.

EFFECTOS DE LAS CONDICIONES FLUIDODINÁMICAS Y DE LA HIDROFOBICIDAD EN LA EXTRACCIÓN CON MEMBRANAS UTILIZANDO GAS DENSO

Plaza, A¹., Cabezas, R¹., Romero, J¹.

¹Laboratorio de Procesos de Separación por Membranas (LabProSeM), Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Chile (USACH), Santiago, Chile

1. INTRODUCCIÓN

La extracción supercrítica basada en contactores de membrana es la operación comercial de extracción con gas denso complementada con un contactor de fases no dispersivo, el cual utiliza membranas de fibras huecas. En este proceso, una membrana macroporosa hidrofóbica permite el contacto entre dos fases, una solución acuosa conteniendo el compuesto de interés, fluye al interior de las fibras y por fuera de esta el solvente de extracción en condiciones cercanas o en un estado supercrítico (SCF). Un Fluido Supercrítico es un compuesto a temperatura y presión superiores que sus condiciones críticas. Bajo estas condiciones un fluido supercrítico muestra interesantes propiedades de transporte y superficie, como un gran poder solvente similar al de los líquidos y una viscosidad similar a la observada en los gases, recibiendo muchas veces el nombre de gas denso. El fluido supercrítico de extracción de uso más común es el dióxido de carbono CO₂.

El sistema en estudio consiste en la extracción de acetona, butanol y etanol desde una solución acuosa proveniente de un sistema de fermentación anaerobio denominado fermentación ABE, este proceso de fermentación tiene un nuevo horizonte en la producción de biocombustibles, al incorporar biomasa de desechos sin la necesidad del uso de suelos destinados a la alimentación, por lo que su optimización presenta importantes desafíos para la ingeniería de procesos. De los compuestos obtenidos es el biobutanol el que presenta un atractivo superior por su alto poder calorífico, bajo impacto en los motores convencionales y el aumento del octanaje en la mezcla con combustibles tradicionales. La extracción de los compuesto ABE , se genera por la disolución en el CO₂ supercrítico, estudiando el efecto de las variables presión, flujo de alimentación de la fase acuosa y flujo de alimentación de la fase densa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción supercrítica se utilizó el equipo representado en la Figura 1, el cual consistió en una membrana hidrofóbica mono fibra macroporosa de politetrafluoroetileno (PTFE), la cual fue puesta en el interior de una carcasa de acero inoxidable y sus extremos

fueron fijados con resina epóxica. Como la membrana es hidrofóbica, la solución acuosa no es capaz de penetrar en el poro y por lo tanto no hay humectación de la membrana, formándose un menisco en la boca del poro de la membrana del lado de la alimentación acuosa; la diferencia de gradiente de potencial químico es la fuerza impulsora que genera la transferencia de masa desde la solución acuosa de alimentación a la fase supercrítica, es el gradiente de concentración. Este gradiente de concentración tiene una discontinuidad en la interface, que esta determinado por el equilibrio químico (Gabelman, 2005).

Una de las principales características de este proceso, es que ambas fases se encuentran a la misma presión y temperatura, en este caso la membrana sólo juega el rol de separar las interfaces, asegurando el contacto. La selectividad de este proceso, estará determinada por el equilibrio ternario del sistema agua-soluto-CO₂.

La solución acuosa de alimentación, la cual contenía 500 ppm de cada uno de los solutos a estudiar (acetona-butanol-etanol), fue circulada con la ayuda de una bomba HPLC por el interior de la fibra con flujos entre 0,1 y 1,5 mL min⁻¹, de manera simultánea se alimentó una corriente gaseosa compuesta por dióxido de carbono por la carcasa del módulo de membrana, mediante una bomba jeringa que operaba bajo condiciones de flujo o presión constantes, los rangos de flujo de la corriente de CO₂ denso utilizados se encontraban entre los valores 40-80-100 CNTP mL min⁻¹ y presiones de trabajo de 70 y 90 bar.

Para asegurar la reproducibilidad de los datos experimentales y el correcto funcionamiento del sistema de extracción, se acopló una celda de equalización para controlar y estabilizar la presión interfacial de las corrientes; junto con esto se controló la temperatura del sistema utilizando un baño calefactor que estaba conectado al manto de la bomba jeringa y además se utilizó una cinta calefactora que cubría el módulo de contacto.

Para monitorear el cambio de concentración de los compuestos volátiles presentes en la solución acuosa, se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500. A partir de la medición de la concentración de los compuestos ABE desde muestras puntuales recolectadas del equipo de extracción antes y después del contacto con el fluido supercrítico, se realizó un balance de masa, con el fin de calcular el porcentaje de extracción y el flujo de permeado a la fase del gas denso.

Con el fin de describir de una buena manera el fenómeno de extracción del sistema en estudio, se propuso un modelo fenomenológico basado en la teoría de resistencias en serie a la transferencia de masa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. flujos de transferencia de masa en la extracción de los compuestos ABE

Al analizar los flujos transmembrana de la acetona en función de los diferentes valores de flujos de alimentación acuosa, es posible afirmar que el compuesto que se extrae de manera preferencial, bajo todas las condiciones operacionales estudiadas en el presente trabajo es la acetona, seguida por el butanol y por último el etanol es extraído en menor proporción. Obteniéndose valores de flujos transmembranas de $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para la acetona, $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y de $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para el etanol.

Estos flujos de transferencia de los compuestos volátiles están relacionados directamente con la solubilidad de los compuestos orgánicos en el CO_2 sc. Donde existe una mayor velocidad de transferencia para la acetona, seguida por el butanol y finalmente el etanol, lo cual está directamente relacionado con los porcentajes de extracción, pero en el caso de las densidades de transferencia de masa, es posible añadir el efecto que tiene en la tasa de transporte el tamaño y forma de las moléculas a ser transferidas.

Cuando se incrementó la presión de trabajo desde 70 a 90 bar, se observó un descenso significativo de los flujos de transferencia para los tres solutos estudiados cuando el flujo de alimentación acuosa fue superior a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Este singular fenómeno observado al operar a altas presiones, puede ser debido a la penetración parcial del líquido en la interface acuoso- CO_2 sc generado en el interior de los poros de la membrana. Entonces, la humectación parcial de la membrana aumenta la resistencia a el transporte de los solutos a través de la membrana, la cual permanece con los poros llenos del gas denso y gradualmente estos poros son ocupados por la fase líquida; por lo tanto, la estabilidad de la interface de contacto del sistema es parte fundamental en el estudio del modelo fenomenológico, en el cual las razones de flujos y los efectos en las resistencias individuales permiten generar una buena descripción del proceso.

3.2. Efecto de las variables de operación en la eficiencia de extracción del proceso

Al analizar los porcentajes de extracción obtenidos al operar a 70 bar de presión, es posible observar que para todas las condiciones de flujos planteadas en este estudio, la acetona es el compuesto que se extrae de manera preferencia, seguido por el butanol y finalmente el etanol, con valores máximos de extracción de 72,4 %, 56,4% y 9,4%, para la acetona, butanol y etanol, respectivamente.

La diferencia en los porcentajes de extracción de los compuestos ABE, se debe principalmente a la afinidad de cada compuesto con la fase de extracción, fase de extracción compuesta por un compuesto no polar (CO_2), entonces por su carácter no polar tiene cierta

dificultad para extraer los tres compuestos polares (compuestos de fermentación ABE) estudiados en este trabajo, sin embargo, la afinidad con los compuestos polares esta delimitada por la constante dieléctrica, la cual varía con la densidad, por lo tanto, como la condición de presión de trabajo es constante, son las fuerzas intermoleculares de los solutos las que determinan la habilidad de disolución de los solutos en la fase supercrítica. La extracción preferencial de la acetona por sobre los demás compuestos, está gobernada por el fenómeno de interacción de cada compuesto volátil con la matriz acuosa de la solución de alimentación, generalizada como la capacidad de formar puentes de hidrógeno entre los mismos solutos y el medio solvente de la solución, es por este hecho, que la acetona al ser un compuesto aprótico no forma puentes de hidrógeno con el agua, por lo tanto tiene movimiento libre, en contraste con el butanol y etanol que son compuestos próticos y por lo tanto, formarán puentes de hidrógeno con el agua. Es esta habilidad de formar puentes de hidrógeno la que resulta en menores porcentajes de extracción para el butanol y etanol. Estos valores de porcentajes de extracción son mayores que los obtenidos por otros investigadores.

Bothun y colaboradores (Bothun, 2003) estudiaron la extracción de etanol y acetona con un 10% p/p, utilizando propano (34,5 bar) y CO₂ (69 bar) comprimidos, con flujos de alimentación entre 0.1 and 1 mL/min y razones molares gas denso/flujo de alimentación entre 3 y 10, obteniendo valores de porcentajes de extracción de 4,7 y 9,9%, para la acetona y etanol, respectivamente. Por otro lado, Estay et al. (Estay, 2007) tomo los valores experimentales obtenidos por Bothun et al, (Bothun, 2003) y los comparó con los que obtuvo al utilizar un modelo fenomenológico desarrollado en Matlab, estos autores obtuvieron valor de porcentajes de extracción de 74,13 % y 10,31%, para la acetona y etanol, respectivamente, al utilizar flujos de alimentación acuosa de 0,5 mLmin⁻¹ y una presión de operación de 69 bar.

Por otro lado, al operar el sistema de extracción supercrítica a altas presiones (90 bar), es posible observar el mismo comportamiento descrito anteriormente, mostrando una extracción preferencial hacia la acetona, seguido por el butanol y por último el etanol; pero en este caso se obtuvieron valores de porcentajes de extracción para la acetona en promedio un 10% más bajos que al operar a 70 bar y las mismas condiciones fluido-dinámicas, este comportamiento no es completamente explicado por la teoría de la disociación como constante dieléctrica y por el incremento de su valor con el aumento de la densidad de la fase supercrítica provocado por el aumento de la presión (Sarrade, 1994), por lo que el descenso de los valores de los porcentajes de extracción es debido a los principios relacionados a la

transferencia de masa y de las resistencias apropiadas en cada fase en el sistema global en estudio.

3.3. Análisis fenomenológico de los compuestos ABE

En la Figura 2, es posible observar los flujos transmembrana para la acetona, obtenidos de manera experimental y estimadas mediante el uso del modelo fenomenológico, cabe destacar que al analizar los flujos transmembrana de los tres compuestos volátiles en estudio y al trabajar con bajas presiones de operación, es el modelo hidrofóbico aquel que describe de una mejor manera los flujos transmembrana para todos los solutos.

La superioridad del modelo hidrofóbico por sobre el hidrofílico es debido principalmente a que el sistema se mantiene estable para el flujo de permeado, manteniendo la interface de transferencia de masa en la boca interior de los poros de la membrana, sin el desplazamiento de esta.

La definición del coeficiente global según la fase líquida propone una distribución de resistencias individuales, siendo la principal resistencia la de fase líquida sobre la del solvente, dejando como fase limitante el transporte del soluto a través de la capa límite de la solución acuosa. La resistencia observada para el flujo de soluto a través de los poros de la membrana, corresponde claramente a lo esperado para la condición hidrofóbica, donde los poros se encuentran llenos del gas denso y de ahí la baja resistencia de esta fase por las excelentes propiedades de transporte que posee.

La forma desarrollada por la curva experimental del flujo de acetona permeada, contenida dentro de las curvas fenomenológicas, explica como dadas las condiciones de alta presión y mayor velocidad del flujo de alimentación acuosa, se genera una humectación parcial del poro de la membrana, aumentando la resistencia global a la transferencia de masa, por el cambio de las condiciones de hidrofobicidad de la membrana. Lo cual se puede comprobar con el análisis de las resistencias individuales que gobiernan el proceso, tanto en la condición hidrofóbica como en la condición hidrofílica; para todas las condiciones fluido dinámicas la constante de reparto es muy superior a 1, traducándose en una alta afinidad hacia el CO₂ versus una mayor resistencia al movimiento en la fase acuosa, tal como lo plantea la condición de un coeficiente global basado en la fase de alimentación acuosa con los que se obtienen los flujos de permeado obtenidos de manera fenomenológica.

La distribución de resistencias para el modelo hidrofóbico presenta una alta resistencia de parte de la fase acuosa, englobando los principios de transporte de la acetona versus una despreciable resistencia al transporte a través de los poros de la membrana, por las excelentes propiedades de transporte en la fase supercrítica, sin embargo, la resistencia de la

fase supercrítica, no es del todo despreciable apareciendo entonces un efecto que es relacionado con las constantes de reparto y el gradiente de concentración que se genera, el modelo hidrofílico presenta una distribución de resistencia mas acorde a lo que dicta lo esperado, ya que al presentar una resistencia predominante sobre el flujo a través del poro de la membrana, no se esta violando lo establecido al definir el coeficiente global sobre la fase líquida y la resistencia global del sistema centrada en esta, ya que al estar el poro lleno de solución acusa, son las propiedades de transporte difusivas de la acetona sobre la solución de alimentación, las que gobiernan la transferencia de masa, elevándose sobre la resistencia de la misma solución pero en régimen convectivo y generando una pequeña resistencia de la fase que posee excelente propiedades de transporte y una alta afinidad hacia la acetona. Transformándose entonces en un modelo híbrido que a bajas velocidades en la fase de alimentación acuosa se comportará como un modelo hidrofóbico, para en función del aumento de la velocidad de la corriente líquida comportarse como un modelo hidrofílico.

Cabe destacar que este comportamiento descrito con anterioridad para el caso de la acetona, es seguido tanto para el butanol como para el etanol, presentandose el mismo comportamiento en las curvas de flujos transmembranas obtenidos tanto de manera experimental como las estimadas a través del modelo fenomenológico.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo fue posible la separación de los compuestos de fermentación ABE, utilizando un contactor de membrana y CO₂ supercrítico como solvente de extracción, bajo las condiciones especificadas en este estudio será la acetona el compuesto predominantemente transferido, alcanzando una extracción máxima de un 70% en un sólo paso de extracción continua en el contactor, siendo 1,5 y 2,5 veces superior a los flujos de transferencia observados para el butanol y etanol respectivamente.

Para cada compuesto de fermentación ABE se presenta una considerable disminución de la velocidad de transferencia de masa conforme aumenta la presión y los caudales de operación sobre cierto limite, lo cual se podría explicar en relación a una desestabilización de la interfase liquido-gas denso en la entrada de los poros de la membrana; esta inestabilidad de la interfase de las soluciones líquido y gas en los poros de la membrana, involucra una variable adicional al problema físico descrito, lo que hace más compleja la predicción de la transferencia de masa. Una interfase estable manteniendo la hidrofobicidad de la membrana asegura errores no mayores al 6 % en la predicción de los flujos de transferencia de masa.

El modelo hidrofílico será capaz de describir el proceso de transferencia de masa cuando las condiciones del flujo de alimentación sean superiores a los $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ operando a una presión superior a la crítica. La resistencia predominante del fenómeno de transferencia de masa es la proporcionada por la fase líquida, siendo importante la resistencia de la fase supercrítica sólo para el etanol.

5. BIBLIOGRAFÍA

Gabelman, S. Hwang, Experimental results versus model predictions for dense gas extraction using hollow fiber membrane contactor, *J. of Supercritical Fluids* 35 (2005) 26-39.

G. Bothun, B. Knutson, H. Strobel, S. Nokes, E. Brignole, S. Díaz, Compressed solvents for the extraction of fermentation products within a hollow fiber membrane contactor, *J. of Supercritical Fluids* 25 (2003) 119-134.

H. Estay, S. Bocquet, J. Romero, J. Sanchez, G.M. Rios, F. Valenzuela, Modeling and simulation of mass transfer in near-critical extraction using a hollow fiber membrane contactor, *Chemical Engineering Science* 62 (2007) 5794-5808.

S. Sarrade, C. Guizard, G.M. Rios, New applications of supercritical fluids processes in separation, *Separation and purification Technology* 32 (2003) 57-63.

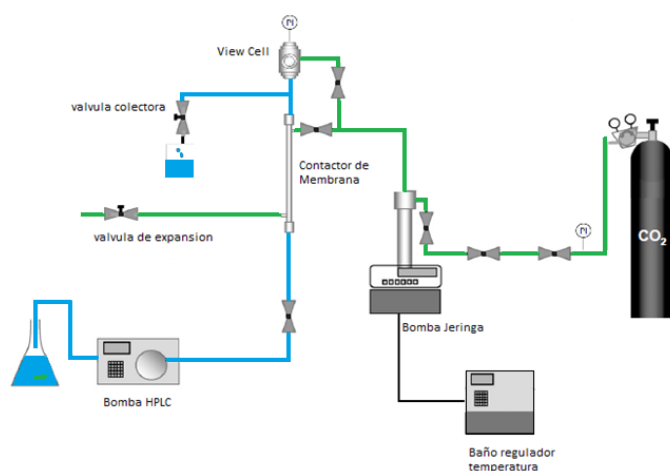


Figura 1. Diagrama del equipo de extracción supercrítica utilizado para la separación de Acetona-butanol-etanol a partir de soluciones ABE.

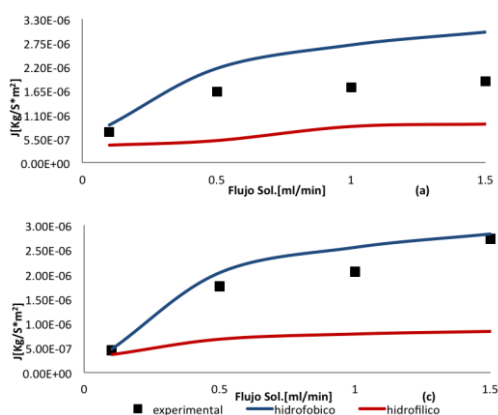


Figura 2. Comparación entre el flujo de permeado experimental y estimado mediante el uso del modelo fenomenológico para la acetona en función de el flujo de alimentación acuosa a una presión de trabajo de 70 bar y a) 40 mL min^{-1} y b) 100 mL min^{-1} de flujos del solvente supercrítico.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BIOCONSERVANTES COMERCIALES EN LA VIDA ÚTIL DE YOGURT ALTERADO CON *Candida intermedia* Y *Mucor Circinelloides*.

María Ximena Quintanilla-Carvajal^{1*}, J. M. Rodríguez-Bernal¹, Johanna Serna-Jiménez¹, María Angélica Uribe-Bohorquez¹, Juanita Cardona-Gómez² y Bernadette Klotz-Cerebrío².

¹ Grupo de Procesos Agroindustriales, Universidad de La Sabana, Campús del Puente del Común- Km 7. Chía, Cundinamarca, Colombia

² Instituto Alpina, Sopo, Cundinamarca, Colombia.

Autor correspondiente: maria.quintanilla1@unisabana.edu.co

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las tecnologías de procesamiento de alimentos buscan mantener la calidad de los productos desde su producción hasta el momento de ingesta por parte del consumidor final. Entre estas tecnologías se encuentra la fermentación que se utiliza también para la conservación de alimentos perecederos desde hace miles de años (Walstra, Wouters y Geurts, 2006).

Debido a sus características fermentativas y antagónicas, las bacterias ácido lácticas (BAL) se han empleado en este tipo de procesos y recientemente han adquirido un fuerte interés por parte de la industria alimentaria por su aplicación en procesos de bioconservación (Rolfe, 2000). Algunos microorganismos tienen la capacidad de inhibir o reducir directa o indirectamente el crecimiento de otros microorganismos debido a la producción de diferentes sustancias como bacteriocinas, antimicrobianos, antibióticos, entre otros. Esta situación es llamada *relación antagonista* y se ha utilizado en la industria alimentaria, específicamente con el uso de BAL (Delavenne, et al., 2012).

El yogurt es un producto lácteo fermentado de baja acidez, el cual se elabora de la leche pasteurizada en el que los contenidos de grasa varían de 0.0 a 4.0 % dependiendo de la región donde se elabore y de la legislación que lo normativice. La leche cruda estandarizada se pasteuriza con el fin de obtener una textura suave y firme del producto final. Uno de los problemas de calidad de este tipo de productos es el deterioro microbiano que se da por mohos y levaduras tolerantes a ambientes ácidos y a las temperaturas de refrigeración (Jakobsen y Narvhu, 1996; Beletsiotis, Ghikas y Kalantzi, 2011). El deterioro por hongos es el mayor limitante para la estabilidad y el valor comercial de este producto, generando pérdidas a nivel mundial y restringiendo las oportunidades de exportación del producto (Delavenne, et al., 2012). Es por esto que en la actualidad se ha evaluado el uso de BAL

como mecanismo para incrementar la vida útil de este tipo de bebidas fermentadas (Welman y Maddox, 2003; de Vuyst y Leroy, 2007). De tal manera, el objetivo de este trabajo fue evaluar en vida útil de yogurt, la combinación de bioconservantes comerciales en una matriz láctea fermentada alterada con hongos y sin alterar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una mezcla de bioprotectores comerciales fue evaluada en yogurt inoculado con *Candida intermedia* y *Mucor circinelloides*, aislados de matrices lácteas fermentadas en vida útil (39 días). Los bioprotectores utilizados fueron Holdbac YM-C (Dupont Danisco, Dinamarca), Microgard 100 (Dupont Danisco, Dinamarca) y Lyofast LFPR-2 (Sacco, Italia).

Se fermentaron 2.0 L de leche con un cultivo iniciador comercial durante 4.5 horas a 42 °C. Posterior a la fermentación, el yogurt fue almacenado a temperatura de refrigeración (4 °C) e inoculado con cada microorganismo en una concentración de 10² UFC/mL para *C. intermedia* y 10² esporas/mL para *M. circinelloides*. Finalmente, el yogurt fue incubado a 4, 8 y 12 °C por 39 días, evaluando en 8 puntos pH, acidez y conteos microbiológicos de mohos en medio agar dextrosa de papa (PDA) mediante una técnica de pozos (Muñoz et al., 2010) y medición de diámetros de crecimiento al cabo de las 120 horas de incubación a 29°C para moho y para la levadura se sembró en medio agar rosa bengala por el método estándar de siembra en placa, posterior incubación a 29°C por 72 horas para lectura de UFC/mL. El ensayo se desarrolló como se muestra en la Tabla 1.

Como control se utilizó yogurt no inoculado con microorganismos alterantes y como agente bioprotector se utilizó una mezcla obtenida en ensayos anteriores para cada tipo de microorganismo. La frecuencia de evaluación usada fue: en las primeras 4 semanas se tomó una muestra a la semana, para las dos últimas se tomaron dos muestras por semana para un total de 8 puntos; el aumento de muestreo al final se debe a que la mayoría de procesos deteriorativos se reflejan o aceleran hacia el final de la vida útil de un producto (Cruz et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para *C. intermedia* se encuentran en la Figura 1 para pH y ° Dórnic. Se puede observar un descenso en el pH para las tres temperaturas evaluadas. A 8 y 12°C, se presentó el mayor descenso en las unidades de pH (0.7 unidades en 39 días) y a la temperatura de refrigeración (4°C), se observó un descenso de 0.3 unidades de pH. Se puede

observar que dicho descenso en el pH o el incremento de los grados Dornic, no están relacionados con la presencia de bioprotectores en el yogurt, puesto que las muestras sin bioprotectores presentaron la misma tendencia (Brabandere y Baerdemaeker, 1999). Los controles presentaron descensos de hasta 0.4 unidades de pH, que al compararlos con los datos de los productos alterados, se consideran diferencias no significativas, sin embargo es necesario realizar pruebas organolépticas que permitan identificar factores alterantes en olor y sabor con la presencia de bioprotectores. En cuanto a los grados °Dornic se observó un incremento en todos los casos sin importar la temperatura evaluada lo que puede estar asociado al metabolismo de los microorganismos presentes y a la dinámica propia de estos productos fermentados durante almacenamiento (Martinussen y *col.*, 2013).

En lo que respecta a los resultados de los conteos microbiológicos, se observó que al inicio del ensayo se registraron crecimientos de la levadura (10^2 UFC/mL) a 12°C, sin embargo en las temperaturas de 4 y 8°C no se evidenció crecimiento durante los 39 días. Los conteos microbiológicos obtenidos 12°C se observan en la Figura 2. Estos resultados corresponden a los ciclos reducidos respecto al control. Se puede observar el efecto inhibitorio de la mezcla de bioprotectores usada al inhibir el crecimiento y la posible alteración del producto por parte de esta levadura.

Para *M. circinelloides* los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 3. En el ensayo de evaluación de vida útil para las tres temperaturas evaluadas, se observó el mismo comportamiento que en la levadura, el mayor descenso de pH se presentó a las temperaturas de abuso 8 y 12°C; para 12°C se registraron pH por debajo de 4.0; a la temperatura de refrigeración (4°C), se observó un descenso de 0,6 unidades de pH a los 39 días. De igual manera, se describió el comportamiento de las muestras que tenían presencia de bioprotectores y microorganismo alterante.

En lo que respecta a los resultados del crecimiento de *M. circinelloides*, se observó que al inicio del ensayo se registró crecimiento del moho con bioprotector y sin bioprotector. Es de destacar que las muestras que tenían bioprotector presentaron un descenso en el diámetro de inhibición de más del 50% en comparación con las que no tenían; al igual que en las levaduras, a 4 y 8°C no se presentó crecimiento del hongo durante los días evaluados. Los resultados de los diámetros de inhibición del hongo a 12°C, se observan en la Figura 4.

CONCLUSIONES

Se logró determinar que el uso de bioconservantes como BAL ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento de microorganismos alterantes (mohos y levaduras) sin alterar el pH del producto evaluado en vida útil. El uso de estos bioprotectores comerciales se convierte en una opción para el control de microorganismos alterantes en productos lácteos fermentados.

REFERENCIAS

- Beletsiotis, E., Ghikas, D., and Kalantzi, K. (2011). Incorporation of microbiological and molecular methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in Greek dairy plant: A case study. *Procedia Food Science*, 1, 1051-1059.
- Brabandere, A. G. De, & Baerdemaeker, J. G. De. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering*, 41, 221–227.
- Cruz, A., Walter, E., Silva, R., Faria, J., Bolini, H., Pinheiro, H., Sant’Ana, A. (2010). Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Research International*, 43, 1444-1448.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., and Le Blay, G. (2012). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*, 30, 206-213.
- de Vuyst, L., y Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
- Jakobsen, M., y Narvhu, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. 6, 755–768.
- Martinussen, J., Solem, C., Holm, A. K. y Jensen, P. R. (2013). Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 124-129.
- Muñoz, R., Arena, M. E., Silva, J., & González, S. N. (2010). Inhibition of mycotoxin producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid band *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1019–1026.
- Rolfe, R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130 (2S), 396S-402S.
- Walstra, P., Wouters, J., y Geurts, T. (2006). *Dairy Science and Technology* (Segunda Edición). ED. Taylor y Francis.
- Welman, A. D., y Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspective and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21, 269-274.

Tabla 1. Combinaciones evaluadas en el ensayo de vida útil.

Muestra	Microorganismo	Bioprotectores	Starter
1	Levadura	si	A
2	Levadura	no	A
3	Moho	si	A
4	Moho	no	A

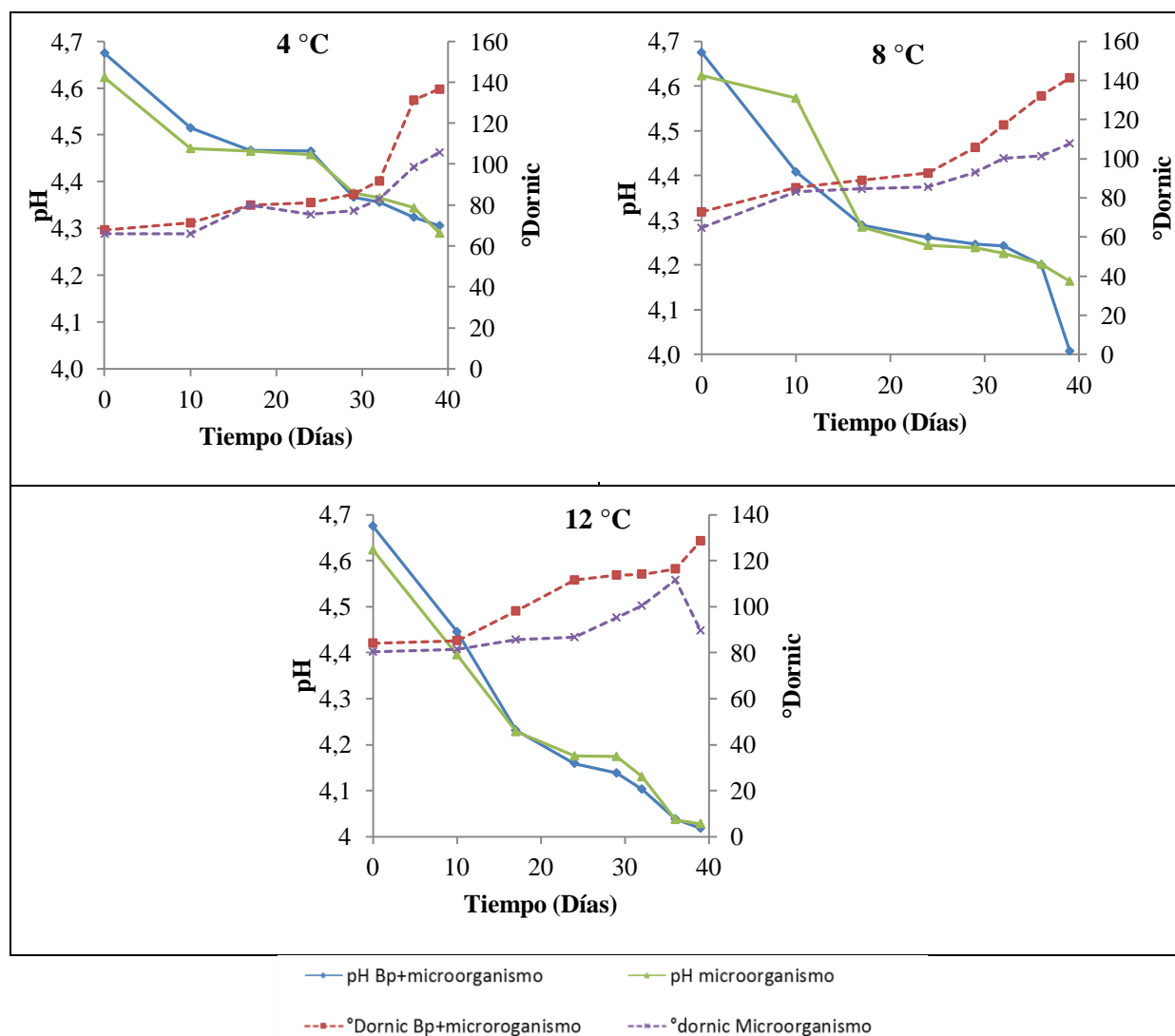


Figura 1. Perfil de pH y °Dornic en vida útil de yogurt inóculado con *C. intermedia*

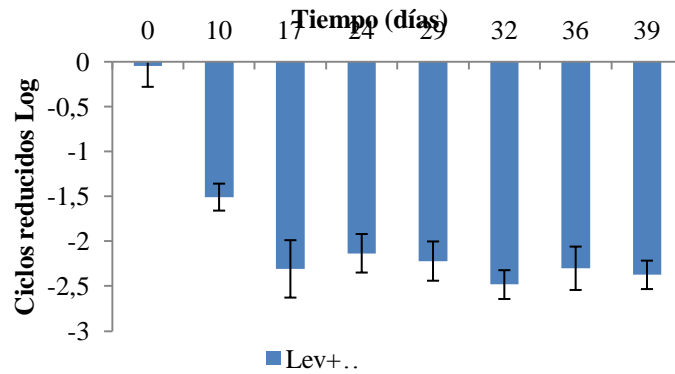


Figura 2. Ciclos Logarítmicos de reducción para levadura respecto al control.

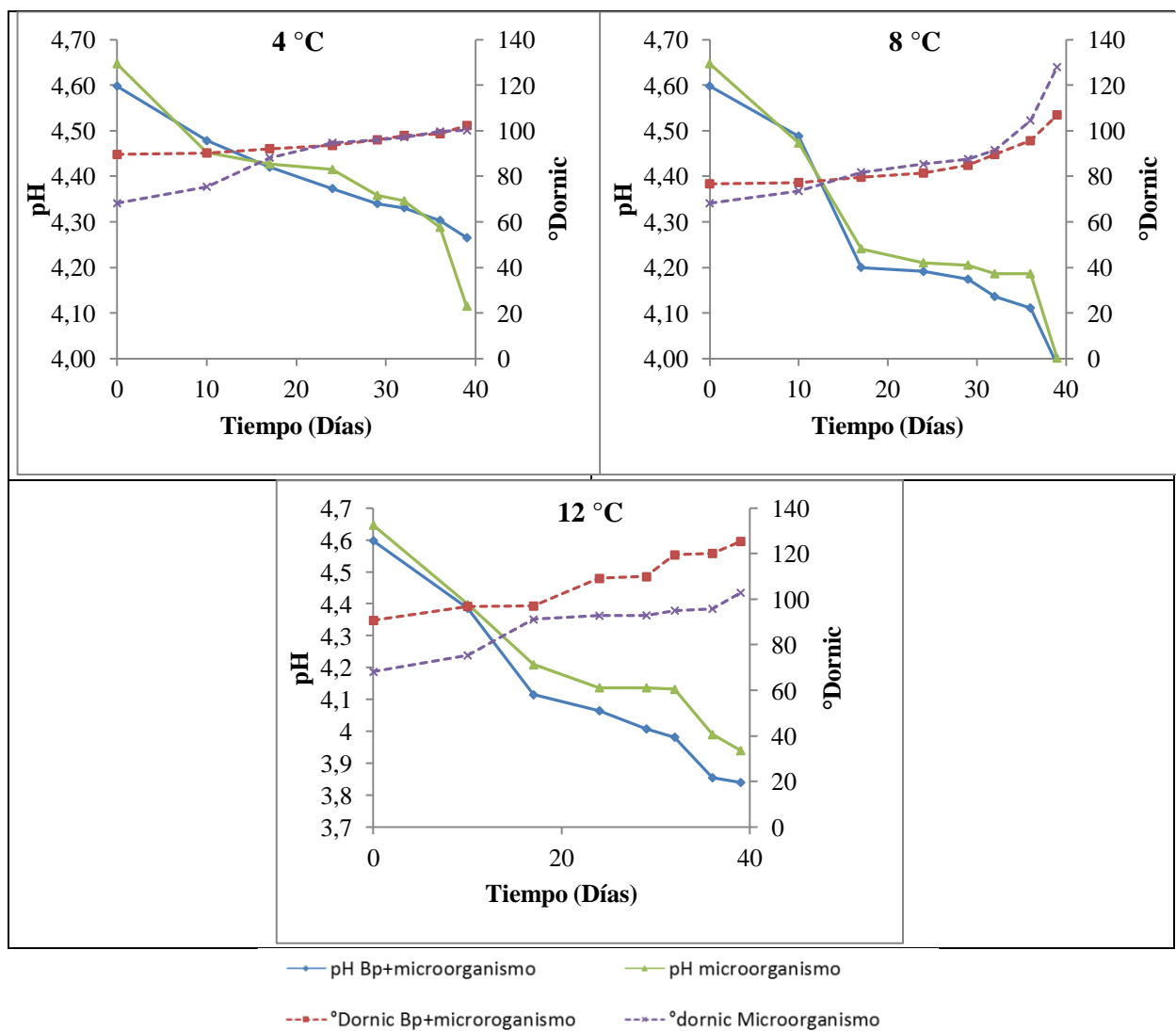


Figura 3. Perfil de pH y °Dórníc en vida útil de yogurt inoculado con *M. circinelloides*.

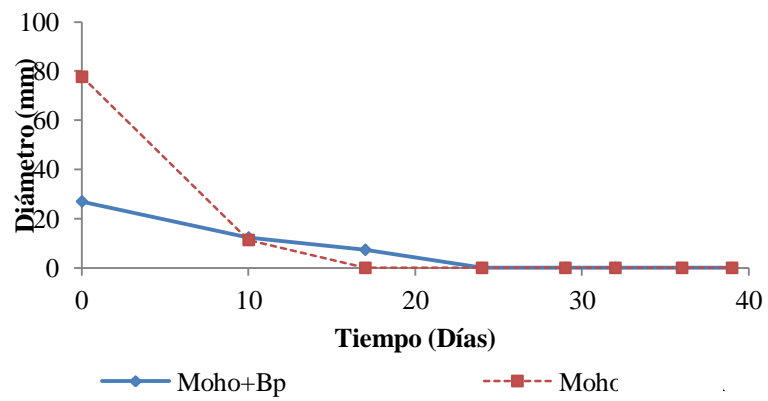


Figura 4. Crecimiento del moho al cabo de los 39 días a 12°C.

CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA DE PULPA DE BOROJÓ (*Borojoa Patinoi* Cuatrecasas) MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA A DIFERENTES ACTIVIDADES DE AGUA (a_w).

Rodríguez-Bernal, J. M.¹, Perea-Flores, M. J.², Flores- Andrade, E.³, Gutiérrez-López, G.⁴, y Quintanilla-Carvajal, M. X.^{1*}.

¹ Ingeniería de Producción Agroindustrial. Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, km 7 vía autopista Norte, Chía, Colombia

² Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, Unidad Profesional “Adolfo López Mateos”, Instituto Politécnico Nacional, México.

³ Facultad de Ciencias Químicas, Zona Cordoba Orizaba, Universidad Veracruzana, México

⁴ Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México

*Autor correspondiente: maria.quintanilla1@unisabana.edu.co, Tel. +5718615555 ext 25216

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del material de pared en un proceso de encapsulación es fundamental al momento de establecer las condiciones de almacenamiento del producto encapsulado (Gibbs et al., 1999). Se ha estudiado el efecto de la actividad de agua (a_w) de los materiales de pared en relación al deterioro, estructura, pegajosidad y apelmazamiento de las microcápsulas (Cai y Corke, 2000; Pérez-Alonso et al., 2008; Pitalua et al., 2010; Liang et al., 2013), sin embargo, la relación con las propiedades de fluorescencia de las mismas, aún no se ha investigado con profundidad (Matiacevich y Pilarbuera, 2006), aunque existen reportes que muestran que su estudio pueden ser útil en la caracterización de materiales biológicos debido a que dichas propiedades dependen de la presencia de moléculas específicas y sus reacciones químicas.

Actualmente, el análisis de imágenes y las técnicas de microscopía son herramientas que facilitan la comprensión de la relación estructura-propiedad-funcionalidad de los biomateriales (Aguilera, Chiralt y Fito, 2003; Aguilera, 2007; Chanona et al., 2008; Quintanilla et al., 2011). Entre estos biomateriales, se encuentra el fruto de Borojón (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas), el cual es originario de la zona pacífica del Choco colombiano y presenta características potenciales por la presencia de compuestos funcionales; el borojón se destaca por sus propiedades nutricionales (Camelo y Sotelo, 2012), su adaptación a diferentes condiciones ambientales (Mosquera, et al., 2011). También se ha proyectado como un fruto con potencial económico por sus posibilidades de exportación (Moreno, Cuesta y Córdoba, 2006) y se considera un insumo importante para la industria alimentaria. En su composición contiene una cantidad significativa de carbohidratos de alto peso molecular (26.2 g / 100 g de pulpa) y una pequeña fracción proteica (0.69 g / 100 g de pulpa) (Mosquera, Moraga y

Martínez-Navarrete, 2010) que en comparación con características similares a otros materiales como la goma arábica, puede ser considerado como un posible material de pared para microencapsulación.

Es por esto, que el objetivo de este trabajo fue identificar los cambios de la intensidad de fluorescencia a diferentes a_w de pulpa de Borojé liofilizada (PBL) como parámetro de calidad y estabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La pulpa de Borojé se adquirió en un mercado local de Bogotá, Colombia. Para el proceso de liofilización se siguió la metodología propuesta por Harnkarnsujarit, Charoenrein y Roos (2012); PBL se obtuvo en un liofilizador de bandejas de laboratorio (Labconco, modelo FreeZone 12 L, Estados Unidos) a una temperatura de 35 °C y una presión de 0.045 mbar, para un proceso de liofilización de 72 horas. Muestras de 1 ± 0.2 g de PBL fueron colocadas en desecadores con pentóxido de fósforo (P_2O_5) a temperatura ambiente durante 3 semanas hasta que se alcanzó el equilibrio. Posteriormente, las muestras fueron ubicadas en celdas de sorción de humedad con soluciones saturadas de sales de LiCl, CH_3COOK , $MgCl_2$, K_2CO_3 , $Mg(NO_3)_2$, $NaNO_2$, NaCl, KCl y K_2SO_4 con actividades de agua de 0.113, 0.291, 0.336, 0.431, 0.529, 0.654, 0.753, 0.843 y 0.973, respectivamente, a una temperatura de 25 °C (Pérez-Alonso et al., 2008). Finalmente, los polvos sometidos de PBL se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ni) con un objetivo plan fluor 40X/075 con filtro B2A (450 a 490 nm y 515 nm de longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente). Las imágenes ópticas y de fluorescencia fueron capturadas con el programa NIS-Elements BR (Nikon Instruments Software, Estados Unidos) y se almacenaron en formato .tiff. Para el análisis de imágenes se utilizó el software ImageJ 1.47v (National Institute of Health, Estados Unidos), donde se realizó una segmentación manual (1.48 x 1.48 cm) por triplicado. Los valores de RGB se convirtieron al espacio de color CIE $L^* a^* b^*$ utilizando el plugin *Color space converter*, donde L^* representa la luminosidad del color (valores cercanos a cero indican negro y valores cercanos a 100 indican blanco), a^* la posición entre rojo y verde (valores negativos indican verde mientras que los positivos indican rojo), y b^* la posición entre amarillo y azul (valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo); finalmente, el cambio de color (ΔE_{ab}^*) se evaluó mediante la ecuación $\Delta E_{ab}^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$, para cambios de fluorescencia entre las diferentes a_w

(Telis y Martínez-Navarrete, 2009). La diferencia significativa de los datos se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se muestran las imágenes ópticas y de fluorescencia obtenidas de PBL. Respecto a los cambios de color expresados como L^* , a^* , b^* y ΔE^*_{ab} se presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la fluorescencia ($p < 0.01$) para las diferentes a_w evaluadas. Para L^* , el valor máximo correspondió a 51.913 con a_w de 0.753 y el valor mínimo a 9.312 correspondiente a una a_w de 0.291. Para el croma a^* , los valores máximos (-24.310) y mínimos (-56.108) corresponden a a_w de 0.291 y 0.654, respectivamente con tendencia a verde. Por último, para el croma b^* , el valor máximo obtenido fue de 55.233 a una a_w de 0.753 y un valor mínimo de 13.711 a una a_w de 0.291. Para cada uno de los parámetros evaluados, se encontraron relaciones matemáticas de tercer orden con R^2 de 0.91, 0.79 y 0.92 para L^* , a^* , y b^* respectivamente (Figura 2). Para el cambio de color, ΔE^*_{ab} , se evidenció el máximo cambio en las muestras a un valor máximo en la a_w de 0.529. En microscopía de fluorescencia, la luz de una longitud de onda es absorbida por moléculas específicas que están presentes en la muestra, y la energía es re-emitida como luz de una longitud de onda más larga y menor intensidad (fluorescencia) (Kal, Allan-Wojm y Miller, 1995). Algunos autores (Chace, Carubelli, y Nordquist, 1991; Fu et al, 1994) observaron, que la evolución de la fluorescencia esta asociada con reacciones intrínsecas que se llevan a cabo en los sistemas biológicos y alimentos como causa de la condensación entre los grupos amino de las proteínas y los grupos carbonilo de azúcares reductores o productos de oxidación de los lípidos (Matiacevich y Buera, 2006). De manera general, las curvas mostraron una etapa inicial de baja fluorescencia, la cuál esta relacionada con la máxima estabilidad del fruto reportado en bajas a_w (Mosquera, Moraga y Martínez, 2010); posteriormente, se encuentra una etapa exponencial para valores medios de a_w , donde se asocia una mayor intensidad de los compuestos presentes en PBL; finalmente, se tiene una etapa lineal correspondiente a los valores máximos de a_w , es probable que la máxima fluorescencia se deba a una mayor exposición de los compuestos fenólicos (Christensen et al., 2005; Matiacevich y Buera, 2006). Finalmente cuando a_w llega a los valores máximos, la fluorescencia tiende a ser constante. Es de resaltar que por medio de este análisis, se puede predecir la a_w de productos como el borrojó despejando la variable x (a_w) de la ecuación.

La caracterización de PBL por medio de este tipo de herramientas brinda la posibilidad de establecer relaciones futuras con otro tipo de materiales de pared para procesos de microencapsulación. Este tipo de marcadores de rápido desarrollo, tienen la ventaja de proporcionar una herramienta para seguir comportamientos tempranos (Matiacevich y Buera, 2006) relacionados con cambios de textura, colapso estructural, pérdida de la relación color / sabor, o daños nutricionales, entre otros, que brindan la posibilidad de establecer parámetros de identificación al comportamiento conformacional de las microcápsulas generadas.

CONCLUSIONES

Por medio de este trabajo, se logró determinar información cualitativa y cuantitativa a partir del análisis de imágenes y modelado matemático donde se caracterizaron los cambios de intensidad de fluorescencia en PBL como parámetro de calidad y estabilidad del producto. Adicional a esto, se propone la búsqueda de herramientas que brinden marcadores de seguimiento a diferentes fenómenos físicos que afecten la calidad final del producto dando la oportunidad de tomar acciones correctivas en tiempos tempranos antes de que se generen reacciones de tipo irreversible.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J.M. (2007). Microstructure and food product engineering. *Food Technology* 54(11), 56-65.
- Aguilera, J. M., Chiralt, A., y Fito, P. (2003). Food dehydration and product structure. *Trends in Food Science & Technology*, 14(10), 432–437.
- Camelo, Gustavo Adolfo, y Luz Indira Sotelo. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el color, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de una bebida Borojoa patinoi Cuatrecasas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11 (2012): 196-205.
- Cai, Y. Z., y Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of food science*, 65(6), 1248–1252.
- Chace, K. V., Carubelli, R., y Nordquist, T. R. (1991). The role of non-enzymatic glycosylation, transition metals, and free radicals in the formation of collagen aggregates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288, 473–480.
- Chanona-Pérez, J., Quevedo, R., Jiménez-Aparicio, A.R., Gumeta-Chávez, C., Mendoza-Pérez, J.A., Calderón-Domínguez, G., Alamilla-Beltrán, L. y Gutiérrez-López, G.F. (2008). Image processing methods and fractal analysis for quantitative evaluation of size, shape, structure and microstructure in food materials. In: *Food Engineering Integrated Approaches*, (G. F. Gutiérrez-López, G. V. Barbosa-Cánovas, J. Welti-Chanes, E. Parada-Arias, eds.), Pp. 277-285. Springer.

- Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R., y Engelsen, S.B. (2005). Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. *Chemical Reviews*, 106 (6), 1979-1994.
- Fu, M.X., Wells-Knecht, K. J., Blackledge, J. A., Lyons, T. J., Thorpe, S. R., y Baynes, J. W. (1994). Glycation, glycoxidation, and cross- linking of collagen by glucose: kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, 43, 676–683.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., y Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 50(3), 213–24.
- Kal, M., Allan-wojm, P., y Miller, S. S. (1995). Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 177–186.
- Liang, R., Huang, Q., Ma, J., Shoemaker, C. F., y Zhong, F. (2013). Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried beta-carotene nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 225–233.
- Matiacevich, S., y Buera, P. M. (2006). A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 95(3), 423–430.
- Moreno, Juan Andres, Cuesta, Carmelo y Córdoba, Salomón. El desarrollo de la floricultura en el departamento del Chocó. 2006. <http://www.asohofrucol.com.co/> (último acceso: 22 de Octubre de 2012).
- Mosquera, L. H., G. Moraga, y N. Martínez-Navarrete. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borjón (Borojoa patinoi Cuatrec.) powder. *Journal of Food Engineering* 97 (2010): 72-78.
- Mosquera, Luz H., G. Moraga, P. F. Córdoba, y N. Martínez-Navarrete. Water Content - Water Activity - Glass Transition Temperature Relationships of Spray-Dried Borjón as Related to Changes in Color and Mechanical Properties. *Food Biophysics* 6, n° 3 (2011): 397-406.
- Harnkarnsujarit, Nathdanai, Sanguansri Charoenrein, y Yrojö H. Roos. Microstructure formation of maltodextrin and sugar matrices in freeze-dried systems. *Carbohydrate Polymers* 88 (2012): 734-742.
- Pérez-Alonso, C., J. Cruz-Olivares, J. F. Barrera-Pichardo , M. E. Rodríguez-Huezo, J. G. Baéz-González, y E. J. Vernon-Carter. DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices. *Journal of Food Engineering* 85 (2008): 613-624.
- Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E. J., y Beristain, C. I. (2010). Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 253–258.
- Quintanilla-Carvajal, María Ximena; Meraz-Torres, L. ., Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J. J., Terres-Rojas, E., Hernández-Sánchez, H., Jimenez-Aparicio, A., y Gutiérrez-López, G. F. (2011). Morphometric characterization of spray-dried microcapsules before and after-tocopherol extraction. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 301–312.
- Telis, V. R. N., y Martínez-Navarrete, N. (2009). Collapse and Color Changes in Grapefruit Juice Powder as Affected by Water Activity, Glass Transition, and Addition of Carbohydrate Polymers. *Food Biophysics*, 4, 83–93.

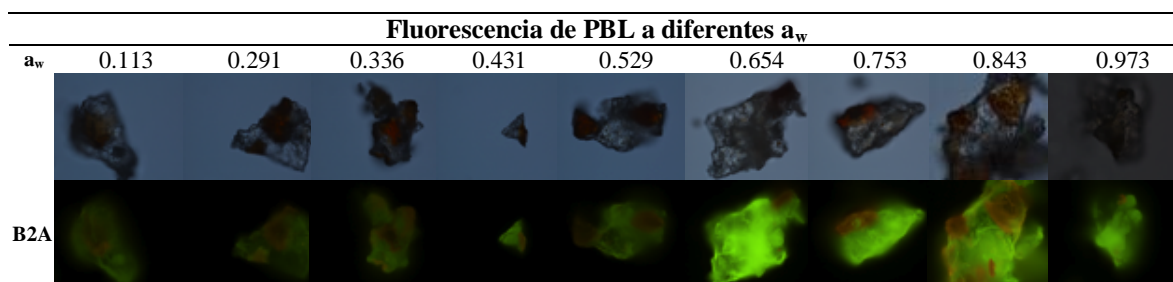


Figura 6. Imágenes Ópticas y de Fluorescencia de PBL 40X a diferentes condiciones de a_w .

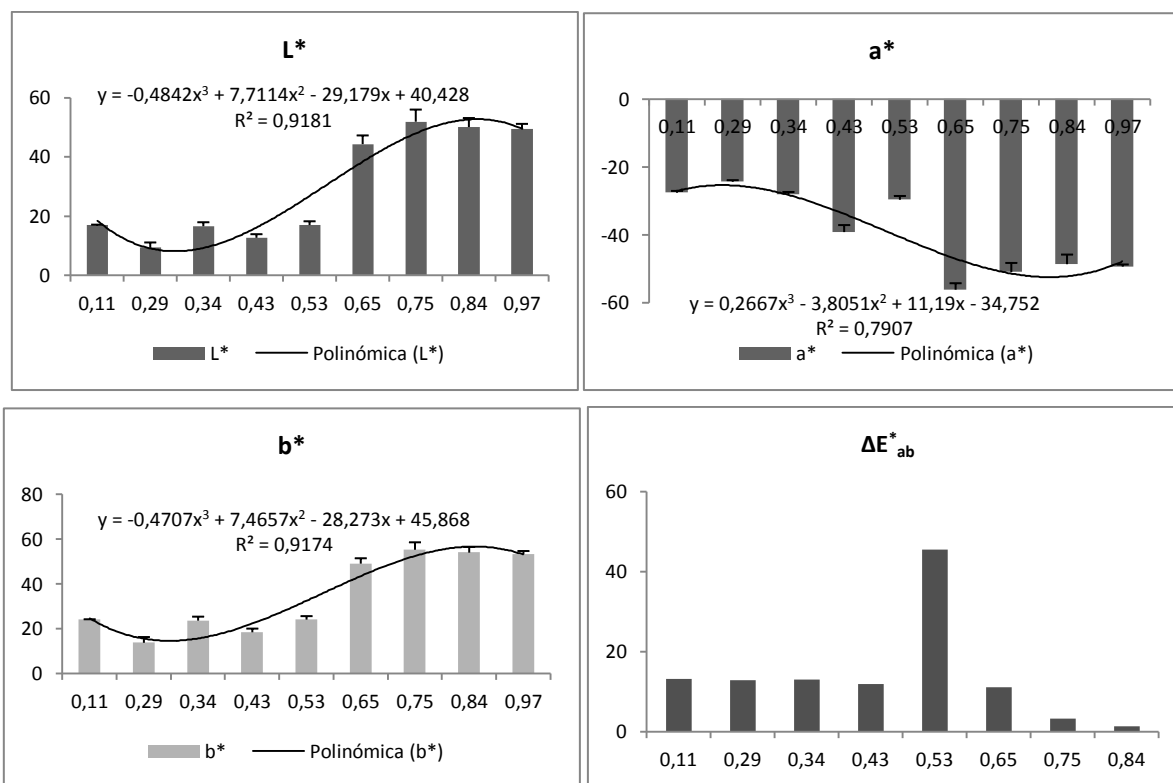


Figura 7. Correlación de parámetros L^* a^* b^* y ΔE^*_{ab} evaluados en imágenes de fluorescencia de PBL a diferentes a_w

EFFECTO DE LA FUENTE DE HIERRRO SOBRE EL COLOR DE HARINA DE BANANO FORTIFICADO SECADO POR ESTUFA.

Oscar E. Romo C.¹, Gustavo Adolfo Camelo-Méndez², María Ximena Quintanilla-Carvajal^{1*}

¹Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación de Procesos Agroindustriales, Campus del Puente del Común, Km. 7, Autopista Norte de Bogotá. Chía, Cundinamarca, Colombia.

²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Yautepec, Morelos, México.

*Autor de correspondencia: mariaquicar@unisabana.edu.co

INTRODUCCIÓN.

El banano Gros Michel (*Musa* spp.), es una de las frutas tropicales importantes por su alto contenido en azúcar y es cultivado en muchos países a pesar de su alta susceptibilidad al deterioro. Se procesa por diversos métodos siendo el secado convencional por aire caliente, el más antiguo utilizado en la conservación de alimentos, y ha sido ampliamente aplicado para el secado de banano (Wang et al., 2007; Baini y Langrish, 2007; Pan et al., 2008; Da Silva et al., 2013).

Muchos de los productos secos son enriquecidos a partir de la fortificación múltiple, técnica que está ganando popularidad ya que contribuye a contrarrestar niveles de malnutrición de micronutrientes en los países en vía de desarrollo (Akhtar et al., 2008). Las cuatro formas más comunes de malnutrición de micronutrientes son, vitamina A, hierro, yodo y zinc (Allen et al., 2006). La suplementación de dichos compuestos, específicamente el hierro, se da a través de la fortificación masiva de productos secos como las harinas (Lynch, 2005).

El color es uno de los atributos más importantes de la calidad de los productos alimenticios secos, debido a su relación con el sabor, y aroma de productos deshidratados (Krokida et al. , 1998; Emerton, 2008) y puede medirse mediante métodos instrumentales o de visión computarizada (Balaban y Odabasi, 2006) . Es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la fuente de hierro sobre el color de harina de banano fortificado secado por estufa.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Preparación de la muestra

Los guineos Gros Michel, fueron comprados en un mercado local en Bogotá, Colombia en estado vegetativo verde con grado de maduración 1 y 2. Se realizó una inmersión en ácido cítrico de 10g/L (Pan et al, 2008). Los guineos se pelaron, pesaron y

cortaron para seguir al proceso de molienda húmeda hasta convertirlo en puré en una proporción 1:1 de agua y pulpa de banano utilizando un homogenizador de alimentos (Oster, USA). Posteriormente, 5 ± 0.01 g se colocaron dentro de una caja de Petri de vidrio de 5 cm de diámetro y 1.5 cm de profundidad por triplicado para cada tratamiento. La pulpa de banano se fortificó al 5%(p/p) con dos diferentes fuentes de hierro: Sunactive, pirofosfato férrico micronizado dispersable encapsulado, (Taiyo Kagaku co ltd, Japón) y Nutranate, gluconato ferroso (dihidrato) no encapsulado, (Nutragal ltd, Israel).

Proceso de secado

Las muestras se sometieron a dos diferentes temperaturas de secado: 50°C y 90°C. Se utilizó una estufa de laboratorio (Mettler, Holanda) con aire caliente; cada 20 minutos se tomaban las muestras y se realizaba la captura de imagen de cada una. El proceso se siguió durante 480 min y 180 min, para las muestras sometidas a 50°C y 90°C respectivamente.

Captura de imagen

La captura de imagen se realizó utilizando una cámara Alpha 380 (Sony, Japón) acoplada a una cabina con condiciones estandarizadas de luz y distancia focal, D65 y 20 cm respectivamente. Las imágenes se almacenaron en formato .jpeg y posteriormente fueron evaluados sus los valores mínimos, medios y máximos de las coordenadas $L^*a^*b^*$ utilizando el *plugin* “Color Space Converter” del software ImageJ (National Association of Health, USA) para registrar las propiedades visuales de los productos durante el secado. Finalmente se determinó el cambio de color (ΔE^*_{ab}) entre la muestra sin fortificar y las fortificadas con hierro usando la ecuación que se describe a continuación (Falade, Igbeka y Ayanwuyi, 2006).

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

Donde:

$\Delta L = L^*_{muestra} - L^*_{referencia}$.

$\Delta a = a^*_{muestra} - a^*_{referencia}$.

$\Delta b = b^*_{muestra} - b^*_{referencia}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para cada tratamiento de secado, a partir de las imágenes capturadas se obtuvieron las coordenadas de color CIELAB de las muestras durante el proceso de deshidratación. En la Figura 1, se presentan los cambios de claridad L^* a 50°C y 90°C durante el tiempo de secado; dicho valor osciló entre 53 y 85 para las muestras evaluadas a 50°C y para aquellas sometidas a 90°C el valor de L^* osciló entre 56 y 83. Se puede apreciar que la muestra de

pure no encapsulado (Blanco) presentó la mayor claridad frente a las demás sometidas a las mismas condiciones, sin embargo, se puede apreciar que la forificación no afecta la percepción de claridad de las muestras. Finalmente se pudo determinar que a partir de los primeros 20 minutos de secado hay una tendencia a la disminución de la claridad L^* que podría estar atribuida al pardeamiento no enzimático y formación de pigmentos resultantes de la reacción de Maillard entre grupos carbonilo y amino libres, es decir, entre azúcares reductores y aminoácidos (Haard, 1992). Otros autores relacionan dicha opacidad con la contracción estructural que pueden sufrir las muestras debido a la evaporación de la humedad (Contreras et al., 2008).

En la figura 2 se pueden observar los cambios obtenidos del parámetro a^* (que comprende los cambios de verde a rojo) a 50°C durante el tiempo de procesamiento. Los valores obtenidos variaron en un intervalo de -2 a 9, siendo más notorio el cambio en la harina de banano fortificado con hierro encapsulado. Se puede apreciar que las otras dos muestras mantienen un comportamiento similar durante toda la cinética. Sin embargo, dicho comportamiento no se da en las harinas obtenidas a 90°C. Algunos autores sugieren que el β -caroteno es el ingrediente que más afecta el enrojecimiento de muestras secas debido a que a temperaturas altas incrementa su tasa de retención (Karabulut et al., 2007).

La figura 3 indica la variación de b^* (que comprende los cambios de azul a amarillo) a 50°C y 90°C, se puede observar que los valores oscilaron entre 3 - 14 y 2 - 10 a 50 y 90°C respectivamente, se destaca la muestra de harina de banano no encapsulado que no presenta una tendencia específica a 90°C. Algunos autores relacionan dichos cambios con la reacción de Maillard sensible al calor y dependiente de la temperatura (pardeamiento no enzimático) (Chua et al, 2002; Niamnuy et al., 2007; Hosseinpour et al., 2013).

Finalmente, en la figura 4 se observa que el menor cambio de color ΔE^*_{ab} se obtiene a 50°C al usar como fuente de hierro el material encapsulado. Debido al efecto directo de la temperatura de secado, el cambio de color se incrementa en los componentes sensibles al calor como azúcares, aminoácidos, ácido, proteínas y vitaminas (Hawlder et al., 2006).

CONCLUSIONES.

De modo general y teniendo en cuenta las diferentes características de color de las muestras de harina de banano sin fortificar y harina de banano fortificada con diferentes fuentes de hierro, es posible observar que la deshidratación provocó cambios en los parámetros evaluados a las diferentes temperaturas. El cambio de color observado puede ser consecuencia de reacciones de pardeamiento no enzimático, que se dan a temperaturas

moderadas y de caramelización de azúcares, que requieren temperaturas más altas. Finalmente, el análisis de imagen permitió evaluar los cambios en color de una manera cuantitativa y objetiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Akhtar Saeed, Anjum F.M., Rehman Salim-Ur, Sheikh Munir A. , Farzana Kalsoom (2008) Effect of fortification on physico-chemical and microbiological stability of whole wheat flour. *Food Chemistry*. 110(1), 113–119.
- Allen, L., de Benoist, B., Dary, O., Hurrell, R., (2006). Guidelines on food fortification with micronrient. In: World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Baini, R., & Langrish, T. a. G. (2007). Choosing an appropriate drying model for intermittent and continuous drying of bananas. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 330–343.
- Balaban, M.O., Odabas,A.Z., 2006. Measuring color with machine vision. *Food Technology* 60 (12), 32–36.
- Contreras, C., Martin-Esparza, M.E., Chiralt, A., Martinez-Navarrete, N., 2008. Influence of microwave application on convective drying: effects on drying kinetics and optical and mechanical properties of apple and strawberry. *Journal of Food Engineering* 88 (1), 55–64.
- Chua, K.J., Hawlader, M.N.A., Chou, S.K., Ho, J.C., 2002. On the study of time-varying temperature drying—effect on drying kinetics and product quality. *Drying Technology* 20 (8), 1559–1577.
- Da Silva, W. P., e Silva, C. M. D. P. S., Gama, F. J. a., & Gomes, J. P. (2013). Mathematical models to describe thin-layer drying and to determine drying rate of whole bananas. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10.1016
- Emerton, V., 2008. *Food Colours*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Falade Kolawole O., Igbeka Joseph C., Ayanwuyi Funke A..(2006). Kinetics of mass transfer, and colour changes during osmotic dehydration of watermelon. *Journal of Food Engineering* 80 (2007) 979–985.
- Haard, N.F., 1992. Biochemistry and chemistry of color and color changes in seafoods. In: Flick, G.J., Martin, R.E. (Eds.), *Advances in Seafood Biochemistry: Composition and Quality*. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, PA, pp. 305–360.
- Hawlader, M.N.A., Perera, C.O., Tian, M., Yeo, K.L., 2006. Drying of guava and papaya: impact of different drying methods. *Drying Technology* 24 (1), 77–87.
- Hosseinpour, S., Rafiee, S., Mohtasebi, S. S., & Aghbashlo, M. (2013). Application of computer vision technique for on-line monitoring of shrimp color changes during drying. *Journal of Food Engineering*, 115(1), 99–114.
- Karabulut, I., Topcu, A., Duran, A., Turan, S., Ozturk, B., (2007). Effect of hot air drying and sun drying on color values and b-carotene content of apricot (*Prunus armenica* L.). *LWT – Food Science and Technology* 40 (5), 753–758.
- Krokida, M.K., Tsami, E., Maroulis, Z.B., 1998. Kinetics on color changes during drying of some fruits and vegetables. *Drying Technology* 16 (3–5), 667–685.

Lynch Sean R. (2005) The impact of iron fortification on nutritional anaemia. Department of Internal Medicine, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA, USA.

Niamnuy, C., Devahastin, S., Soponronnarit, S., 2007. Effects of process parameters on quality changes of shrimp during drying in a jet spouted bed dryer. *Journal of Food Science* 72 (9), 553–563.

Pan, Z., Shih, C., McHugh, T. H., & Hirschberg, E. (2008). Study of banana dehydration using sequential radiation heating and freeze-drying. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1944-1951.

Wang, J., Li, Y., Chen, R., Bao, J., & Yang, G. (2007). Comparison of volatiles of banana powder dehydrated by vacuum belt drying, freeze-drying and air-drying. *Food Chemistry*, 104(4), 1516–1521.

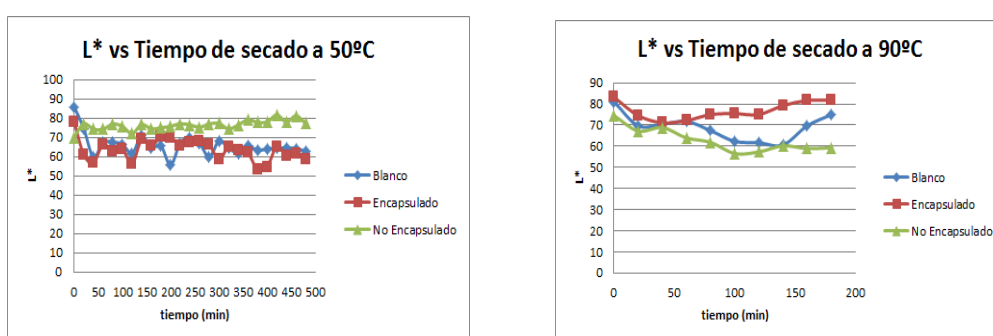


Figura 1. Perfil de la claridad (L^*) de harinas de banana fortificado con hierro a 50 y 90°C.

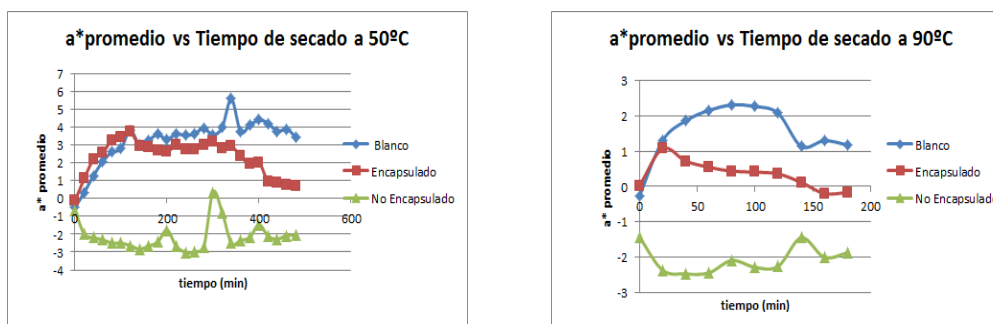


Figura 2. Perfil de la coordenada a^* vs tiempo a 50 y 90°C.

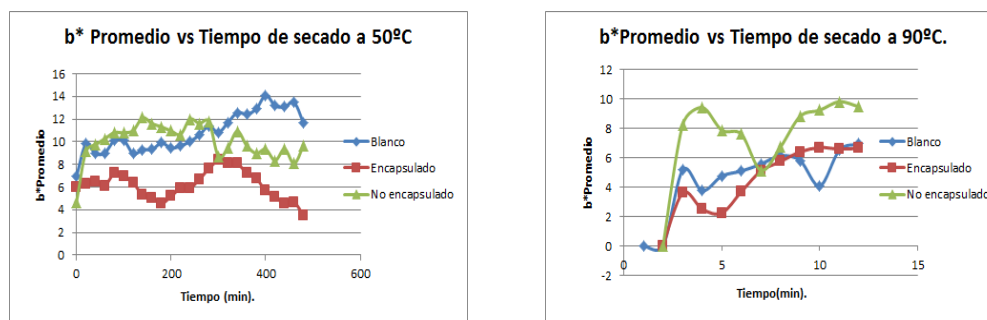


Figura 3. Perfil de las coordenada b^* vs tiempo a 50 y 90°C.

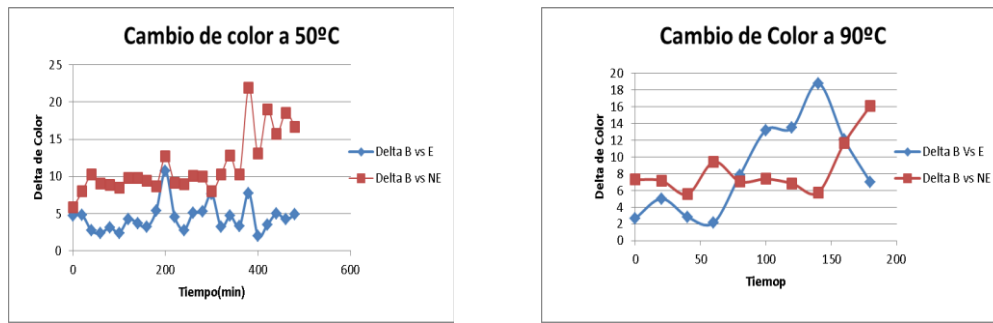


Figura 4. Cambio de color a a 50 y 90°C.

EFEECTO DE LA INCORPORACIÓN DE MMT EN LA ABSORCIÓN DE HUMEDAD Y EN LA PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA DE PELÍCULAS DE HARINA DE ARROZ Y HARINA DE PLÁTANO.

Rodríguez-Marín, M.L., González-Soto, R.A., Bello-Pérez, L.A.

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CEPROBI No 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México, C.P. 62731.

INTRODUCCIÓN

Las películas de almidón presentan limitadas propiedades de barrera. Por lo que una estrategia para contrarrestar esta deficiente propiedad ha sido adicionar macromoléculas, tales como proteínas, lípidos, y polisacáridos. En este sentido, se ha explorado el uso de harinas, ya que estas son una mezcla natural de macromoléculas (lípidos, proteínas, polisacáridos) y debido al efecto sinérgico de los componentes de las harinas se espera que las propiedades de barrera de las películas resultantes se mejoren. En estudios recientes se ha reportado que las películas elaboradas con harina de plátano, tienen baja permeabilidad al oxígeno, comparadas con películas de metilcelulosa y de proteína de trigo. Lo que sugiere que estas películas pueden tener un uso potencial, empleándose como empaques naturales para proteger alimentos de reacciones de oxidación (García y col., 2000; Souza y Andrade, 2001; Mali y col., 2004; Sothornvit y Pitak, 2007). Por otro parte, la montmorillonita (MMT) tienen un papel importante en las propiedades de barrera de películas nanocompuestas de almidón, ya que inhiben la difusión de moléculas permeantes (vapor de agua y oxígeno). Diversos autores han reportado un mejoramiento en las propiedades de barrera de películas de almidón por efecto de la MMT (Kampeerappun y col., 2007; Cyras y col., 2008; Müller y col., 2011). En este trabajo se adiciono MMT a películas de harina de arroz y plátano para evaluar su efecto en la disminución de absorción de agua y en la permeabilidad al vapor de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Isotermas de sorción

Las isotermas de sorción de humedad de las películas fueron medidas a 25 °C, usando soluciones salinas saturadas para obtener diferentes humedades relativas (22 %, 33 %, 42 %, 52 %, 70 %, 75 %, 84 % y 90 %). Inicialmente, las muestras se secaron durante 2 h, posteriormente se colocaron en desecador para enfriar a temperatura ambiente. Se usaron charolas a peso constante para colocar las muestras. Se registraron los pesos de las charolas

vacías, de las muestras (0.5 g de muestra aproximadamente para cada replica). Las charolas con las muestras se colocaron en desecadores con humedad relativa controlada. Los desecadores se colocaron dentro de una estufa manteniendo la temperatura constante de 25°C. Se pesaron las muestras cada tercer día hasta que el peso se mantuvo constante. Se registró el último peso y se secaron las charolas con muestra en una estufa a 80 °C hasta peso constante y se volvieron a pesar las charolas. Se usó la ecuación de BET para calcular el valor de la monocapa.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA) a diferentes humedades relativas.

Para evaluar el efecto del almacenamiento a humedades relativas controladas en los valores de PVA, las películas fueron almacenadas a tres humedades relativas 40 %, 75 % y 90 % durante 7 días. Transcurrido este periodo de almacenamiento, se determinó la permeabilidad al vapor de agua, empleando el método gravimétrico estándar de la ASTM, E 96-80 (ASTM, 1989) conocido como el “método de la copa” o “celda de prueba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adsorción de humedad es un índice importante de la sensibilidad de las películas a la humedad del ambiente. Las curvas de sorción de las películas de harina de plátano y de harina de arroz adicionadas con MMT se muestran en la figura 1.

Las películas mostraron un valor similar de contenido de agua en un intervalo de A_w entre 0.22 a 0.58. Puede notarse que la forma de la isoterma es de tipo II (sigmoideal), esta forma corresponde a la clasificación del tipo de isotermas de UIPAC y Brunauer.

Estas isotermas tipo II presentan una pendiente leve a baja A_w , formando un punto de inflexión y un incremento exponencial a alta A_w , tal como se observa en la figura 1. A valores de A_w mayores de 0.62, se observa un aumento en los valores de contenido de agua en las películas. Este comportamiento ha sido atribuido al carácter hidrofílico del almidón, y que debido a la presencia del glicerol se ha observado que el carácter hidrofílico del almidón aumenta (Mali y col., 2002).

Sin embargo, en este trabajo no se observan diferencias en los valores de absorción de humedad entre las películas debido a la presencia de MMT, ya que las interacciones entre el glicerol, almidón, y los demás componentes de las harinas (fibra, proteínas, lípidos) ocupan la mayoría de los sitios (-OH) enlazantes de moléculas de agua, dejando pocos sitios disponibles (Majdzadeh-Ardakani, y col., 2009). Las películas presentaron los siguientes valores de adsorción de humedad en la monocapa, $HP_{Control}= 0.0128$, $HP_{MMT} =0.0126$; $HAC_{Control} 0.0134$, $HAMMT 0.0128$.

El valor más bajo de la monocapa se obtuvo para la muestra HAMMT Asimismo, por arriba de 0.82 de A_w la película HAMMT mostró un incremento en el contenido de humedad, esto puede ser atribuido a las interacciones entre la MMT y los componentes no amiláceos de la harina de arroz (proteínas), lo cual provoca una estructura laminada abierta con sitios disponibles para las moléculas de vapor de agua, como fue descrito por Gorrasi y col. (2003).

Los valores de permeabilidad de las películas de harina de arroz y harina de plátano adicionadas con montmorillonita de sodio se muestran en la figura 2, podemos observar que las películas adicionadas con MMT presentan valores más bajos de PVA que su película control.

Debido a que el almidón puede formar enlaces puente de hidrogeno con los grupos hidroxilos de la MMT y esta estructura podría reducir la difusión de las moléculas de vapor de agua a través del material. Un comportamiento similar ya ha sido reportado por diversos autores (Huang y col., 2004; Huang y col., 2006; Cyras y col., 2008; Carvahlo y col., 2001).

Por otro lado el efecto de la humedad relativa en la permeabilidad al vapor de agua a humedades de 40 y 75 % no fue significativo. Sin embargo a 90 % se observa para todos los casos una disminución de la PVA. Este comportamiento es consistente con lo observado en las isothermas de sorción en donde a humedades relativas por encima de 75 % hay un incremento en el contenido de agua. En las películas de harina de arroz se observó que al incrementar la HR disminuye la PVA, lo cual se debe a que durante el almacenamiento a HR altas, se saturan los sitios de enlace de las moléculas de agua. Y en el caso de las películas de harina de plátano, los componentes de esta harina (fibra y almidón, entre otros) al interactuar con la MMT permiten obtener una estructura amorfa con espacios intermoleculares que permite el paso de las moléculas de agua (Godbillot y col., 2006).

CONCLUSIONES

El carácter higroscópico de las películas nanocompuestas tanto de harina de arroz como de harina de plátano aumenta a humedades relativas mayores al 75 %.

A humedades relativas altas (90 %) la permeabilidad al vapor de agua de las películas nanocompuestas de ambas harinas disminuye.

BIBLIOGRAFÍA

- ASTM (1989). Standard methods for water vapor transmission of materials (E96-80). Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Cyras, V., P., Manfrendi, L., B., Ton-That, M., Vazquez, A. 2008. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites films. *Carbohydrate Polymers*. 73: 55-63.
- García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E, 2000. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coating. *Food Chemistry and Toxicology*. 65 (6):941-947.
- Godbillot, L., Dole, P., Joly, C., Rogé, B., Mathlouthi, M. 2006. Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry*. 380-386.
- Gorrasi, G. Tortora, M., Vittoria, V., Pollet, E., Lepoittevin, B., Alexandre, M., Dobbois, P. 2003. Vapor barrier properties of polycaprolactone montmorillonite nanocomposites: effect of clay dispersion. *Polymer*. 44: 2271-2279.
- Huang, M., Yu, J., Ma, X. 2006. High mechanical performance MMT-urea and formamide-plasticized thermoplastic cornstarch biodegradable nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 63: 393-399.
- Huang, M-F., Yu, J-G., Ma, X-F. 2004. Studies of the properties of Montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. *Polymer*. 45: 7017-7023.
- Kampeerappun, P., Aht-ong, D., Pentrakoon, D., Srikulkit, K. 2007. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydrate Polymers*. 67: 155-163.
- Majdzadeh-Ardakani, K., Navarchian, A. H., Sadeghi, F. 2009. Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrates Polymers*. In press.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N. and Zaritzky, N. E. 2004. Barrier, mechanical and optical of plasticized yam starch films. *Carbohydrates Polymers*. 129-135.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N. and Zaritzky, N. E. 2002. Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrates Polymers*. 50: 379-386.
- Sothornvit R., Pitak, N. 2006. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International*. 40: 365-370.
- Souza, R.C., Andrade, C.T. 2000. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 10 (1): 24-30.

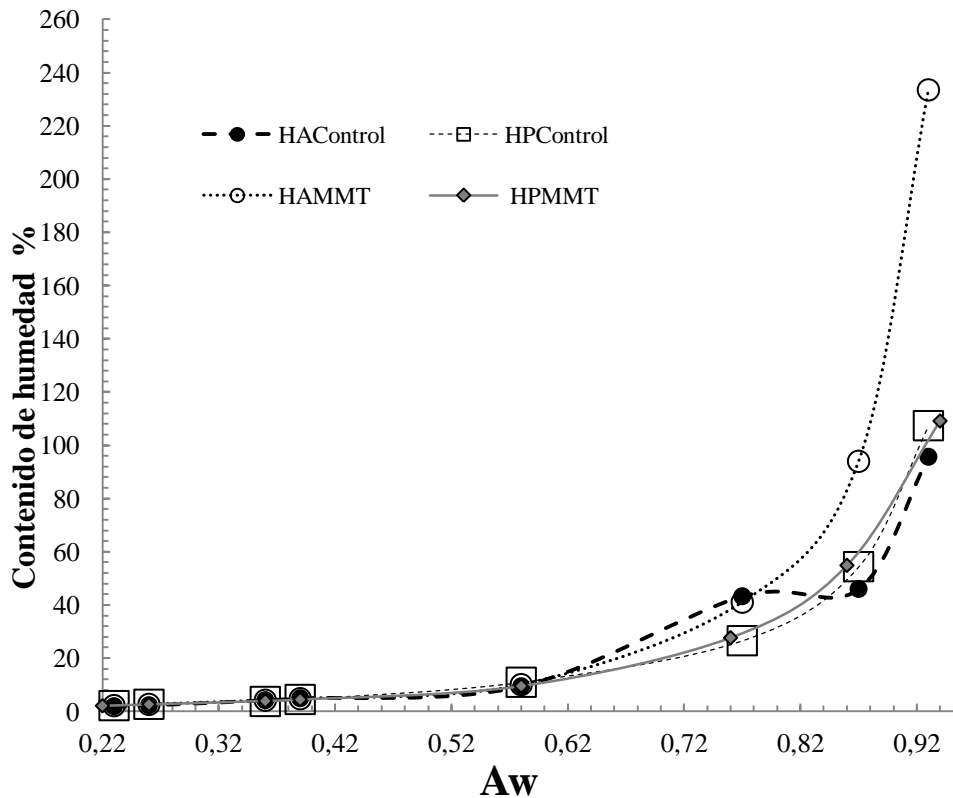


Figura 1. Curvas de isotermas de sorción de humedad de las películas de harina de arroz (HA) y harina de plátano (HP) adicionadas con MMT.

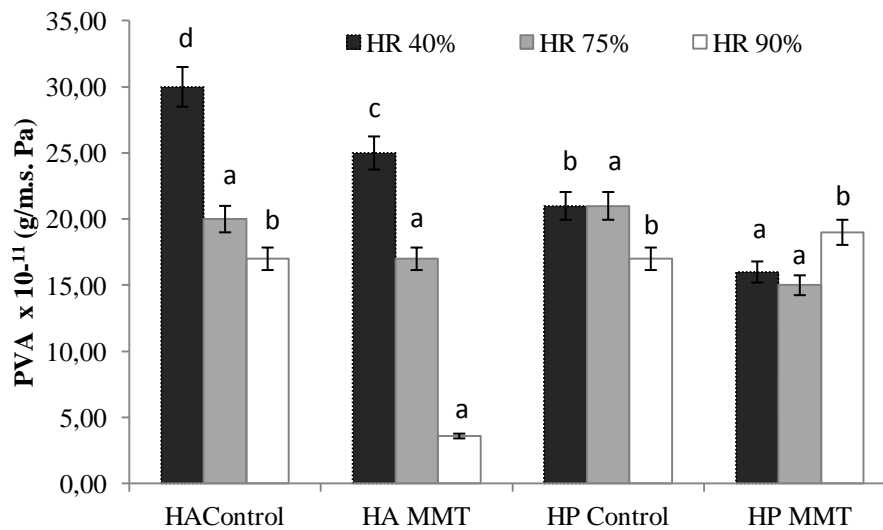


Figura 2. Permeabilidad al vapor de agua de las películas nanocompuestas de harina de arroz (HA) y harina de plátano (HP) adicionadas con MMT y acondicionadas a 40 %, 75 % y 90% de humedad relativa (HR). Barras de error estándar con letras iguales no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

PELÍCULAS DE ALMIDÓN DE PAPA DOBLEMENTE MODIFICADO: EVALUACIÓN REOLÓGICA DE LAS SOLUCIONES FILMOGÉNICAS Y SUS PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE BARRERA.

González-Soto, Rosalía A., Núñez-Santiago, Carmen, Gutiérrez-Meráz, Felipe y Bello-Pérez, Luis A.

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN (CEPROBI-IPN), Apartado postal, C.P. 62731, Yauatepec, Morelos, México. Tel: +52 735 39 42020, Fax: +52735) 39 41896. Correo electrónico: rsoto@ipn.mx

INTRODUCCIÓN

El uso de polímeros sintéticos para la elaboración de materiales de empaque ha generado un problema ambiental relacionado con la acumulación de desechos sólidos, ya que estos materiales son resistentes a la degradación ambiental. Por ello actualmente existe un gran interés por el desarrollo de materiales biodegradables. El almidón es un polímero natural abundante en la naturaleza y mediante su procesamiento, se convierte en un material termoplástico que posee buenas propiedades físico-químicas, es inocuo, barato, no alergénico y renovable); por este hecho, actualmente el almidón es uno de los biopolímeros más comúnmente estudiados en la elaboración de empaques biodegradables. El almidón termoplástico se obtiene después del desordenamiento y ruptura de sus moléculas, cuando éste es sometido a un proceso termomecánico en presencia de agua y plastificantes como el glicerol (Majdzadeh-Ardakani y col., 2009). Sin embargo, la naturaleza hidrofílica del almidón termoplástico lo hace sensible a la humedad ambiental, y la presencia de un alto nivel de glicerol refuerza este comportamiento. Durante el almacenamiento, el almidón termoplástico tiende a cambiar su estructura, llegando a ser más quebradizo (Soest y col., 1996). Por lo anterior se han realizado diferentes modificaciones en el almidón para cambiar ciertas características como la sensibilidad al agua. El entrecruzamiento y la acetilación hacen al almidón más hidrofóbico y por lo tanto pueden modificarse también otras propiedades de las películas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una doble modificación química por entrecruzamiento y acetilación en el almidón de papa, sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas elaboradas por casting y hacer una evaluación reológica de sus soluciones filmogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron almidón de papa nativo y modificado por entrecruzamiento y acetilación (Industrias Alimenticias FABP, S.A. de C.V). Se elaboraron las películas a través de gelatinización térmica o casting, mediante el método propuesto por Mali y col. (2004). Se mezclaron directamente el almidón nativo y modificado con el glicerol y con el agua destilada. La solución se calentó en una parrilla hasta 100 °C durante 20 min, para finalmente enfriar a 65 °C, manteniéndose en agitación constante durante 1 h. Las suspensiones gelatinizadas se vaciaron inmediatamente sobre cajas de Petri estériles de poliestireno. Las suspensiones se secaron a 45 °C en una estufa durante 16h, transcurrido este tiempo, se desprendieron las películas de las cajas de Petri. Estas se almacenaron a 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 57 %, provista de una solución saturada de NaBr.

Para analizar la reología de las soluciones filmogénicas, se hicieron barridos de deformación de 0.1 a 300 seg^{-1} a las soluciones antes de ser vaciadas en las placas.

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua se utilizó el método E96 de la ASTM (American Society for Testing and Materials) (1986) con algunas modificaciones. Cada muestra de película se colocó en una celda de prueba con un área circular abierta de 0.000264 m^2 la cual contenía cloruro de calcio anhidro (aproximadamente 0 % HR). Estas celdas se colocaron en desecadores con una solución sobresaturada de cloruro de sodio (75 % HR). La humedad relativa del interior de las celdas fue menor que la exterior y el transporte de vapor de agua se determinó por una ganancia de peso en la celda de permeación. Después de que se alcanzó el estado estacionario, se pesaron las muestras cada hora por un periodo de tiempo de 8 h.

Las pruebas mecánicas se realizaron con un texturómetro TA.XT2i. Se usaron muestras de 8 cm. de largo y 0.7 cm. de ancho y al menos 4 muestras se usaron para cada formulación. La distancia entre las pinzas será de 6 cm. y la velocidad del ensayo de 10 mm/min. La fuerza máxima a la ruptura y la extensión al momento de la ruptura se obtuvo de las curvas de la fuerza vs. deformación de acuerdo al método de la ASTM D882-91.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La acetilación es una modificación química del almidón por esterificación, en el cual se sustituyen sus grupos hidroxilos por grupos acetilos ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) que le brindan mayor estabilidad, variando sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, aun teniendo un bajo grado de sustitución; la introducción de grupos acetilos, provee al almidón estabilidad y resistencia a la retrogradación, aumenta su hidrofobicidad dependiendo de la longitud de

cadena y del grado de sustitución del almidón, lo cual provoca que sea soluble en otros polímeros hidrofóbicos (acetona, cloroformo, etc.) (Saartrat et al., 2005).

El entrecruzamiento consiste en la formación de puentes entre las cadenas de glucosa que forman el almidón. El entrecruzamiento es realizado por el tratamiento del almidón granular con reactivos multifuncionales capaces de formar enlaces éter o éster con los grupos hidroxilos del almidón. Estas reacciones se llevan a cabo fácilmente por tratamiento con el producto adecuado en presencia de un álcali diluido, y modifican muy poco la estructura, ya que se forman puentes solamente entre 1 de cada 200 restos de glucosa como máximo. Los almidones entrecruzados son utilizados ampliamente como espesantes en los alimentos, particularmente cuando es necesario obtener una viscosidad alta y estable. El entrecruzamiento minimiza la ruptura de los gránulos, la pérdida de la viscosidad y la formación de una pasta fibrosa durante el cocimiento. (Rutenberg y Solarek, 1984).

En este trabajo se evaluaron las propiedades de barrera de las películas de almidón nativo y modificado por entrecruzamiento y acetilación. La doble modificación del almidón produjo una disminución en el valor de permeabilidad debido a que se introdujeron grupos hidrofóbicos que permitieron darle una mayor resistencia al paso de vapor de agua (Tabla 1). La modificación química logró una disminución de la PVA de las películas (6.62×10^{-10} y 5.88×10^{-11} g/m s Pa para el almidón nativo y modificado, respectivamente), tanto la acetilación como el entrecruzamiento provocan un aumento de grupos hidrofóbicos.

La doble modificación del almidón produjo un resultado significativo en las propiedades mecánicas, sobretodo en la elongación de las películas como puede verse en el Tabla 1, el porcentaje de elongación aumentó (40 y 54% para almidón nativo y modificado, respectivamente); este resultado concuerda con el trabajo de Chen, y col. (2008) quienes encontraron que el almidón acetilado de papa extrudido aumentaba las propiedades mecánicas. Sin embargo, la tensión a la fractura se vio disminuida con el uso del almidón modificado (2.91 MPa) con respecto a la película de almidón nativo (5.54 MPa). Las soluciones filmogénicas mostraron un comportamiento reofluídico por cizalla (Figura 1); la viscosidad de la solución filmogénica disminuyó, ya que tanto el entrecruzamiento como la acetilación son modificaciones químicas que restringen el hinchamiento de los gránulos de almidón.

Tabla 1.- Efecto de la modificación química en las propiedades de películas elaboradas con almidón de papa, por casting.

	Películas de almidón nativo	Películas de almidón modificado
Permeabilidad al vapor de agua (g/m s)	6.62×10^{-10}	5.88×10^{-11}
Tensión a la fractura (MPa)	5.54	2.91
Elongación (%)	45	40

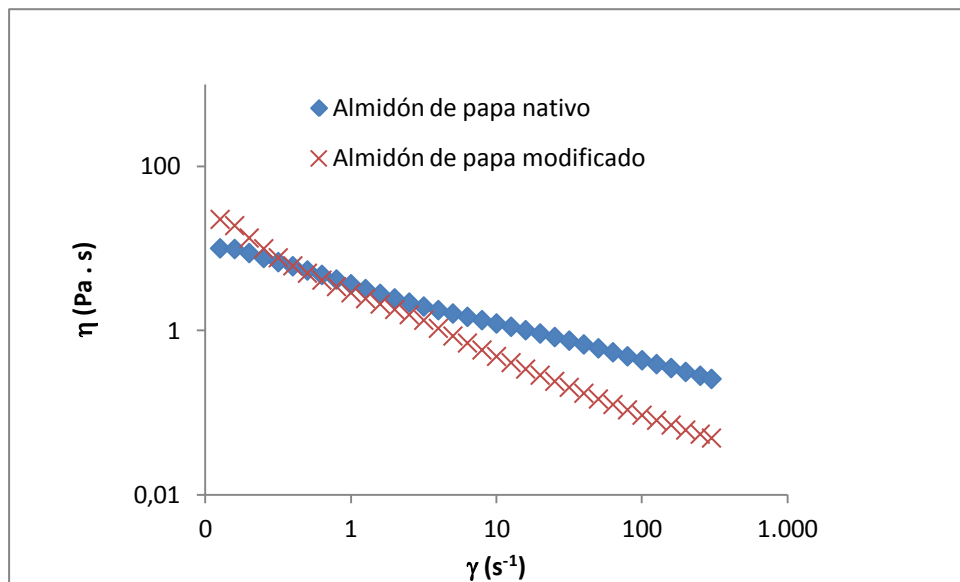


Figura 1.- Reología de soluciones filmogénicas utilizadas para hacer películas de almidón de papa nativo y modificado por entrecruzamiento y acetilación.

CONCLUSIONES

Con la modificación química del almidón de papa se obtuvieron películas en las que se disminuyó la PVA y aumentó el porcentaje de elongación, por otro lado las soluciones filmogénicas fueron menos viscosas al utilizar el almidón modificado

BIBLIOGRAFÍA

- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1996. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting D882-97. In: Annual book of ASTM. Philadelphia, PA. pp. 162-170.
- Chen, J., Liu, C., Chen, Y., Chen, Y., Chang, P.R. 2008. Structural characterization and properties of starch/konjac glucomannan. *Carbohydrate Polymers*. 74: 946-952.
- Majdzadeh-Ardakani, K., Navarchian, A. H., Sadeghi, F. 2009. Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrates Polymers*.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N. and Zaritzky, N. E. 2004. Barrier, mechanical and optical of plasticized yam starch films. *Carbohydrates Polymers*. 129-135.
- Rutenberg, M. W. y Solarek, D. 1984. Starch derivatives: production and uses ch.10. In R. L. Whistler y J. N. BeMiller y E. F. Paschall (Eds.), *starch chemistry and technology*, 2. New York: Academic Press.
- Saartrat S., Puttanlek C., Rungsardthong V. y Uttapap D. 2005. Paste and gel properties of low-substituted acetylated canna starches. *Carbohydrate Polymers*, 61: 211-221.
- Soest V., Benes, J.J.G , K., Wit, D. 1996. The influence of starch molecular mass on the properties of extruded thermoplastic starch. *Polymer*. 37: 3543-3552.

INACTIVACIÓN Y DAÑO SUBLETAL DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE ALTAS PRESIONES HIDRÓSTATICAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE *STEVIA*

C. M. Belda-Galbis¹, M. Sanz-Puig¹, A. Martínez¹, D. Rodrigo¹

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Avda. Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, València, España.

INTRODUCCIÓN

Organizaciones ámbito nacional e internacional recomiendan encarecidamente el consumo de frutas y verduras debido a que garantiza bienestar y puede prevenir la aparición de ciertas patologías, como la obesidad, la diabetes, la hipertensión y ciertos tipos de cáncer (CDC, 2011).

El consumidor, cada vez más consciente de ello pero reticente en muchos casos a la toma de piezas frescas, opta por incluir en su dieta zumos, enriquecidos con leche o similares, que permitan aprovechar los beneficios asociados a la ingesta de frutas y verduras de una forma cómoda y apetecible, a cualquier hora del día, dentro o fuera del hogar.

Para ello, es decir, para que el consumo de zumos supla en parte el consumo de fruta y verdura fresca es fundamental el desarrollo e implementación de tecnologías de procesado no térmicas que garanticen inocuidad, estabilidad y calidad sensorial durante periodos de tiempo prolongados al máximo, sin apenas modificar las características nutricionales de los zumos recién exprimidos. Sobre todo es importante la obtención de alimentos microbiológicamente seguros, que no pongan en riesgo la salud del consumidor, al menos durante el tiempo de vida útil asignado al producto en cuestión.

El procesado por altas presiones hidrostáticas (HPP) junto con el uso de ingredientes capaces de inhibir y/o controlar el crecimiento microbiano, parece una buena alternativa y por ello se planteó este presente trabajo cuyo objetivo fue evaluar el potencial conservante de las altas presiones hidrostáticas junto con la adición de *Stevia rebaudiana* (*Stevia*), siendo un zumo multifrutas con avena la matriz a tratar y *Listeria monocytogenes* el microorganismo patógeno a estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del cultivo microbiano

A partir de un liófilo proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo se obtuvieron múltiples viales de la cepa a estudio (*L. monocytogenes* CECT 4032) siguiéndose el método descrito por Saucedo-Reyes y col (2009).

La concentración celular promedio de los viales se determinó por dilución y siembra en agar triptonsoja (TSA; Scharlab S. L., España) estableciéndose un valor promedio de $7,60 \times 10^9$ ufc/mL.

Formulación y obtención de la bebida

La matriz a estudio se desarrolló a partir de zumo frutas ricas en antioxidantes y bebida de avena, siendo 4,6 el pH final del alimento. Su composición pormenorizada se muestra en la Tabla 1.

La obtención de zumos se efectuó empleando exprimidores convencionales, equipos de molienda (FitzMill[®], FitzPatrick, USA), prensas neumáticas, tela de lino y tamices de 297 μ m para lograr una mezcla filtrada y homogénea, aprovechando al máximo las piezas de fruta adquiridas.

La infusión de *Stevia* se obtuvo a partir de hojas secas suministradas por la empresa ANAGALIDE S. A. (España). La concentración a estudio se fijó teniendo en cuenta el contenido de azúcar máximo presente en bebidas similares y cuál es la relación que existe entre el poder endulzante del azúcar de mesa y el de la *Stevia* (Savita et al., 2004). Para la obtención de un stock concentrado, hojas y agua embotellada llevada a ebullición se mantuvieron en reposo durante 30 minutos. La mezcla hojas-agua se filtró y alicuotó, empleándose para la filtración un matraz kitasato, un embudo Büchner y papel de filtro (Whatman[®] N° 1, Whatman International Ltd, UK) y se almacenó a -40 °C.

Procedimiento experimental

La inactivación y el daño subletal generado por los tratamientos se evaluó comparando el recuento de viables obtenido en TSA (Scharlab S. L., España) con y sin sal (NaCl; Scharlab S. L., España), antes y después de la aplicación de tratamientos de intensidad y duración variada (Tabla 2), en presencia y ausencia de *Stevia*, teniendo en cuenta que en medios generales crece todo tipo de células de viables, estén dañadas o no, mientras que en presencia de un 5% de sal sólo crecen células intactas (García et al., 2004; Somolinos et al., 2008). Así, para cada tratamiento, el número de microorganismos inactivados se estableció en base a la diferencia existente entre los recuentos de viables obtenidos pre y post-tratamiento,

mientras que el número de células dañadas se determinó en base a la diferencia existente entre el recuento de viables y el de intactas, es decir, entre el recuento post-tratamiento obtenido en placas sin sal y con sal.

Todos los tratamientos se aplicaron a bebida inoculada sin *Stevia* o con un 2,5% (p/v) de ésta, siendo aproximadamente 1×10^7 ufc/mL la concentración celular de partida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con cada uno de los 20 tratamientos a estudio, en presencia y ausencia de *Stevia*, se muestran en la Figura 1. En ella se observa que para una misma presión, a mayor tiempo de tratamiento, mayor número de células muertas y menor número de células intactas.

Para un mismo tiempo de tratamiento, a mayor presión, mayor número de células muertas y menor número de células intactas, también. Siendo el tiempo de tratamiento 5 minutos, por ejemplo, a 250 MPa la inactivación es menor de un ciclo log, mientras que a 325 MPa la inactivación fue completa, de casi 8 ciclos log, se añada o no *Stevia* a la bebida.

A igual presión y tiempo de tratamiento, en presencia de *Stevia* el número de células muertas registrado es mayor al registrado en ausencia de ésta. El número de intactas, en cambio, es menor. Si la bebida inoculada se somete a 325 MPa durante 1 minuto, en presencia de *Stevia* se reduce el número de células intactas recuperadas y se consigue inactivar a parte de la población, cosa que no ocurre en ausencia de ésta. A esa misma presión, si el tiempo de exposición pasa de 1 a 2 minutos, tras la aplicación del tratamiento también se detectan diferencias interesantes entre las muestras control y las problema. En presencia de *Stevia* la proporción viables/muertas es similar a la observada en su ausencia pero todas las viables están dañadas. Estos resultados son importantes porque las células dañadas al someterse a un estrés adicional pueden llegar a inactivarse más rápidamente que las intactas.

Por lo tanto, el estudio del daño producido es indicador de sinergia entre ambas tecnologías ya que demuestra que la *Stevia* potencia el efecto generado mediante HPP, aunque la magnitud del daño depende de la combinación presión-tiempo.

CONCLUSIONES

Con el fin de obtener zumos no procedentes de concentrados, sabrosos, seguros y nutritivos, en ausencia de aditivos sintéticos, se propone combinar el procesado mediante tecnologías no térmicas con el uso de conservantes de origen biológico, respectivamente, a

intensidades moderadas y a concentraciones sensorial, económica y fisiológicamente aceptables.

Los resultados obtenidos demuestran que las HPP son capaces de inactivar y causar daño a *L. monocytogenes*, sobre todo en presencia de *Stevia*. Algunas combinaciones logran la inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos, cumpliendo así con los requisitos exigidos por la CFR (2012) para cualquier tecnología destinada a prolongar la vida útil y garantizar la inocuidad de zumos procesados.

BIBLIOGRAFÍA

CDC (2011). Strategies to Prevent Obesity and Other Chronic Diseases: The CDC Guide to Strategies to Increase the Consumption of Fruits and Vegetables. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services.

Saucedo-Reyes D, Marco-Celdrán A, Pina-Pérez MC, Rodrigo D, Martínez-López A (2009) Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2):135-41.

Savita SM, Sheela K, Sunanda S, Shankar AG, Ramakrishna P, Sakey S (2004). Health implications of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Human Ecology*, 15(3):191-194.

García D, Gómez N, Mañas P, Condón S, Raso J, Pagán R (2005) Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1):94-104.

Somolinos M, García D, Pagán R, Mackey B (2008) Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24):7570-7577.

CFR (2012) Title 21: Food and drugs. USA: FDA. Disponible online en: www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=120.24 (Último acceso: 24 de Octubre de 2013).

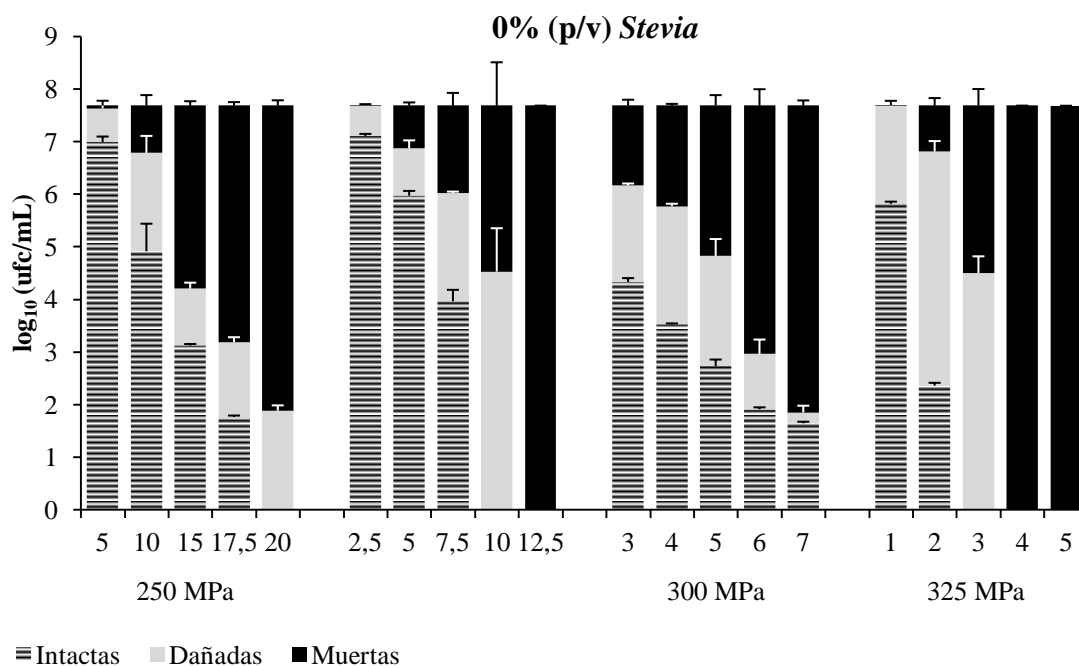
Tabla 1 Composición pormenorizada de la bebida formulada.

Ingrediente	Cantidad (%)
Zumo de mango	10
Zumo de naranja	7,5
Zumo de papaya	32,5
Bebida de avena	20
Infusión de stevia/Agua	30

Tabla 2 Intensidad y duración de los tratamientos aplicados.

Presión (MPa)	Tiempo (minutos)
250	5; 10; 15; 17,5; 20
275	2,5; 5; 7,5; 10; 12,5
300	3; 4; 5; 6; 7
325	1; 2; 3; 4; 5

(A)



(B)

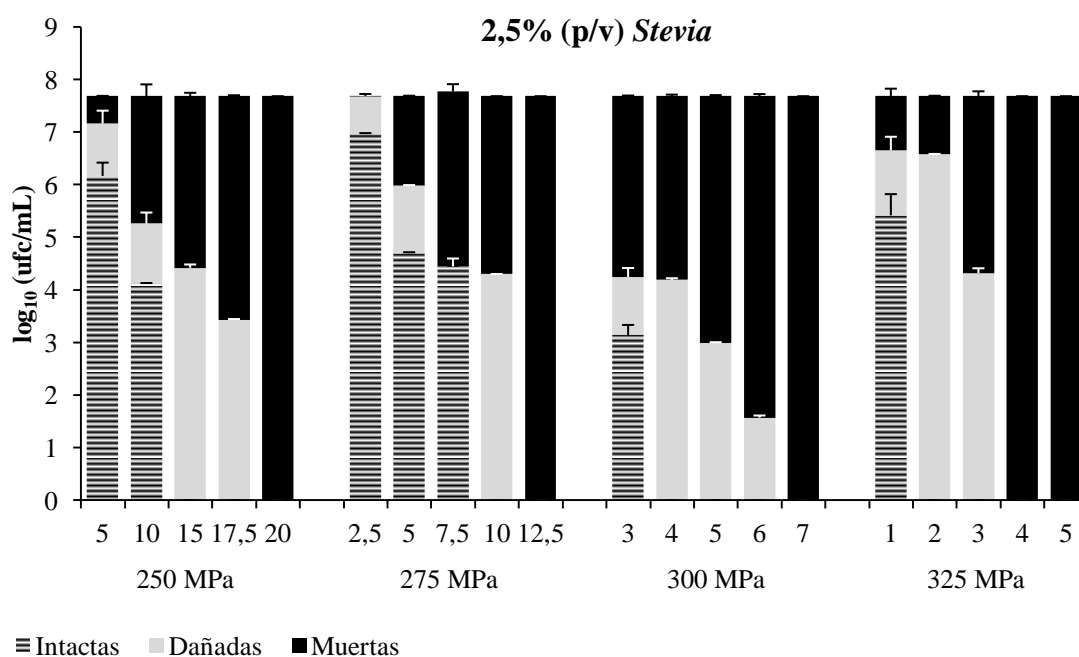


Figura 1 Células intactas, dañadas y muertas, en ausencia (A) y presencia (B) de *Stevia*, tras diferentes tratamientos de HPP. En el eje de categorías se muestran todas las combinaciones de presión (MPa) y tiempo (minutos) ensayadas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar que se asocia a los promedios mostrados.

DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES A BASE DE RECORTES DE PAVO Y POLLO

Carlos Fraguela*, Indira Franco*, Anya Fernández, Hania Muñoz****

*Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad Tecnológica de Panamá. Campus Víctor Levi Sasso. Avenida Ricardo Arias con Vía Universidad Tecnológica.

**Departamento de Investigación y Desarrollo de Nuevos Productos. Empresa Víveres de Panamá, S.A. Urb. Herbruger, Vía Simón Bolívar, Transistmica, Detrás de Supermercado Riba Smith.

INTRODUCCIÓN

La demanda por alimentos con propiedades saludables ha incrementado en los últimos años, debido a la necesidad de una mejor calidad de vida por parte del consumidor, en donde se ejecutan dietas, principalmente para reducir riesgos a padecer de enfermedades. Debida a esta razón, la industria alimentaria ha desarrollado alternativas para el cumplimiento de las nuevas necesidades del consumidor, creando los alimentos funcionales.

Un alimento funcional, de acuerdo a Ospina, et al. (2011), es todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, que, además de sus funciones nutricionales básicas, es capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos benéficos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental contiene un componente (sea nutriente o no) con un efecto selectivo de una o varias funciones del organismo.

Los alimentos cárnicos forman parte importante de las dieta aportando proteína, vitaminas y minerales, pero también contienen ácidos grasos saturados, colesterol, altos niveles de sodio, nitritos y nitratos, los cuales son precursores de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer y obesidad. Esto ha cambiado la manera en que los consumidores perciben esta sección de alimentos, evitando o disminuyendo el consumo de los mismos.

Para contrarrestar este efecto negativo del consumo de alimentos cárnicos, la industria cárnica se ha visto en la obligación de desarrollar nuevos productos con cualidades funcionales. Las posibles modificaciones que se pueden realizar a alimentos cárnicos, de acuerdo a Jiménez-Colmenero, et al. (2001) son:

1. Modificación a la composición de carcasas.
2. Manipulación de materia cárnica cruda.
3. Reformulación de productos cárnicos.

- Reducción de contenido graso.
- Modificación del perfil lipídico.
- Reducción de colesterol.
- Reducción de calorías.
- Reducción del contenido de sodio.
- Reducción de nitritos y nitratos.
- Incorporación de ingredientes funcionales.

Los productos cárnicos a base de pollo y pavo son muy comunes, desde jamones deshuesados de pavo hasta salchichas, al igual que productos de pollo. Los consumidores, debido a información de distintos medios, tienen el conocimiento que los productos cárnicos de esta procedencia son más saludables. De acuerdo a valores de referencia de la base de datos de nutrientes según la USDA, se indica que la grasa de pavo es la de menor cantidad de ácidos grasos saturados, con excepción de la grasa de ganso. También establece que son las grasas con mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, debido a sus siglas en inglés *polyunsaturated fatty acids*).

El objetivo de esta investigación es realizar dos productos cárnicos funcionales a base de recortes de pavo y pollo, con adición de fibra de trigo, extracto de romero y orégano, uso de fermento de azúcar como reemplazante de sal y endulzante con bajo índice glicémico, y evaluando su composición fisicoquímica, microbiológica durante el almacenamiento y la aceptación sensorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron dos productos una hamburguesa fresca y una salchicha de desayuno. Ambos productos contienen la misma matriz cárnica de recortes en la siguiente relación 3:3:4 (recortes de pechuga de pollo: recorte de encuentro de pavo: recorte de pechuga de pavo). La composición de los recortes fueron analizados previamente para determinar la proteína, grasa y humedad que aportaban cada uno.

Preparación de Productos

La carne de hamburguesa fresca (TFB) y su control (TFBC) fueron realizadas con la formulación mostrada en la tabla 1. La fibra de trigo, el extracto de romero y el condimento de hamburguesa fueron provistos por empresas de aditivos para la industria alimentaria. La muestra control no contiene fibra ni extracto de romero como conservante.

La salchicha de desayuno (TBS) y su control (TBSC) se elaboraron con la formulación mostrada en la tabla 2. La condimentación fue probada en distintas concentraciones de las especias hasta obtener la que se muestra en la tabla. El conservante utilizado contiene extracto de orégano, romero y una mezcla de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido ascórbico y ácido cítrico). La muestra TBS contiene 3.00% de fibra, 0.70% de sal, 0.70% de conservante y 10% de sirope de agave. En comparación con la muestra TBSC no contiene fibra, ni conservante, tiene un 1.62% de sal, 11.48% de sirope de agave y 3.44% de almidón de papa.

Proceso de Elaboración

La TFB y TFBC fueron elaboradas mediante la molienda de los recortes, luego el mezclado de los mismos junto con los demás ingredientes hasta obtener una pasta uniforme. Las muestras fueron envasadas en bandejas de poliestireno expandido cubiertas con película plástica, almacenándolas durante 7 días a temperatura de refrigeración de 2-7°C.

Para obtener TBS y TBSC fueron molidos y mezclados los recortes, se añadió la sal y la mitad de la cantidad de agua. Luego, los demás ingredientes hasta obtener una pasta uniforme. La pasta fue embutida en tripas de colágeno calibre 18 con longitud de 5cm cada una. Se hornearon hasta alcanzar 77°C, y luego se enfriaron por 24 horas. Se procedió a envasar 20 unidades (aprox. 1 lb) en cada empaque al vacío y almacenadas en refrigeración de 2-7°C durante 52 días.

Análisis Proximal

Toda determinación analítica fue realizada por triplicado. Los valores de los distintos parámetros fueron expresados como la media \pm desviación estándar.

El contenido de humedad, cenizas y proteína fueron determinados de acuerdo al metodología establecida por la AOAC (1997). El contenido de lípidos fue estimado mediante la extracción con éter dietílico usando un sistema de Soxhlet, por 9 ciclos cada muestra. El valor del nitrógeno total fue obtenido mediante el método de Kjeldahl utilizando el factor general 6.25. El total de cenizas se realizó mediante el secado previo de las muestras a 100°C y luego su incineración a 550°C por 8 horas. El índice de peróxido se realizó a las muestras luego de la extracción de grasa mediante el método establecido por AOCS Cd 8b-90, expresando los valores como miliequivalentes de O₂ / Kg de grasa.

Análisis Microbiológicos

Se utilizó 10g de muestra y se le añadió 100 mL de agua peptonada esterilizada, preparada previamente. Se tomó una alícuota de 1mL y se sembró en placas petri films 3M.

Para aerobios totales, coliformes totales y enterobacterias se incuban por 24 horas a 37°C. Para hongos y levaduras, las placas son incubadas a temperatura ambiente por 5 días.

Rendimientos de Cocción

Para las carnes de hamburguesas se realizó en una plancha eléctrica al ser cocinadas a 300°C por 10 minutos cada lado. Se registró la diferencia de peso antes y luego de la cocción. Los resultados se expresan en porcentaje de producto al final.

En las salchichas de desayuno se registró la diferencia de pesos antes, después de ser horneadas y durante la refrigeración antes de ser envasadas. Expresando los resultados como porcentaje de producto final.

Evaluación Sensorial

Las carnes de hamburguesas fueron preparadas como se describió previamente. Las muestras fueron divididas de forma homogénea y colocadas en envases con tapas para evitar la resequeidad de la muestra. Las condiciones de conservación, manejo, y preparación fueron las mismas. Las muestras fueron codificadas con 3 dígitos aleatorios. Se evaluó la aceptación del panelista mediante una prueba pareada de preferencia con escala hedónica de 5 puntos, donde 1 representaba disgusta mucho y 5 me gusta mucho.

Las salchichas de desayuno se prepararon en una plancha eléctrica por 10 minutos, se tomaron las mismas medidas en cuanto al manejo de y presentación de las muestras ya establecidas previamente. Se realizó una prueba pareada de preferencia y escala hedónica para la evaluación de la textura, salado, dulzor y agrado general. En la textura 1- mala y 5- buena; salado 1-poco salado y 5- muy salado; dulzor 1- poco dulce y 5- muy dulce; y agrado general 1-disgusta mucho y 5 gusta mucho.

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existía una preferencia significativa ($P < 0.05$) y luego se realizó el test de Duncan para saber si la diferencia era significativa en cuanto a la evaluación hedónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Proximales

Los resultados obtenidos de los análisis proximales realizados tanto para la carne de hamburguesa y la salchicha de desayuno se muestran en las tablas 3 y 4. En la carne de hamburguesa las humedades entre TFB y TFBC no presentan diferencia significativa ($P < 0.05$). Sin embargo, en la salchicha de desayuno si hubo mayor humedad en la muestra con adición de fibra TBS que la muestra control. La diferencia de proteína entre las pruebas y

los controles se debe a la cantidad de fibra y agua añadida tanto a TFB y TBS, este mismo efecto se presenta en el contenido de grasa el cual se ve disminuido. El contenido de cenizas no presentó diferencia significativa entre las muestras y los controles ($P < 0.05$). Besbes, et al. (2008) presentó el mismo efecto en carne de hamburguesas con fibra de guisante y trigo.

Índice de Peróxido

Los índices de peróxidos obtenidos se muestran en la tabla 5 y 6. En la carne de hamburguesa TFB se utilizó extracto de romero como agente antioxidante. Se muestra que el extracto de romero evitó la oxidación de las grasas, ya que el índice de peróxido se mantuvo constante ($P < 0.05$). TFBC presentó un crecimiento exponencial, demostrando que el extracto de romero disminuyó la oxidación un 76.6% en comparación a TFBC. La salchicha de desayuno TBS, contiene ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido ascórbico y ácido cítrico) y extractos de orégano y romero. En el día 0 ya TBSC mostraba peróxidos, en comparación con TBS cual no presentó. El comportamiento permaneció hasta el día 13, en donde el crecimiento de peróxidos en TBSC aumentaba y en TBS se mantuvo constante. El mismo efecto de peroxidación se observó en un estudio de carnes de hamburguesas con adición de quitosano en distintas concentraciones (Georgantelis, et al., 2007).

Análisis Microbiológico y pH

Los resultados de los análisis microbiológicos y las fluctuaciones de pH se presentan en la tabla 7 y 8. A pesar que los extractos utilizados fueron añadidos con el propósito de evitar la oxidación de las grasas de pavo y pollo. Sin embargo, se ha descubierto que los extractos de romero y orégano tienen cualidades bacteriostáticas. La diferencia más significativa ($P < 0.05$) en el caso de las carnes de hamburguesas se presenta en el crecimiento de coliformes, en cuanto a enterobacterias no hay diferencia significativa ($P < 0.05$).

La salchicha de desayuno TBS presenta un crecimiento de levaduras significativo ($P < 0.05$). Se debe sinéresis en el envasado al vacío; además, la formulación es rica en carbohidratos debido al sirope de agave, creando las condiciones para el crecimiento de levaduras. (Rodríguez, 2011). La sinéresis es significativamente menor en TBSC debido a la capacidad de gelatinización del almidón al momento de cocción, permitiendo una retención de agua mayor. La fibra de trigo a pesar de su capacidad de absorción de agua, no es capaz de retener agua tan eficazmente como el almidón.

Rendimientos de Cocción

En las carnes de hamburguesas TFBC y TFB presentaron 70.3% y 73.7%, respectivamente en cuanto al rendimiento luego de ser cocidas, respaldando los encuentros de

Besbes, et al. (2008), en carnes de hamburguesas con fibra de guisante y trigo. En las salchichas de desayuno, luego de ser horneadas TBSC y TBS presentaron rendimientos de 92.13% y 89.08%, respectivamente. Esto demuestra que la fibra de trigo aumenta los rendimientos significativamente ($P < 0.05$) en productos frescos o crudos. En productos precocidos, la fibra de trigo no es capaz de retener el agua absorbida durante el proceso, y la libera durante el horneado y en el envasado.

Evaluación Sensorial

Las carnes de hamburguesas, no hubo preferencia significativa entre las muestras TFB y TFBC, los panelistas la evaluaron 4.06 y 4.02, respectivamente. Al realizar el ANOVA no hubo diferencia significativa entre las muestras.

En las salchichas de desayuno, no hubo preferencia significativa entre las muestras. En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos. TBSC presentaba mayor dulzor mas no agradaba totalmente, en comparación con TBS el dulzor se encontraba adecuado, presentando una diferencia significativa ($P < 0.05$). En cuanto al salado, no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre TBS que contenía 0.70% de sal y TBSC con 1.62%, siendo el reemplazante parcial de sal muy eficiente. La textura si presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) debido a la característica de la fibra de trigo a proporcionar una textura más suave y granulosa, resultados parecidos presentó Sánchez-Zapata, et al. (2010) con carnes de hamburguesas con fibra de *Cyperus esculentus* (0%, 5%, 10% y 15%). En comparación con el almidón que al gelatinizarse crea una textura más firme y más agradable al producto. Pero al evaluar el agrado general de ambas muestras, no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$).

CONCLUSIÓN

El uso de fibra de trigo aumenta los rendimientos en productos frescos mas no en productos precocidos, para ser utilizado se recomienda añadir almidón para retener agua. El extracto de romero y orégano funcionan eficazmente para prevenir la oxidación lipídica, como efecto secundario pueden tener propiedades antimicrobianas. El fermento de azúcar como reemplazante parcial de sal, puede disminuir hasta un 50% de sal utilizada en una fórmula, sin embargo hay que tener en consideración el tipo de producto que se está elaborando.

Estos ingredientes juntos proporcionan un perfil funcional que es de gran competencia el mercado evolutivo de productos cárnicos. (AOAC, 1997)

BIBLIOGRAFÍA

AOAC, 1997. *Official Methods of Analyses*. Washington, DC: s.n.

AOCS, 2013. *American Oil Chemists' Society*. Urbana: s.n.

Besbes, S. y otros, 2008. Partial Replacement of Meat by Pea Fibre and Wheat Fibre: Effect on the Chemical Composition, Cooking Characteristics and Sensory Properties of Beef Burger. *Journal of Food Quality*, 31(3), pp. 480-489.

Georgantelis, D. y otros, 2007. Effect of Rosemary Extract, Chitosan and Tocopherol on Lipid Oxidation and Colour Stability during Frozen Storage of Beef Burgers. *Meat Science*, 2(3), pp. 256-264.

Jiménes-Colmenero, F., Carballo, J. & Cofrades, S., 2001. Healthier Meat and Meat Products: Their Role as Functional Foods. *Meat Science*, Volumen 59, pp. 5-13.

Ospina, S., Restrepo, D. & López, J., 2011. Derivados Cárnicos como Alimentos Funcionales. *Revista LaSallista de Investigación*, 8(2), pp. 163-172.

Rodríguez, J., 2011. *Real Academia Nacional de Farmacia*. [En línea]
Available at: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1107/1121>
[Último acceso: 13 Agosto 2013].

Sánchez-Zapata, E. y otros, 2010. Effect of Tiger Nut Fibre on Quality Characteristics of Pork Burger. *Meat Science*, 85(2), pp. 70-76.

ANEXOS

TABLAS

Tabla 1. Formulación de carne de hamburguesa.

Ingredientes	TFB(%)	TFBC(%)
Recortes de Pollo	23.80	27.08
Recorte de Encuentro de Pavo	23.80	27.08
Recorte de Pechuga de Pavo	31.73	36.10
Fibra de Trigo	3.00	0.00
Extracto de Romero	0.10	0.00
Condimento de Hamburguesa	2.75	2.75
Agua/Hielo	14.83	7.00
Total	100.00	100.00

Tabla 2. Formulación de Salchicha de Desayuno

Ingrediente	TBS(%)	TBSC(%)
Recortes de Pollo	19.70	22.62
Recorte de Encuentro de Pavo	19.70	22.62
Recorte de Pechuga de Pavo	26.27	30.16
Sal	0.70	1.62
Pimienta	0.20	0.23
Salvia en Polvo	0.30	0.34
Ajo	0.15	0.17
Pimienta Cayenne	0.07	0.08
Nuez Moscada	0.20	0.23
Sirope de Agave	10.00	11.48
Fibra de Trigo	3.00	0.00
Almidón de Papa	0.00	3.44
Fermento de Azúcar	2.50	0.00
Conservante	0.70	0.00
Agua/Hielo	16.50	7.02
Total	100.00	100.00

Tabla 3. Valores proximales de carne de hamburguesa.

Muestra	Humedad (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)
TFB	67.67±1.04	15.09±0.49	16.06±0.64	1.74±0.07
TFBC	68.50±1.55	17.2±0.43	18.27±0.83	1.78±0.06

Tabla 4. Valores proximales de salchicha de desayuno.

Muestra	Humedad (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)
TBS	64.13±0.85	4.80±0.10	13.29±0.73	2.36±0.02
TBSC	59.66±0.73	6.66±0.58	15.26±0.41	2.39±0.03

Tabla 5. Índice de peróxido de la carne de hamburguesa durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración por 7 días.

Tiempo de Almacenamiento (Días)	Control (meq O ₂ / kg de grasa)	Prueba (meq O ₂ / kg de grasa)
0	13.77±0.93	11.55±0.47
3	23.16±0.36	9.75±0.98
7	49.29±1.12	11.51±0.55

Tabla 6. Índice de peróxido de la Salchicha de desayuno durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración por 52 días.

Tiempo de Almacenamiento (Días)	Control (meq O ₂ / kg de grasa)	Prueba (meq O ₂ / kg de grasa)
0	2.61±0.80	0.00±0.00
13	34.06±1.19	0.00±0.00
35	52.11±0.68	4.71±0.37
52	41.90±.47	23.78±0.78

Tabla 7. Microbiología de carne de hamburguesa durante almacenamiento en refrigeración por 7 días.

	Tiempo (días)	Microbiología (UFC/g)					pH
		RTA ¹	Col ²	Ent ³	Hongos	Lev ⁴	
Control	1	9800	240	60	0	0	5.88
	3	9500	950	100	0	30	5.82
	7	9800	1600	130	0	10	5.75
Prueba	1	190	190	30	0	0	5.92
	3	100	100	60	0	10	5.60
	7	8000	50	110	0	80	5.66

1=Recuento Total de Aerobios; 2=Coliformes totales; 3=Enterobacterias; 4=Levaduras

Tabla 8. Microbiología de salchicha de desayuno durante almacenamiento en refrigeración por 52 días.

	Tiempo (días)	Microbiología (UFC/g)					pH
		RTA ¹	Col ²	Ent ³	Hongos	Lev ⁴	
Control	0	650	0	0	0	0	5.95
	13	3000	10	20	0	400	5.95
	35	3600	0	0	0	560	5.67
	52						
Prueba	0	190	0	0	0	0	5.98
	13	2600	0	10	0	2400	6.12
	35	4600	0	0	0	2000	5.52
	52						

1=Recuento Total de Aerobios; 2=Coliformes totales; 3=Enterobacterias; 4=Levaduras

FIGURAS

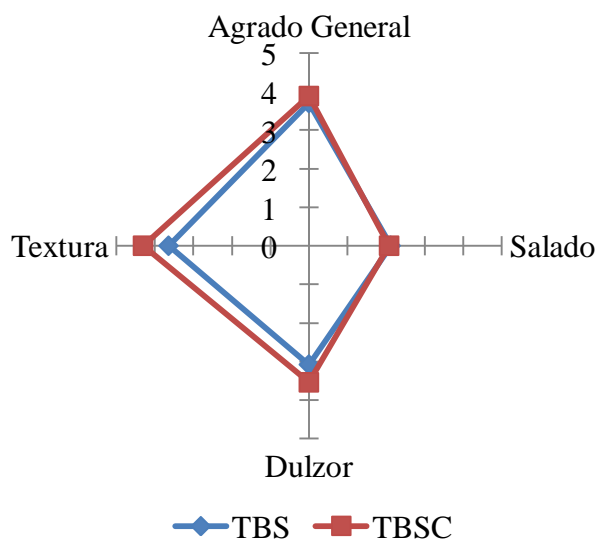


Figura 1. Resultados de evaluación sensorial de salchicha de desayuno. Para el agrado general, 1-me disgusta mucho y 5-megusta mucho; salado, 1-poco salado y 5-muy salado; dulzor, 1-poco dulce y 5-muy dulce; y textura, 1-mala textura y 5-buena textura.

USO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICO E NO TÉRMICO (ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA) PARA LA INACTIVACIÓN DE ENZIMAS BACTERIANAS METALOPROTEASAS PRESENTES EN LA DEGRADACIÓN DE LECHE

Pinto Junior, W. R.¹, Pereira, P.R.¹, Silva, J. M.¹, Del Aguila, E. M.¹, Silva, J. T.¹, Paschoalin, V. M. F.¹ And Rosenthal, A.²

¹ Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

² Embrapa Food Technology, Rio de Janeiro, Brazil.

1 INTRODUCCIÓN

A pesar del potencial presentado por la leche nutricional, productos de alta calidad sólo pueden ser producidos a partir de materias primas de buena calidad. La leche de calidad debe tener la posibilidad de tolerar la tecnología de tratamiento y se convirtió en un producto que satisfaga las expectativas de los consumidores, como atributos nutricionales, sensoriales e higiene (Ribeiro, 2010). El enfriamiento de la leche cruda en el origen de la producción y el transporte a la industria, se practica en muchas propiedades en el Brasil. Sin embargo, la aplicación de este procedimiento favorece el crecimiento de bacterias psicrotróficas. Mayoría de las bacterias psicrotróficas, *Pseudomonas fluorescens*, son inactivadas por pasteurización o tratamiento UHT. Sin embargo, antes del tratamiento térmico puede ocurrir, la producción de enzimas proteolíticas resistentes al calor que puedan resultar en problemas técnicos como la formación de malos sabores, la coagulación y la reducción de rendimiento de productos lácteos. Es interesante destacar que entre las bacterias psicrotróficas, el género *Pseudomonas* es prevalente en la leche refrigerada. Varios estudios informan las propiedades bioquímicas de las proteasas producidas por la especie *P. fluorescens* asociada con el deterioro de los productos lácteos. Aprx, se llama una proteasa que pertenece a la familia de serralisina, se ha caracterizado a partir de *P. fluorescens* y por la codificación del gen que fue identificado en muchas culturas. Está situado dentro del operón, que puede contener genes que codifican la lipasa, inhibidores de la proteasa, la proteasa y las proteínas secretoras auto-portadoras (Liao y McCallus, 1998; Johnson et al., 1992; Kawai et al., 1999; Ahn et al., 1999; Doug et al., 1992). El gen Aprx también se detectó en *P. tolaasi*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Flavobacterium* aislado del suelo (Martins et al., 2005). La mayoría de las proteasas de *Pseudomonas spp.* Son una metaloenzima monómero de 40 a 50 kDa, que comprende un átomo de zinc y de cuatro a ocho átomos de calcio (Frank, 1997; Nielsen, 2002; Stepania, 2004). Tener una actividad óptima entre 30 °C y 45 °C, con una actividad significativa a temperaturas de refrigeración (Frank, 1997) y el pH óptimo entre 6.5 y 8.0 (Chen et al.,

2003). La termorresistencia de estas proteasas es un obstáculo importante para la industria lechera (Mu et al., 2009). La alta presión hidrostática como método para procesar y conservar los alimentos, se ha estudiado desde finales del siglo XIX. Sin embargo, estos estudios se intensificaron, sólo al final del siglo pasado (Costa et al., 1999) cuando el equipo desarrollado para la industria de la cerámica se sometió a modificaciones con el fin de adaptarse a la industria alimentaria (Sangronis et al., 1997). La conservación de los alimentos por alta presión se caracteriza por un proceso no térmico donde estos son submetidos a las presiones de 150 a 900 MPascal (MPa) equivalente a 1500 hasta 9000 atmósferas (atm), respectivamente, con opciones para la variable en el tiempo, los ciclos y la temperatura del proceso, y se pueden usar solos o en combinación con otras tecnologías (Rosenthal, 2008). Este procedimiento da a la comida el aumento de la validez comercial, la inactivación de enzimas y microorganismos y, por otra parte, puede dar lugar a la capacidad de promover cambios estructurales en las proteínas, lo que provoca la alteración de la conformación, dependiendo de la presión aplicada, lo cual es a menudo beneficioso para alimentos (Rosenthal, 2008; Buckow y Heinz, 2008; Ludikhuyze et al., 2002). Por lo tanto, el estudio de la aplicación de la tecnología de alta presión en el tratamiento de la leche para la inactivación de las enzimas proteolíticas puede proporcionar un producto con alta calidad y salubridad diferencial, capaz de investir en un aumento del consumo y de valor agregado, con el fin de beneficiarse de la cadena de producción, con impactos económicos y sociales.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para investigar la capacidad termo-resistente y la inactivación inducida por la presión sobre la proteasa extracelular cruda producida a partir de *Stenotrophomonas maltophilia*, en la que fue detectada el gen Aprx. La cepa fue aislada a partir de una planta de productos lácteos después de 72 h de crecimiento del microorganismo a 30 °C en un medio complejo (CM) que contiene peptona (5 g / L), extracto de carne (3 g / l) suplementado con 1% de leche desnatada en polvo. La cepa de *P. fluorescens* (CT) ATCC 13525 (cepas de referencia), fue obtenida de la colección del Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud (INCQS) de la Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ.

2.1 Tratamiento de Alta Presión Hidrostática

Cuatro microgramos del extracto bruto fueron colocados en bolsas de plástico de la muestra (3 cm x 2 cm), sellado libres de burbujas de aire, fueron tratadas con alta presión hidrostática (Stansted Fluid Power Co.) en la unidad del laboratorio existente en el Instituto

Embrapa Alimentación en Río de Janeiro. Fue tratada a 30° C y 300 MPa o a 600 MPa y 35 °C durante 15 minutos seguido por el almacenamiento a 4 °C hasta la determinación de la actividad de la proteasa.

2.2 Tremoresistencia

El extracto en bruto fue tratado térmicamente a 63,5 °C durante 30 min e guardado enseguida a 4 °C hasta la determinación de actividad de la proteasa, con algunas modificaciones (THE, et al., 2011).

2.3 Evaluación de la Actividad Proteolítica Extracelular

Las cepas en diferentes sectores industriales fueron activados en medio complejo (CM) que contiene peptona (5 g/L), extracto de carne (3 g/L) es un medio de agar sólido y bacto (15 g/L), suplementado o no con leche desnatada en polvo para una concentración final de 1 % (w/v) a 30 °C durante 24 h con el fin de inducir la producción de la enzima propuesto por Dufour et al. (2008). El crecimiento de las células (10^5 UFC/ ml) fueron controlados por turbidimetría a 600 nm en un espectrofotómetro (BELphotonics, modelo SP1105, Monza, Italia, después que se inoculó en 100 ml del medio complejo a 30 °C durante 72 h con agitación (140 rpm). Al final del período de fermentación, las células se fueron colectadas por centrifugación (12.000 g durante 15 min a 4 °C) y el sobrenadante libre de células se utilizó como un extracto de enzima en bruto. La concentración de proteína fue evaluada por fluorimétrica usando el método Qubit (Invitrogen).

3 RESULTADOS

En este estudio, la enzima termo-resistente, mostró una reducción de la actividad enzimática después del tratamiento térmico, como es observada con la cepa *S. maltophilia* y la cepa de referencia de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) donde mostraron una disminución de 52,8 % y 73,3 % de la actividad enzimática, respectivamente (gráfico 1). Según Teh et al., (2011) de las 52 cepas aisladas de las superficies internas de los tanques de leche cruda, productoras de enzimas termo-resistentes, veintinueve cepas aisladas produjeron únicas enzimas proteolíticas termo-resistentes, cuando fueron tratados durante a 63,5 °C durante 30 min. La mayor parte de los aislados termoresistentes productores de enzimas durante el invierno pertenecían al género *Staphylococcus aureus* (85%), mientras que una mezcla de bacterias fue aisladas en verano como *Serratia* spp. (68%), *Streptococcus* spp. (12%), *Staphylococcus* spp. (12%) y *Pseudomonas* spp. (8%). La baja estabilidad térmica se observó para *Bacillus* sp. con actividad proteasica en la leche, la inactivación se encontró

bajo de 50 °C y una completa inactivación después de 5 min a 80 °C (Bilbao-Sáinz, et al., 2011). Una leve disminución de la actividad de la proteasa de *S. maltophilia* se observó cuando la presión se incrementó en el pH 8,3 mostrando una inactivación de 14,3% a 300 MPa y de 17,3% a 600 MPa (gráfico 2). Las inactivaciones parciales no parecen ser un mecanismo general ya que la inactivación proteolítica se observó cuando el extracto crudo producido por la cepa de referencia, *P. fluorescens* (ATCC 13525) fue utilizado en las mismas condiciones. La enzima aislada a partir de *S. maltophilia* fue sometida a diferentes niveles de presión (300 y 600 MPa) durante dos períodos de tiempo (0 y 15 min). La actividad caseinolítica se determinó usando azocaseína como sustrato. Según Bilbao-Sáinz, et al. (2011), la enzima parecía ser muy resistente a la presión en la leche, después de los tratamientos más severos a la temperatura inicial de 60 °C y presión de 600 MPa durante 15 min, las actividades residuales fueron superiores a 70%. Ludikhuyze et al., (2001) también observó un pequeño aumento en la actividad de la actoperoxidase (LPO) encontrada en la leche y suero de leche debido al tratamiento de la presión. Para algunas enzimas, presiones bajas (100 - 400MPa) combinados con temperaturas moderadas mostraron que mejoran significativamente la actividad enzimática (Anese, et al., 1995; Cano, et al., 1997; Verlent, et al., 2004). Este estudio mostró que el tratamiento térmico fue más eficaz para la reducción de la actividad enzimática de la proteasa en comparación con la tecnología no térmica de alta presión hidrostática.

4 CONCLUSIÓN

La actividad de la proteasa en la bacteria *S. maltophilia* presentó una inactivación con 300 MPa y a 600 MPa. La inactivación parcial no parece ser un mecanismo común en todas las bacterias ya que no fue observado ninguna alteración con el extracto crudo de la cepa de referencia, *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), cuando submetidas a las mismas condiciones experimentales. También fue observado que la pérdida de la actividad de la proteasa fue alterada por el cambio de temperatura, llegando a ser más drástica que cuando submetida a la alta presión. La inactivación parcial de las enzimas proteolíticas de *S. maltophilia* dependía del pH, la temperatura de procesamiento y del tiempo de procesamiento. La combinación de estos factores pueden aumentar la sensibilidad de la proteasa en diferentes condiciones de presión.

5 REFERENCIAS

- Ahn, J. H.; Pan, J. G.; Rhee, J. S. Identification of the tliDEF ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Journal of Bacteriology*. v.181, p.1847–1852, 1999.
- Anese, M.; Nicoli, M.; Dall'anglio, G. & Lerici, C. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Food Biochemistry*, v.18, 285–293, 1995.
- Buckow R.; Heinz V. High pressure processing: a database of kinetic information. *Chemistry Ingenieur Technik*, v.80, p.1081–95, 2008.
- Cano, M.; Hernandez, A. & Ancos, B. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, v.62, n.1, 85–88, 1997.
- Chen, L.; Daniel, R. M.; Coolbear, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v.13. p.255–275. 2003.
- Doug, F.; Lazdunski, A.; Cami, B.; Murgier, M. Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to other secretory pathways. *Gene*. v.121, p.47–54, 1992.
- Dufour, D; Nicodème, M; Perrin, C; Driou, A; Brusseau, E; Humbert, G; Gaillard, J; Dary, A. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, n.125, p.188–196, 2008.
- Frank, J. F. Milk and dairy products. In Doyle, P., Beuchat, R. Montville, J. *Food microbiology – Fundamentals and frontiers*, Washington, cap.6, p.101–116, 1997.
- Johnson, L. A.; Beacham, I. R.; Macrae, I. C.; Free, M. L. Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.58, n.5, p.1776–1779, 1992.
- Kawai, E.; Idei, A.; Kumura, H.; Shimazaki, K.; Akatsuka, H.; Omori, K. The ABC exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1446, p. 377–382, 1999.
- Liao, C. H.; McCallus, D. E. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, p.914–921, 1998.
- Ludikhuyze, L.; Van Loey, A.; Indrawati; Denys, S.; Hendrickx, M. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. In *Ultra High Pressure Treatments of Food*. *Food Science and Technology*, p.115–66, 2002.
- Martins, M. L.; De Araujo, E. F.; Mantovani, H. C.; Moraes, C. A.; Vanetti, M. C. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.102, p.203–211, 2005.
- Mu. Z.; Du, M.; Bai, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *European Food Research and Technology*, v.228, p.725–734, 2009.

Nielsen, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.6628–6634, 2002.

Ribeiro, A. C; Ribeiro; S. D. A. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, Elsevier. v 89, p. 225–233, 2010.

Rosenthal, A. *Tecnologias de Alimentos e Inovação: Tendências e Perspectivas*. Embrapa informações tecnológica, Brasília, DF, Embrapa, 1º edição, 193p, 2008.

Sangronis. E.; Pothakamury, U.; Ramos, A. M.; Ibraz, A.; Barbosa Cánovas, G. V.; Swanson, B. G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria*. p.33–43, 1997.

Stepaniak, L. Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, n. 2/3, p. 153–171, 2004

The, K. H.; Steve Flint, S.; Palmer, J.; Lindsay, D.; Andrewes, P. And Bremer, P. Thermo resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal Surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, v.21, 742–747, 2011.

Verlent, I., Van Loey, A., Smout, C., Duvetter, T., & Hendrickx, M. E. Purified tomato polygalacturonase activity during thermal and high pressure treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v.86, n1, 63–71, 2004.

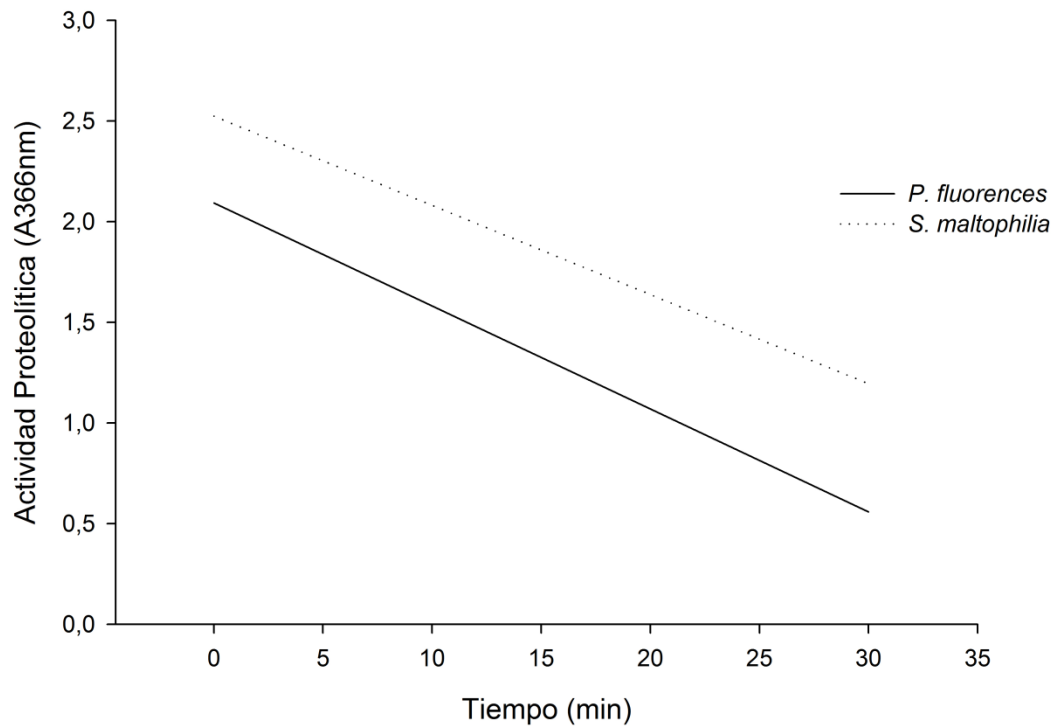


Gráfico 1. Actividad Caseinolítica después del tratamiento térmico

La enzima aislada de *S. maltophilia* fue tratada durante al 63.5 °C durante 30 min donde el substrato utilizado fue azocaseína.

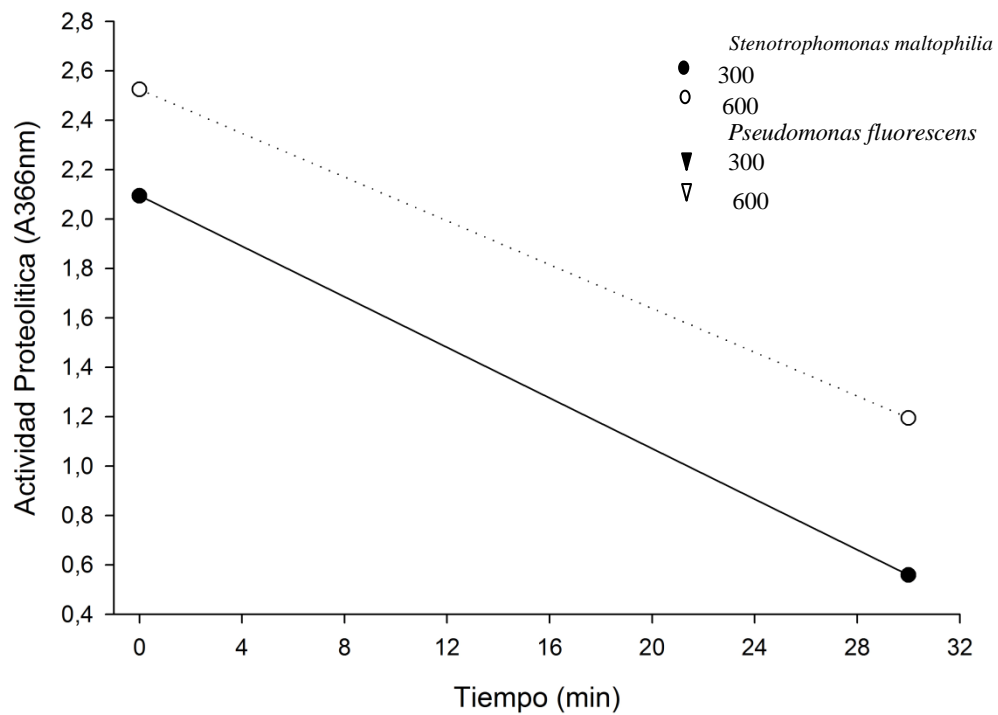


Gráfico 2. Actividad proteásica con diferentes variaciones de presión

La enzima aislada a partir de *S. maltophilia* fue sometido a diferentes niveles de presión (300 y 600 MPa) durante diferentes intervalos de tiempo (0 y 15 min). La actividad caseinolítica fue determinada usando azocaseína como sustrato.

EVALUACIÓN DE SOYA GENETICAMENTE MODIFICADA POR Q-PCR EN EL PROCESAMIENTO DE LECHE DE SOYA

Matos, A.^{1,2}, Torrezan, R.², Del Aguila, E.M.¹, Oliveira, E.M.M.² e Paschoalin, V.M.F.¹.

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, RJ – Brasil

2. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

INTRODUCCIÓN

La soya es una planta que pertenece a la familia Fabaceae (leguminosa) que está presente en la cadena alimentar hace 5.000 años. Única leguminosa que contiene los nueve aminoácidos esenciales en la proporción correcta para la salud humana, visto que la función básica de las proteínas en la dieta es suplir al organismo de cantidades adecuadas de aminoácidos, ya que no son sintetizados por el organismo. El mercado de soya presenta fuerte crecimiento en el sector de bebidas NANCS – no alcohólicas, no carbonatadas, cuando comparado a los productos tradicionales. ROSA & RÉVILLION, 2011 predicen que este mercado crecerá a una tasa anual del 20% hasta 2020. La leche de soya es considerada un producto de procesamiento moderado con beneficios nutricionales debido a los altos niveles de aminoácidos esenciales y ácidos grasos, vitaminas y minerales, representando también una alternativa a la leche de origen animal, especialmente para personas intolerantes a la lactosa o alérgicas a las proteínas de la leche. Sin embargo, la etiqueta de las bebidas a menudo no proporciona información suficiente sobre el origen de la soja adoptado en el proceso. A pesar de la etiqueta ser obligatorio para los alimentos en el Brasil y la Comunidad Europea se ha fijado en 1 % y 0,9 % de OGM (BRASIL, 2005; EC, 2003), respectivamente, ni siempre es posible determinar tales cantidades, dado el tipo de proceso adoptado. En el Brasil, se estima que 88,8 % de la zafra 2012/ 13 sea de cultivo de la soya genéticamente modificada (CÈLERES, 2012). Sin embargo, no hay datos reales sobre el consumo de alimentos procesados a base de esta cultivar. La cultura de soya tolerante al herbicida glifosato – Soya *Roundup Ready*® es la que ocupa las mayores extensiones agrícolas en el mundo, y el Brasil es el segundo mayor productor (JAMES, 2013). El establecimiento de las evaluaciones *farm to fork* es necesario, una vez que el mercado es regulado a través de la Resolución Normativa, n° 9, de 2 de diciembre de 2011, de la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad – CTNBio, que aprueba el plano de control de los transgénicos posteriores a la liberación comercial. Frente a esta situación, es importante implementar metodologías que

permitan la rastreabilidad del organismo genéticamente modificado a fin de asegurar el derecho del consumidor (BRASIL, 2003).

OBJETIVO

Cuantificar el porcentual de soya RR en la producción del extracto hidrosoluble de soya, en las formulaciones de 0,1 hasta 50 % de soya RR® por PCR en tiempo real usando una sonda del tipo *Taqman*® 35S GMO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Producción de formulados con soya orgánica y soya genéticamente modificada

Granos de soya (*Glycine max*, L.) de zafra 2006/2007 de dos diferentes sistemas de cultivo: orgánica, ECOBRAS de procedencia do Rio Grande do Sul; e genéticamente modificada - BRS 247, del estado de Paraná. Se obtuvieron los extractos hidrosolubles de soya conforme Felberg *et al.*, 2003. La Tabla 1 muestra las formulaciones de granos descascados de soya orgánica y soya RR®. La soya orgánica ha sido procesada para asegurar que no había contaminación cruzada con otras legumbres o semillas de soya modificadas genéticamente.

Análisis molecular

Material

Material de Referencia Certificados – MRC con porcentual de soya RR® definidos: 0% nominal (>0,003%), 0,1 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % y 5,0 % del CRM IRMM-410 (*Fluka Chemie GmbH*); y formulaciones de los extractos de soya (Tabla 1).

Extracción del DNA genómico

El DNA genómico de los extractos hidrosolubles de soya en las formulaciones de soya RR® y de los padrones fueron extraídos usando el kit comercial - DNeasy® Plant Mini (Quiagen).

Análisis del DNA genómico total de soya

Las muestras de DNA aislados y purificados fueron analizadas por espectrofotometría (espectrofotómetro BioRad) para la evaluar la pureza por la relación de la absorbancia OD₂₆₀/ OD₂₈₀. En seguida, la cantidad de DNA genómico aislado fue determinada pelo método fluorométrico, usando el Qubit® *fluorometer* (Invitrogen). Con estas extracciones fueron realizadas PCR *simplex* para detección del gen de la lectina con la

secuencia de los oligonucleótidos iniciadores criados y validados por Germini *et al.* (2004), sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*. Las reacciones fueran realizadas a 95 °C, por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 50 seg, 60 °C por 50 segundos y a 72 °C por 50 seg, y una extensión final a 72 °C por 10 min en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. La mezcla de reacción para detección de lectina consistía en 2 µL de tampón PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1 % Triton X-100), 0,8 µL de DNTPs 10 mM, 1,4 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,6 µL de la enzima Taq polimerase, 300 ng de DNA usada como molde y 1 nM de la mezcla de oligonucleotídeos iniciadores, en un volumen total de reacción de 20 µL. Los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa 2,0 % y visualizados con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), en tampón TBE 0,5x. Las condiciones de análisis de electroforesis fueron de 90 V por 90 min. Los productos de PCR fueron visualizados y foto documentados con el auxilio de un transiluminador (*E-Box 008 System; Vilbert Loumat-Biosystems*) con luz UV a 302 nm.

Cuantificación de soya RR en la leche de soya por PCR en tiempo real - qPCR

Las muestras de DNA aislados fueron analizadas en PCR tiempo real con la sonda TaqMan® *GMO 35S Soy Detection Kit (Applied BioSystems)*, en un termociclador ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las fluorescencias detectadas fueron analizadas por el programa SDS 7000. La cuantificación del porcentual OGM en las muestras fueron obtenidas en base a la diferencia entre los valores de C_T del gen estudiado y del endógeno. . Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 20 µL, donde: 17,6 µL de *TaqMan® GMO 35S Soy PCR Mix*, 0,4 µL *AmpliTaq Gold® DNA polimerasa* y 400 ng de DNA molde. La reacción consiste de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 50 seg, 60 °C por 60 seg y 72 °C por 50 seg, y una etapa final de 72 °C por 5 min. Los resultados del evento GM fueron evaluados estadísticamente usando los siguientes parámetros: especificidad, rango dinámico lineal, la pendiente, coeficiente de correlación lineal, la eficiencia de PCR, límite de cuantificación y la precisión se evaluó de acuerdo con el protocolo de la JRC - CRLVL13/05VR (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis do ADN genómico total de soya

Los aislados de los extractos formulados presentaron una relación - OD₂₆₀/ □D₂₈₀, en media igual a 1,9. Las cuantificaciones fluorométricas de los aislados de ADN total de las formulaciones del extracto soluble fueron (236 ± 87) µg/ mL. Sin embargo, los productos de

la amplificación del gen de la lectina (157 pb) mostraron intensidad similar para todas las muestras (figura 1).

qPCR - Soya *roundup ready*®

La cuantificación de todos los extractos hidrosolubles fue realizada con el kit TaqMan® 35S *GMO*. En primer lugar, fueron realizados ensayos para garantizar que la soya orgánica utilizada en el estudio estaba libre del evento RR; y el agua libre de contaminación que resultaría en resultados no específicos (Tabla 2). La soya orgánica usada en este estudio no mostró ningún señal (valor de C_T) para el evento o de contaminación por el virus CaMV. La leche de soya se considera un producto de procesamiento moderado (ROTT *et al.* 2004). Sin embargo, el resultado en % OMG en todos los protocolos de cuantificación sugiere que el ADN presentó un alto grado de degradación, debido a la baja correspondencia a las formulaciones elaboradas. Algunos estudios que analizaron productos similares presentaron resultados siempre menores que 0,9 %, no siendo necesario cumplir lo etiquetado en cualquiera de los países que regulan este tipo de mercado (BARROS *et al.*, 2008; DINON *et al.*, 2010; BRANQUINHO *et al.*, 2010). La detección del evento RR en *leche* de soya en productos altamente procesados sólo fue reportada cuando la PCR convencional es del tipo *Nested* PCR (BROD *et al.*, 2007; ZHANG, 2007), donde son necesarias dos reacciones de amplificación con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica, con un aumento considerable del costo analítico. El análisis del extracto hidrosoluble realizado con 100 %, 50 %, 25 % de soya RR, indica que el rango lineal dinámico del detector de fluorescencia es menor que 10 %, independiente del producto de amplificación evaluado. Sin embargo, Bernal & Holst-Jesen (2001) observaron que en muestras con un mínimo grado de procesamiento y contenido conocido de soya RR de 10 y 100 %, obtuvieron resultados indicando que la cuantificación absoluta podría ser realizada. El formulado 4 que contenía 5 % de soya RR mostró resultados aproximadamente de un 75 % menor que la masa de soya RR de la partida del procesamiento, que muestra que esta cuantificación no puede ser dada como absoluta para este tipo de muestra. El procesamiento industrial, los conservantes utilizados, la mezcla con pulpa o extractos de frutas dificultan el acceso a un ADN adecuado. Por lo tanto, la aplicación de protocolos para el análisis de la cadena productiva, es necesario para rastrear el origen del grano. Una vez que, dado el tipo de procesamiento y el porcentaje de la soya en el producto final, esa información no es transmitida de forma adecuada para el consumidor del producto o acompañar su uso después de la liberación comercial como determinado en la normativa (EC, 2003; BRASIL, 2011).

CONCLUSIÓN

Los resultados reportados en la Tabla 2 mostraron que, independientemente del método de cuantificación, la mezcla intencional o no, muestras de soya RR® no fueron posibles de resolver. Sin embargo, la leche sólo será capaz de ser etiquetado si las semillas de soya RR® está con un nivel mayor que 5 % en peso de granos de este procesamiento de la leche.

REFERENCIAS

Barros, N. E. F.; Oliveira, E. M. M.; Marin, V. A., Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos., Revista de Nutrição, 2008, v. 21, p. 83-90.

Berdal, K.G.; Holst-Jensen, A., Roundup Ready Soybean event-specific realtime quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis. Eur. Food Res. Technol., 2001, v. 213, p. 432-8.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4680_03.htm>. Acesso em: 11 jan 2012.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24.03.2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Disponível em <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/1034.html>>. Acesso em: 11 jan 2012.

BRASIL. Resolução Normativa Nº 9, de 2 de dezembro de 2011. Dispõe sobre as normas de monitoramento pós-liberação comercial de organismos geneticamente modificados. A Comissão Técnica Nacional De Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições legais e regulamentares, em observância às disposições contidas no inciso III do art. 14 da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, resolve: Art. 1º. O monitoramento pós-liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados – OGM ou sua isenção são regulados pelas normas constantes desta Resolução Normativa. Acesso em: 11 jan 2012.

Brod, F.C.A.; Ferrari, C.D.; Valente, L.L.; Arisi, A.C.M., Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk., Lwt-food Science And Technology, 2007, Vol.40(4), pp.748-751.

CELERES *celer.es.com.br/wordpress/wp-content/.../RelBiotecBrasil_1202_por.pdf*
Acessado em:02/09/2013.

European Commission (2003). Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament

and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Union, L 268, 1–23.

European Commission (2003). Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. Official Journal of the European Union, L 268, 24–28.

Felberg, I. ; Torrezan, Renata ; CABRAL, L. C. . Estabelecimento de condições adequadas para obtenção de leite de soja integral. . Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2003 (Comunicado Técnico (n.59)).

Germini, A. *et al.*. Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p. 3958-3962, 2005.

James, C.. Isaaa Brief 44-2012: Executive summary - global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. Disponível em <<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/37/executivesummary/default.html>>. Acesso em: 09 set 2013.

JRC - CRLVL13/05VR: JRC validation report - Event-specific method for the quantification of soybean line A2704-12 using a real time PCR, 2007. Acesso em: set de 2013

Rosa, N.P.; RÉVILLION, J.P.P., Fatores estratégicos explorados pelas empresas processadoras de lácteos para inserir-se no mercado de bebidas à base de soja. *Ciência Rural*, 2011, v.41(6), pp.1108-1113.

Rott, M.E.; Lawrence, T.S.; Wall, E.M.; Green, M.J., Detection and quantification of Roundup Ready Soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction, *J Agric Food Chem*, 2004, v. 52, p. 5223-5232.

Zhang, M.; Gao, X.; Yu, Y; Ao, J.; Qin, J.; Yao, Y; Li, Q., Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR., *Food Control*, 2007, v.18 (10), p.1277–1281.

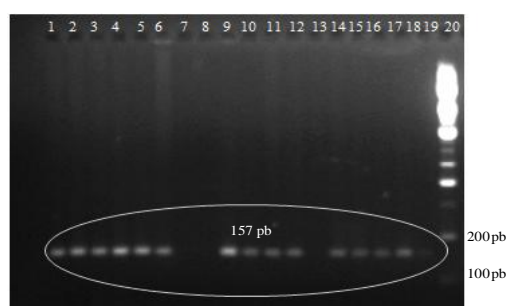


Figura 1. Productos de PCR cualitativa para detección del gen endógeno de la lectina en las leches de soja, en las formulaciones de los extractos hidrosolubles de soja y MRCs de soja RR. Línea (1). MRC 0%; (2) MRC 0,1%; (3) MRC 0,5%; (4) MRC 1,0%; (5) MRC 2,0%; (6) MRC 5,0%; (7) Padrón Fluka 0%; (8) Branco de la extracción%; (9) Agua utilizada en la preparación de la leche; (10) *leche* 0,1%; (11) *leche* 1%; (12) *leche* 2%; (13) *leche* 5%; (14) *leche* 10%; (15) *leche* 25%; (16) *leche* 50%; (17) *leche* con soja orgánica 100%; (18) *leche* con soja convencional 100%; (19) *leche* con soja RR 100%; (20) Padrón *Low mass* (Invitrogen)

Tabla 1. Formulaciones para producción de extracto hidrosoluble de soya con las concentraciones nominales conocidos de soya RR®.

Formulado	Soja RR (g)	Soja orgánica (g)	% RR®
(1)	0,1109	100,1196	0,1
(2)	1,0273	101,1340	1,0
(3)	2,0275	98,0457	2,0
(4)	5,0153	95,1163	5,0
(5)	10,1427	90,1603	10,0
(6)	25,0510	75,0321	25,0
(7)	50,0682	50,1190	50,0

Tabla 2. Cuantificación – Formulados de leche de soya RR®

	% RR
F (1): 0,1%	0,16
F (2): 1,0%	0,36
F (3): 2,0%	0,67
F (4): 5,0%	1,60
F (5): 10,0%	2,34
F (6): 25,0%	4,82
F (7): 50,0%	9,19
<i>Leche soya orgánica</i>	ND
<i>Leche soya convencional</i>	0,04
<i>Leche soya RR®</i>	41,5
Branco	ND
H2O	ND

ND – no detectable.

REUTILIZACIÓN DE RESÍDUO DE SOYA (*Glycine max*) COMO FUENTE DE PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Cyntia S. Freitas; Patrícia R. Pereira; Eduardo M. Del Aguila; Vânia M. F. Paschoalin; Joab T. Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química –
Rio de Janeiro – Brasil

INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine Max*) es un grano de la familia de las oleaginosas, rico en lípidos y proteínas. Es un producto agrícola de gran interés mundial gracias a la versatilidad de aplicación de sus productos en la alimentación humana y animal y a su valor económico en los mercados nacional e internacional. El Brasil figura entre los mayores productores de soya del mundo, siendo cultivado en varias regiones del país (Mello *et al.*, 2004). La soya es la cultura agrícola brasileña que más creció en las últimas tres décadas, correspondiendo a 49 % de la área plantada en granos del país. Los granos de soya son una excelente fuente de proteínas de alta calidad, grasas poliinsaturadas, vitaminas, minerales y otros nutrientes importantes tanto para la alimentación humana cuanto para la animal (Krishnan, 2000; Torun, 1992 e Wang *et al.*, 2003). En media, la soya contiene cerca de 40 % de proteínas (Nielsen, 1996). Con excepción de la metionina, este producto fornece todos los otros aminoácidos esenciales, permitiendo su aplicación en la salud humana y animal. Raramente la soya es consumida simplemente cocinándose los granos. Tradicionalmente, ella es procesada generando alimentos a base de ese grano o ingredientes para la industria de alimentos. Para la producción de aceite, la soya pasa por un proceso de prensar o por extracción con solvente orgánico produciendo al final un residuo sólido rico en proteínas. Este residuo, en la mayoría de las veces, es utilizado para fabricación de alimento animal después del tratamiento térmico seguido de una etapa de torrar para la inhibición de los factores anti-nutricionales (Snyder & Wilson, 2003). La importancia nutricional de la soya es también atribuida a la presencia de péptidos bio-activos. Estos pueden beneficiar la salud en varios aspectos, como en la prevención de enfermedades circulatorias, diabetes, en la protección contra el cáncer, para bajar el nivel de colesterol, en la prevención de la obesidad, auxiliando en las funciones inmunomoduladoras y actuando también contra microorganismos patogénicos (Wang & Mcjia, 2005; Galba et al., 2013). La diversidad de propiedades funcionales exhibida por los péptidos de la soya despertó el interés por este producto en el área clínica y alimenticia impulsando el desarrollo de nuevas tecnologías para producción de compuestos bio-activos en escala

industrial (Korhonen *et al.*, 1998). Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas que participan del sistema de defensa de las plantas siendo considerados como parte de la inmunidad innata (Thevissen *et al.*, 2003). De hecho, estos péptidos exhiben una potente actividad contra fito -patógenos y también contra microorganismos patogénicos para los seres humanos, incluyendo los virus, bacterias, protozoarios y hongos (Grossi-de-Sá *et al.*, 2011). La habilidad de los PAMs atrajo una atención especial, despertando el interés por estas moléculas en las áreas clínica y alimenticia, una vez que ellos representan una herramienta valiosa en el control de la pérdida de colectas y en la producción de antibióticos para tratar infecciones humanas (Grossi-de-Sá *et al.*, 2011). Adicionado a esto, los PAMs pueden ser aplicados a la industria alimentar, no sólo como un conservante de alimentos, pero también como ingredientes de alimentos funcionales para promover la salud (Fadaei, 2012). En general, los PAMs extraídos de plantas poseen una masa molecular que varía de 2 a 9 kDa y, de acuerdo con la estructura primaria parecidas, pueden ser clasificados en 10 familias: Tioninas, Defensinas, Proteínas de Transferencia de Lipídicos, Peptídicos semejantes-a la-haveína, MBI, IbAMP, Snakinas, Sheferdinas y péptidos macro-cíclicos (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001). Muchos péptidos de plantas están siendo identificados y caracterizados, como a lunasina, un péptido de la soya y cebada con 43 residuos de aminoácidos; las tioninas que poseen propiedades anti- carcinogénica; y los ciclotides, una clase de péptidos con actividad insecticida, anti-HIV y anti- citotóxica (Gunasekera *et al.*, 2006, Marcos *et al.*, 2008). Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue extraer péptidos bio-activos del residuo de la soya con actividad antimicrobiana contra microorganismos de importancia clínica y alimentar.

MATERIAL Y MÉTODOS

El residuo de soya (*Glycine max*) fue gentilmente cedido por una industria brasileña. Los microorganismos (*Acinetobacter genomospecies 3*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* y *Aeromonas hydrophila*) utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana fueron obtenidos del banco de células del Laboratório de Análises Avanzadas en Bioquímica y Biología Molecular (LAABBM) de la UFRJ.

Extracción de péptidos.

Una parte del residuo (50 g) fue triturada y homogenizada en agua destilada (150 ml) seguido de incubación en baño a 50 °C durante 24 h con agitación constante. Esta suspensión fue centrifugada (8000 x g) durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante fue térmicamente tratado en baño a 90 °C durante 10 min con agitación constante y

en seguida el producto final (extracto acuoso del residuo) fue filtrado en membrana de 0,22 μm y estocado a 4° C.

Determinación de la cantidad de proteína

La concentración de proteína del extracto fue cuantificada utilizando Qubit ® Kit Protein Assay (Invitrogen), conforme las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, 2013).

Análisis por SDS-PAGE

El perfil proteico del extracto obtenido fue analizado en gel de poliacrilamida a 20 % en condiciones desnaturantes (Laemmli, 1970). Las bandas proteicas fueron visualizadas por coloración con Coomassie Brilliant Blue G-250 0,2% como descrito por Schägger & Jagow (1987). Como patrón fue utilizado Ultra Low Range Molecular Weight Marker (Invitrogen).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

El microorganismo *A. genomospecie 3* fue cultivado en medio LB (Luria-Bertani BD™) y los demás fueron cultivados en medio BHI (Brain Heart infusion BD™) durante 18 h a 37 °C hasta alcanzar una concentración celular de 10^9 células/ mL, en la ausencia o en la presencia de cantidades decrecientes del extracto del residuo (250 ppm – 3000 ppm). En seguida, las células fueron diluidas en forma seriada (1: 10) en solución salina (NaCl 0,85 %) y sembradas en medio LB o BHI sólido. Después 18 h a 37 °C, las unidades formadoras de colonias fueron contadas para evaluar la viabilidad de las células en la presencia de los péptidos.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

El extracto del residuo fue fraccionado en HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando un sistema semi-preparativo de GPC/SEC con inyección automática. Fue utilizada una columna de GPC/SEC PROSEC 300S 300 x 7,5mm (Varian inc.) ligada a una columna guarda y acoplado a un detector de fotodiodo (PDA [SPD-M20A]). La fase móvil consistió en 50 mM Tris-HCl pH 7,5 con NaCl 0,1 M y el flujo fue mantenido en 1,0 mL/ min a 25 °C. Fue inyectado en la columna 25 μL del extracto del residuo (3 mg/ mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo utilizado para extraer proteínas de bajo masa molecular del residuo de soya se mostró adecuado para ese propósito, donde fue observado un rendimiento en la extracción de 4,8 mg/ mL de proteína total. Con este protocolo fue observado grandes cantidades de péptidos fueron extraídas conforme revelado por análisis en SDS-PAGE,

excepto por presentar algunas bandas poli-peptídicas superiores a 14,2 kDa (Fig. 1 A). El fraccionamiento del extracto del residuo en HPLC confirmó la extracción mayoritaria de proteínas con baja masa molecular. De acuerdo con la curva de calibración realizadas con padrones de proteína (66 kDa – 12 kDa), proteínas con masa molecular de 37 kDa a 1,4 kDa son eluidas entre 10 y 17 min (figura 1B). La soya industrialmente procesada pasa por tratamientos térmicos que pueden desnaturar e inactivar proteínas y auxiliar en la formación de hidrolizado proteico (péptidos). Partes de las masas identificadas pueden corresponder a péptidos antimicrobianos, una vez que estos valores están en el rango de masa molecular de los péptidos descritos en plantas (2-9 kDa) (García-Olmedo *et al.*, 1998; 2001). Inicialmente, el extracto fue testado contra *A. genomospecie 3*, el microorganismo utilizado como modelo en este estudio. El extracto del residuo fue capaz de inhibir 100 % del crecimiento bacteriano (Tabla 1), en una concentración de 250 ppm (1,25 mg de proteína). La concentración mínima de inhibición para esta bacteria parece estar entre 200 e 250 ppm de extracto, una vez que 200 ppm de este extracto no fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. El extracto del residuo también fue eficaz contra las especies de *A. hydrophila* y *E. coli* (tabla 1), inhibiendo completamente el crecimiento de estas bacterias en la concentración de 2000 ppm. Lo mismo no fue observado para la especie *S. coagulase negativa* la cual tuvo una inhibición de 52,38 % con la utilización de 3000 ppm del extracto. Para determinar el potencial antimicrobiano del residuo, testes adicionales todavía serán realizados. Como mencionado anteriormente, las proteínas del extracto acuoso probablemente están sometidas a hidrolise durante las etapas de elevación de temperaturas. Según Adachi *et al.* (1991), la hidrólise de polipéptidos puede ser estratégicamente utilizada para producir péptidos bio-activos. Posiblemente, el extracto acuoso del residuo de soya aquí descrito, es compuesto no apenas de péptidos que están naturalmente presentes en la soya, pero también de péptidos liberados a partir del proceso de hidrolise.

CONCLUSIÓN

La extracción de péptidos del residuo de soya fue eficiente usando el protocolo de extracción con agua, siendo un método simple y barato para extracción de péptidos antimicrobianos. El residuo industrial de la soya mostró ser una valiosa fuente de estos péptidos que pueden ser utilizados para fines clínicos o en la industria alimenticia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fadaei V. Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food Ingredients. *Annals of Biological Research*, 2012, 3 (5):2520-2526
- Galbas M., Porzucek F., Woźniak A., Słomski R., Selwet M., Isolation of low-molecular albumins of 2S fraction from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Biochimica Polonica*; (2013) Vol. 60, No 1.
- Garcia-Olmedo, F., Rodriguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M, López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión, C.,. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, (2001) 498, 219-222.
- Krishnan, H. B.. Biochemistry and molecular biology of soybean seed storage proteins. *Journal of New Seeds*, (2000) 2, 1–25.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- Mello, F. O. L.; Sedyama, C. S.; Moreira, M. A.; Reis, M. S.; Massoni, G. A.; Piovesan, N. D.; Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. *Pesq. Agropec. Bras.*, (2004) v. 39, n. 5, p. 445-450.
- Nielsen, N.C.. Soybean seed composition. In: Verma, DPS, Shoemaker RC, editors. *Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology*. Wallingford, U.K.: CAB International. (1996) p 127–63.
- Snyder, HE; Wilson, LA. Em: Caballero, B., Trugo, L. C. e Finglas, P. M. (eds.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, Oxford, UK, (2003) 2nd Ed., Vol. 9, pp. 5383-5389.
- Torun, B.. Soy proteins as amino acid and protein sources for preschool-age children. In F. Steinke, D. H. Waggle, & M. N. Volgarev (Eds.), *New Protein Foods in Human Health: Nutrition, Prevention, and Therapy*. Boca Raton Fl: CRC Press (1992). pp. 91–100.
- Thevissen, K.; François, I.E.J.A.; Takemoto, J.Y.; Ferket, K.K.A.; Meert, E.M.K.; Cammue, B.P.A. DmAMP1, na antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae* *FEMS Microbiol Lett*, (2003) 226:169-173.
- Wang W, Mcjia EG. Soybean Association and the USDA Functional Foods. *Comp Rev FoodSd Food Sate* (2005) 4: 63–78.

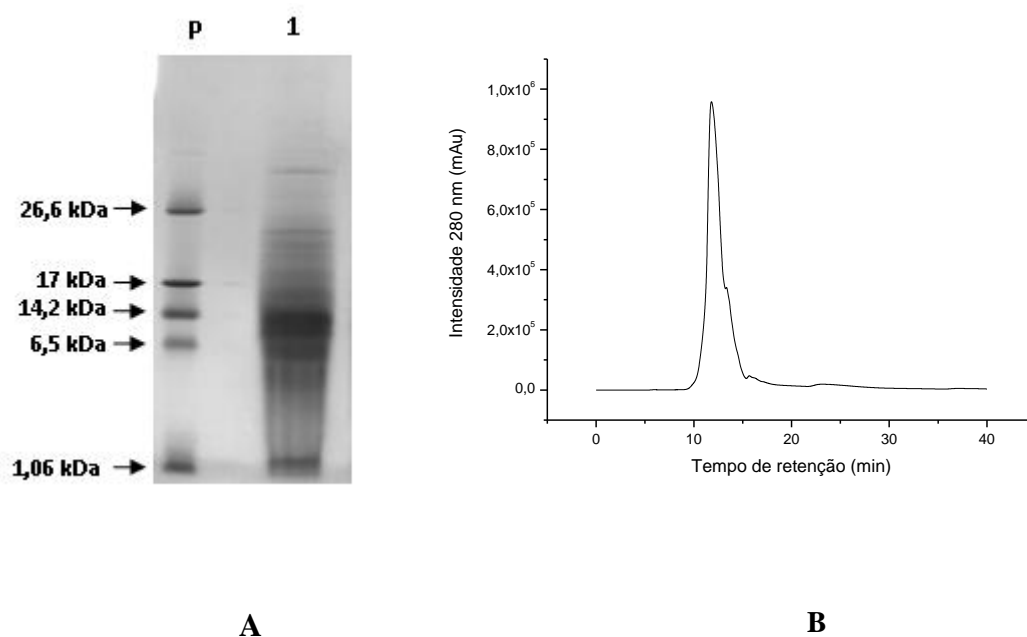


Figura 1. Fracionamento do extrato do resíduo de soja. (A) O Extrato do resíduo (linha 1) foi analisado em gel de poliacrilamida a 20% e comparado com o padrão (linha P) Ultra Low range Molecular weight marker (Invitrogen). (B) Cromatograma com extrato do resíduo (25 μ L) analisado em HPLC usando uma coluna de gel filtração (GPC/SEC PROSEC 300S 300 x 7,5mm).

Tabla 1. Resultados de la actividad antimicrobiana del extracto del residuo.

Microrganismos	Extracto (ppm)	Inhibición (%)
<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>	250	100
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2000	100
<i>Escherichia coli</i>	2000	100
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	3000	52,38

AVALIAÇÃO DO TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SORO DE TOFU CONCENTRADO POR CRIOCONCENTRAÇÃO

MSc. Silvia Benedetti¹; Eng.Lara Alexandre Fogaça¹; Dra.Elane Schwinden Prudêncio²; MSc. José Marcos Gontijo Mandarino³; Quim. Rodrigo Santos Leite³; Dr.José Carlos Cunha Petrus¹

¹ Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Florianópolis, SC, Brasil. silviabene@gmail.com

² Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Florianópolis, SC, Brasil.

³ Embrapa Soja, Londrina-PR, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento e a recuperação de compostos a partir de resíduos da indústria de alimentos constitui em uma alternativa à obtenção de compostos funcionais de alto valor agregado, que podem ser utilizados como insumos e/ou ingredientes na indústria de alimentos e farmacêutica, além de minimizar o impacto ambiental gerado por esses resíduos.

O tofu é um alimento muito consumido nos países orientais, geralmente produzido em pequenas indústrias e se origina da coagulação do extrato hidrossolúvel de soja. Um das suas etapas de produção é a prensagem, na qual é eliminada grande quantidade de resíduo líquido, denominado soro. O soro de tofu é caracterizado por elevados valores de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), elevado teor de proteínas (CHAI et al., 1999), concentrações substanciais de açúcares e minerais (coagulantes) (BAZINET; IPPERSIEL; LAMARCHE, 1999). Além disso, contém moléculas de baixa massa molar, como peptídios, lipídios, e alguns compostos funcionais, tais como isoflavonas e oligossacarídeos (KIM; KIM; YOO, 2005). As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes à classe dos fitoestrógenos, que apresentam estrutura química semelhante ao estrogênio humano e estão presentes na soja em quatro formas químicas: β -glicosídeos, malonil glicosídeos e acetil glicosídeos e na forma não-conjugada aglicona, sendo que cada forma química possui três isômeros: a genistina, a daidzina e a glicitina (CHUN; KIM; KIM, 2008).

Um grande número de pesquisadores vem relatando em seus trabalhos os benefícios do consumo de produtos contendo isoflavonas na saúde humana, tais como a capacidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares, colesterol, aterosclerose, osteoporose, apresentar atividade estrogênica amenizando sintomas relacionados à menopausa e reduzindo o risco de

câncer de próstata e mama, além de seu efeito antioxidante (KWAK, LEE e PARK, 2007; SCAMBIA et al, 2000; ZHANG et al., 2003).

Para seleção de um processo a ser utilizado na indústria de alimentos e de bioprodutos, é importante avaliar se o mesmo possui baixo custo, se é uma tecnologia eficiente e sustentável e se preserva os componentes do alimento, bem como sua atividade biológica conferida pelos seus compostos fitoquímicos (KLIMCZAK et al., 2007). Nesse contexto, a crioconcentração vem sendo considerada uma técnica promissora para concentração de compostos bioativos. Essa tecnologia promove a concentração de fluidos alimentícios através do congelamento e subsequente separação da parte aquosa dos solutos por meio de descongelamentos fracionados sucessivos (BELÉN et al., 2012). Do ponto de vista da indústria de alimentos, a crioconcentração é adequada devido à sua capacidade de preservar a qualidade nutricional dos fluidos alimentícios, pois minimiza a perda de compostos termolábeis, resultando num produto final de melhor qualidade e pode ser uma alternativa promissora às técnicas de concentração convencionais utilizadas no processamento de alimentos (SÁNCHEZ et al., 2011a,b). Considerando os aspectos positivos da crioconcentração e os benefícios potenciais das isoflavonas presentes no soro de tofu, esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da crioconcentração de compostos bioativos presentes nesse resíduo bem como da atividade antioxidante, na fração concentrada e no gelo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Crioconcentração

O princípio deste método baseia-se no congelamento total da solução seguido por descongelamento parcial através de separação gravitacional simples. Assim, obtêm-se duas frações: o fluido concentrado (FC) e a fração de gelo (G). A crioconcentração foi realizada de acordo com metodologia proposta por Aider e Ounis (2012), com modificações. Um volume inicial de 1,5 L de soro de tofu foi dividido em 2 bateladas de 750 mL e então congelado a -20 ± 2 °C. O processo de congelamento foi conduzido em um freezer por congelamento indireto. Após congelar-se completamente a solução, 50 % do seu volume inicial foi descongelado à temperatura ambiente (20 ± 2 °C). O líquido descongelado representa o fluido concentrado da primeira etapa da crioconcentração. Esse fluido concentrado foi novamente congelado a -20 ± 2 °C e então utilizado como solução de alimentação para a segunda etapa. Ao final da segunda etapa, 50 % da solução concentrada foi descongelada, coletada e congelada novamente. Esse procedimento foi repetido até a 3ª etapa de crioconcentração,

sendo que em cada etapa o fluido concentrado foi congelado a -20 ± 2 °C e utilizado como solução de alimentação na etapa seguinte. O gelo remanescente de cada etapa e uma alíquota de cada concentrado foi armazenado a -20 ± 2 °C até o momento da realização das análises. Na Figura 6 está apresentado um diagrama exemplificando o processo de crioconcentração a ser utilizado.

O fator de concentração (FC) de cada etapa da crioconcentração foi calculado de acordo com a metodologia proposta por Aider e Ounis (2012), em função do aumento de concentração da solução em relação à quantidade de matéria seca no soro inicial de alimentação. O conteúdo total de matéria seca será determinado pela medida da perda de peso após a secagem a 80 °C e expresso como conteúdo de matéria seca/massa total ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) (AOAC, 2005). Todas as análises do gelo e do fluido concentrado serão realizadas em triplicata. O FC, expresso em %, será calculado de acordo com a Equação 1.

$$FC = \frac{DM_n}{DM_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde DM_n é o conteúdo total de matéria seca (g) do fluido concentrado de cada etapa da crioconcentração e DM_0 é o conteúdo total de matéria seca (g) do soro de tofu inicial. O desempenho da crioconcentração (E) será determinado baseando-se no conteúdo de isoflavonas e de oligossacarídeos. A eficiência do processo é referida como o aumento do conteúdo de isoflavonas e de oligossacarídeos do fluido concentrado em relação ao conteúdo destes mesmos compostos remanescente no gelo, calculado pela Equação 2.

$$E (\%) = \frac{CCC_n - CCG}{CCC_n} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde CCC_n é o conteúdo do composto de interesse (isoflavonas) no fluido concentrado (mg) em cada etapa da crioconcentração e CCG é conteúdo do composto de interesse no gelo (mg) em cada etapa da crioconcentração.

A matéria seca total foi determinada pela medida da perda de peso das amostras numa estufa a 80 °C e expressa com conteúdo de matéria seca/peso seco ($\text{g}/100 \text{ g}$) (AOAC, 2005).

2.2 Quantificação de isoflavonas

A extração de isoflavonas das amostras de soro de tofu foi realizada conforme metodologia proposta Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2002), com modificações. A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas de acordo com a Berhow (2002), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de arranjo de foto diodo (Modelo 996) e injetor automático de amostras (Modelo 717 Plus) da

WATERS® (Milford, EUA). Foi utilizada nesta etapa uma coluna de fase reversa (YMC Pack ODS-AM®, 250 mm x 0,4 mm de diâmetro).

2.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP (Método de redução do ferro)

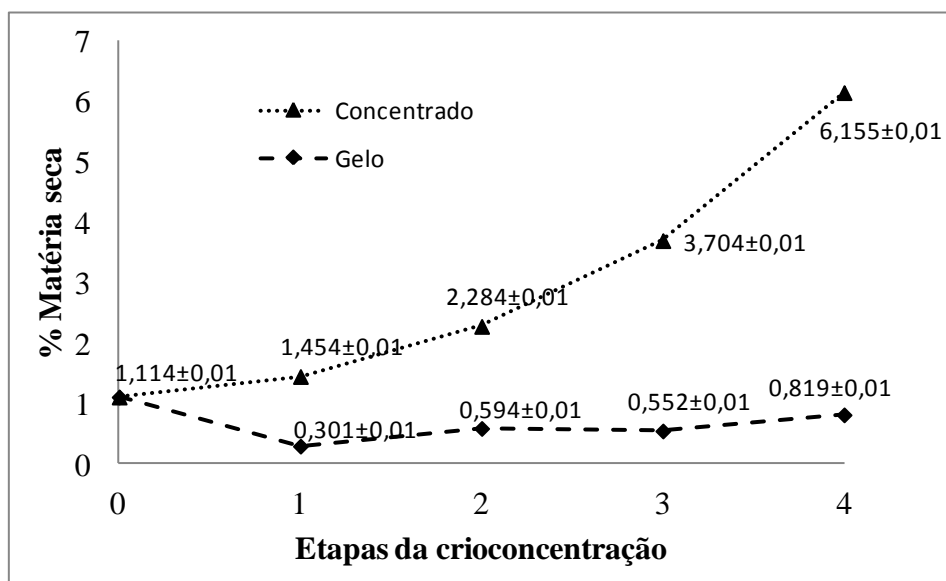
Utilizou-se o método descrito por Benzie e Strain (1996), com modificações de Arnous, Makris e Kefalas (2002). Este se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe³⁺ /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe²⁺, de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. O Trolox foi usado como padrão e os resultados foram expressos como equivalente Trolox em µmol/mL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Matéria seca total e fator de concentração

A evolução do conteúdo de matéria seca total em função das etapas da crioconcentração está apresentada na Figura 1. O conteúdo de matéria seca total aumentou significativamente ($p < 0,05$) no fluido concentrado nas etapas 2 a 4 se comparado com o soro inicial. Já o fator de concentração aumentou significativamente ($p < 0,05$) em todas as etapas do processo se comparado com os valores do soro inicial de aproximadamente 130, 40 % na primeira etapa, 206, 5 % na segunda etapa, 338, 05 % na terceira etapa e 554,40 % na última etapa. O conteúdo de matéria seca total no gelo remanescente diminuiu significativamente ao longo do processo em todas as etapas quando comparado ao soro inicial.

Figura 1: Conteúdo de matéria seca total do gelo e do fluido concentrado em função das etapas da crioconcentração. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.



3.2 Eficiência da concentração de isoflavonas

O conteúdo de isoflavonas tanto no fluido concentrado quanto no gelo, está apresentado na Tabela 1. O efeito do ciclo da crioconcentração foi significativo no conteúdo de isoflavonas em todos os fluidos concentrados, aumentando com o tempo de processamento. Na fração de gelo, observa-se que o conteúdo de isoflavonas na primeira etapa, foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que nas etapas subseqüentes, sendo que no gelo das etapas 2 e 3, não houve diferença significativa na concentração desses compostos. Os compostos fenólicos apresentam um grande número de pontes de hidrogênio, o que lhes confere a capacidade de ligação com moléculas de água. Pelo aumento da concentração de isoflavonas na solução, a água intersticial torna-se menos disponível para o congelamento, resultando na retenção desses compostos no gelo durante o processo de separação. De acordo com Aider, Halleux e Akbache (2007), esse fenômeno pode reduzir a eficiência do processo. A maior eficiência na separação foi observada na terceira etapa da crioconcentração, com 89,11 %. Nas etapas anteriores a eficiência foi inferior, de 82,23 % na segunda etapa e 79,52 % na primeira etapa. De acordo com Belén et al. (2012), normalmente ocorre perda da eficiência ao longo das etapas da crioconcentração devido ao aumento da retenção de solutos no gelo. Porém, nesse caso houve menor retenção de solutos na terceira etapa e um aumento significativo de isoflavonas no concentrado.

Tabela 1: Conteúdo de isoflavonas (mg L⁻¹) no soro de tofu na alimentação, fluidos concentrados e fração de gelo de cada etapa da crioconcentração em blocos.

Amostras	β-glicosídeos*			Malonil glicosídeos*			Agliconas*			Totais**
	G-dai	G-gli	G-gen	M-dai	M-gli	M-gen	Dai	Gli	Gen	
Soro	2,59 ^d ±0,15	1,67 ^d ±0,12	2,22 ^d ±0,24	5,64 ^d ±0,12	4,95 ^d ±0,12	10,72 ^d ±0,57	1,08 ^d ±0,13	4,07 ^c ±0,19	0,56 ^d ±0,06	33,50 ^d ±0,17
Conc1	9,55 ^c ±0,37	7,59 ^c ±0,17	8,51 ^c ±0,16	20,50 ^c ±0,17	17,44 ^c ±0,61	33,01 ^c ±2,00	2,54 ^c ±0,07	5,95 ^c ±1,85	0,77 ^c ±0,04	105,87 ^c ±1,89
Conc2	12,02 ^b ±0,13	9,42 ^b ±0,08	11,86 ^b ±0,27	26,20 ^b ±1,30	22,56 ^b ±0,42	41,25 ^b ±2,34	3,27 ^b ±0,10	9,60 ^b ±0,38	1,03 ^b ±0,07	137,21 ^b ±3,73
Conc3	21,76 ^a ±0,16	14,91 ^a ±0,21	19,17 ^a ±0,18	42,53 ^a ±1,54	35,56 ^a ±0,53	64,55 ^a ±0,69	5,31 ^a ±0,23	12,12 ^a ±0,76	1,30 ^a ±0,10	217,21 ^a ±4,23
Gelo1	2,27 ^A ±0,06	1,76 ^A ±0,11	2,09 ^A ±0,08	5,03 ^A ±0,48	4,42 ^A ±0,29	9,30 ^A ±0,35	0,88 ^A ±0,03	2,36 ^A ±0,74	0,37 ^A ±0,02	28,47 ^A ±0,85
Gelo2	1,98 ^B ±0,06	1,44 ^B ±0,06	1,76 ^B ±0,06	4,95 ^{AB} ±0,31	3,87 ^B ±0,16	7,96 ^B ±0,24	0,75 ^B ±0,05	1,36 ^B ±0,04	0,31 ^B ±0,00	24,38 ^B ±0,70
Gelo3	2,06 ^B ±0,04	1,51 ^B ±0,08	1,73 ^B ±0,11	4,37 ^{BC} ±0,10	3,94 ^B ±0,13	8,13 ^B ±0,03	0,72 ^B ±0,03	0,95 ^C ±0,09	0,24 ^C ±0,05	23,66 ^B ±0,38

*Dai=daizeína; Gli=gliciteína; Gen=genisteína; G-gen=genistina; G-gli=glicitina; G-dai: daidzina; M-dai: malonil daidzina; M-gli: malonil glicitina; M-gen: Malonil genistina.

** Isoflavonas totais: agliconas + β-glicosídeos + Malonil glicosídeos.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de soro de tofu e concentrados.

^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de gelo.

3.3 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do soro inicial e do fluido concentrado de cada etapa da crioconcentração, medido através do método FRAP, está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade antioxidante do soro inicial e dos fluidos concentrados de cada etapa da crioconcentração.

	Soro inicial	Conc 1	Conc 2	Conc 3	Conc 4
FRAP (μmol/mL)	120,64±5,18 ^b	72,2±1,76 ^c	141,53±1,76 ^a	113,98±4,02 ^b	145,76±2,04 ^a

Os valores de FRAP aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no fluido concentrado na etapa 4, de aproximadamente 120 μmol/mL para 146 μmol/mL, embora as etapas intermediárias tenham apresentando alguns resultados insatisfatórios. A atividade antioxidante de produtos da soja também foi relatada em outros estudos, na inibição da auto-oxidação do ascorbato em produtos fermentados e também na soja in natura (WANG; YU; CHOU, 2006; CHAIYASUT et al., 2010; NIAMNUY et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou a possibilidade de se aumentar o conteúdo de compostos bioativos e a atividade antioxidante do soro de tofu através da crioconcentração em blocos. Esse processo mostrou-se uma possível alternativa para preservar as características funcionais de produtos da soja. O concentrado apresentou aumento na concentração de isoflavonas em todas as etapas, principalmente na etapa final. Embora o processo seja eficiente, houve retenção de parte das isoflavonas no gelo. A atividade antioxidante medida pelo método FRAP aumentou significativamente no concentrado final, sendo correlacionada ao conteúdo de isoflavonas com potencial antioxidante comprovado.

5 BIBLIOGRAFIA

- Aider, M., De Halleux, D.; Akbache, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. *Journal of Food Engineering*, v.82, n.1, 92-102, 2007.
- Aider, M.; Ounis, W. B. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: Gravitational vs. microwave-assisted. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(1), 195-202, 2012.
- Bazinet, L.; Ippersiel, D.; Lamarche, F. Recovery of magnesium and protein from soy tofu whey by electrodialytic configurations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.74, p.663-668, 1999.
- Belén, F., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J.M., Raventós, M. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. *Journal of Food Engineering*, v.110, p.364-373, 2012.
- Benzie, I. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v.239, n.1, p.70-76, 1996.
- Berhow, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: Buslig, B.S.; Manthey, J.A. *Flavonoids in the Living Cell*. New York: Klusher, 2002. 505 p.
- Carrão-Panizzi, M. C.; Góes-Favoni, S.P.; Kikuchi, A. Extraction time for isoflavone determination. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.45, n.4, p.515-518, 2002.
- Chai, X.; Mi, Y.; Yue, P-L.; Chen, G. Bean curd wastewater treatment by membrane separation. *Separation and Purification Technology*, v.15, p.175-180, 1999.
- Chaiyasut, C.; Kumar, T.; Tipduangta, P.; Rungseewijitprapa, W. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n.26, p. 4120-4126, 2010.
- Chun, J.; Kim, J.S.; Kim, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. *Food Chemistry*, v.109, p.278-284, 2008.
- Kim, W.J.; Kim, H.H.; Yoo, S.H. Ultra- and- nano-filtration process optimization of isoflavones and oligosaccharides from sunmul. *Food Science and Biotechnology*, v.14, n.3, p.380-386, 2005.

Klimczak, I.; Małecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczyńska-Świgło, A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

Kwak, C.S.; Lee, M.S.; Park, S.C. Higher antioxidant properties of hungkookjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. *Nutrition Research*, v. 27, p.719-727, 2007.

Niamnuy, C.; Nachaisin, M.; Laohavanich, J.; Devahastin, S. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. *Food Chemistry*, v.129, p. 899-906, 2011.

Sánchez, J.; Hernández, E.; Auleda, J.M.; Raventós, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. *Journal of Food Engineering*, v. 103, p.147-155, 2011a.

Sánchez, J.; Hernández, E.; Auleda, J.M.; Raventós, M. Review: freeze concentration technology applied to dairy products. *Food Science and Technology International*, v.17, n.1., p.5-13, 2011b.

Scambia, G.; Mango, D.; Signorile, P.G.; Anselmi, R; Palena, C; Gallo, D.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P.; Riva, A .; Mancuso, S. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. *Menopause*, v.7, p. 105-111, 2000.

Wang, Y-C.; Yu, R-C.; Chou, C-C. Antioxidative activities of soymilkfermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, v. 23, p.128-135, 2006.

USO DE MEMBRANAS CERÂMICAS MICROPOROSAS NA EMULSIFICAÇÃO ÓLEO/ÁGUA

Eng. Vanessa Zanatta¹; Eng. Frederico Marques Penha¹; Eng. Guilherme Zin¹; Dr. Marco Di Luccio¹; Dr. José Carlos Cunha Petrus¹

¹ Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); Brasil

1 INTRODUÇÃO

As emulsões são geralmente sistemas dispersos de dois ou mais líquidos imiscíveis nos quais a primeira fase (fase dispersa) é distribuída em forma de gotas em outra fase (fase contínua). Ambas as fases, desempenham um papel importante na formulação de muitos alimentos, nos processos farmacêuticos, bem como na indústria cosmética.

De interesse para a tecnologia de alimentos podemos considerar as emulsões de óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). A primeira, de maior interesse, são constituídas de gotas de óleo suspensas em uma fase aquosa contínua, enquanto à segunda, são constituídas de água em óleo.

As propriedades das emulsões dependem de sua composição e especialmente o tipo e a concentração de surfactantes ou emulsificantes utilizados. Tradicionalmente, as emulsões O/A são produzidas pela homogeneização do produto, na presença de um ou mais emulsificantes, que desempenham um papel duplo. Agem para reduzir a tensão interfacial e melhoram a estabilidade da emulsão evitando coalescência das partículas dispersas (SIMON, 2000). O emulsificante deve estar em uma concentração mínima que permita o revestimento de toda a superfície interfacial, de forma, que seja eficaz para prevenir a coalescência das gotas (MCCLEMENTS, 2004).

Nos últimos anos, a emulsificação com membranas (EM) tem recebido um crescente destaque por tratar-se de um processo simples e com aplicações potenciais em diversas áreas. O método utilizado para a preparação de emulsões tem uma grande influência sobre as propriedades físico-química do produto final. O tamanho da gota e a distribuição de tamanho estão entre as mais importantes propriedades que devem ser consideradas ao preparar um determinado tipo de emulsão. É justamente nesta etapa que as membranas podem ser úteis, pois podem produzir micropartículas com pouca dispersão em seus tamanhos.

Apesar de considerável quantidade de trabalhos sobre emulsificação com membrana, a influência dos parâmetros de processo sobre a distribuição de tamanho da gota e a estabilidade das emulsões não foram investigados com profundidade.

Neste trabalho foram produzidas emulsões simples O/A utilizando-se a técnica de emulsificação com membranas cerâmicas e analisou-se a estabilidade das emulsões produzidas ao longo do tempo, com diferentes concentrações de surfactantes. Verificou-se, também, se o método de emulsificação com membrana cerâmica foi eficiente e os principais fatores que podem influenciar na estabilidade das emulsões formadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Como surfactante utilizou-se o Tween 80 P.S, fornecido pela VETEC Química Fina, Brasil. Na preparação das emulsões utilizou-se óleo de girassol refinado como fase dispersa que foi adquirido em um supermercado local. Para a formação das emulsões O/A, utilizou-se uma membrana cerâmica tubular hidrofílica, preparada à base de alumina (Ceraver, França) com área filtrante útil de 50cm², com diâmetro exterior de 10 mm, espessura de 0,8 mm e 250 mm de comprimento. Segundo o fabricante esta membrana apresenta uma elevada dispersão de tamanhos de poros e alta porosidade, da ordem de 55%.

2.2 Limpeza das Membranas

As membranas cerâmicas foram imersas em solução de hidróxido de sódio, 0.1 M, pH 12, durante 20 minutos. Na sequência, imersas por mais 20 minutos em solução ácida (ácido fosfórico) 0.01%, pH 2. Após, o enxague, foi mantida em água destilada até o uso. Antes de serem utilizadas para produção das emulsões, as membranas foram submetidas a um tratamento com ultrassom, durante 30 minutos para eliminação de bolhas de ar.

2.3 Planejamento Experimental

Neste trabalho, foi utilizado o planejamento experimental do tipo Plackett&Burman-Seleção de Variáveis. Com relação à formulação das amostras, foram selecionadas quatro variáveis a serem testadas no planejamento: pressão, velocidade tangencial, concentração de óleo e concentração de surfactante, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Planejamento Experimental utilizado nos ensaios.

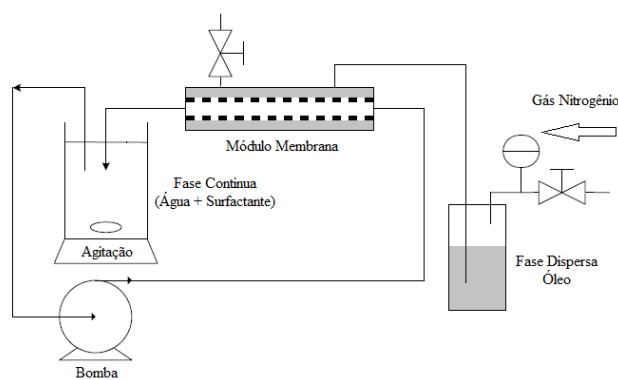
Ensaio	Pressão (bar)	Surfactante (%)	Óleo (%)	Velocidade Tangencial (m/s)
1	3,5	1	10	0,24
2	3,5	4	10	0,12
3	3,5	4	20	0,12
4	1,5	4	20	0,24
5	3,5	1	20	0,24
6	1,5	4	10	0,24
7	1,5	1	20	0,12
8	1,5	1	10	0,12
9	2,5	2,5	15	0,18
10	2,5	2,5	15	0,18
11	2,5	2,5	15	0,18

2.4 Procedimento Experimental

Para produzir as emulsões utilizou-se um sistema de filtração operando em fluxo tangencial. Ao passar pelos poros da membrana, o óleo é fracionado em pequenas gotículas, resultando em uma emulsão de óleo em água. Foram utilizadas duas membranas com tamanhos médios de poros de 0,2 e 0,8 μm . A Figura 1 mostra um esquema do aparato experimental.

A fase dispersa (óleo de girassol) foi armazenada em um recipiente de aço inox de aproximadamente 300 mL e aplicou-se uma pressão mediante gás nitrogênio acoplado a um manômetro. A fase contínua (água) contendo o surfactante (Tween 80) foi agitada com uma barra magnética em erlenmeyer de 250 mL. Mediante a aplicação de uma pressão adequada de gás nitrogênio, a fase de óleo permeava pelos poros uniformes da membrana e formaram-se as gotas que foram coletadas na fase aquosa. Os experimentos foram realizados à uma agitação de 700 rpm. Durante a emulsificação a temperatura foi mantida constante (temperatura ambiente $\sim 22^\circ\text{C}$).

Figura 1 Aparato experimental utilizado na emulsificação O/A



2.5 Determinação da Distribuição do Tamanho das Partículas

As determinações da distribuição do tamanho das partículas foram realizadas através de difração a laser (Mastersizer Malvern MSE, Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Inglaterra, modelo 2000). Os parâmetros, que mediante as análises por difração a laser que foram obtidos para caracterizar a distribuição do tamanho de gota, foram o diâmetro de Sauter (d_{32}) e o fator span. O diâmetro Sauter (d_{32}) se calcula como mostra a Equação 01, onde n_i é o número de gotas de diâmetro d_i .

$$d_{32} = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad (01)$$

A emulsão resultante é principalmente caracterizada pelo diâmetro Sauter (d_{32}), e da distribuição dos tamanhos das gotas, a produtividade está relacionada com o fluxo transmembrana. Diâmetro médio de Sauter (d_{32}) é uma média do tamanho das partículas. É definida como o diâmetro de uma esfera que possui o mesmo volume/relação de área de superfície de uma partícula de interesse.

Os dados de distribuição de tamanho podem ser usados para calcular os coeficientes de variação (spans) para medir a faixa de distribuição. Quanto mais estreita for a distribuição, menor será o intervalo. Se o coeficiente de variação for inferior a 0.4, as partículas podem ser consideradas monodispersas (NAKASHIMA et al. 1991). O fator de span é obtido através da equação:

$$span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (02)$$

Onde, d_{10} , d_{50} e d_{90} são os diâmetros representativos e 10%, 50% e 90%, respectivamente correspondem ao volume total da emulsão composto de gotas de diâmetro menor ou igual a estes valores.

2.6 Microscopia de Fluorescência

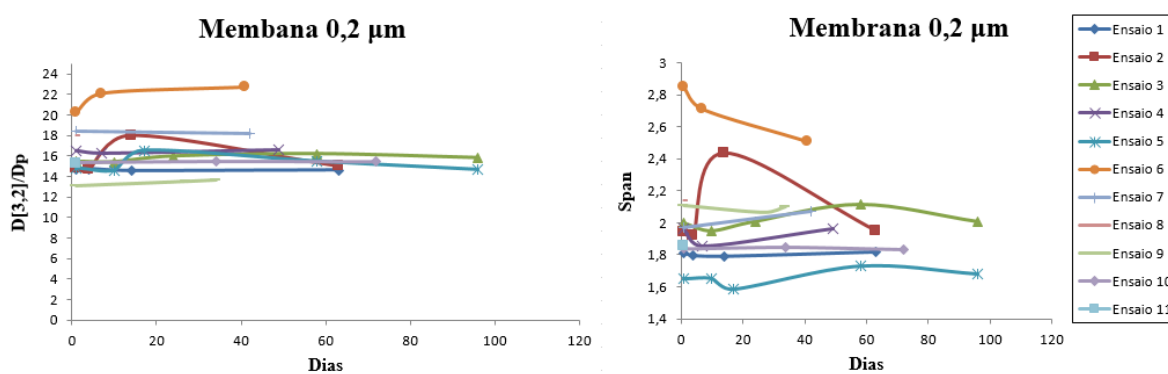
Com a finalidade de visualizar a microestrutura das emulsões obtidas mediante emulsificação com membranas, foi utilizado um microscópio de fluorescência, marca Leica DMI6000 B Microscope, em modo fluorescente e campo claro. Para diferenciar as duas fases da emulsão usou-se azul de metileno para tingir a fase do óleo. Lentes objetivas de 5X, 10X, 20X e 1000X de aumento foram usadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabilidade das Emulsões

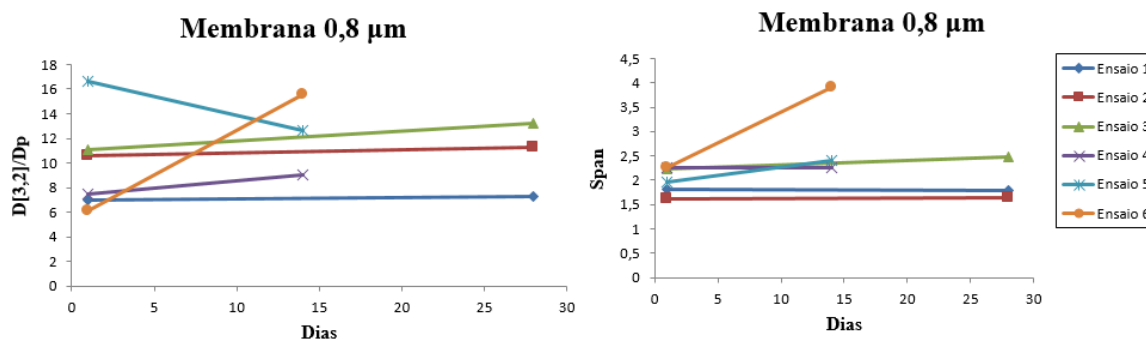
A estabilidade das emulsões foi determinada com o monitoramento da distribuição do tamanho das gotas das emulsões durante um período de 100 dias. As Figuras 2 e 3 mostram a evolução de d_{32}/D_p e span com o tempo para as emulsões obtidas com membranas cerâmicas de 0,2 e 0,8 μm , respectivamente. As emulsões obtidas com membranas cerâmicas de 0,2 μm restam estáveis por 96 dias, ou seja, são mantidos os tamanhos das gotas e o span para concentração de Tween 80 de 4%.

Figura 2: Evolução de d_{32}/D_p e span como tempo para emulsões produzidas com membranas cerâmicas de 0,2 μm utilizando-se Tween 80 como emulsificante.



Observa-se que para a membrana de 0,2 μm , conforme mostrado na Figura 3, a relação d_{32}/D_p independe da concentração de Tween 80 em um intervalo de operação considerado, isto é, entre 1% e 4%. Nestas condições, d_{32}/D_p se mantém entre os valores 13 e 23. Em relação à dispersão do tamanho de gota, observa-se que a membrana leva à formação de emulsões fracamente monodispersas, com valores de span variando entre 1,5 até 2,8 para todas as concentrações de Tween 80 testadas. Observa-se que o menor valor de span foi obtido pelo Ensaio 5, onde utilizou-se 1% de surfactante, 20% de óleo de girassol, velocidade tangencial de 0,24 m/s e pressão de 3,5 bar. Os melhores resultados obtidos para d_{32}/D_p pela membrana de 0,2 μm , foram os ensaios 1, 3, 5 e 10, onde as emulsões se mantiveram constantes, por 63, 96, 96 e 72 dias, respectivamente, sendo que os melhores resultados foram para os ensaios 3 e 5.

Figura 3: Evolução de d_{32}/D_p (a) e span (b) como tempo para emulsões produzidas com membranas cerâmicas de 0,8 μm e utilizando-se Tween 80 como emulsificante.

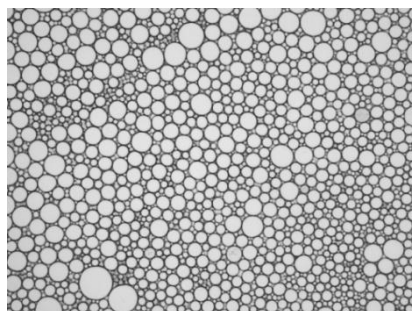


No caso das emulsões obtidas com membranas cerâmicas de 0,8 μm , valores constantes de d_{32} e de span podem ser observados em emulsões com uma concentração de Tween 80 superior a 2,5%, durante 28 dias. Este ensaio continua sendo monitorado. Segundo SCHRÖDER ET al. (1998), emulsificantes estabilizam as gotas contra a coalescência e/ou degradação, dependendo do tipo e concentração do emulsificante. O tipo dos agentes tensoativos utilizados influencia significativamente no tamanho das gotas.

3.2 Microestrutura das Emulsões O/W Estabilizadas com Tween 80

A Figura 4 mostra uma emulsão O/A obtida por EM de 0,8 μm e concentração de 2,5% de Tween 80. Na imagem, pode-se observar a distribuição do tamanho das gotas relativamente uniforme, que pode possibilitar uma maior estabilidade à emulsão com estas características.

Figura 4: Imagem de uma emulsão O/A com 0,8 μm e 2,5% de Tween 80, usando lentes objetivas de 10x.



4 CONCLUSÃO

Verificou-se, a partir dos resultados apresentados, que a estabilidade de uma emulsão além de poder ser controlada através de distintas concentrações de surfactantes tem importância também o tamanho de poros da membrana utilizada bem como a velocidade tangencial aplicada ao sistema. Em termos de dispersão e tamanho de gota, observou-se que as membranas de 0,8 μm permitiram obter emulsões monodispersas, com valores de span de aproximadamente 2,0, para todas as concentrações de Tween 80. No caso das membranas com tamanho de poro de 0,2 μm , verificou-se uma maior dispersão, mantendo o span entre 1,6 e 2,9. Os valores de d_{32} e de span se mantiveram constantes em emulsões com uma concentração de 4% de Tween 80, durante 96 dias. A membrana cerâmica com maior tamanho de poros, 0,8 μm , proporcionou menores variações nos tamanhos das gotas e menores valores de span, resultando em emulsões monodispersas.

Os resultados indicam a viabilidade e eficiência do processo de emulsificação com membranas, revelando potencial para aplicação industrial.

5 BIBLIOGRAFIA

- Bontorim, G. (2009). Estudo de Estabilidade de Emulsão Cosmética Utilizando Reologia e Técnicas Convencionais de Análise. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Química. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- Charcosset C, Limayem I, Fessi H. The membrane emulsification process—A review. *J Chem Tech Biotech* 79:209–218, 2004.
- Dalgleish Dg, Srinivasan M, Singh H. Surface properties of oil-in-water emulsion droplets containing casein and tween60. *J Agric Food Chem* 43:2351–2355, 1995.
- Dickinson E, Semenova M, Antipova AS, Pelan EG. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids* 12:425–432. 1997.
- Guzeyd. and D.J. McClements. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid And Interface Science*, 128:227, 248, 2006.
- Joscelyne Sm, Tragardh G. Membrane emulsification— A literature review. *J Membr Sci* 169:107–117. 2000.
- Joscelyne Sm, Tragardh G. Food emulsions using membrane emulsification: Conditions for producing small droplets. *J Food Eng* 39:59–64, 1999.
- McClements, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*, CRC:Press, Boca Raton, FL. 2004.
- Nakashima T, Shimizu M, Kukizaki M. Membrane emulsification by microporous glass. *Key Eng Mater* 61/ 62:513–516, 1991.

Schröder, O. V. Behrend, H. Schubert. Effect of dynamic interfacial tension on the emulsification process using microporous ceramic membranes, *J. Colloid Interface Sci.* 202 (1998) 334–340.

Vladislavjevic, T and R.A. Williams. Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Advances In Colloid And Interface Science*, 113(1):1–20, 2005. Leer fonéticamente.

EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN COLOR-COMPOSICIÓN EN CULTIVARES DE JAMAICA MEDIANTE TÉCNICAS DE VISIÓN ARTIFICIAL

Camelo-Méndez GA¹, Quintanilla-Carvajal M.X.², Vanegas-Espinoza PE¹, Heredia FJ³, Del Villar-Martínez AA^{*1}

¹Laboratorio de Biología Molecular. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Yauatepec, Morelos, México.

²Grupo de Procesos Agroindustriales. Universidad de La Sabana, Chía, Cundinamarca, Colombia.

³Laboratorio de Color y Calidad de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

* Autor de correspondencia: adelvillarm@ipn.mx

INTRODUCCIÓN

Hibiscus sabdariffa (Malvaceae) es una planta anual, erecta, arbustiva, y herbácea que alcanza hasta 2.4 m de altura, su cáliz crece hasta la madurez y el fruto es carnoso y rojizo brillante (Gomes Maganha *et al.*, 2010). Es una planta tropical nativa de la India y Malasia, aunque crece ampliamente en los trópicos y subtropicos de ambos hemisferios, y se ha naturalizado en muchas zonas de América (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2007).

En México, es comúnmente llamada "flor de jamaica" o "jamaica". En la tradición popular de este país, los cálices se secan al sol para la elaboración de bebidas artesanales altamente apreciadas por su sensación de frescura y tratamiento contra la obesidad (Aquino y León, 2005). Actualmente, existen planes de mejoramiento genético que han dado lugar a materiales con diferentes niveles de pigmentación, obteniendo cálices de color blanco, rosa y rojo intenso.

Existen pocos estudios de caracterización de materiales de jamaica con diferentes grados de pigmentación. Christian y Jackson, (2009) estudiaron materiales sembrados en Jamaica, indicando que el cáliz oscuro presentó mayor contenido de antocianinas y actividad antioxidante, seguidos por el cáliz rojo, mientras que el cáliz blanco no presentó ningún compuesto de este tipo, resultados similares a los reportados por otros autores (Christian *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2009).

Los estudios realizados hasta la fecha se basan en la determinación de antocianinas por medios espectrofotométricos y estudios preliminares de la actividad de enzimas importantes en el organismo. Pero no hay reportes científicos sobre la relación color-composición de cultivares de jamaica. El objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de antocianinas en tres cultivares (Negra, Sudán, Rosa) de jamaica con diferentes

grados de pigmentación para determinar la relación color-composición, aplicando colorimetría triestímulo, análisis digital de imágenes y análisis estadístico multivariado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los cálices de jamaica se produjeron en el campo experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO) Iguala, Guerrero, México, durante la temporada de invierno (noviembre- diciembre) de 2011. Se utilizaron tres cultivares de jamaica: Negra, Sudán y Rosa.

Determinación de color de las harinas mediante tratamiento digital de imágenes

Se capturaron imágenes de las harinas usando un DigiEye® (Luo *et al.*, 2001), incluye una caja de iluminación diseñada por VeriVide Ltd. (Leicester, UK), el gabinete del equipo estaba equipado con dos tubos fluorescentes (D65). Las harinas de jamaica fueron colocadas uniformemente en el gabinete. Una vez que las imágenes se obtuvieron fueron procesadas con el programa MATLAB® para el análisis colorimétrico, los parámetros de color obtenidos (RGB) fueron procesados con el software DigiFood® (Heredia *et al.*, 2006) para la obtención de los parámetros de color CIELAB.

Extracción de antocianinas

Cada muestra (5 g) se extrajo con 25 mL de metanol 75% [HCl 1 N (5%)] a temperatura ambiente bajo agitación constante (250 rpm) durante 1 h, el extracto se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue colectado. El residuo se extrajo tres veces con 25 mL de mismo disolvente con el fin de obtener todos los compuestos fenólicos. Los sobrenadantes se combinaron y se evaporaron a sequedad bajo atmósfera inerte de nitrógeno, el concentrado se resuspendió en 1 mL de acetonitrilo: agua (10:90, v/v).

Análisis cromatográfico de antocianinas (HPLC –DAD)

Las antocianinas se identificaron por la metodología propuesta por Ivanova *et al.* (2011) con modificaciones. Se usó ácido trifluoroacético (0,1 %) como fase A y acetonitrilo como fase B. El perfil de elución fue el siguiente : 0 a 3,25 min 90% A - 10% de B; 3,25 a 15,62 min 90% A - 10% de B; 15,62-20,83 min 85% A - 15% de B; 20,83-26,04 min 85% A - 15% de B; 26,04-46,88 min 82% A - 18% de B; 46,88-52,08 min 70% A - 30% de B; 52,08-60 min 65% A - 35% de B; 60-65 min 90% A -10% B. La cuantificación se hizo a 525 nm mediante la comparación de las áreas y tiempos de retención utilizando una curva de

calibración obtenida con soluciones estándar de cianidina 3-glucósido y delphinidina 3-glucósido.

Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre cultivares de jamaica se determinaron por análisis de varianza (ANOVA) usando Statgraphics Plus versión 5.1 ® (Manugistics, Inc., Rockville, MA, EE.UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis colorimétrico

El análisis colorimétrico evidenció que, para los cultivares analizados, la ubicación de los valores en el diagrama a^* , b^* y L^* se sobreponen entre sí (datos no presentados). Al relacionar los parámetros de color a^*/b^* se encontró que predomina el parámetro b^* . Mientras que el parámetro h_{ab} indicó que los cultivares presentaron tonalidades rojas resultados coherentes demostrados por la relación de los parámetros a^*/b^* ; sin embargo, las diferencias entre los valores de C_{ab}^* indican que el cultivar Rosa tiene una saturación mayor, es decir que tiende a coloraciones rojo-claro en comparación de los cultivares Negra y Sudán; los resultados colorimétricos de este estudio fueron similares a los reportados por otros estudios (Christian y Jackson, 2009).

Contenido de antocianinas

En este estudio, se identificaron dos antocianinas; delphinidina 3-sambubiósido (Dp-3-Sa) y cianidina 3-sambubiósido (Cy-3-Sa). El compuesto mayoritario fue Dp-3-Sa de hasta tres veces más que la Cy-3-Sa. El cultivar Sudán presentó un mayor contenido de antocianinas en comparación con los cultivares de Negra y Rosa ($p < 0.05$) (Tabla 1). El metanol acidificado permite una mayor extracción de antocianinas, debido a que estas estructuras son más polares que su correspondiente aglicona según lo reportado por Giusti y Ping (2008) ya que se ha obtenido mayores eficiencias de extracción hidroalcohólicas a bajo pH y estabilización del catión flavilo. El contenido de antocianinas fue superior a los reportados en otros estudios de jamaica (Camelo-Méndez *et al.*, 2013; Christian y Jackson 2011; Mohd-Esa *et al.*, 2010), la diferencia entre el contenido de antocianinas de este estudio y los reportados por literatura se atribuye a que la acumulación de estos compuestos depende de factores como el pool genético y las condiciones ambientales (temperatura, luz, deficiencias de nutrientes del suelo y ataque de patógenos) (Cheng *et al.*, 2002; Torres-Morán *et al.*, 2011)

Relación entre el contenido de antocianinas y los parámetros de color

Con el fin de definir el color completamente por colorimetría triestímulo, las coordenadas L^* , a^* , b^* , h_{ab} y C_{ab}^* se consideró en conjunto, debido a la naturaleza tridimensional del color (Stinco *et al.*, 2013). En este sentido, se realizaron regresiones múltiples con el fin de comprobar si los parámetros colorimétricos completan o aumentan considerablemente las correlaciones obtenidas para las antocianinas. Los valores de los coeficientes de regresión múltiples se obtuvieron cuando el conjunto de parámetros L^* , a^* , b^* se consideraron como predictores, los valores fueron de 0.91 a 0.92 y de 0.89.

Las correlaciones obtenidas del análisis de regresión múltiple ($r > 0.8$) fueron superiores a los obtenidos por el análisis de regresión simple, siendo coherente ya que se usa un mayor número de variables y por lo tanto se logró una mejor predicción (Tabla 2). En este trabajo se propusieron ecuaciones para la estimación rápida para cada una de las antocianinas totales presentes en los cultivares obtenidos del análisis de HPLC-DAD.

El análisis estadístico (ANOVA) demostró que existe relación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) para cada uno de los modelos generados; además los valores de los coeficientes de correlación obtenidos fueron aceptables para la predicción del contenido de antocianinas, estos valores fueron superiores a los reportados por literatura para modelos de determinación de carotenoides en diferentes productos de tomate (Stinco *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Las diferencias en las características químicas y de color de los cultivares de jamaica con diversos grados de pigmentación evaluados en este trabajo, tuvieron un impacto significativo en su caracterización y clasificación, aplicando colorimetría triestímulo, análisis digital de imágenes y análisis estadístico multivariado; además de que permitieron generar modelos matemáticos para establecer la correlación entre los parámetros químicos y colorimétricos.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón-Aguilar FJ, Zamilpa A, Pérez-García MD, Almanza-Pérez JC, Romero-Nuñez E, Campos-Sepúlveda EA, Vázquez-Carrillo LI, Román-Ramos R. 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology* 114 (1): 66-71.

Aquino YD, León A. 2005. Flor de Jamaica orgánica de México. Obtenido de Vinculando.org Revista Electrónica Latinoamericana: Visto On line. Disponible en el URL <http://vinculando.org/mercado/>.

Camelo-Méndez GA, Ragazzo-Sánchez JA, Jiménez-Aparicio AR, Vanegas-Espinoza PE, Paredes-López O, Del Villar-Martínez AA. 2013. Comparative study of anthocyanin and

volatile compounds content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by multivariable analysis. *Plant Foods for Human Nutrition*. 68 (3) 229-234

Cheng Z, Lu BR, Baldwin BS, Sameshima K, Chen JK. 2002 Comparative studies of genetic diversity in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties based on analysis of agronomic and RAPD data. *Hereditas* 136:231–239.

Christian KR, Jackson JC. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 663-667.

Christian KR, Nairb MG, Jackson JC. 2006. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 778–783.

Giusti MM, Ping P. 2008 Analysis of Anthocyanins. Cocaciu, C En: *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. Taylor & Francis. Cluj-Napoca, Romani.

Gomes Maganha E, da Costa Halmenschlager R, Moreira Rosa R, Pegas Henriques JA, Lia de Paula Ramos AL, Saffi J. 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry* 118:1-10.

Heredia FJ, Gonzalez-Miret ML, Álvarez C, Ramírez A. 2006. DigiFood. (Registro N° SE-01298).

Ivanova V, Stefova M, Vojnoski B, Dörnyei A, Márk L, Dimovska V, Stafilov T, Kilár F. 2011. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening, *Food Research International* 44(9): 2851-2860.

Luo MR, Cui G, Rigg B. 2001. The Development of the CIE 2000 Colour-Differences Formula: CIEDE2000. *Colour Research and Application* 26: 340-350.

Mohd-Esa N, Hern FS, Ismail A, Yee CL. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry* 122: 1055–1060.

Stinco CM, Rodríguez-Pulido FJ, Escudero-Gilete ML, Gordillo, B, Vicario IM, Meléndez-Martínez AJ. 2013. Lycopene isomers in fresh and processed tomato products: Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. *Food Research International* 50(1): 111-120.

Torres-Morán MI, Escoto-Delgadillo ME, Ron-Parra J, Parra-Tovar G, Mena-Munguía S, Rodríguez-García, A. 2011. Relationships among twelve genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivated in western Mexico. *Industrial Crops and Products* 34, 1079– 1083.

Wong SK, Lim YY, Chan, EWC. 2009. Antioxidant properties of *Hibiscus*: Species variation, altitudinal change, coastal influence and floral colour change. *Journal of Tropical Forest Science* 21(4): 307-315.

Tabla 1. Contenido de antocianinas (mg/ 100g de PS) en diferentes cultivares de jamaica.

Compuesto	Negra	Sudán	Rosa
Dp-3-Sa	1818.27±318.71 ^b	2373.61±172.431 ^a	324.11±42.32 ^c
Cy-3-Sa	629.913±110.62 ^a	655.50±49.94 ^a	170.56±16.85 ^b
AT	2448.18±429.09 ^b	3029.11±191.87 ^a	494.68±59.12 ^c

Datos presentados por promedio ± desviación estándar (n=6). Letras diferentes indican diferencias significativas (p <0.05) mediante la prueba de DMS. Dp-3-Sa: Delfinidina 3-sambubiósido, Cy-3-Sa: Cianidina 3-sambubiósido, AT: Antocianinas totales.

Tabla 2. Coeficientes y valores de r obtenidos de modelos de regresión múltiple utilizados para el estudio del contenido de antocianinas frente a los parámetros colorimétricos.

	L*, a*, b*					L*, C* _{ab} , h* _{ab}				
	Constante	L*	a*	b*	r	Constante	L*	C* _{ab}	h _{ab}	r
Dp-3-Sa	1642.30	409.39	-797.05	519.88	0.92	-190.90	414.98	-431.59	-1.34	0.86
Cy-3-Sa	76.44	105.87	-105.51	-40.72	0.91	273.30	90.14	-103.06	0.58	0.91
AT	1718.64	515.26	-902.56	479.16	0.92	82.40	505.11	-534.65	-0.76	0.88

Dp-3-Sa: Delfinidina 3-sambubiósido, Cy-3-Sa: Cianidina 3-sambubiósido, AT: Antocianinas totales.

INFLUENCIA DE LA DESHIDRATACIÓN EN LA CALIDAD DE DIFERENTES VARIEDADES DE PIMIENTO. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

Casa, Francisco¹; Acurio, Liliana²; Igual, Marta³; Martínez-Navarrete, Nuria⁴; Camacho, María del Mar⁵

¹ Ingeniero en Alimentos, Máster en Gestión y seguridad alimentaria
Universidad Tecnológica Equinoccial, Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD)

² Ingeniera en Alimentos, Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos
Universidad Técnica de Ambato, Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD)

³ Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia
Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

⁴ Doctora en Ciencias Biológicas.
Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

⁵ Doctora en Ciencias Químicas.
Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

INTRODUCCIÓN

El pimiento posee un elevado valor nutritivo, se trata de una de las fuentes más ricas en vitamina C entre las frutas y verduras de consumo común, alcanzándose concentraciones de ácido ascórbico (AA) hasta 4-5 veces superior al de cítricos y kiwis (Rodríguez-Burruezo y Nuez, 2006; Rodríguez-Burruezo et al, 2009). Los tratamientos térmicos pueden reducir significativamente el contenido en AA, pero, por su naturaleza hidrosoluble, procesos que implican la deshidratación (uso como pimentón) provocan las pérdidas más sensibles de esta vitamina (Bossland y Votava, 2000). La extraordinaria diversidad cromática de los frutos maduros de *Capsicum* es debida a la presencia de decenas de carotenoides amarillos, naranjas y/o rojos, muchos de los cuales tienen una elevada actividad antioxidante (capsantina, β -caroteno), antitumoral, preventiva de enfermedades oculares per se (luteína) o por ser precursores de la vitamina A (β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina).

Dentro de los procesos de industrialización más comunes en alimentos está el proceso de secado mediante aire caliente. El pimiento, como señala Zapata et al. (1992) es uno de los productos hortícolas que mejor se deshidrata mediante aire caliente por presentar una razonable resistencia a las alteraciones por calor, dentro de unos ciertos límites (65 -75 °C). Otra forma de secado de alimentos es mediante el uso de microondas. Hay estudios que apuntan ventajas de la aplicación de microondas frente al secado por aire caliente desde el punto de vista de una mejor retención de fenoles totales, catequinas, vitamina C, carotenos

totales y licopeno, por ejemplo (Igual et al, 2010). También, en algunos trabajos se indica que los productos tratados por microondas mantienen mejor color, brillo, aroma y sabor (Gulati et al, 2003). Por otra parte, una tecnología que no requiere la aplicación de temperaturas altas para la mejor preservación de los compuestos bioactivos mencionados anteriormente y que son tan deseables en este tipo de productos, es la liofilización. Este proceso de conservación mediante sublimación como lo indica Ramírez-Navas (2006), es utilizado con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles, es uno de los procesos más adecuados ya que mayoritariamente las propiedades del alimento no se alteran y es rehidratado fácilmente. El pimiento, una vez deshidratado, debe almacenarse adecuadamente para su correcta conservación, pues, tal como ponen de manifiesto Nuez et al. (1996), durante su almacenamiento se produce una variación de los pigmentos carotenoides de la piel, debido a un proceso de oxidación, este aumenta por la acción de agentes externos de naturaleza física, y química, afectando esencialmente al color, aroma, composición y apariencia visual, por otra parte, estos cambios pueden afectar también a las propiedades microbiológicas del producto. La ganancia de humedad se dará con una humedad relativa superior a la actividad del agua (a_w) que tenga el alimento, la relación entre la a_w y la humedad de equilibrio a una temperatura y presión constante constituye la isoterma de sorción, el conocimiento de esta puede ser útil para asegurar la calidad de los productos, seleccionando las condiciones de almacenamiento y prediciendo la vida útil en relación con la evolución en el contenido de humedad en el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó pimiento (*Capsicum annuum* L. ‘California Wonder’) rojo y amarillo.

Secado por aire caliente (SAC): Eliminando semillas y pared placentaria fueron cortados longitudinalmente en tiras de 0,5 cm de ancho. Fueron deshidratados por aire caliente, hasta peso constante, utilizando un secador de bandejas perforadas (Back to Basics FD-600) a 60 °C de temperatura y velocidad del aire de 1,6 m/s.

Microondas (MW): Las tiras de pimiento se colocaron en un microondas (Molinox 5141 AFW2), hasta peso constante, con un ratio W/g de 0,27 (100 W para 370 g de producto).

Liofilización (LIOF): Los pimientos fueron triturados con un equipo Thermomix. Las muestras fueron depositadas en bandejas de aluminio en finas capas y se congelaron a -40°C durante 24 horas antes de su liofilización en un liofilizador Telstar Lioalfa-6, a 0,026 mBar y a -56°C durante 48 h. El pimiento liofilizado se trituró para obtener un producto en polvo.

La humedad se determinó de acuerdo con la metodología de la AOAC (1990) en una estufa de vacío (JP-SELECTA mod. Vaciotem-t) a una temperatura constante de 60°C y a una presión de 10 mmHg, hasta alcanzar un peso constante. La a_w se determinó a temperatura ambiente con un higrómetro de punto de rocío (DECAGON mod. CX2), con una sensibilidad de 0.003 y el pH de la materia prima, previamente triturada, se determinó con un pH-metro (Crison Instruments, S.A.) con un electrodo de contacto.

Para la obtención de las isothermas de sorción se empleó el método gravimétrico estático propuesto por Spiess y Wolf (1987) y Wolf et al. (1985), se prepararon cámaras herméticamente cerradas con disoluciones sobresaturadas de sales con a_w conocidas a 20°C de temperatura. Se introdujeron las muestras hasta que llegaron a la condición de equilibrio termodinámico. La humedad en el equilibrio (w_e) se calculó mediante la ecuación 1 (Tabla 1). Las isothermas de sorción fueron ajustadas mediante el modelo de BET (ecuación 2, Tabla 1) y el modelo de GAB (ecuación 3, Tabla 1). Los parámetros de los modelos fueron calculados a partir de sus ecuaciones linealizadas 4 y 5 expuestas en la Tabla 1.

Para analizar las propiedades mecánicas se utilizó un texturómetro (StableMicro Systems TA.XT2) con una sonda cilíndrica de 10 mm. La velocidad del ensayo fue de 0,1 mm/s con una distancia fijada de 2 mm, obteniendo las curvas Fuerza-distancia (N-mm).

El color fue determinado por un espectrocolorímetro (Konica Minolta CM-3600D), con una ventana de medida de 6 mm de diámetro, un iluminante D65 y observador 10°. Se calculó el tono (h^*_{ab}), croma (C^*_{ab}) y diferencia total de color (ΔE^*) (Tabla 2) tomando como referencia las muestras equilibradas de menor a_w .

La comparación estadística se realizó empleando un (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0,05$) utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se presentan los resultados medios experimentales de las características de la materia prima fresca: Humedad (x_w expresados en g agua/g muestra), actividad del agua (a_w), pH y las coordenadas de color en el espacio CIE $L^* a^* b^*$. De acuerdo con el análisis estadístico, entre PA y PR existen diferencias significativas en todos los parámetros estudiados excepto en la a_w .

La tabla 4 muestra el nivel de deshidratación mediante las medias experimentales de x_w y a_w . En los productos deshidratados el límite de la a_w para que no haya crecimiento microbiano es 0,62 (Scott, 1957). Las muestras se encuentran en un intervalo de a_w (0,2 - 0,34) por lo que la estabilidad microbiana estaría asegurada. Existen diferencias significativas

entre los productos obtenidos en cuanto a la a_w tanto con la variedad como con el tratamiento, siendo PA-SAC el de menor a_w y PR-LIOF el de mayor. En cuanto a x_w PA en general tiene valores mayores en x_w a excepción de la tratada por SAC (tabla 4). MW es el tratamiento que consigue reducir menos la humedad y por consiguiente la a_w .

Una vez equilibrados los pimientos, se construyeron las isotermas de sorción representando w_e en función de la a_w (Figuras 1 y 2). Basándose en la revisión hecha por Brunauer et al. (1940), se observó que las isotermas tienen un valor C mayor que 2 lo que permite clasificarlas como isoterma de tipo II, esta forma es típica para productos ricos en carbohidratos de alto peso molecular como el pimiento. Se observan ligeras desviaciones a la tendencia de las isotermas, probablemente causadas por un proceso de cristalización de algún componente como lo han puesto de manifiesto Martínez-Navarrete et al. (2011). En el PR, durante todo el intervalo de a_w estudiadas, las muestras tratadas por MW y SAC mantienen una mayor capacidad de retención de agua que las tratadas por LIOF. Esto no ocurre con PA (Figura 2) donde las tres isotermas llegan a tener valores muy similares en todo el intervalo de a_w . Según este resultado se puede decir que PR-LIOF, cuya capacidad higroscópica es menor, resulta ser el producto más estable ya que la baja capacidad de las muestras para absorber la humedad atmosférica es una característica positiva. Se recomienda que los alimentos deshidratados no superen 0,6 de a_w , esto supone valores de humedad de 0,13 (g H₂O/g m.s) para la muestra LIOF y 0,18 (g H₂O/g m.s) para los demás tratamientos en el caso de PR y de 0,16 (g H₂O/g m.s) para toda la muestra de PA tratada. Los puntos experimentales de la isoterma de sorción obtenida se ajustan a los modelos de GAB Y BET, siendo BET el que mejor se ajustó con un coeficiente R^2 superior a GAB. Los parámetros de cada modelo se encuentran expuestos en la tabla 5. Ambos modelos están en función de (w_m , humedad de la monocapa). Este es un parámetro importante ya que indica la cantidad de agua que está fuertemente ligada por algunos puntos específicos en la monocapa y está relacionado con la máxima estabilidad del alimento. (Pérez-Alonso et al., 2006), siendo este parámetro fundamental para definir las condiciones de almacenamiento del pimiento y así controlar las reacciones de deterioro. El parámetro C y K en el modelo GAB, están relacionados con el calor de sorción en las moléculas de la monocapa y de las multicapas, respectivamente. Ambos oscilaron entre 3-10 y 0,8-1,1 respectivamente, encontrándose valores significativamente diferentes para la variedad de pimiento.

La variación de color de los pimientos mediante las coordenadas del espacio Cie $L^*a^*b^*$, se muestran en la figura 3. La tendencia en los parámetros de L^* , a^* , b^* , C^* y h^*_{ab} es ir disminuyendo sus valores a medida que la a_w de almacenamiento aumenta (0,11-0,68).

En el caso de h^*_{ab} esta tendencia se produce solo hasta 0,52, lo que puede ser debido a un exceso de hidratación de las muestras, pues tal como se observaba en las isotermas de adsorción a esta a_w las muestras son muy higroscópicas. La disminución de a^* y b^* tanto para PR como para PA se traduce en una pérdida de color rojo y amarillo, respectivamente, y en consecuencia en una significativa menor pureza de color (C^*). La ΔE en todos los casos es cada vez mayor según aumenta la a_w en el almacenamiento, observándose una mayor diferencia entre las muestras tratadas por diferentes métodos de deshidratación a partir de la a_w de 0,43. La luminosidad (L^*) se ve disminuida, debido a la formación de los compuestos del pardeamiento no enzimático durante el almacenamiento, además de otras reacciones como la degradación oxidativa del ácido ascórbico y/o la conversión de polifenoles en policarbonilos que pueden contribuir igualmente al oscurecimiento (Cortés et al., 2007). El croma (C^*), tanto para PA como para PR existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres tratamientos siendo la liofilización con la que se obtienen mayores valores de este parámetro, en todo el intervalo de a_w . En PA la tendencia es la misma en todas las muestras mientras que en el PR los valores de C^* se igualan al final del intervalo de a_w . En cuanto al tono (h^*_{ab}), en PA se observa que los valores llegan a tener una tonalidad más cercana al anaranjado, mientras que en PR se mantiene el rojo hasta una a_w de 0,68 en la que cambia bruscamente la tendencia, para llegar a tener una tonalidad cercana a la de PA, es decir tendiendo al naranja. En general, el proceso de SAC provoca menores diferencias de color haciéndolo un proceso indicado si lo que se busca es proteger la variabilidad de color, sin embargo, pese a que LIOF es el proceso que más variación de color sufre en el almacenamiento en las distintas cámaras, es también el proceso que mejores valores posee en general en cuanto a sus coordenadas de color y psicométricas en las distintas condiciones de almacenamiento.

En las figuras 4 y 5 se muestra la fuerza máxima evaluada por el ensayo llevado a cabo en relación con la a_w de la sal utilizada en el almacenamiento. Se puede observar que en el intervalo de a_w de 0,33-0,43, al igual que sucedía con los resultados de color, existe una caída brusca de la fuerza o cambio de dirección en su pendiente. Por ejemplo, para PR la curva de SAC y MW presenta una forma sigmoideal, indicando una caída brusca de la fuerza cuando aumenta la humedad de las muestras, mientras que en LIOF existe un cambio negativo de su pendiente. El obtener cambios importantes en el intervalo de a_w de 0,33-0,43 evidencia una estrecha relación entre fenómenos físico-químicos que se producen por causa de la humectación de las muestras provocando el cambio de textura y color. Se ha demostrado que la pegajosidad, colapso, cristalización y fracturabilidad ocurren cuando se

rebasa el valor de la a_w crítica. Estos cambios estructurales son responsables de muchos cambios deteriorativos en alimentos de baja humedad, ya que afectan la sorción de agua y la estabilidad de los mismos (Roos, 1995). El tratamiento que menos afecta a las propiedades de textura es LIOF, pues su variación es pequeña en comparación a SAC Y MW. En algunos casos (PR-LIOF y PA-SAC), se evidencia otro fenómeno de importancia donde nuevamente los resultados coinciden con la evaluación de color, a a_w de 0,6 aumenta la dureza probablemente debido probablemente al cambio de estado vítreo a gomoso y posterior cristalización de algunos solutos, como mencionan (Saragoni et al.,2007 y Mosquera 2010).

CONCLUSIONES

La hidratación de pimientos deshidratados por causa de una conservación deficiente produce una disminución en los atributos de color y textura. Se observaron cambios importantes a partir de una a_w de 0,3, y en algunos casos cambios muy notorios a 0,6. Estos cambios pueden ser producidos por fenómenos físico-químicos como reacciones de Maillard, responsables del pardeamiento no enzimático en el caso de color y pegajosidad, colapso, cristalización y fracturabilidad en el caso de textura. Existe una estrecha relación entre niveles de hidratación representados en las isotermas y los cambios organolépticos producidos, por lo que el estudio tiene una utilidad en el momento de elegir las condiciones más adecuadas de conservación dependiendo de la prioridad que se tenga. Así los procesos en los que mejores niveles de deshidratación, y mayores atributos de color fueron SAC y LIOF, mientras que para textura LIOF mantuvo mejor sus propiedades mecánicas. Además se observó que las diferencias entre PA y PR también existen y no se comportan igual pese a pertenecer a una misma variedad. Por ello, dependiendo de lo que se busque preservar, se debería tener en cuenta todas estas diferencias al momento de elegir que método de deshidratación resulta más rentable utilizar y que envase resulta ser el más apropiado.

BIBLIOGRAFÍA.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). "Official Method of Analysis", Association of Official Analytical Chemists n° 934.06. Arlington, MA, Washington
- Bosland, P.W., and Votava, E.J. (2000). Vegetable and spice capsicums. CABI Publishing. Oxon, UK and New York. 204 p.
- Brunauer, S., Deming, L.S., and Deming, W. E., Teller, E. (1940). On a theory of the van der waals adsorption of gases. J.Am.Chem.Soc. 62:1723-1732.
- Cortés, R. M., García, S., A., y Suarez, M. H. (2007). Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. Vitae 14(1):16 - 24

- Gulati, A., Rawat, R., Singh, B., Ravindranath, S.D. (2003). Application of microwave energy in the manufacture of enhanced-quality green tea. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (16), 4764-4768.
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chem.*, 198, 291-299
- Martínez-Navarrete, N., Grau, A.M., Chiralt-Boix, A., & Fito-Maupoe, P. (2011). *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Editorial UPV, Valencia-España.
- Mosquera, L. H. (2010). Influencia de la humedad y de la adición de solutos (maltodextrina o goma arábica) en las propiedades fisicoquímicas de borjón y fresa en polvo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Nuez, F., Costa-García, J., Gil-Ortega, R. (1996). *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Mundi-Prensa, Madrid-España.
- Pérez-Alonso, C., Beristain, C. I., Lobato-Calleros, C., Rodríguez-Huezo, M. E., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 753-760.
- Ramírez-Navas, J. S. (2006). *Liofilización de alimentos* Revista ReCiTeIA. Vol.6 No.2, Diciembre
- Rodríguez-Burruezo, A., Nuez, F. (2006). Mejora de la calidad en el pimiento. En: *Mejora genética de la calidad de plantas* (eds. G. Llácer, M.J. Díez, J.M. Carrillo, M.L. Badenes), Editorial Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, p 361-391.
- Rodríguez-Burruezo, A., Prohens, J., Raigón, M.D., Nuez, F. (2009). Variation for bioactive compounds in ají (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. & P.) and implications for breeding. *Euphytica* 170:169-181.
- Roos, Y.H. (1995). Glass transition – related physical changes in food. *Food Technology*. 10,97 – 102
- Saragoni, P., Aguilera, J.M., and Bouchon, P. (2007). Changes in particles of coffee powder and extensions to caking. *Food Chemistry*, 104, 122-126.
- Scott, W. (1957). Water relations of food spoilage microorganism. *ADV. Food Res* 7:84.
- Spiess and Wolf, (1987) Critical evaluation of methods to determine moisture sorption isotherms. En Louis, B., Bencho, L. (eds). *Water Activity: theory and applications to foods*. New York. Marcel Dekker Inc., 215 -233
- Wolf, W., Spiess, W.E.L., Jung, G. (1985), *Sorption isotherms and water activity. Influence of food materials*. Elsevier Sciences Publishing Co., New York.
- Zapata, M., Bañón-Arias, S., & Cabrera-Ferrández, P. (1992). *El pimiento para pimentón*. Mundi-Prensa, Madrid-España

*Los autores agradecen a la Generalitat Valenciana la financiación de este trabajo con el proyecto concedido GV/2013/032, y al Senescyt por su “convocatoria abierta de becas 2011”.

Tabla 1. Modelos empleados en la caracterización de isotermas de sorción de agua en alimentos.

Ec.	Expresión	No. Ec.
Humedad en equilibrio	$w_{\varepsilon(b.z)} = \frac{(m_i \cdot xw_i) + \Delta m}{m_i \times (1 - xw_i)}$	(1)
BET	$w_{\varepsilon(b.z)} = \frac{w_0 \cdot C \cdot a_w}{(1 - a_w) \cdot (1 + (C - 1) \cdot a_w)}$	(2)
	Ecuación Linealizada $\frac{a_w}{(1 - a_w) \cdot w_{\varepsilon}} = \frac{1}{w_0 \cdot C} + \frac{C - 1}{w_0 \cdot C} \cdot a_w$	(4)
GAB	$w_{\varepsilon(b.z)} = \frac{w_0 \cdot C \cdot K \cdot a_w}{((1 - K) \cdot a_w) \cdot (1 + (C - 1) \cdot K \cdot a_w)}$	(3)
	Ecuación Linealizada $\frac{a_w}{w_{\varepsilon}} = \frac{1}{w_0 \cdot C \cdot K} + \frac{C - 2}{w_0 \cdot C} \cdot a_w + \frac{K \cdot (1 - C)}{w_0 \cdot C} \cdot a_w^2$	(5)

Tabla 2. Fórmulas utilizadas en análisis de color de las muestras.

Ec.	Expresión	No. Ec.
Tono	$h_{ab}^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$	(6)
Croma	$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$	(7)
Diferencia de color	$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$	(8)

Tabla 3. Caracterización de la materia prima

	xw	a _w	pH		
PA	0,936 (0,009) ^a	0,999 (0,001) ^a 25,03°C	5,187 (0,012) ^a 23,17°C		
PR	0,914 (0,003) ^b	0,998 (0,001) ^a 25,01°C	4,883 (0,015) ^b 24,03°C		
	L*	a*	b*	c*	h*
PA	40,04 (0,308) ^a	8,99 (0,1) ^a	47,13 (1,82) ^a	47,98 (1,8) ^a	79,19 (0,35) ^a
PR	20,06 (0,886) ^b	29,35 (0,66) ^b	22,41 (2,74) ^b	36,95 (2,2) ^b	37,26 (2,69) ^b

Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar.

a-b: Letras iguales en superíndice, dentro de una misma columna de valores, indica los grupos homogéneos establecidos por el análisis estadístico ANOVA (p<0,05).

Tabla 4. Nivel de deshidratación después de los tratamientos

	xw	a _w
PA-SAC	0,027 (0,007) ^a	0,204 (0,001) ^a
PA-MW	0,074 (0,001) ^b	0,321 (0,001) ^b
PA-LIOF	0,046 (0,002) ^a	0,283 (0,001) ^c
PR-SAC	0,039 (0,006) ^c	0,252 (0,001) ^d
PR-MW	0,072 (0,002) ^b	0,307 (0,001) ^e
PR-LIOF	0,021 (0,002) ^d	0,344 (0,001) ^f

a-f: Letras iguales en superíndice, , indica los grupos homogéneos establecidos por el análisis estadístico ANOVA (p<0,05).

Tabla 5. Parámetros obtenidos del ajuste de los modelos de GAB Y BET para la isoterma de sorción de PR y PA con distintos tratamientos de secado (SAC, LIOF, MW).

MODELO	SAC-PR	SAC-PA	MW-PR	MW (PA)	LIOF-PR	LIOF-PA
BET						
C	12,181	4,170	8,093	8,791	5,654	3,360
W ₀	0,056	0,074	0,071	0,070	0,043	0,087
R ²	0,893	0,828	0,980	0,972	0,877	0,985
Gab						
C	10,062	4,86	7,856	9,725	3,734	2,945
W ₀	0,055	0,06	0,069	0,065	0,048	0,111
K	1,145	1,11	1,049	1,072	1,133	0,839
R ²	0,710	0,75	0,840	0,900	0,700	0,901

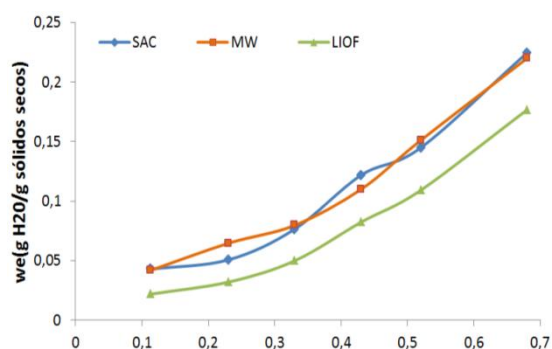


Figura 1. Isotermas de a_w sorción a 20 °C PR tratados mediante SAC, MW y LIOF.

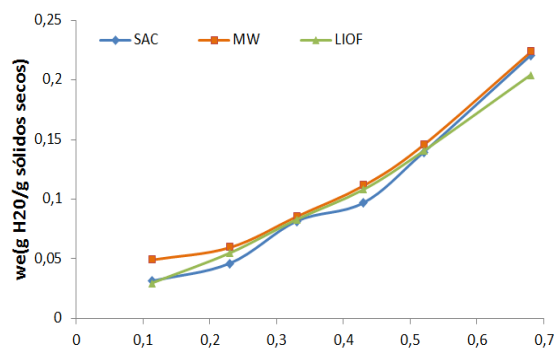


Figura 2. Isotermas de a_w sorción a 20 °C PA tratados mediante SAC, MW y LIOF.

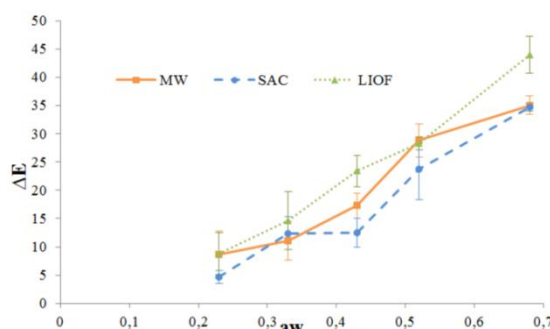
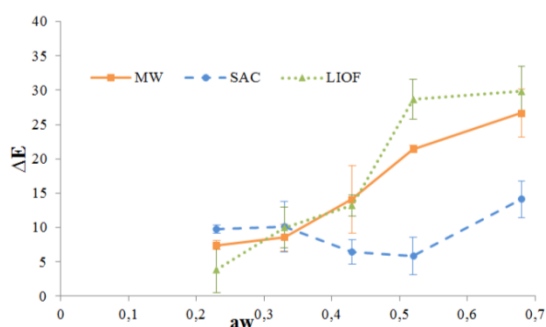


Figura 3. La diferencia de color (ΔE) con respecto a HR (0,113) tratados mediante SAC, MW y LIOF. A la izquierda PR y a la derecha PA.

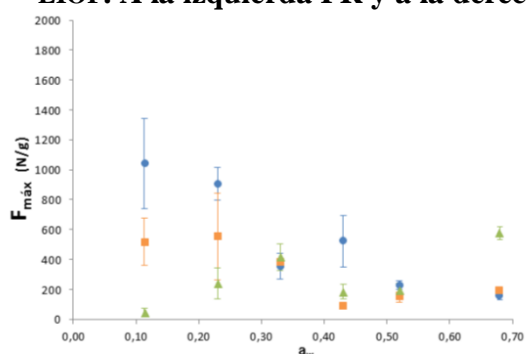


Figura 4. Evolución del parámetro mecánico en función de la a_w para PA.

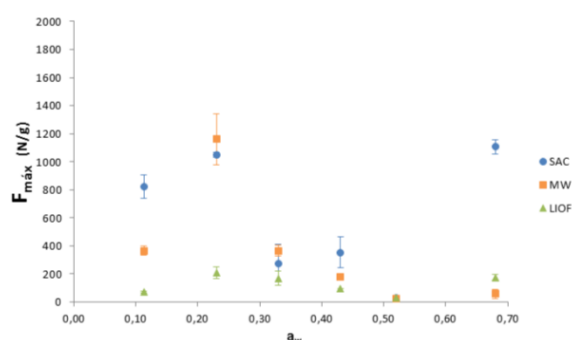


Figura 5. Evolución del parámetro en función de a_w para PR.

SECAGEM DE FEIJÃO CARIOCA EM SECADOR ROTATIVO

William Borges Dias¹, Gustavo Araújo Teixeira^{2,3}, José Roberto Delalibera Finzer^{1,2}

¹Universidade de Uberaba, Faculdade de Engenharia Química, Av. Nenê Sabino, 180, Bairro Universitário, Campus Aeroporto, Uberaba – MG, Brasil.

² Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Av. João Naves de Ávila 2121, Campus Santa Mônica, Bloco 1K, Uberlândia – MG, Brasil.

³ Universidade Federal do Triângulo Mineiro, ICTE, Engenharia de Alimentos, Av. Dr. Randolfo Borges Júnior, 1250, Campus Univerdecidade, Uberaba –MG, Brasil.

bwill.gt@gmail.com, gustavo.at@hotmail.com, jrdfinzer@pq.cnpq.br

INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus Vulgaris*) é uma leguminosa importante, constituindo uma fonte pouco onerosa de proteínas, fibras, carboidratos e minerais. Dentre as variedades de leguminosas mais consumidas mundialmente, o feijão encontra-se em posição de destaque. No Brasil, o padrão arroz-feijão é amplamente consumido pela população (FERNANDES; DUTRA; PROENÇA, 2007).

A secagem de grãos é uma etapa do processo agrícola amplamente utilizada por agricultores. A secagem pode ser realizada de forma natural e que utiliza da incidência dos raios solares, condicionada a condições climáticas que podem causar o aumento do período de secagem e em consequência a deterioração do produto por microrganismos, ou artificial, processo em que utiliza secadores mecânicos (CARDOSO SOBRINHO, 2001).

A secagem do feijão deve ser realizada logo após a colheita, momento no qual o feijão se encontra a umidade inferior a 20% (base úmida). O grão com elevado teor de água propicia a atuação de microrganismos, sendo comum o feijão abrigar ovos de carunchos que ao eclodirem em armazéns podem proporcionar enormes prejuízos. A alta umidade no grão também desencadeia o processo germinativo da semente (CARVALHO, 1994). A umidade recomendada no armazenamento para o caso do feijão comum se situa em torno de 10 a 11% (bu) e cerca de 15% (bu) para armazenamento em curto prazo (FILHO, 1985).

Os secadores rotativos com distribuição radial do ar de secagem é um dos tipos muito comercializados no Brasil. Este secador foi desenvolvido inicialmente para a secagem de café, mas tem sido usado para a secagem de outros tipos de grãos. Consiste em um secador usado por agricultores e cooperativas de produtores rurais principalmente por possibilitar elevada velocidade de secagem, flexibilidade em termos de utilização para outros grãos, fácil operabilidade e sua efetiva tendência para secagem uniforme.

A configuração básica de um secador rotativo para grãos com capacidade volumétrica de até 15 m³ é mostrada nas Figuras 1 e 2.

O secador rotativo é constituído basicamente por um cilindro tubular disposto no sentido horizontal que gira em torno de seu eixo longitudinal com velocidade que varia entre 1 a 15 rpm. Uma câmara distribuidora de ar atravessa axialmente o interior do cilindro. O dispositivo tem como objetivo a distribuição homogênea do ar em escoamento e a promoção da uniformidade da secagem pelo movimento com mistura dos grãos. O produto com elevado grau de umidade é transportado por elevadores até um silo posicionado acima do secador sendo descarregado por gravidade dentro do cilindro. Necessita-se que se deixe um espaço vazio com altura entre 0,2 e 0,3 m na posição superior do cilindro rotativo para possibilitar uma melhor movimentação e mistura dos grãos durante a secagem. A secagem ocorre em batelada até que se atinja o teor de umidade desejado (COSTA 2010).

A Equação (1) consiste em uma equação empírica, que relaciona o coeficiente de transferência de calor U_a (Btu/ft³.h.°F) para secadores rotativos, (McCABE et al., 1993):

$$U_a = 0,5 \frac{G^n}{D} \quad (1)$$

sendo: U_a expresso em Btu/ft³.h.°F, G é o fluxo mássico do gás em lb/ft².h e D é o diâmetro do secador em *feet*, “ n ” depende do tipo de secador rotativo. Aplicando a equação:

$$\dot{q} = 0,5 \frac{G^n}{D} V \Delta \bar{T} = 0,125 \cdot \pi \cdot D \cdot L \cdot G^n \cdot \Delta \bar{T} \quad (2)$$

sendo: V o volume do secador (ft³); L o comprimento (ft); $\Delta \bar{T}$ a média logarítmica de temperatura entre a o ar de secagem na entrada e saída e a temperatura de bulbo úmido (°F).

O objetivo deste trabalho foi realizar balanço de massa e energia em um secador rotativo usado para a secagem de feijão carioca, utilizando modelos de predição das propriedades termofísicas usando a composição química desta leguminosa e quantificar o desempenho do secador, culminando com a obtenção de coeficiente volumétrico de transferência de calor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos de secagem foram efetuados com: 1) estufa com circulação forçada de ar; 2) secador rotativo comercial (PINHALENSE) com capacidade volumétrica de 15 m³ operando em sistema batelada, realizado na empresa Feijão João Pedro LTDA, localizada no município de Araxá (MG) - Brasil.

O material processado foi feijão carioca (*Phaseolus Vulgaris*), umidade inicial na colheita de 18,2% (bu), produzido no município de Araxá, Minas Gerais, no mês de março de 2013.

Os parâmetros quantificados durante a secagem foram: os teores de umidade dos grãos; a vazão volumétrica e a temperatura do ar de secagem (entrada 80°C ; exaustão: média de 36,8°C); temperatura de bulbo seco e a umidade relativa do ar ambiente.

O secador rotativo (ver a Figura 2) consiste em um cilindro de 2,25 m de diâmetro por 5 m de comprimento constituído por chapa de aço perfurada. O cilindro gira em torno de seu eixo longitudinal com velocidade de 3 rpm, por meio de um conjunto de engrenagens, acionado por um motor elétrico de 5 hp. O ar de secagem é admitido por um soprador centrífugo instalado em uma das extremidades do cilindro e escoar no interior da massa de grãos.

O aquecimento do ar de secagem é realizado em trocador de calor tubular, com gases de combustão de fornalha onde se queima madeira de reflorestamento. O cilindro do secado foi carregado com o feijão carioca proveniente da lavoura por meio de elevadores conectados com um silo de espera e após a secagem foi descarregado por gravidade em câmaras de estocagem.

A umidade relativa do ar ambiente no local do experimento foi monitorada com o uso de um psicrômetro. A vazão volumétrica do ar de entrada do secador foi calculada pelo produto da velocidade média de admissão do ar pela área da seção de entrada.

O acompanhamento da umidade dos grãos na secagem com o uso do secador rotativo comercial foi realizado por aparelho GEHAKA G650.

No estudo laboratorial, a umidade do feijão foi medida pelo método da estufa, com circulação forçada de ar na temperatura 105 ± 2 °C, até massa constante, usando amostras de 15 grãos do feijão em estudo, em triplicata. Uma das amostras teve a massa quantificada a cada 30 minutos. Outras cinco amostras, cada uma constituída por um único grão de feijão, foram colocadas na estufa e tiveram suas massas e volumes monitorados para estudo do encolhimento.

O volume de grãos de feijão marcados foi determinado pela medição dos três eixos ortogonais com o uso de um paquímetro digital, e usando a Equação (3), considerando o grão um esferóide tri-axial oblato, Figura 3. Foi efetuado estudo de encolhimento usando o Modelo de Secagem Uniforme (Equação 4).

$$V = \frac{\pi \cdot a \cdot b \cdot c}{6} \quad (3)$$

$$\frac{A}{A_0} = (bX + C)^{2/3} \quad (4)$$

sendo: $b = \rho_0 / (X_0 + 1)$ e $C = 1 + b - \rho_0$; ρ_0 e X_0 são a densidade e umidade inicial do feijão.

As propriedades termofísicas do feijão, densidade e calor específico, foram quantificadas usando correlações em função da porcentagem de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas e água do feijão (HELDMAN, 2002). Para o feijão carioca, o percentual de proteínas é 18,51%, carboidratos 76,75%, lipídios 1,29% e cinzas em 3,45% Pires et al. (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação da velocidade de admissão do ar no secador foi efetuada medindo-se a velocidade do ar em diversos pontos na seção transversal retangular (0,75 por 0,92 m) de alimentação do ar no trocador de calor do secador e os resultados (m/s) foram ajustados à Equação (5) seguindo a integração para cálculo da velocidade média (BIRD, STEWART e LIGHTFOOT, 2002), obtendo-se a vazão do ar aquecido admitido no secador em 3,35 m³/s.

$$v = 4,86 + 0,1739 x + 2,8533 y \quad (5)$$

$$v_{\text{média}} = \frac{\int_{-0,46}^{+0,46} \int_{-0,375}^{+0,375} (v) dx dy}{\int_{-0,46}^{+0,46} \int_{-0,375}^{+0,375} dx dy} = \frac{\int_{-0,46}^{+0,46} \int_{-0,375}^{+0,375} (4,86 + 0,1739 x + 2,8533 y) dx dy}{2 \cdot 0,375 \cdot 0,46} = 0,46 \text{ m/s}$$

A umidade inicial do feijão foi 18,3 (base úmida); 0,224 (bs).

A Figura 4 consiste na curva de encolhimento de uma amostra de feijão, o resultado de 5 amostras mostrou que, em média, para umidade de 0,1 kg_{água}/kg_{fs}, praticamente, cessa o encolhimento e os pontos experimentais se afastam do modelo. Essa condição não foi alcançada na secagem em secador rotativo, pois a umidade de descarga foi 0,18 kg_{água}/kg_{fs}.

A Figura 5 mostra as curvas de secagem e de taxa de secagem do feijão. Pode-se verificar que, no início da secagem, os grãos mais à periferia do secador rotativo tem um aumento no teor de água causado pela passagem do ar saturado com vapor de água proveniente dos grãos mais ao centro do secador, caracterizando o período à indução. Em um

primeiro momento, o sólido está a uma temperatura abaixo da temperatura de saturação adiabática do ar e a taxa de evaporação aumenta até o momento em que é atingida a condição de taxa constante. O período à taxa constante no caso estudado abrange o decréscimo da umidade do grão do valor de 0,218 a 0,194 (bs). Já o período à taxa decrescente iniciou-se em 0,194 e ao alcançar 0,180 b.s, efetuou-se a descarga do secador dos grãos.

Balço de massa

Dos 11.200 kg de feijão úmido (0,181 kg água/kg fs), correspondendo a 9.173 kg de feijão seco, quantifica-se que a quantidade de água retirada na operação de secagem com duração de 5,38 horas foi de 376 kg de água; 18,47% do total de água que alimentou o secador constituindo parte do feijão carioca.

Balço de energia no secador

$$\frac{q}{m_{fs}} = C_{ps} (T_{sb} - T_{sa}) + X_a C_{pl} (T_v - T_{sa}) + (X_a - X_b) \lambda + X_b C_{pv} (T_{sb} - T_v) + (X_a - X_b) C_{pv} (T_{va} - T_v) \quad (6)$$

sendo: T_{sa} a temperatura de alimentação; T_v é a temperatura de vaporização; T_{sb} a temperatura final do sólido; T_{va} é a temperatura final do vapor; λ é o calor latente de vaporização da água; c_{ps} ; c_{pl} ; c_{pv} , os calores específicos do sólido, líquido e vapor, respectivamente (McCABE et al., 1993). Usando o Sistema Internacional:

$$\frac{q}{m_{fs}} = 1,68(35,8 - 25) + 0,222 \cdot 4,18(26 - 25) + 2265(0,222 - 0,181) + 0,181 \cdot 4,18(35,8 - 26) + (0,222 - 0,181)1,86(36,8 - 26)$$

$$\frac{q}{m_{fs}} = 120,175 \text{ kJ/kg(ss)}$$

O calor total trocado é: $q = 120,175 \text{ kJ/kg}_{\text{ feijão seco}} \cdot 9173 \text{ kg feijão seco} = 1.102.365 \text{ kJ}$.

Dividindo o calor trocado pelo tempo de secagem obtém-se a potência de 57 kW.

Usando a Equação (2), com $n=1,67$, quantificado neste trabalho e os parâmetros obtidos das dimensões do secador e dados de operação: média logarítmica de diferença de temperaturas $20,52^\circ\text{F}$; $V_{\text{secador}} = 529,72 \text{ ft}^3$; $G = 79,69 \text{ lb de ar/ft}^2 \cdot \text{h}$, tem-se:

$$q_{(t)} = 0,5 \frac{G^{1,27}}{D} V \Delta \bar{T} = 0,5 \frac{79,69^{1,27}}{7,38} 529,72 \cdot 20,52 = 191.390 \text{ Btu/h} \quad (1.086.370 \text{ kJ})$$

Isto indica que o fator n é igual a 1,27, para o secador rotativo operando com escoamento do ar de secagem radialmente no leito de feijão.

CONCLUSÕES

A umidade de $0,1 \text{ kg}_{\text{água}}/\text{kg}_{\text{fs}}$ em que cessa o encolhimento dos grãos de feijão em secador rotativo não foi alcançada, pois o feijão foi seco para curto período de estocagem. No período de indução, inicialmente a umidade dos grãos situados no centro do secador se transfere para os grãos da periferia pela ocorrência da saturação do ar de secagem. Por balanço massa verificou-se que a quantidade de água retirada na secagem com duração de 5,38 horas foi de 18,47% do total alimentado com o feijão. Para a secagem do feijão carioca com secador rotativo operando em batelada com escoamento radial do ar de secagem, obteve-se o fator n igual a 1,27 e foi de 57 kW a potência consumida no aquecimento do ar de secagem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG pelo suporte dado à apresentação deste trabalho no CIBIA 9.

BIBLIOGRAFIA

- Bird, R. Byron; Stewart, Warren E.; Lightfoot, Edwin N. Transport Phenomena. 2. ed. New York: John Wiley, 2002. 895 p.
- Cardoso Sobrino, J. Simulação e avaliação de sistemas de secagem de café. Viçosa: UFV, 2011. 112p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Carvalho, Nelson Moreira de. A secagem de sementes. Jaboticabal - SP, FUNEP, 1994. 165 p.
- Filho, Vicente Canécchio. Cultura De Feijão. Campinas - SP: Instituto Campineiro De Ensino Agrícola, 1985. 30 p.
- Costa, Douglas Romeu et al. Análise de custo de sistemas de secagem de milho em secadores mecânicos. Engenharia na Agricultura, Viçosa - MG, v. 18 n. 1, p. 63-76, 2010.
- Heldman, Denis R. Prediction Of Specific Heat. In: IRUDAYARAJ, Joseph; Food Processing Operations Modeling: Design And Analysis. New York: Marcel Dekker, 2002. cap. 1. p. 15-75.
- Mccabe, W.L.; SMITH, J.C.; HARRIOTT. Unit Operations of Chemical Engineering. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1993. 1130 p.
- Pires, C.V. et al. Composição Físico-Química de Diferentes Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Alimentos e Nutrição, Araraquara - SP, v. 16, n. 2, p. 157-162, 2005.

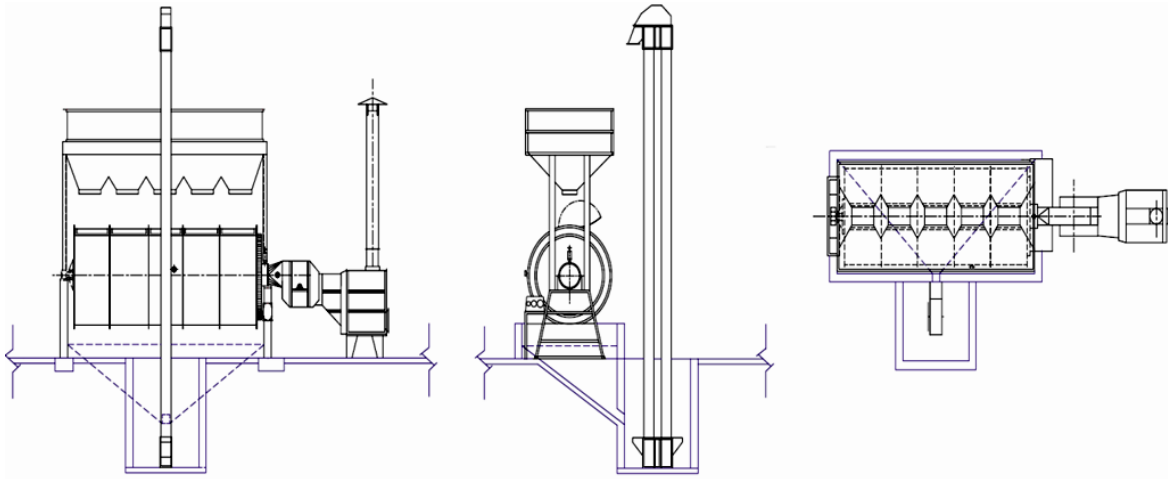


Figura 1. Configuração básica do secador rotativo.



Figura 2. Secador rotativo utilizado na secagem do feijão carioca.

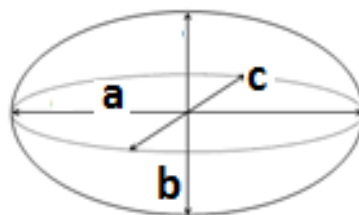


Figura 3. Dimensões características de um esferóide tri-axial oblato.

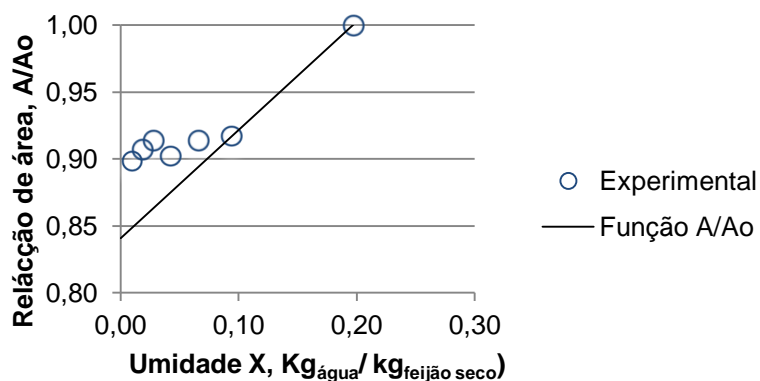


Figura 4. Relação adimensional de área em função da umidade do feijão.

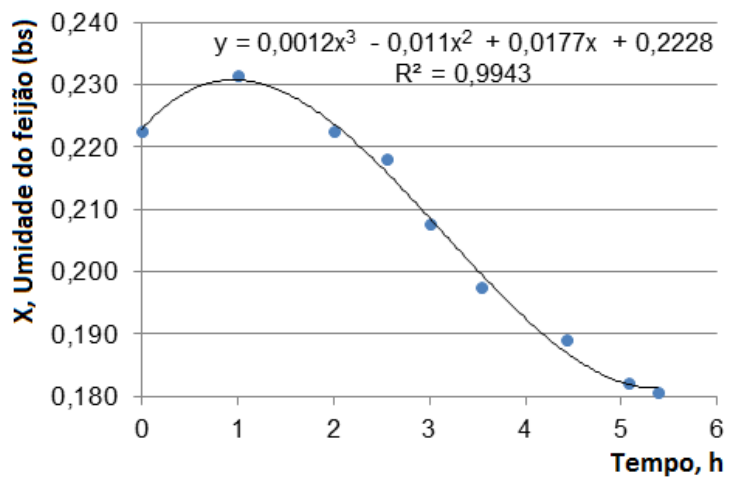


Figura 5. Curva de secagem do feijão.

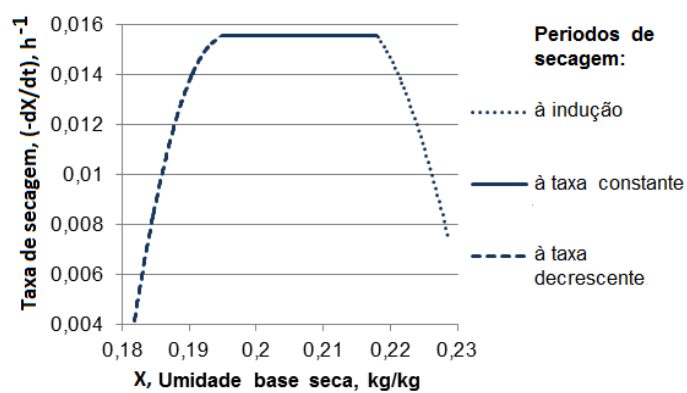


Figura 6. Curva de taxa de secagem do feijão.

EFFECTO DE DIFERENTES PROCESOS DE SECADO SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN LA PULPA DE COPOAZÚ (*Theobroma grandiflorum*)

Lina Guio¹, Daniel Duarte¹, Liz Muriel Piragauta¹, María Ximena Quintanilla² y Luis Eduardo Díaz²

¹ Estudiante, Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana. Chía, Colombia. ² Profesor, Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana. Chía, Colombia

INTRODUCCIÓN

Los procesos de secado para la conservación de los alimentos son de gran importancia permitiendo la prolongación de la vida media de los mismos. Sin embargo, la elección del método de secado de alimentos no es un proceso simple, numerosos factores físicos y químicos afectan el sistema biológico dinámico.

El copoazú (*Theobroma grandiflorum*) es una fruta nativa, exótica y promisoría – prima silvestre del cacao- de la cuenca amazónica colombiana que presenta cantidades importantes de vitamina C, antioxidantes, pectina, fósforo, hierro y calcio, entre otros, que se desea sean conservadas en el tiempo puesto que esta es una fruta estacional^[1].

Existen diversos tipos de secado que favorecen la conservación de los compuestos funcionales del producto a tratar, sin embargo, en muchos casos dichas metodologías pueden ser costosas por su alto consumo energético. Entre los métodos tradicionales se conocen el secado por horno a presión reducida, que es un proceso lento y poco efectivo, ya que puede llegar a retirar un 20% de humedad en un periodo de tiempo de 8 a 10 horas, sin embargo, la condición de presión reducida es una ventaja al disminuir el punto de ebullición del agua^[2], favoreciendo a los lípidos y proteínas presentes en la matriz, pues estos componentes son muy sensibles a temperaturas.^[3] Otro método tradicional es la deshidratación por aire caliente siendo el método de deshidratación más sencillo debido a que solo consta de una cámara cerrada y a temperatura elevada. El producto es sometido a este ambiente dispuesto en bandejas abiertas^[4].

Como tecnologías más novedosas se conoce el sistema de Ventana Refractiva y la Liofilización, la primera técnica permite la “conversión de alimentos líquidos y materiales biológicos en polvo con valor agregado dando como resultado productos de excelente color, vitaminas y retención de antioxidantes”^[5]. Por otro lado, el proceso de secado por liofilización se fundamenta en el concepto de sublimación del agua para la extracción de humedad, sometiendo el producto a bajas presiones y temperaturas bajo cero (-40°C),

resultando un material seco, y conservando de manera intacta las propiedades y características del producto original.

Es por esto que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes procesos de secado sobre el contenido de compuestos funcionales del copoazú con el fin de determinar el tipo de procesamiento que garantice la conservación de algunas propiedades y características del fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó como muestra orgánica pulpa sin tratar de Copoazú traído desde la Selva Amazónica, cosechada durante la segunda semana de abril del año 2012, zona donde las temperaturas varían entre los 20,0 a 27,5 °C, humedad relativa promedio de 77-88 %, congelada a -80,0 °C. Las muestras se secaron por Ventana Refractiva (VR), Liofilización (L), Horno a Presión reducida (HPR) y Horno de Aire Caliente (HAC). Para VR la pulpa de fruta se expuso a una temperatura de $72\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante 180 minutos. L se desarrolló con una rampa de calentamiento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a una temperatura de sublimación de 40°C a 0,04 MPa durante 80 horas. En el caso de HPR la pulpa se sometió a una temperatura de 70°C por 24 horas. Para HAC la pulpa se secó por 24 horas a 40°C , a la pulpa y a los productos obtenidos después del proceso de secado se les determinó humedad, Azúcares reductores, Actividad antioxidante, Vitamina C y Polifenoles totales.

Cuantificación de Azúcares Reductores. Protocolo para prueba con reactivo DNS ^[6].

Cuantificación de Vitamina C. Protocolo de Cuantificación de Vitamina C con patrón de Ácido Ascórbico ^[7].

Determinación de la Actividad Antioxidante. Protocolo con reactivo DPPH ^[8].

Determinación de Polifenoles totales. Protocolo para cuantificación de Polifenoles totales ^[9] expresado como equivalentes de ácido gálico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 1 expresados como el promedio de triplicados realizados en cada una de las diferentes pruebas, con sus respectivas desviaciones estándar. El método de liofilización obtuvo el mayor porcentaje de humedad retirado en comparación a los otros métodos evaluados. El secado en ventana refractiva depende de las condiciones de la matriz que va a someterle, cuando las películas que se extienden sobre las plataformas de secado no son lo suficientemente delgadas, a medida que se recibe radiación para la eliminación de agua la matriz empieza a formar en su superficie

una película que encapsula el material húmedo en su interior, disminuyendo el rendimiento del proceso y la velocidad de evaporación del agua; además a medida que el producto va perdiendo agua, la transferencia de calor varía afectando así la velocidad de evaporación del agua, disminuyendo la concentración de agua en el producto y la tasa de evaporación disminuye, afectando el resultado pues el tiempo requerido para la deshidratación total no es óptimo. El porcentaje de humedad por horno HPR, es considerablemente menor que los otros métodos, pues este trabaja con una presión máxima de 15 inHg, la cual no es suficiente para poder retirar todo el porcentaje de agua que posee la pulpa. Para llevar por completo el proceso físico se tendría que aplicar una presión mínimo del 0,001 inHg^[10].

En lo que respecta a los Azúcares Reductores los resultados se obtuvieron teniendo en cuenta una curva de Calibración con patrón de Glucosa con $r^2=0,997$. Los resultados no presentaron variación significativa entre el proceso de deshidratación de Liofilización y Ventana Refractiva.

La concentración de Vitamina C en la muestra sometida a VR fue considerablemente menor respecto a las otras muestras, esto se debe a la susceptibilidad de la Vitamina a cambios de temperaturas elevadas^[11]. En el proceso de secado la temperatura osciló entre 60°C a 75°C generando un cambio drástico lo que precede un choque térmico en el material orgánico, degradando la vitamina de manera significativa. En el caso de la liofilización, se manejó una baja temperatura y baja presión, por lo que la mayoría de Vitamina C se conservó. Para el caso de HAC, la concentración fue similar a la de liofilización, sin embargo, los valores obtenidos fueron menores debido a que la temperatura de 70°C puede considerarse alta para este tipo de procesos. La sobreexposición al calor pudo afectar la vitamina presente en la parte más externa de la pulpa de Copoazú. Para el caso de HPR el vacío generado en el horno no alcanzó a ser suficiente puesto que los contenidos de Vitamina no fueron altos.

Se obtuvo una curva de Calibración con patrón de concentración mM de Trolox ($R^2=0,9939$), para la determinación de la capacidad antioxidante presente en cada una de las muestras de Copoazu. Los compuestos fenólicos como los tocoferoles, tocotrienoles y flavonoides presentan una alta capacidad de capturar radicales libres, por lo que en muchas ocasiones resulta de gran utilidad la evaluación del contenido total de fenoles. Luego de realizar el proceso experimental, se obtuvo que el método de liofilización conservó la mayor actividad antioxidante. En el caso del HAC los valores obtenidos para la actividad antioxidante alta no fueron altos puesto que la sobreexposición al calor del material seco de la parte externa del material a secar, generó daños sustanciales en la concentración de

compuestos antioxidantes. En el caso de VR, la actividad antioxidante aumentó significativamente en comparación del método por horno.

CONCLUSIONES

Se logró determinar que el método de deshidratación más eficiente para preservar los compuestos bioactivos del copoazú fue la liofilización debido a que presentó los valores más altos en lo que respecta a concentraciones de Azúcares reductores, Vitamina C y polifenoles totales. Por otro lado se logró determinar que el método de ventana refractiva es eficiente al presentar resultados similares a los de liofilización.

BIBLIOGRAFIA

Corpoica,(Noviembre1998). *Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria Productos Y Procesos Tecnológicos Por Macrorregion*. 1st Ed. Santa Fe De Bogotá: Caballito De Mar.

Microfood (2012). *Que Es La Tecnología Puffing?* [ONLINE] Available At: [Http://Microfood.Eu/Es-Oferta.Html](http://Microfood.Eu/Es-Oferta.Html). [Last Accessed 23 Noviembre 2012].

Hernández Díaz, Carlos G. "La Transformación Industrial De La Producción Agropecuaria". Ambrona (España), 2004.1st Ed. España: Solana E Hijos.A.G.S.A.

Medrano Carvajal, Stephanie Alexandra. "Obtención De Deshidratados De Borojó (*Borojoapatinoi*) Y Copoazú (*Theobromagrandiflorum*) Mediante Procesos Térmicos De Secado Con Aire Forzado. Facultad De Ingeniería Química Y Agroindustrial. Quito: 2010. Pp. 1 -169.

Mejia Terán, Adriana Luzely. "Efecto De La Deshidratación Por Radiación Infrarroja Sobre Algunas Características Físicoquímicas De Interés Comercial De Aloe Vera (*Aloe Barbadosis*)" Universidad De La Sabana. Facultad De Ingeniería. 2011

Somogyi, M (1952). Notes On Sugar Estimation. *J. Biol. Chem.* 200: 245.

Shrivastava, K.,Agrawal, K. And Patel, D. K. (2005), A Spectrophotometric Determination Of Ascorbic Acid. *Jnl Chinese Chemical Soc*, 52: 503–506. Doi: 10.1002/Jccs.200500072

Diaz, L.E.; Munoz, D.R.; Prieto, R.E.; Cuervo, S.A.; Gonzalez, D.L.; Guzman, J.D.; Bhakta, S. Antioxidant, Antitubercular And Cytotoxic Activities Of Piper Imperiale. *Molecules* 2012, 17, 4142-4157.

Singleton Y Rossi, 1965

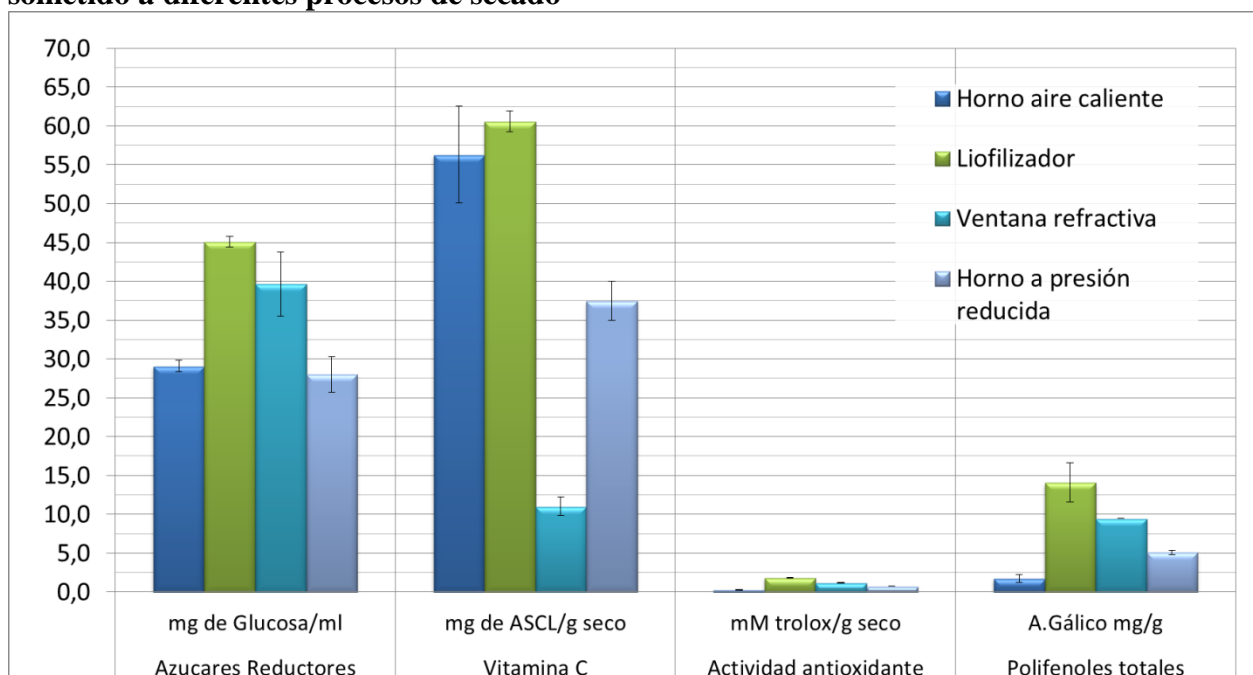
Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich. [En Línea] Sigma-Aldrich. (Consultado: 29 De Mayo De 2012.)

[Http://Www.Sigmaldrich.Com/Etc/Medialib/Docs/Sigma/Bulletin/Bca1bul.Par.0001.File.Tmp/Bca1bul.Pdf](http://Www.Sigmaldrich.Com/Etc/Medialib/Docs/Sigma/Bulletin/Bca1bul.Par.0001.File.Tmp/Bca1bul.Pdf).

Montiel, Graciela. "Cinética De Degradación Del Acido Ascórbico En Puré De Pimientos". Universidad Nacional Del Nordeste. Argentina: 2000.

	Horno aire caliente	Liofilizador	Ventana refractiva	Horno a presión reducida	
Humedad	91,95	92,744	91,809	46,19	%
Azúcares Reductores	29,07±0,74	45,11± 0,70	39,67±4,11	27,99±2,28	mg de Glucosa/ml
Vitamina C	56,31±6,21	60,60±1,34	11,02±1,22	37,45±2,53	mg de ASCL/g seco
Actividad antioxidante	0,29±0,03	1,83±0,01	1,19±0,01	0,73±0,00	mM trolox/g seco
Polifenoles totales	1,74±0,52	14,09±2,51	9,46±0,00	5,08±0,25	mg A. Gálico/g seco

Tabla 1. Resultados obtenidos de compuestos funcionales del Copoazú luego de ser sometido a diferentes procesos de secado



Gráfica 1. Comparación de resultados obtenidos de compuestos funcionales del Copoazú luego de ser sometido a diferentes procesos de secado

VALORIZACIÓN DE UN SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA PESQUERA PARA LA FABRICACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Joaquín Gómez-Estaca, Pilar Montero y M. Carmen Gómez-Guillén

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid (España). Email: cgomez@ictan.csic.es

INTRODUCCIÓN

El proceso de elaboración de surimi incluye una serie de lavados del músculo con la finalidad de obtener proteína miofibrilar purificada. Con ello se genera un considerable volumen de residuos acuosos ricos en proteína y, en función de la especie animal, también en grasa. Por otro lado, se han descrito concentrados ricos en grasa y proteína a partir de residuos de crustáceos con propiedades bioactivas, y/o nutricionales, por lo que su aprovechamiento y valorización son de gran interés para la industria alimentaria (Pérez-Santín et al. 2013). Además, la eliminación de estos residuos supone un serio problema medioambiental y económico, de modo que su aprovechamiento tiene una doble utilidad.

Existe un creciente interés por parte de la industria alimentaria en el desarrollo y aplicación de recubrimientos comestibles para alimentos, con la finalidad de mejorar la calidad y la seguridad de los mismos (Sánchez-González et al. 2011). Sus aplicaciones son diversas, incluyendo el retardo del intercambio gaseoso (dióxido de carbono, oxígeno, vapor de agua, aromas), aportan firmeza, brillo, previenen la contaminación microbiana, y son vehículo para la incorporación de compuestos funcionales tales como antimicrobianos o antioxidantes (Falguera et al. 2011), o bien como parte del diseño del propio alimento en *nouvelle cuisine*. En el presente trabajo se plantea el aprovechamiento de las aguas de lavado de langostino (*L. vannamei*), obtenidas como subproducto de la elaboración de surimi, para el diseño y caracterización de películas comestibles en base a agar con capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y caracterización del concentrado de aguas de lavado (CAL)

Las aguas de lavado de langostino (*L. vannamei*) se conservaron en congelación a -18 °C hasta su utilización. La recuperación de la materia seca se hizo mediante solubilización a pH 11 con NaOH 10 M y posterior precipitación a pH 4.5 con HCl 10 M. El precipitado se recuperó mediante centrifugación en una centrífuga vertical (GEA Westfalia OKA 2-06-566,

Düsseldorf, Alemania) y se secó por liofilización. El CAL se conservó al 0% de humedad relativa hasta su utilización.

El CAL se caracterizó en base a su composición elemental, contenido en aminoácidos, y actividad antioxidante (capacidad de reducción del hierro, FRAP y capacidad de secuestro del radical ABTS) como describieron Pérez-Santín et al. (2013). Asimismo, se llevó a cabo un análisis de compuestos reductores por el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a Gomez-Estaca et al. (2009). El perfil de pesos moleculares de la proteína se determinó por SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli (1970).

Elaboración y caracterización de las películas comestibles

El CAL se incorporó en la formulación de películas de agar en relación 60:40 (agar:CAL), utilizando como plastificante glicerol (50 g/100 g polímero). Como control se utilizó una película compuesta por agar y glicerol (50 g/100 g polímero). Las películas se elaboraron por moldeo y se secaron a 45 °C durante 18 h. El acondicionamiento previo a las determinaciones se llevó a cabo al 58% de humedad relativa y 22 °C, durante un mínimo de 4 días. Las películas se caracterizaron en base a su solubilidad, retención de agua y estabilidad dimensional (incremento de diámetro y de espesor) tras la inmersión en agua y sus propiedades mecánicas (tensión máxima, deformación máxima, módulo de elasticidad), de acuerdo con Balaguer et al. (2011b) y Balaguer et al. (2011a). Las propiedades ópticas y la permeabilidad al vapor de agua se determinaron de acuerdo a Balaguer et al. (2011b) y Gomez-Estaca et al. (2009). Asimismo, se realizó un estudio cinético de liberación de compuestos reductores, así como de la actividad antioxidante resultante, en distintos medios simulantes alimentarios: agua (simulante de alimentos acuosos), y etanol 95% (simulante de alimentos grasos). Los compuestos reductores se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método ABTS, como describieron Pérez-Santín et al. (2013).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM SPSS Statistics 21, evaluando las diferencias entre las medias mediante el test de Tukey-B con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del concentrado de aguas de lavado (CAL)

El CAL estuvo compuesto principalmente por proteína ($61,8 \pm 0,33\%$) y grasa ($23,6 \pm 0,8\%$), presentando también una considerable cantidad de cenizas ($6,8 \pm 0,14\%$) y un contenido residual de humedad de $2,6 \pm 0,4\%$. El análisis del perfil electroforético reveló que la fracción proteica del CAL estuvo compuesta por proteína de bajo peso molecular, principalmente ≤ 15 kDa, aunque también presentó una cierta cantidad de proteína entre 15-30 kDa (Figura 1). El origen más probable de estas proteínas es, por un lado, proteínas sarcoplásmicas del músculo, y por otro, enzimas y proteínas de bajo peso molecular presentes en el cefalotórax, aunque también puede incluir fracciones peptídicas procedentes de la autólisis parcial. En cuanto al contenido en aminoácidos (Tabla 1), los mayoritarios fueron la asparagina, glutamina, glicina y alanina. El CAL presentó cantidades significativas de aminoácidos esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina e histidina), así como de taurina, con reconocida actividad biológica.

En la Tabla 2 se muestra el análisis del contenido en compuestos reductores, por el método de Folin-Ciocalteu, así como la actividad antioxidante medida como la capacidad reductora (FRAP) y de secuestro de radicales libres (ABTS). El análisis de compuestos reductores sugiere la presencia de compuestos fenólicos y de azúcares reductores, la cual está siendo actualmente investigada por HPLC-MS. No obstante, debe considerarse la existencia de reacciones cruzadas con otros compuestos, por ejemplo, de naturaleza peptídica. El CAL presentó capacidad reductora y de secuestro del radical ABTS, en clara concordancia con la presencia de sustancias reactivas al método del Folin-Ciocalteu.

Caracterización de las películas

Las películas de agar y de agar-CAL fueron flexibles y de espesores de 116 ± 21 μm y 129 ± 24 μm , respectivamente. Ambas películas difirieron significativamente ($p \leq 0,05$) en luminosidad, tono y saturación (Tabla 3), presentando la película de agar-CAL una coloración amarillo-anaranjada de mayor saturación. La opacidad (Tabla 3) de la película agar-CAL también fue mayor que la de la película de agar ($p \leq 0,05$), pero a pesar de ello mantuvo una elevada transparencia (Figura 2). Ambas películas, y especialmente la película agar-CAL, presentaron baja transmisión a la luz en el rango ultravioleta (resultados no mostrados).

Ambas películas mantuvieron su integridad tras la inmersión en agua, registrando una considerable pérdida de peso que fue mayor en la película agar-CAL ($p \leq 0,05$), pero que en

ambos casos debe atribuirse principalmente a la liberación de glicerol, pues éste se incorporó en alta concentración (50 g/100 g de polímero). La mayor pérdida de peso de la película agar-CAL se debe principalmente a la liberación de péptidos de bajo peso molecular de la matriz. Ambas películas, al igual que ocurre en el caso de otros biopolímeros de carácter hidrofílico, experimentaron una considerable retención de agua, siendo significativamente mayor en la película agar-CAL ($p \leq 0.05$). Este fenómeno, junto con el hecho de que la película agar-CAL mostró un mayor incremento de grosor ($p \leq 0.05$) tras la inmersión, serían indicativos de una estructura más desordenada en esta película, en la que el agua puede penetrar más fácilmente dando lugar a un mayor hinchamiento. La menor tensión máxima de las películas agar-CAL, en comparación con las películas de agar, también sería indicativo de que el CAL se encuentra integrado en la matriz polimérica a modo de relleno, aparentemente con una mínima implicación en la formación de la red polimérica. La mayor deformación máxima sería debida a la mayor plastificación producida tanto por la presencia de proteína de bajo peso molecular como de grasa. Con respecto al módulo de elasticidad, los valores fueron muy bajos en ambas películas, lo cual es indicativo de un comportamiento mecánico muy poco elástico, a diferencia del comportamiento típico de las películas de proteínas (Balaguer et al. 2011b; Blanco-Pascual et al. 2013). Con respecto a la permeabilidad al vapor de agua, la incorporación de CAL en la formulación de las películas de agar dio lugar a la reducción de la misma en un orden de magnitud, siendo atribuible a la presencia de grasa, la cual eleva las propiedades de barrera al agua del material (Perez-Mateos et al. 2009).

La cinética de liberación de compuestos reductores y actividad antioxidante (secuestro de radicales ABTS) en medios simulantes alimentarios se muestra en la Figura 3. Se puede observar una mayor liberación de compuestos reductores, acompañado de una mayor actividad antioxidante, en agua que en etanol 95%. Además, esta liberación fue más rápida, siendo ambos hechos atribuibles al mayor hinchamiento de las películas en agua. Este comportamiento es el típico de las matrices hidrofílicas incorporadas con compuestos activos, en las que la plastificación y relajación de las cadenas poliméricas en condiciones de alta humedad favorece la liberación de las moléculas activas (Higuera et al. 2013). De esta manera, la película agar-CAL sería especialmente interesante para aplicaciones alimentarias en las que los productos a recubrir tuvieran una alta actividad de agua.

CONCLUSIONES

A partir de las aguas de lavado de langostino generadas en el proceso de la elaboración de surimi, se ha obtenido un concentrado rico en grasa y proteína que ha mostrado actividad antioxidante. Dicho concentrado se ha incorporado con éxito en la formulación de películas comestibles en base a agar, las cuales presentan unas propiedades mecánicas moderadas, una considerable barrera al vapor de agua y a la radiación ultravioleta, y que tienen capacidad para la liberación de compuestos antioxidantes en medios simulantes alimentarios (agua y etanol 95%), siendo esta liberación mayor en agua.

REFERENCIAS

- Balaguer MP, Gómez-Estaca J, Gavara R & Hernández-Muñoz P (2011a) Biochemical properties of bioplastics made from wheat gliadins cross-linked with cinnamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(24), 13212-13220.
- Balaguer MP, Gómez-Estaca J, Gavara R & Hernández-Muñoz P (2011b) Functional Properties of Bioplastics Made from Wheat Gliadins Modified with Cinnamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(12), 6689-6695.
- Blanco-Pascual N, Fernández-Martín F & Montero MP (2013) Effect of different protein extracts from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*. 33(1), 118-131.
- Falguera V, Quintero JP, Jiménez A, Muñoz JA & Ibarz A (2011) Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*. 22(6), 292-303.
- Gomez-Estaca J, Gimenez B, Montero P & Gomez-Guillen MC (2009) Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*. 92(1), 78-85.
- Higuera L, López-Carballo G, Hernández-Muñoz P, Gavara R & Rollini M (2013) Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N α -dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*. 165(3), 339-345.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*. 227(5259), 860-865.
- Perez-Mateos M, Montero P & Gomez-Guillen MC (2009) Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*. 23(1), 53-61.
- Pérez-Santín E, Calvo MM, López-Caballero ME, Montero P & Gómez-Guillén MC (2013) Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT - Food Science and Technology*. 54(1), 87-94.

Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A & Cháfer M (2011) Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. Food Engineering Reviews. 3(1), 1-16.

Tabla 1. Composición en aminoácidos del concentrado de aguas de lavado de langostino (CAL).

	Residuos/1000 residuos
Asp	126
Thr	37
Ser	66
Glu	115
Gly	118
Ala	96
Cys	10
Val	48
Met	22
Ile	31
Leu	64
Tyr	29
Phe	50
His	25
Lys	56
Arg	43
Pro	47
Tau	19

Tabla 2. Actividad antioxidante del concentrado de aguas de lavado de langostino (CAL).

Compuestos reductores (mg ácido gálico/g CAL)	33.9 ± 1.5
FRAP (μmol FeSO ₄ ·7H ₂ O eq./g CAL)	79.8 ± 0.6
ABTS (mg vitaminA C eq./g CAL)	54.2 ± 1.1

Tabla 3. Algunas propiedades físico-químicas de las películas de agar y agar-CAL: estabilidad tras la inmersión en agua, propiedades mecánicas, propiedades de barrera y propiedades ópticas.

		Agar	Agar-CAL
Estabilidad tras la inmersión en agua	Pérdida de peso (%)	56,1 ± 1,4a	61,0 ± 1,2b
	Retención de agua (%)	729 ± 50a	1395 ± 175b
	Incremento de diámetro (%)	2,1 ± 0,6a	1,6 ± 0,3a
	Incremento de grosor (%)	302 ± 14a	405 ± 18b
Propiedades mecánicas	Tensión máxima (MPa)	9.94 ± 1.3a	6,1 ± 1,2b
	Deformación máxima (%)	36.13 ± 1.7a	49,2 ± 11,8b
	Módulo de elasticidad (MPa)	0,59 ± 0,04a	0,47 ± 0,03b
Propiedades barrera	Permeabilidad al vapor de agua (Kg·m/m ² ·s ·Pa)	5,7·10 ⁻⁷ ±6,4·10 ⁻⁸ a	5,1·10 ⁻⁸ ±6,8·10 ⁻⁹ b
Propiedades ópticas	Luminosidad	87 ± 2a	68 ± 2b
	Tono	100 ± 3a	73 ± 3b
	Saturación	19 ± 6a	39 ± 1b
	Opacidad	2.72 ± 0.04a	3.47 ± 0.09b

Letras distintas (a, b) en la misma línea indican diferencias significativas (p≤0.05).

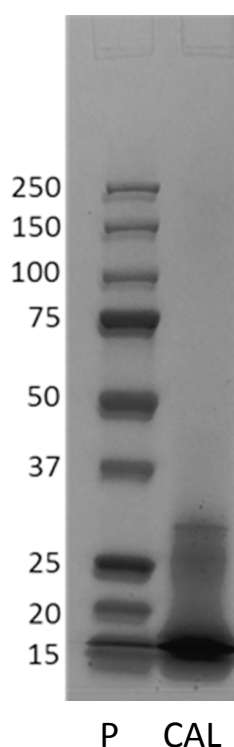


Figura 1. Perfil electroforético del concentrado de aguas de lavado de langostino (CAL).

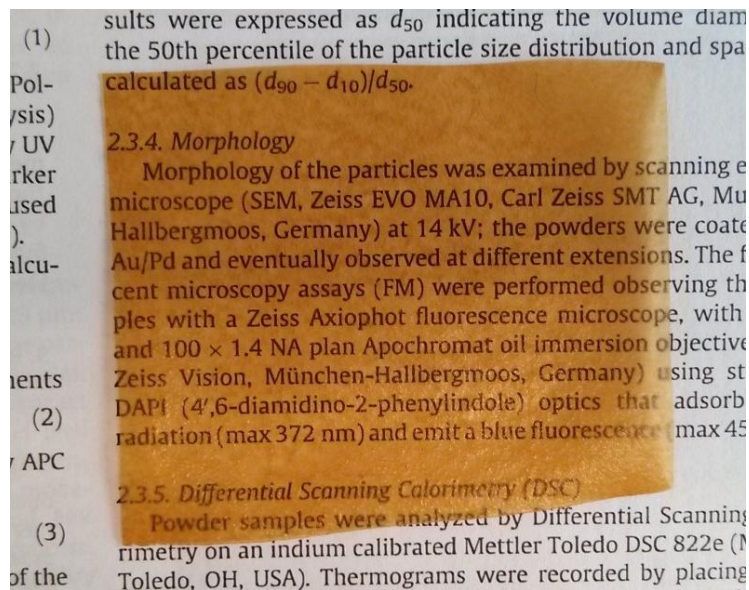


Figura 2. Imagen de la película agar-CAL.

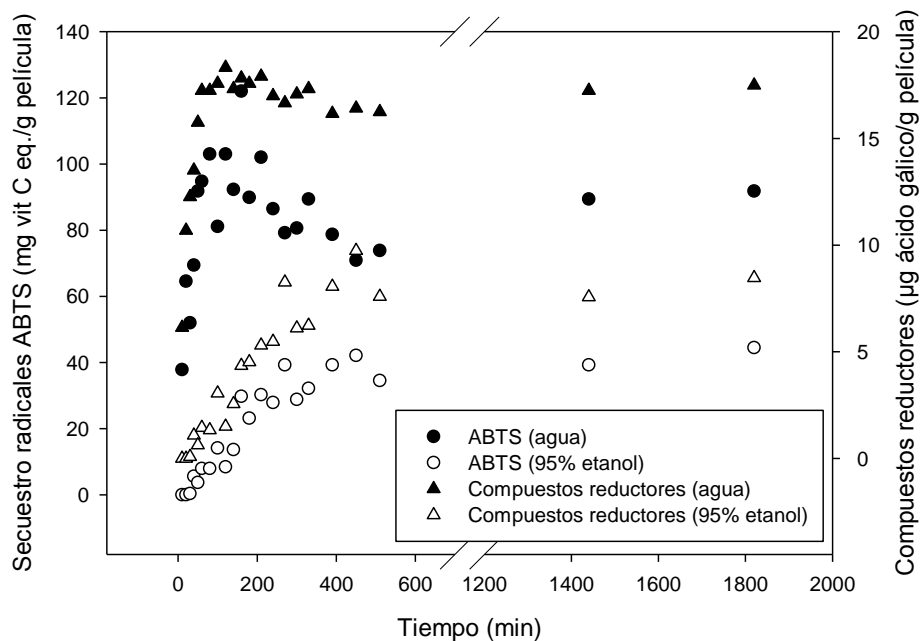


Figura 3. Cinética de liberación de compuestos reductores y capacidad de secuestro de radicales libres ABTS de las películas agar-CAL en agua (simulante de alimentos acuosos) y etanol 95% (simulante de alimentos grasos).

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HIDROLASA DE SALES BILIARES EN ESPECIES DE *L. FERMENTUM* COMO POTENCIAL HIPOCOLESTEROLÉMICO

Stephania Aragón Rojas¹, Luis Eduardo Díaz², María Clementina Cueto Vigil³

¹ Egresada Maestría en Diseño y Gestión de procesos. Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Correo electrónico: saragon@unicolayor.edu.co

² Docente investigador Universidad de La Sabana. Correo electrónico: luisdb@unisabana.edu.co.

³ Directora Maestría en Diseño y Gestión de Procesos y Docente Investigador de la Universidad de La Sabana. Correo electrónico: maria.cueto@unisabana.edu.co.

INTRODUCCIÓN.

La hipercolesterolemia es una patología derivada de los altos niveles de colesterol depositados sobre las paredes arteriales, predisponiendo al organismo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Wang, Wu, Ng, & Shyu, 2010). La disminución de 1% de los niveles de colesterol sérico, pueden reducir entre 2-3% el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Nguyen, Kang, & Lee, 2007).

En el metabolismo catabólico del colesterol interviene la enzima Hidrolasa de Sales Biliares (BSH). En el hígado, el colesterol después de 7 reacciones enzimáticas se transforma a ácidos biliares, los cuales se conjugan con los amino ácidos de taurina o glicina, formando las sales biliares (Jones, Chen, Ouyang, Metz, & Prakash, 2004). Entre un 5-10% de las sales biliares son hidrolizadas en el intestino delgado por acción de la BSH a residuos de amino ácidos y ácidos biliares excretados posteriormente del organismo (Jiang et al., 2010). La BSH es sintetizada intracelularmente solo por los microorganismos de la flora intestinal, y ha sido aislada de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Corzo & Gilliland, 1999)

Las especies del género *Lactobacillus*, producen una gran variedad de isoformas de la enzima BSH, por ejemplo *L. acidophilus* y *L. plantarum* sintetiza cuatro isoenzimas con especificidad de sustrato diferente (Lambert, Bongers, De Vos, & Kleerebezem, 2008; Ooi, Ahmad, Yuen, & Liong, 2010). *L. fermentum* es una de las especies en donde el estudio de BSH se encuentra aún en proceso de desarrollo, por lo cual, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión génica y la actividad enzimática de BSH en esta especie, para así determinar su potencial hipocolesterolémico.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Aislamiento cepas *L. fermentum*.

Se emplearon 5 cepas de *L. fermentum* aisladas de suero costeño (alimento autóctono de la región Caribe Colombiana) caracterizadas en cuanto a sus propiedades probióticas, tolerancia a pH 2.0, concentración de 0,3% de sales biliares, adhesión a mucosa intestinal y tolerancia a antibióticos de importancia clínica, (Acuña, 2009). Las cepas fueron cultivadas en caldo MRS a 37°C durante 24 horas y fueron crioconservadas en glicerol 30% (-70 °C). Como controles durante los ensayos se utilizó *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 (Moreira *et al.*, 2005).

Actividad enzimática de la BSH por HPLC.

La actividad de la enzima BSH fue evaluada durante las primeras seis horas de crecimiento bacteriano por la técnica HPLC (Begley, Hill, & Gahan, 2006; Zago *et al.*, 2011). La extracción de las sales biliares, se realizó tomando 100 µL de las cepas activadas en caldo MRS a 37°C por 24 h y se inocularon en caldo MRS suplementado con 1.2 mM de Glucolato de sodio (GCA), 2.8 mM Taurocolato de sodio (TCA) y 2.8 mM Taurodeoxicolato de sodio (TDCA)(Lourenço & Camilo, 2002), se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C, cada dos horas se tomó una muestra para ser analizada por cromatografía. Cada muestra se centrifugó a 7600 g durante 10 min, a 1500 µL de sobrenadante se le adicionó 30 µL de HCL 6N y 1500 µL de metanol grado HPLC.

Las muestras se llevaron para el análisis en el cromatógrafo HPLC LaChrom Elite Hitachi, evaluadas a una longitud de onda de 200 nm. Se usó una columna de fase inversa C18 (300 x 3,9 mm) y como fase móvil una mezcla de Buffer acetato pH 4,3 y metanol (37% y 63% respectivamente) en modo isocrático. Para la identificación y cuantificación de las señales se usaron como patrones de referencia soluciones de taurocolato de sodio (0,167 mg/mL), glucolato de sodio (0,167 mg/mL) y taurodeoxicolato de sodio (0,167 mg/mL). Los estándares fueron disueltos en una mezcla de buffer acetato pH 4,3 y metanol (60:40). Los tiempos de retención para Taurocolato de sodio, Glucolato de sodio y Taurodeoxicolato de sodio fueron: 6.0 min, 8.5 min y 12.4 min (Martoni *et al.*, 2007).

Análisis de la expresión de la enzima BSH.

El análisis de la expresión del gen *bsh* se determinó durante las primeras 6h de crecimiento de la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 evaluando su comportamiento en condiciones diferentes de aerobiosis/anaerobiosis y presencia o ausencia de sales biliares: S1: Incubación en caldo MRS a 37°C en condiciones aeróbicas; S2: Incubación en caldo MRS

enriquecido con 0.5% de taurocolato de sodio a 37°C en condiciones aeróbicas; S3: Incubación en caldo MRS a 37°C en condiciones anaeróbicas; S4: Incubación en caldo MRS enriquecido con 0.5% de taurocolato de sodio a 37°C en condiciones anaeróbicas.

Se aisló el RNA total empleando el reactivo Trisure (Bioline) según las indicaciones mencionadas por el fabricante. El RNA total obtenido se cuantificó en el Qubit® Fluorometer (Invitrogen). Una vez cuantificado el RNA total se sintetizó a cDNA por medio del Kit DNAC MMLV Reverse transcriptase 1st-standar cDNA (Epicentre). Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C.

El gen 16S rRNA fue empleado como housekeeping de la expresión del gen *bsh* (Kumar *et al.*, 2012). Los primers utilizados para el 16S rRNA fueron descritos por Woo *et al.*, en el 2002 y el gen *bsh* se amplificó según lo descrito por Aragón, 2013. Los amplímeros se verificaron en gel de agarosa al 1.5%, las bandas de ADN fueron visualizadas en el equipo Quantityone (BioRad), por medio del software Quantityone 4.6.8 (BioRad) se calculó la intensidad de las bandas y se halló la relación entre el gen de referencia y el gen de interés.

Análisis estadístico

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA de un factor ($\alpha=0.05$) y comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$). Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Actividad enzimática de la BSH por HPLC.

La actividad enzimática de la BSH se evaluó al determinar la hidrólisis de las sales biliares presentes en el medio durante la fase exponencial de crecimiento microbiano para identificar cuando da inicio la actividad y correlacionarlo con el momento en el cual se expresa la enzima.

Todas las cepas mostraron actividad hacia sales conjugadas con taurina, reportándose inicio de la actividad enzimática a la hora 2. El aislamiento *L. fermentum* K72, mostró actividad enzimática a la hora dos, la cual se mantuvo durante la hora cuatro y se evidenció una disminución de sustrato en el medio de cultivo a la hora seis para TCA y TDCA. La cepa *L. fermentum* K73 inició actividad enzimática a la hora dos, la cual se mantuvo hasta la hora cuatro, en donde se observó una disminución de TCA constante hasta la hora seis (Figura No.1). Finalmente, las cepas ATCC no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre medias para ninguno de los tres sustratos ($\alpha=0.05$).

La variabilidad entre la actividad enzimática durante la fase exponencial medida por HPLC, puede asociarse a la posibilidad de usar la enzima en base a su función de fortalecimiento de membrana. En el duodeno, enzimas como fosfolipasa A2 o defensinas contribuyen a la actividad antimicrobiana del intestino ocasionando daño en la membrana microbiana (Taranto, Fernandez Murga, Lorca, & de Valdez, 2003). Cada uno de los microorganismos procede de lugares distintos de la geografía Colombiana, y no se puede decir con certeza el tiempo en el cual estuvieron en contacto con el tracto gastrointestinal, la cepa *L. fermentum* K73 fue la que mayor actividad enzimática presentó, esto puede deberse a que ha estado en el tracto gastrointestinal más tiempo o su presencia en el alimento se asocia a contaminación oro-fecal en alguna de las fases de elaboración del producto o en la materia prima.

La expresión de la enzima BSH fue evaluada durante la fase exponencial en las cepas de *L. fermentum*, tomándose la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 como modelo, el análisis de RNAm mostró inicio a la segunda hora de crecimiento bacteriano. Se evaluó la expresión del gen *bsh* en respuesta a dos condiciones fisiológicas: oxígeno y sales biliares (Figura No. 2). La expresión del gen *bsh* para cada uno de los tratamientos en los diferentes tiempos fue variable, lo cual mostró diferencias estadísticamente significativas al realizar un análisis de variancia ($\alpha=0.05$).

Los análisis de interacción entre las variables, aerobiosis, presencia de sales biliares y expresión de la BSH, mostraron al estar el microorganismo bajo estas condiciones se genera mayor síntesis de RNAm del gen *bsh*. Por otro lado, en condiciones de aerobiosis y en ausencia de sales biliares aumenta la expresión aunque en una proporción menor que en presencia de las dos condiciones, concluyendo que probablemente el factor más influyente para la expresión de la enzima es la presencia de oxígeno. Por otro lado, el pico máximo de expresión es a las dos horas y se presenta un descenso posterior en la expresión en ausencia de sales biliares y anaerobiosis, por el contrario, en presencia de sales biliares la expresión continúa indicando que probablemente la presencia de las sales biliares, es el factor que mantiene la síntesis de RNAm constante si el microorganismo así lo requiere.

El análisis de la expresión del gen *bsh* a las dos horas también fue reportado por (Duary, Batish, & Grover, 2012) asociado a la síntesis de la enzima BSH funcional, durante la segunda hora de crecimiento para *L. plantarum*, de igual forma, (Koskenniemi et al., 2011) evaluaron el transcriptoma de la cepa *L. rhamnosus* en presencia de 0.3% oxgall. El gen *bsh* es diferente entre las especies del género *Lactobacillus*, sin embargo, su momento de expresión es el mismo, siendo ésta una similitud en cuanto a su función fisiológica para el

microorganismo indicando lo necesario que es este gen para su desarrollo y supervivencia. Algunos autores atribuyen la expresión a la concentración de sales presentes en el medio, se ha observado que la cepa *L. acidophilus* NCMF no muestra expresión diferencial para ninguno de sus dos genes cuando es sometida a éste factor de estrés (Pfeiler, Azcarate-Peril, & Klaenhammer, 2007). Por otro lado, algunos autores evalúan la expresión génica únicamente en aerobiosis y variando la concentración de sales biliares, considerándose éste factor como causal de síntesis de RNAm, no obstante, al simular *in vitro* las condiciones reales del intestino delgado se hace necesario contemplar que el sistema es anaeróbico (Martoni et al., 2007), razón por la cual se incluyó dicha variable en este estudio. Finalmente en este estudio se mostró que el inicio de la expresión génica es sincrónico con el inicio de actividad enzimática.

CONCLUSIONES.

Las cepas *L. fermentum* evaluadas pudieron desconjugar las sales biliares *in vitro* como medida de su efecto hipocolesterolémico. Se pudo determinar que los microorganismos utilizan la enzima en la fase exponencial iniciando su expresión y actividad enzimática a la segunda hora de crecimiento microbiano siendo el oxígeno el factor que influye en el inicio de la expresión génica. La síntesis de la enzima BSH genera beneficios al consumidor y al microorganismo, razón por la cual, la continuidad de su estudio permitirá generar mecanismos para potencializar su producción y de esta forma generar un impacto duradero sobre la salud del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA.

- Acuña, Y. (2009). Selección e identificación bacterias ácido lácticas (BAL) con potencial probiótico aisladas del suero costeño., Universidad de La Sabana.
- Aragón, S. (2013). Evaluación bioquímica y molecular de la capacidad hipocolesterolémica de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico., Universidad de La Sabana.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1729.
- Corzo, G., & Gilliland, S. (1999). Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy Science*, 82(3), 472-480.
- Duary, R. K., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* gut conditions. *Mol Biol Rep*, 39(3), 2541-2552. doi: 10.1007/s11033-011-1006-9

- Jiang, J. K., Hang, X. M., Zhang, M., Liu, X. L., Li, D. T., & Yang, H. (2010). Diversity of bile salt hydrolase activities in different lactobacilli toward human bile salts. *Annals of Microbiology*, *60*(1), 81-88. doi: 10.1007/s13213-009-0004-9
- Jones, M. L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T., & Prakash, S. (2004). Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2004*, 61-69.
- Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., . . . Varmanen, P. (2011). Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol Cell Proteomics*, *10*(2), M110.002741. doi: M110.002741 [pii]10.1074/mcp.M110.002741
- Kumar, Nagpal, Kumar, Hemalatha, Verma, Kumar, . . . Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res*, *2012*, 902917. doi: 10.1155/2012/902917
- Lambert, J. M., Bongers, R. S., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2008). Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Applied and environmental microbiology*, *74*(15), 4719.
- Martoni, C., Bhathena, J., Jones, M. L., Urbanska, A. M., Chen, H., & Prakash, S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active lactobacillus in the simulated human GI tract. *J Biomed Biotechnol*, *2007*(7), 13684. doi: 10.1155/2007/13684
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., & Lee, M. S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(3), 358-361. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015
- Ooi, L. G., Ahmad, R., Yuen, K. H., & Liong, M. T. (2010). *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *Journal of dairy science*, *93*(11), 5048-5058.
- Pfeiler, E. A., Azcarate-Peril, M. A., & Klaenhammer, T. R. (2007). Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol*, *189*(13), 4624-4634. doi: JB.00337-07 [pii] 10.1128/JB.00337-07
- Taranto, M. P., Fernandez Murga, M. L., Lorca, G., & de Valdez, G. F. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J Appl Microbiol*, *95*(1), 86-91. doi: 1962 [pii]
- Wang, C. Y., Wu, S. C., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Effect of *Lactobacillus*-fermented adlay-based milk on lipid metabolism of hamsters fed cholesterol-enriched diet. *Food Research International*, *43*(3), 819-824.
- Woo, P. C., Fung, A. M., Lau, S. K., & Yuen, K. Y. (2002). Identification by 16S rRNA gene sequencing of *Lactobacillus salivarius* bacteremic cholecystitis. *J Clin Microbiol*, *40*(1), 265-267.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., . . . Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*, *28*(5), 1033-1040. doi: S0740-0020(11)00051-7 [pii]10.1016/j.fm.2011.02.009

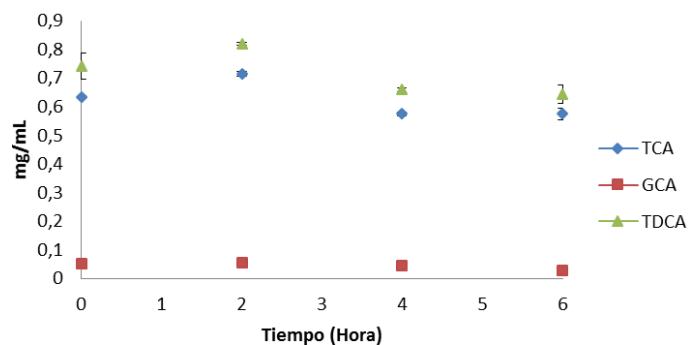


Figura 1. Desconjugación de sales biliares para *L. fermentum* K73 medida por HPLC durante la fase exponencial

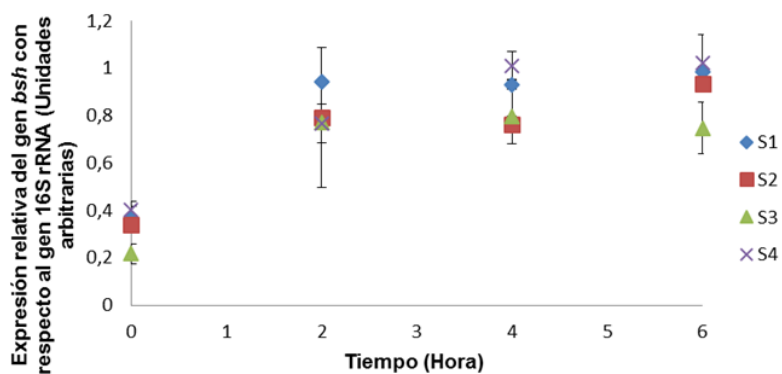


Figura 2. Cinética de la expresión génica de la enzima BSH para cada tratamiento en la cepa *L. fermentum* ATCC 9338.

EFFECTO DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE EL CONTENIDO DE BETACAROTENO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, Y COLOR DE LA PULPA DE UCHUVA (*PHYSALIS PERUVIANA* L.)

Jéssica López^{1,3}, Antonio Vega-Gálvez^{1,2}, María José Torres-Ossandón¹, Margarita Miranda M.¹, María José Galotto³, Puente-Díaz, L.⁴

1 Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitran s/n, 599. La Serena, Chile. Email: avegag@userena.cl; j.lopez.pasten@gmail.com; mtorresossandon@gmail.com, mperez@userena.cl.

2 Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, CEAZA, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

3 Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad of Santiago de Chile (USACH), Santiago, Chile. Email: maria.galotto@usach.cl

4 Departamento Ciencias de los alimentos y Tecnología Química, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Email: lpueente@ciq.uchile.cl

INTRODUCCIÓN

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) pertenece a la familia de las solanáceas y al género *Physalis*. Es un fruta nativa de Colombia, es una baya jugosa de color amarillo-naranja, de forma redonda y contiene unas 100 a 300 semillas por fruto (Duque et al., 2011). Ha adquirido gran interés debido a sus propiedades nutritivas, ya que es una excelente fuente de vitamina A, vitamina C, además rico en Potasio y Fósforo; y posee una alta actividad antioxidante, además debido a los componentes biológicamente activos que posee, este fruto ofrece beneficios para la salud (Puente et al. 2011; Restrepo et al., 2009). La pulpa de uchuva se utiliza para la fabricación de néctar, helados, mermeladas, entre otros productos y su color es amarillo-anaranjado y son los carotenoides que contribuyen a que tenga este color (Ramadán y Mörsel, 2004). El principal carotenoide de la uchuva según Ramandan (2011) es el all-trans- β -caroteno, aportando el 76,8% del total de carotenoides. El mantenimiento del color natural de los pigmentos en los alimentos térmicamente procesados y almacenados es un reto importante en el procesamiento de alimentos. La literatura indica que la APH provoca un aumento de la reacción de pardeamiento en algunos productos vegetales (Eshtiagi y Knorr 1993; Ahmed et al. 2005), mientras que Fernández et al. (2001) informaron que no hubo efecto de la presurización sobre los pigmentos del puré de tomate.

El proceso de APH consiste en someter un alimento a una elevada presión (100-1000 MPa) y moderada temperatura durante un periodo corto de tiempo (Daoudi et al. 2002). Esta tecnología transmite la presión de manera isostática al producto, independiente de la composición, del tamaño y la forma de los alimentos. La utilización de APH ofrece un

sistema de conservación no térmico que difiere de la tecnología tradicional, donde no se requiere someter a procesos de altas temperaturas para conseguir la reducción de la carga microbiana; además se ha demostrado que los alimentos mantienen sus propiedades nutricionales, su frescura original y los cambios de aroma, sabor y color son mínimos (Dede et al. 2007; Varela-Santos et al. 2012).

El presente trabajo tiene como objetivo analizar los efectos de la presión y tiempos de procesamiento en el contenido de β -caroteno, capacidad antioxidante y color en la pulpa de uchuva, inmediatamente después del tratamiento y después de 30 días de almacenamiento a 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra y aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

La fruta (uchuva) fue adquirida en un local comercial de La Serena, Chile. La fruta fue seleccionada por el color, tamaño y estado de maduración acorde al análisis visual. La fruta fue almacenada en refrigeración a 4 °C por no más de 48 horas. Antes de la presurización, la fruta fue triturada y homogeneizada en una licuadora eléctrica Philips (HR1720, Amsterdam) a la máxima potencia por 2 minutos. La pulpa fue empacada en bolsas flexibles de polietileno y almacenada a temperaturas de refrigeración hasta su procesamiento por APH. Las muestras envasadas se colocaron en unidad de procesamiento de 2 L (Avure Technologies Incorporated, Kent WA, USA) a temperatura ambiente y se presurizaron a 300, 400 y 500 MPa durante 1, 3 y 5 min para cada tratamiento y se compararon con una muestra sin tratar (control). Se empleó agua como medio de transmisión de la presión, a una velocidad de 17 MPa/s; y el tiempo de descompresión fue menor a 5 s. Luego de realizar la presurización las muestras se analizaron inmediatamente (día 0) y otras muestras se almacenaron a 4°C (día 30).

Determinación del color

El color de las muestras se midió usando un Hunter Lab (HunterLab, Miniscan XE Plus 45/0-L. (Hunter Associates Laboratory Inc., Virginia E.U.A.) equipado con una abertura de diámetro de 2.5 cm. El color se expresa en unidades Hunter Lab, L* (luminosidad/ oscuridad), a* (rojo/verde) y b* (amarillo/ azul).

Determinación del contenido de β -caroteno

La extracción se llevó a cabo de acuerdo al método de Koca et al. (2007) con algunas modificaciones. Las condiciones cromatográficas utilizadas se basa en el trabajo publicado

por Laur y col. 2011. La cuantificación de los carotenoides se realizó usando un sistema HPLC Agilent series 1200 (Santa Clara, CA), que incluye una bomba modelo G1311A cuaternaria, un inyector automático modelo G1329B, una columna con horno, modelo G1316A, y un modelo G1315D de detector de arreglo de (DAD). La columna utilizada fue una Kromasil 100-5C18, 250 x 4,6 mm, conectado con una guarda columna de Kromasil. Los datos fueron procesados usando el software Agilent Chem Station. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min. Las fases móviles fueron (A) acetonitrilo: H₂O: trietilamina (900:99:1, v / v / v) ajustada con ácido fosfórico 1 M a pH 8,5, y (B) acetato de etilo. La elución en gradiente fue: 0-5 min, 100-75 % de A; 5-10 min, 75-30 % A; 10-14 min, 30-0 % de A; 14-15 min, 0-100 % de A; 15-20 min, 100 % A. La absorbancia se leyó a 450 nm, el β -caroteno se identificó basándose en el tiempo de retención y las áreas de peak en comparación con el estándar. Los resultados se expresaron como mg β -caroteno/100 g de muestra.

Capacidad Antioxidante según método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La extracción de los componentes antioxidantes fue realizada según el método descrito por Ou et al., 2002 con algunas modificaciones. El ensayo ORAC se llevó a cabo midiendo la actividad captadora del radical peróxido en las muestras de uchuva utilizando un análogo de la vitamina E, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como antioxidante estándar acorde al método previamente reportado por Zhang et al., 2010. Se utiliza una solución madre de fluoresceína 100 mM diluido en buffer fosfato (75 mM pH 7,4) preparado al momento de la lectura y mantenida a 4°C en la oscuridad. Se hace la lectura de la fluorescencia añadiendo en cada pocillo una mezcla de 200 μ L de fluoresceína 100 nM y 40 μ L de la muestra madre diluida (para el blanco es utilizado buffer fosfato pH 7,4). Se incuba durante 20 min a 37°C en agitación. Posteriormente se adicionó 35 μ L del (AAPH) 2,20-azobis-2-amidinopropano diluido en buffer fosfato y se midió la fluorescencia en un lector de placa Victor Multilabel (Perkin-Elmer, Hamburgo, Germany) la temperatura se mantiene a 37 °C hasta que la lectura sea reducida a menos del 5 % de la lectura inicial. Las muestras y el blanco fueron realizados en triplicado. El valor ORAC se expresa como μ mol ET/100 g muestra.

Análisis estadístico

El efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre cada parámetro medido fue estimado usando el programa estadístico Statgraphics1 Plus 5 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA). Los resultados fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial. Las diferencias entre las medias fueron analizadas utilizando el test de mínima

diferencia significativa (LSD) con un intervalo de confianza de 95% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto en el Color

En la Figura 1 se muestran los valores promedios de los parámetros cromáticos de las muestras control y tratadas con APH en el día 0 y almacenadas a 30 días. Los valores de las coordenadas cromáticas de la muestra control del día 0 (L^* , a^* y b^*) fueron $54,44 \pm 0,29$, $23,67 \pm 0,30$ y $59,85 \pm 0,30$, respectivamente. Se presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las muestras tratadas a APH en todos los parámetros de color con respecto a la muestra control. El tratamiento de APH provoca un descenso en los valores de a^* , b^* y L^* (figura 1). Esta disminución se observa con mayor intensidad en el tratamiento de 300 MPa/ 1 min. A nivel macroscópico se observa que el tratamiento con APH provoca un oscurecimiento y pérdida de color en las muestras. Varela-Santos et al. (2012) trabajando con jugo de granada a presiones de 350-550 MPa reporta una disminución de los valores de a^* y L^* y lo atribuyen a la degradación o polimerización de las antocianinas. Estos resultados demuestran claramente que la estabilidad del color de la pulpa de uchuva depende en las condiciones de procesamiento. Durante el almacenamiento de 30 días se observa una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en los valores de a^* , b^* y L^* (figura 1) en comparación con el día 0. Daoudi y col., (2002) obtuvieron resultados similares para el jugo de uva blanca tratada por APH y almacenada a 4 °C durante 60 días. Según Oey y col., (2008) esto ocurre debido a que los compuestos colorimétricos de las frutas procesadas con APH pueden cambiar durante el almacenamiento debido a la inactivación incompleta de las enzimas y microorganismos que pueden dar lugar a reacciones químicas no deseadas (tanto enzimáticas y como no enzimáticas) en la matriz del alimento.

Efecto en el contenido de β -Caroteno

La Figura 2 muestra los valores medios del contenido de β -caroteno en las pulpas control, sometidas a APH y almacenadas a 4 °C durante 30 días. La muestra control en el día 0 presento un contenido de $217,74 \pm 12,12$ mg β - caroteno/100 g muestra. Se presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las muestras con APH y la control. El tratamiento de 300 MPa/ 3 min y 500 MPa/ 5 min en el día 0 obtuvo el mayor contenido de β -caroteno en comparación con el resto de las muestras, incluso de la muestra control. Este resultado indica que en esta gama particular de procesamiento condicionado por el tratamiento de alta

presión, modifica el mecanismo de la degradación de los pigmentos, ya que afecta a las moléculas implicadas en la cinética de reacción, tales como enzimas (Ferrari y col., 2010). De acuerdo a Oey y col., (2008) los carotenoides tienen un comportamiento estable al ser sometidos a tratamientos de APH. Plaza y col., (2011) trabajando con zumo de naranja tratado a 400 MPa/1 min reportaron un incremento del contenido de carotenoides donde concluyen que la aplicación de APH podría mejorar la capacidad de extracción de carotenoides debido a una mejor liberación de estos compuestos bioactivos partir de la matriz del alimento. En la Figura 2 se observan los resultados obtenidos después de 30 días de almacenamiento. La muestra control presentó un aumento con respecto a la pulpa control del día 0, mientras que los las muestras tratadas con APH presentaron una disminución significativa ($p \leq 0,05$) durante el almacenamiento presentando pérdidas de inferior al 50% en relación a la pulpa control, con excepción del tratamiento de 300 MPa/ 3 min. Plaza y col., (2011) reportan un aumentó en la capacidad de extracción del β -caroteno a través de APH en jugo de naranja, el cual se mantuvo bastante estable durante el almacenamiento.

Efecto en la Capacidad Antioxidante

La Figura 3 presenta los valores de la capacidad antioxidante en las pulpas control, presurizadas y almacenadas a 4 °C durante 30 días medida a través del método ORAC. El valor de la muestra control en el día 0 fue $804,12 \pm 1,73 \mu\text{mol ET/ 100 g}$ muestra. La aplicación de APH tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) en la actividad antioxidante, donde se observa que las presiones sobre los 400 MPa a los tres tiempos de trabajo aumentaron su contenido con respecto a la muestra control, con excepción de 400 MPa/ 5 min que presentó una disminución significativa. Es posible que los cambios en la matriz del tejido inducidos por la APH, por ejemplo, ruptura de las paredes celulares del fruto, dio como resultado la liberación de compuestos con acciones antioxidantes en el medio ambiente extracelular (McInerney et al., 2007) . Varios autores también han informado de que el procesamiento de alta presión aumentan o no afecta a la actividad antioxidante de los alimentos (Patras et al., 2009; Shiferaw et al., 2013; Varela-Santos et al., 2012).

Los resultados observados después del almacenamiento de 30 días, presentaron una disminución considerable en la capacidad antioxidante en comparación con los tratamientos evaluados en el día 0, para las presiones sobre los 400 MPa, en cambio los tratamientos de 300 MPa presentaron un aumento significativo ($p \leq 0,05$). Shiferaw et al. (2013) indican que un aumento de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento de las muestras de fresa pudo haber ocurrido porque los productos de degradación de los compuestos fenólicos

que se pudieran generar durante el procesamiento y almacenamiento aún pueden poseer una gran capacidad antioxidante, ya que dependiendo de su estructura química, estos productos de degradación o metabolitos pueden tener diferentes actividades en diferentes ensayos de capacidad antioxidante.

CONCLUSIÓN

La aplicación de APH resulta ser interesante en la pulpa de uchuva, que se caracteriza por su alto contenido de componentes bioactivos. La pulpa sometida a APH cambió de manera significativa el color, contenido de β -caroteno y actividad antioxidante en comparación con la pulpa sin tratar. El color presentó cambios significativos al disminuir los tres parámetros cromáticos estudiados una vez aplicado todos los tratamientos de APH. El máximo contenido de β -caroteno se observó a 300 MPa/ 1 min y 500 MPa/5 min. En cuanto a la capacidad antioxidante, presiones sobre los 400 MPa a los tres tiempos de trabajo aumentaron su contenido con respecto a la muestra control. Después de 30 días de almacenamiento a 4 °C todas las muestras tratadas disminuyeron sus parámetros. Estos resultados muestran que el tratamiento de APH mejoró la disponibilidad del Betacaroteno y la capacidad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto FONDECYT 1120102. J.López reconoce el apoyo a la beca Nacional de Doctorado de la comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed J., Ramaswamy H., Hiremath N. (2005). The effect of high pressure treatment on rheological characteristics and colour of mango pulp. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 885–895.
- Daoudi L, Quevedo JM, Trujillo AJ, Capdevila F, Bartra E, Minguez S. (2002). Effects of high-pressure treatment on the sensory quality of white grape juice. *High Pressure Research*, 22: 705-709.
- Dede S, Alpas H, Bayindirli A. (2007). High hydrostatic pressure treatment and storage of carrots and juices: Antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 773–872.
- Duque AL, Giraldo GA, Quintero VD. (2011). Caracterización de la fruta, pulpa y concentrado de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *TEMAS AGRARIOS*, 16 (1): 75-83.
- Eshtiagi MN, Knorr D. (1993). Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 58: 1371–1374.

- Fernandez Garcia A., Butz P., Tauscher B. (2001). Effects of High-pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Food Science*, 66 (7), 1033-1038.
- Ferrari G, Maresca P, Ciccarone R. (2010). The aplicación of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100: 245-253.
- Koca N., Burdurlu, H., Karadeniz F. (2007). Kinetics of colour changes in dehydrated carrots. *Journal of Food Engineering*, 78, 449-455.
- McInerney JK., Seccafien CA., Stewart CM. & Bird AR. (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 543-548.
- Laur L., Tian L. (2011). Provitamin A and vitamin C contents in selected Californiagrown cantaloupe and honeydew melons and imported melons. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 194–201.
- Oey I., Lille M., Loey A., Hendrickx, M. (2008). Effect of highpressure processing on colour, texture and flavour of fruitand vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 320-328
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer K.,(2002).Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3122-3128.
- Patras A., Brunton NP., Da Pieve S. & Butler F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and color of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 308-313.
- Plaza L., Sánchez C., Ancos B., Elez-Martínez P., Martín M., Canoa P. (2011). Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of Orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 834-839.
- Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7): 1733-1740.
- Ramadan M., Mörsel, J. (2004). Goldenberry: A novel fruit source of fat soluble bioactives, *INFORM* 15, 130–131.
- Ramadan MF. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*, 44(7): 1830-1836.
- Restrepo AM., Cortés M., Márquez CJ. (2009). Uchuvas (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesadas fortificadas con vitamina E. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16 (1), 19-30.
- Shiferaw Terefe N., Kleintschek T., Gamage T., Fanning KF., Netzel G., Versteeg C. & Netzel M. (2013). Comparative effect of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 57-65.

Varela-Santos E, Ochoa-Martinez A, Tabilo-Munizaga G, Reyes JE, Pérez-Won M, Briones-Labarca V, Morales-Castro J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13:13-22.

Zhang L., Li J., Hogan S., Chung H., Welbaum GE., Zhou K. (2010). Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 119, 592-599.

FIGURAS

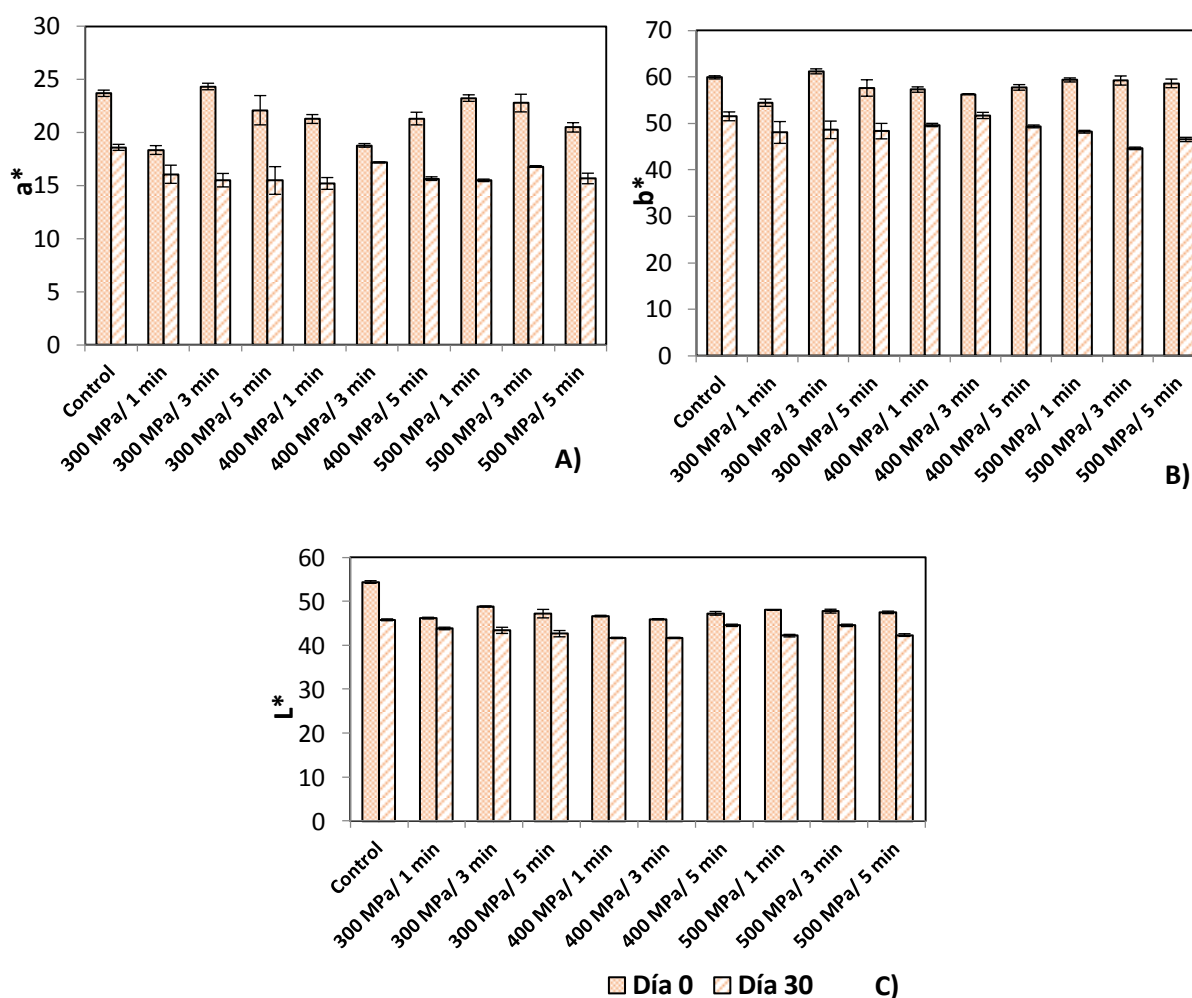


Figura 1. Cambios en los parámetros de color (a*(A), b*(B) y L*(C)) procesados por APH en pulpa de uchuva durante 30 días de almacenamiento a 4 ° C. Promedio de tres determinaciones con su desviación estándar.

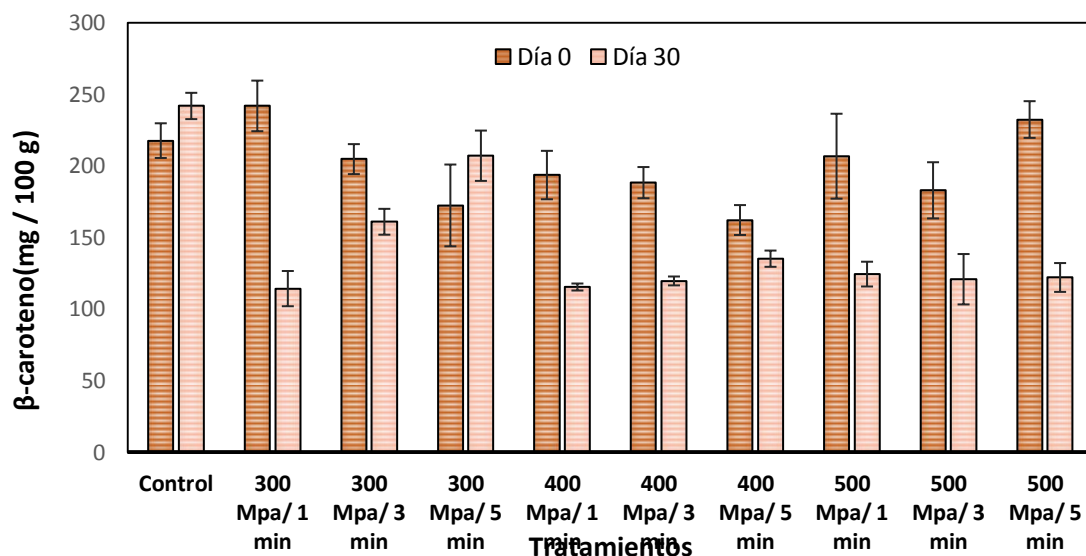


Figura 1. Efecto del tratamiento APH en la evolución del contenido de β -caroteno (mg/100 g) en la pulpa de uchuva durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C por 30 días. Promedio de tres determinaciones con su desviación estándar.

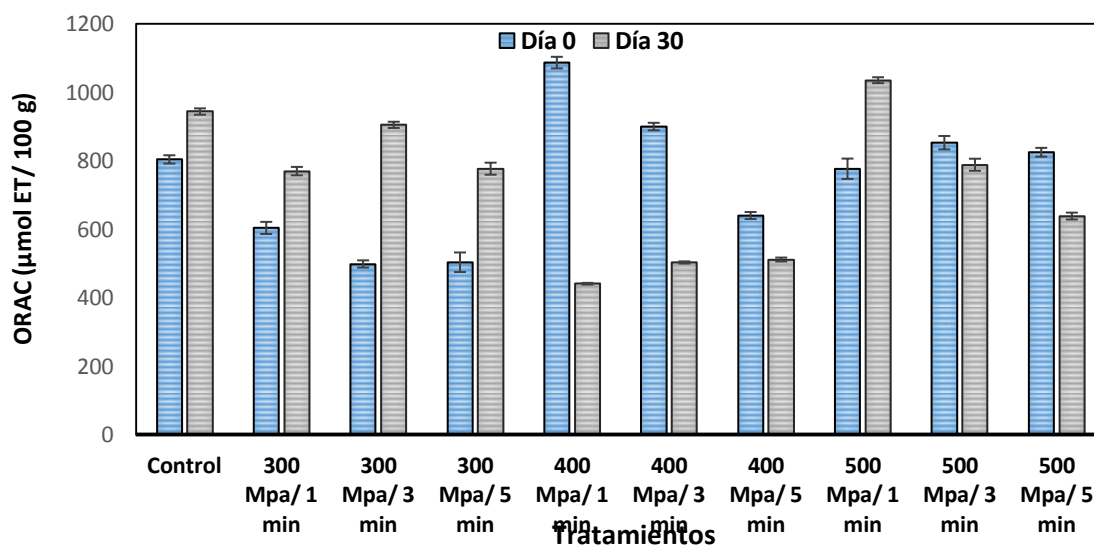


Figura 3. Efecto del tratamiento APH en la evolución de la capacidad antioxidante de la pulpa de uchuva durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C por 30 días. Promedio de tres determinaciones con su desviación estándar.

ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE MIGRACION DE TIMOL DESDE NANOCOMPOSITOS DE PELBD UTILIZADOS COMO ENVASES PARA ALIMENTOS

A. Torres¹, M. Ríos¹, M.J. Galotto¹, A. Guarda¹

¹: Centro para el Desarrollo de Nanociencia y Nanotecnología (CEDENNA), Laboratorio de Envases (LABEN-Chile), Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, USACH - Obispo Umaña 050, Santiago, Chile-Teléfono: (56)(2)7184520
alejandra.torresm@usach.cl

INTRODUCCIÓN

Al año se producen alrededor de 250 millones de toneladas de plásticos en todo el mundo, donde más de un 40% de esta producción está destinada a envases. Las poliolefinas, dentro de los materiales plásticos, son las más utilizadas para la fabricación de envases. Sin embargo, estos no son inertes con respecto al alimento que contienen, su uso puede provocar problemas de interacción con el alimento, relacionados con procesos de transferencia de masa de compuestos desde y a través del material polimérico. De los procesos de interacción, la Migración es el que determina la calidad sensorial y el grado de seguridad del producto envasado (Galotto y col., 2011a). En los últimos años, la tendencia apunta a utilizar este tipo de interacciones de forma positiva, mediante la aplicación de la tecnología de Envases Activos. Uno de los más utilizados corresponde a aquellos que incorporan compuestos con capacidad antimicrobiana y/o antioxidante, donde destacan, por su origen natural, los presentes en extractos de aceites esenciales de frutas, vegetales y especias. Además, en los últimos años, la nanotecnología y más recientemente, los nanocompositos, se han utilizado con el objetivo de mejorar propiedades barrera y mecánicas de los materiales plásticos (Rodríguez y col., 2012). Una de las aplicaciones más prometedoras es el uso de este tipo de estructuras con el objetivo de generar un camino tortuoso en las matrices poliméricas que dificulte el paso de ciertos compuestos desde los envases hacia los alimentos.

El objetivo de este trabajo es el análisis teórico-experimental de la migración de timol desde nanocompositos de PELBD mediante análisis experimentales de migración y modelación matemática. Como resultado, se constató la intercalación de la organoarcilla en la matriz polimérica para los diferentes nanocompositos. Además, se observó un efecto de la organoarcilla incorporada sobre la velocidad de difusión del compuesto activo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Polietileno lineal de baja densidad (densidad 0,919 g/cm³) fue suministrado por Braskem. Cloisite[®]20A fue obtenida de Southern Clay Products Inc. (Texas, USA). Timol (< 99,5% pureza) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Santiago, Chile),

Preparación de los nanocompositos

Los films plásticos fueron desarrollados en una extrusora piloto Scientific LabTech mediante extrusión cast en el Laboratorio de Envases de la Universidad de Santiago de Chile. Los nanocompositos consistieron de 5% en peso de Cloisite 20A y diferente contenido del compuesto activo timol (0, 2 y 4% en peso).

Caracterización de los nanocompositos

Los nanocompositos fueron caracterizados en cuanto a propiedades térmicas y estructurales. Las propiedades térmicas fueron medidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo Mettler Toledo modelo DSC 822e (Greifensee, Suiza). El análisis se realizó con una velocidad de calentamiento de 10°C/min desde 25°C hasta 250°C.

Con el objetivo de comprobar la presencia del compuesto activo timol y la organoarcilla en los films extruidos se realizó el análisis de FTIR, marca Bruker modelo ALPHA (Alemania) con accesorio ATR (reflectancia total atenuada) con cristal de diamante. Se programó para trabajar con 24 escaners y en un rango de longitud de onda entre 4000 y 400 cm⁻¹.

Por otro lado, se utilizó Difracción de Rayos X para determinar posibles interacciones entre el compuesto activo, la organoarcilla y la matriz polimérica. Este análisis se realizó en el Laboratorio de Cristalografía del Departamento de Física de la Universidad de Chile. Para el análisis se utilizó un Difractómetro de Rayos X marca Siemens D5000 (30 mA, 40 kV) para un rango de 2θ entre 2 y 12° a una velocidad de 0,02°/s.

Simultáneamente se realizó un estudio de la cinética de liberación del compuesto activo timol en los films de polietileno lineal de baja densidad hacia distintos simulantes de alimentos. Los análisis de migración específica de timol se realizaron según norma Europea (EN 2005) a una temperatura de 40°C y utilizando etanol 95% como simulante de alimento. Posteriormente mediante un modelo matemático y utilizando resultados como el coeficiente de reparto y otras propiedades del polímero y del simulante se ajustaron los coeficientes de difusión del timol en la matriz polimérica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego del proceso de extrusión, se determinó la concentración efectiva de timol en los films plásticos. Los porcentajes de timol retenidos en los films variaron entre un 49% y 79% luego del proceso de extrusión.

Se determinaron las propiedades térmicas de los films las cuales son reportadas en la tabla 1. A partir de los resultados presentados en la tabla se puede decir que al aumentar el porcentaje de timol dentro de la matriz polimérica, disminuye el porcentaje de cristalinidad, el cual alcanza una variación de hasta 24% si se compara el film sin aditivos con el film con 4% de timol, lo cual podría deberse a un aumento de los espacios amorfos en la matriz. Este aumento de los espacios amorfos podría favorecer la transferencia de masa de timol en los simulantes de alimentos.

Con el objetivo de establecer posibles interacciones entre el compuesto activo, la organoarcilla y la matriz polimérica se realizaron análisis de DRX. Los difractogramas obtenidos se muestran en la figura 1, donde se puede observar que el peak máximo de la organoarcilla Cloisite 20A fue de $3,34^\circ$, lo cual es concordante con lo descrito en literatura. Se puede observar además que se obtuvo la intercalación de la organoarcilla en la matriz polimérica para todos los nanocompositos desarrollados debido al aumento de la distancia interlaminar de los nanocompositos en comparación con la organoarcilla pura.

Por otro lado, se realizaron análisis de FTIR para confirmar la presencia del timol en los films extruidos. En la figura 2 se pueden observar los espectrogramas obtenidos, donde al aumentar el porcentaje de timol en los films se observa un aumento de la señal relacionada con la vibración del anillo aromático del timol, lo que confirma la incorporación del compuesto activo en los nanocompositos desarrollados (Sanchez-Garcia y col., 2010).

Se realizó además un estudio cinético de la liberación del compuesto activo timol en simulantes de alimentos con el objetivo de determinar el efecto de la organoarcilla sobre la migración de timol. En la figura 3 se muestran las curvas de migración obtenidas mediante HPLC y el ajuste de los datos experimentales con un modelo matemático desarrollado anteriormente (Galotto y col. 2011a, b; Torres y col., 2012). En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de coeficientes de partición y de difusión del timol para los diferentes films con y sin organoarcilla incorporada. Se puede observar a partir de los resultados presentados tanto en la figura 3 como en la tabla 2 que la presencia de organoarcilla en la matriz polimérica disminuye aproximadamente 4 veces la velocidad de difusión del compuesto activo en las dos concentraciones estudiadas.

CONCLUSIONES

Mediante el proceso de extrusión se obtuvieron nanocompositos con diferentes concentraciones de timol. La intercalación de la organoarcilla en la matriz polimérica fue verificada mediante análisis DRX. La incorporación de la organoarcilla afecta la velocidad de difusión del compuesto activo a través de la matriz polimérica.

BIBLIOGRAFÍA

EN 13130-1. (2005). Materials and articles in contact with foodstuffs—plastics substances subject to limitation. Part 1: guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants.

Galotto, M. J., Torres, A., Guarda, A., Moraga, N., Romero, J. (2011a). Experimental and theoretical study of LDPE versus different concentrations of Irganox 1076 and different thickness. *Food Research International*, 44(2), 566-574.

Galotto, M. J., Torres, A., Guarda, A., Moraga, N., Romero, J. (2011b). Experimental and theoretical study of LDPE: Evaluation of different food simulants and temperatures. *Food Research International*, 44(9), 3072-3078.

Rodríguez F., Coloma A., Galotto M.J., Guarda A., Bruna J. (2012). *Polymer Degradation and Stability* 97, Issue 10, Pages 1996–200.

Sanchez-Garcia, M. D., Lopez-Rubio, A., Lagaron, J. M. (2010). Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 21(11), 528-536.

Torres, A., Guarda, A., Moraga, N., Romero, J., Galotto, M. J. (2012). Experimental and theoretical study of thermodynamics and transport properties of multilayer polymeric food packaging. *European Food Research and Technology*, 234(4), 713-722.

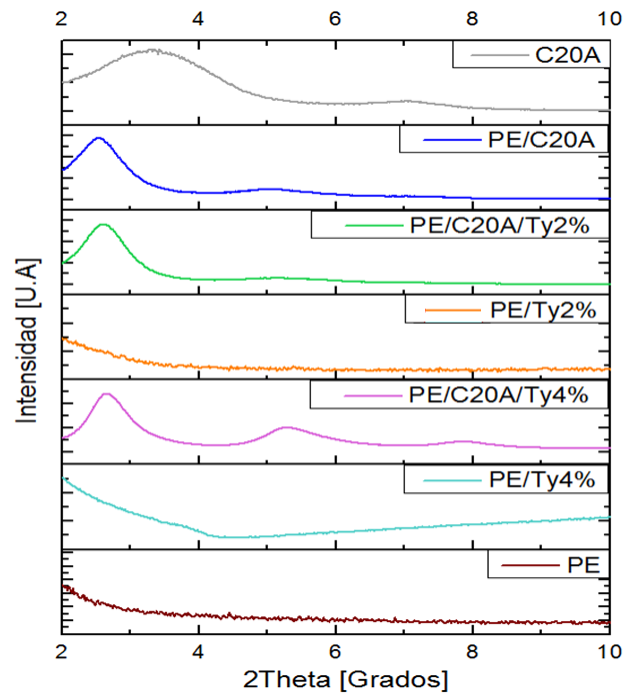


Figura 1. Difractogramas obtenidos de los nanocompositos con diferente concentración de timol.

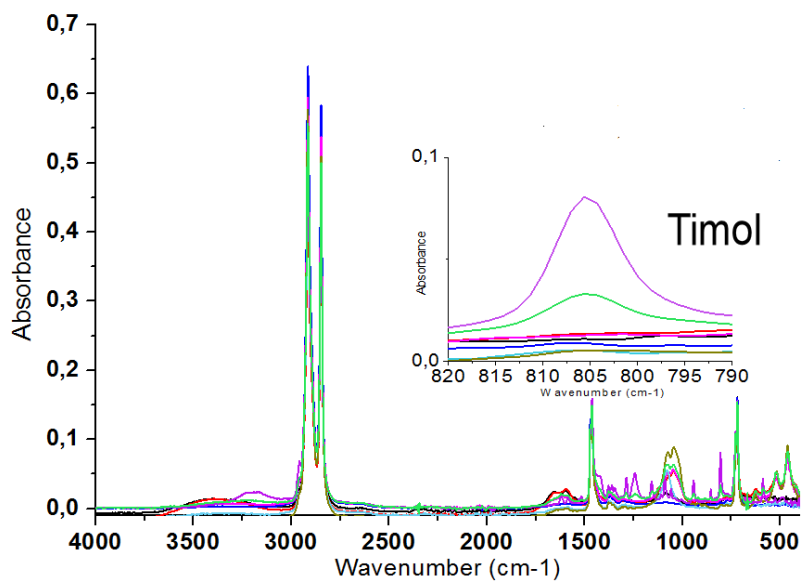


Figura 2. Espectrogramas obtenidos para los diferentes films extruidos.

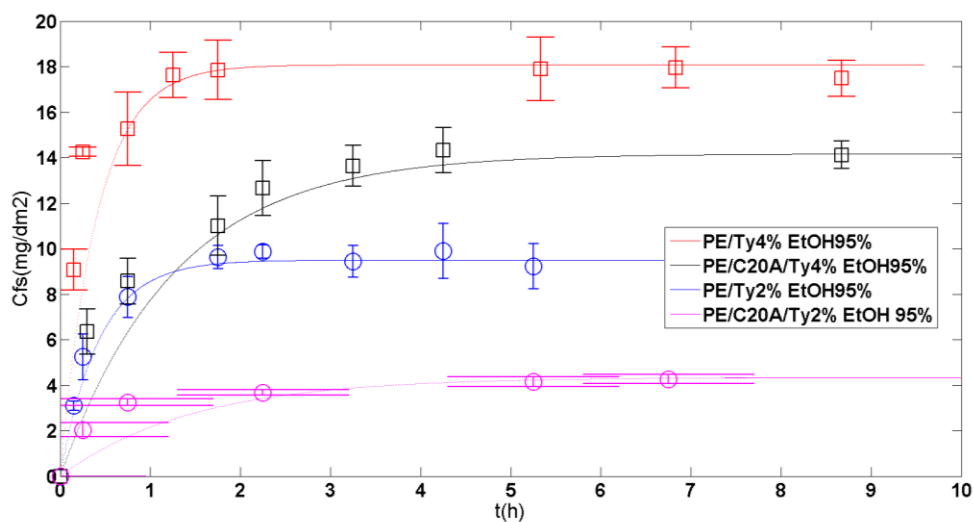


Figura 3. Cinética de liberación del compuesto activo timol en etanol 95%.

Tabla 1. Propiedades térmicas de los films extruidos

Film plástico	T _m (°C)	ΔH _f (J/g)	Cristalinidad (%)
PELBD	124,78	108	36,8
PELBD/C20A	124,98	108,7	37
PELBD/Timol2%	124,94	98,24	33,5
PELBD/C20A/Timol2%	124,46	101,1	34,4
PELBD/Timol4%	127,33	81,7	27,8
PELBD/C20A/Timol4%	124,81	99,8	34

Tabla 2. Coeficientes de reparto y difusión del timol para los diferentes films con y sin organoarcilla.

Film plástico	Simulante de alimento	K _{P/SA}	D _p (m ² /s)	RMSE* (%)
PELBD/Timol2%	Etanol 95%	75	2,5 · 10 ⁻¹²	0,02
PELBD/C20A/Timol2%		220	5,5 · 10 ⁻¹³	0,011
PELBD/Timol4%		40	2,5 · 10 ⁻¹²	0,027
PELBD/C20A/Timol4%		130	6,0 · 10 ⁻¹³	0,017

*RMSE: Error cuadrático medio



Universidad Nacional
de Entre Ríos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

EDITORIAL